



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(QUÍMICA ACUÁTICA)

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS SOBRE LA TOXICIDAD DEL ARSÉNICO EN POSTLARVAS DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* A DIFERENTES CONDICIONES DE SALINIDAD (17, 25 y 33ups) Y TEMPERATURA (20, 25 y 30°C)”.

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Q. A. JESÚS ALBERTO VALENTINO ÁLVAREZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. GABRIEL NÚÑEZ NOGUEIRA, ICML, ESTACIÓN EL CARMEN, CAMPECHE.

COMITÉ TUTOR:

DRA. RUTH CECILIA VANEGAS PÉREZ, FACULTAD DE CIENCIAS.
DRA. LUZ MARÍA GARCÍA DE LA PARRA, CIAD, UNIDAD MAZATLÁN, SINALOA.
DR. JORGE RICARDO RUELAS INZUNZA, ICML, UNIDAD MAZATLÁN, SINALOA.
DR. FERNANDO ANTONIO GONZÁLEZ FARÍAS, ICML.

MÉXICO, D. F., AGOSTO DEL 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de una Tesis es un proceso arduo, que requiere mucho tiempo, dedicación y esfuerzo, no sólo de quien la realiza sino de la gente que le rodea. Es por esto y mucho más que quiero hacer un especial agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado durante estos años y gracias a las cuales este trabajo ha sido posible. Mi agradecimiento a los directores de esta Tesis por la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, por su dedicación y su apoyo:

A mi director de tesis Dr. Gabriel Núñez Nogueira, por darme la oportunidad de realizar el proyecto de la maestría.

A mi Comité Tutorial por sus valiosos comentarios para enriquecer el proyecto;

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez, por su gran apoyo, aportes al proyecto y asesoría durante las pruebas toxicológicas, Mil Gracias.

Dra. Luz María García de la Parra, por sus sugerencias y puntos de vista, Gracias.

Dr. Jorge Ricardo Ruelas Inzunza, por sus comentarios y sugerencias al proyecto, Gracias.

Dr. Fernando Antonio González Farías, por sus sugerencias, opiniones y por facilitar amablemente el espacio adecuado para la realización de las pruebas experimentales. Mil Gracias.

Y también agradezco;

Al M. C. Sergio Rendón, por su apoyo en la gestión del envío de los organismos de Mazatlán, Sinaloa al D. F.

A la unidad de producción acuícola FITMAR PROVEEDORA DE LARVAS, S. A. de C.V., con sede en Mazatlán, Sinaloa.

Al M. C. Héctor Alexander Valdés y a la I. Q. Patricia Ortega por la realización de los análisis químicos de As en el Lab. de Análisis Fisicoquímico.

A la Dra. Guadalupe de la Lanza, por sus enseñanzas en el curso de sistemas litorales.

A la Dra. Gabriela Gaxiola por aportar alimento para los camarones en las primeras etapas del proyecto.

A la M.C. Gema Y. Armendáriz Ortega, por el breve, pero interesante curso de crustáceos y la enseñanza en la disección de un camarón peneido.

A la Dra. Sandra A. Santillán Hernández, por sus valiosas observaciones a mi proyecto, durante el curso de Toxicología Ambiental, MIL GRACIAS.

¡A la Excelente UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO!

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,

A todos los doctores y maestros del ICML que aportaron su granote de arena en mi formación como alumno de posgrado

A Diana, Lupita, Chantal, Gaby y Dra. Gloria Vilaclara por su enorme apoyo en la tramitología en la Coordinación de Posgrado ICMYL.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por el apoyo económico, mediante una beca con No.41530.

Y a la DGAPA por el apoyo financiero para cubrir parte del estudio realizado mediante el proyecto PAPIIT IN227207.

DEDICATORIAS

A la Tierra, sus Océanos y seres vivientes

A Dios, por darme la fortaleza y vida día con día

A mis padres por su enorme apoyo y sabios consejos:

Josefina Álvarez Urieta y Jesús Valentino Figueroa.

A mis Abuelitos (q. e. p. d.):

Domitila Urieta Ríos y Gonzalo Hidalgo Lara.

A mi tío Fausto Hidalgo Lara.

A mis primos del alma: Julieta y Marco Antonio Álvarez Amparán.

A mis tíos: Julieta Amparán y Arcadio Álvarez, Lety, Esther, Raquel, Beto, Tanis, Fer y Marcelo Valentino, Armando Herrera.

A GOYITO, por ser una criatura perruna muy linda, gracias por brindarme muchas alegrías y permanecer en mi corazón (†).

A los compañeros del bioterio por hacer mucho más agradable los días en el ICMYL:

M.C. Alfredo Ordiano, Q. F. B. Hirai Mizre Gómez Martínez, gracias por su apoyo durante los bioensayos.

M.C. Laura Fernández, por su asesoría en el mantenimiento.

M. C. María Cauich García y a los ausentes Paola Castillo, Juan Guillermo Flores S. y Nancy Cruz M.

A l@s compaÑeros y amig@s del Posgrado ICMYL que he conocido a lo largo de mi estancia en las clases y en los laboratorios, mil gracias por su amistad, es un gran placer conocerlos:

M. C. L. Magaly Roldán Luna, gracias Magy, por echarme porras en todo momento. M. C. Kristel L. Gopar Canales y Familia, Brenda Gisela Robledo O., M. C. Yazmín Segura García, Tania Pascoe, Sofía Escoto H., R. Pamela Martínez Loustalot, Carlos Alberto L., Alejandra Irasema Campos S., Mariana Hidalgo, América Lavariega, M.C. Topacio Meza, Dulce Parra T., Nataly Bayona, Carolina Bustamante G., Sayuri y Nichte-ha Muñoz, Mauricio Valdés, Cesar Tirado, Clara Edith Soriano, Liliana García, Inti Iván Sánchez, Iván Chargoy, Sebastian Donat, Ariadna Pico Rojas, Roxana Mohedano, Carlos Polo Silva, Alicia León, Juan Pablo R., Etna Sánchez Izquierdo, Rosaura Cuevas V., Jorge L. Martínez Mérida, Magaly Galván P., Iris Zuen, Kary Villegas, Barbará Nicol Moreno Caldiño, Ariel Flores.

También para mis amig@s:

MVZ. Bertha Jazmín Nájera, MVZ. Jaime Becerra García, MVZ. Maru Eugenia Gómez D., MVZ. Nayeli Garduño H., Dra. Leonor Sangines y M. C. Teresita Amezcua, IQ. Martha Rivera Rodríguez, QFB. Gisela Solano M., QA. Janeth García Valle, IQ. Viny y QA. Miriam, IQ. Juan y Juanita, IQ. Israel Islas y Ana Pérez, IQM. Abelardo y Gisela, QFB. Karina Rea y Ricardo, pQA. Cuauhtémoc Gutiérrez G. "Chipotín" y pQFB. Lola, QA. Cristal A. Meza, QA. Alicia Mora L., QFB. Magda Ramírez C., QA. Guadalupe Monsiváis V., QA. Elsa Luna Shekina, QA. Jocabed Alfaro, QA. Angélica Fuentes Ramírez.

"Una vez más quedo en deuda con las criaturas de la Tierra, que dan su vida a cada momento para beneficio de nosotros, una vez más gracias a todos los camarones que fueron utilizados y dieron su vida para contribuir a un mejor entendimiento de la naturaleza y del ambiente que nos rodea, ojala este trabajo ayude a tener más conciencia del efecto negativo de la contaminación sobre los mares y océanos, que son fuente de vida". (JAVA.)

"La vida es un viaje por mar

Con días de calma y días de tempestad

Dueño de mi destino

Y capitán de mi alma", (FORTALEZA, banda de rock veracruzana).

"Cuida tus pensamientos porque se volverán palabras, cuida tus palabras porque se transformarán en actos. Cuida tus actos porque se convertirán en costumbres. Cuida tus costumbres porque forjarán tu carácter. Cuida tu carácter porque creará tu destino. Y...tu destino será tu vida." (Mahatma Gandhi).

"Si supiera que el mundo se ha de acabar mañana, yo hoy aún plantaría un árbol" (Martin Luther King, Jr.)

Si la Tierra tuviera sólo unos pocos centímetros de diámetro y flotara unos pocos centímetros sobre el suelo en cualquier lugar, acudiría gente de todas partes a admirarla. Darían vueltas a su alrededor, maravillándose de sus grandes estanques de agua, de los pequeños y de las corrientes que fluyen entre ellos. La gente se maravillaría de sus prominencias y oquedades, de la finísima capa de gas que la rodea y del agua suspendida en el gas. La gente se maravillaría de todos los seres acuáticos. La gente la declararía sagrada por ser única y la protegería para que nadie le hiciera daño. La esfera sería la mayor maravilla conocida y la gente acudiría a rezarle, a ser curados por ella, a adquirir conocimiento, a admirar su belleza, preguntándose cómo sería posible. La gente la amaría y la defendería con su vida, porque sabrían de algún modo que su vida no sería nada sin ella.

Si la Tierra sólo tuviera unos pocos centímetros de diámetro.

Joe Miller

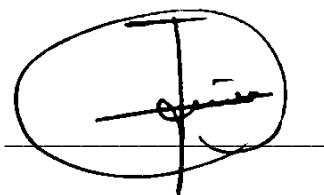
DECLARACIÓN

Este trabajo de maestría, se desarrolló en el Laboratorio de Química Ambiental y en el Bioterio de Peces y Crustáceos, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, CU, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Gabriel Núñez Nogueira.

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación y la parte experimental realizada en este trabajo de tesis fueron efectuados por el Q. A. Jesús Alberto Valentino Álvarez, como estudiante del Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la maestría en ciencias (química acuática) durante agosto de 2009 a junio de 2012.

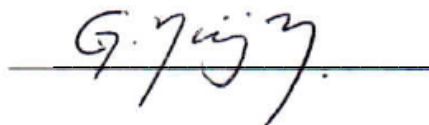
Sustentante:

Jesús Alberto Valentino Álvarez

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized letter 'J' that loops around and crosses itself, with a horizontal line underneath.

Director de tesis:

Dr. Gabriel Núñez Nogueira

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'G. Nogueira', written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Índice

Agradecimientos	2
Dedicatorias.....	3
Declaración	6
Resumen.....	12
I. Antecedentes.....	13
Arsénico (As) en ambientes acuáticos, elemento traza: presencia, orígenes y concentraciones.....	13
Contaminación por As en ambientes costeros en México.....	15
Características químicas del arsénico en ambientes acuáticos	17
Efectos del arsénico a nivel bioquímico en especies acuáticas.....	20
Diversidad y características ambientales de los sistemas estuarino-lagunares de México.....	24
Importancia del carbono orgánico disuelto y de las sustancias húmicas en los sistemas estuarino-lagunares de México: Fuentes, concentraciones y estructuras químicas.....	26
Las SH y AH: funciones ambientales e interacciones con los elementos traza y metales pesados.....	32
Importancia ecológica y económica de los crustáceos peneidos en los sistemas estuarino-lagunares de México.....	35
Ciclo de vida del camarón blanco peneido <i>Litopenaeus vannamei</i>	36
Características fisiológicas y condiciones ambientales óptimas de temperatura y salinidad para el crecimiento de <i>Litopenaeus vannamei</i>	37
II. Justificación académica	39
III. Hipótesis	40
IV. Objetivo general y específicos	40
V. Materiales y métodos	41
V.1. Obtención de los juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i>	41
V.2. Aclimatación, mantenimiento y alimentación	41
V.3. Preparación de Ácidos Húmicos.....	43
V.4. Pruebas de toxicidad aguda del Arsénico.....	44
Bioensayos de toxicidad aguda de As Vs. AH en juveniles de <i>L. vannamei</i>	45

Dosificación de las soluciones de As y AH.....	46
VI. Resultados y discusión	48
Parámetros fisicoquímicos y forma arsenical predominante	48
Cambios de comportamiento en los organismos.....	51
Peso promedio de los juveniles.....	52
Concentraciones de AH referidos como COD en muestras de agua marina artificial e interacción fisicoquímica con el As disuelto a las diferentes condiciones experimentales.....	53
Interacción AH y As.....	56
Toxicidad del As en forma individual y en presencia de AH a diferentes escenarios de temperatura salinidad sobre <i>Litopenaeus vannamei</i>	58
Mecanismos de regulación fisiológica en los camarones <i>L. vannamei</i> frente a los diferentes escenarios de temperatura-salinidad y su asociación con la toxicidad del As y los AH	63
Comparación de la toxicidad del As en otros crustáceos.....	67
VII. Conclusiones	69
VIII. Recomendaciones	70
IX. Referencias bibliográficas	72
X. Anexos	85
i. Fotografías	85
ii. Obtención de CL ₅₀ -96h (estadísticos obtenidos con BioStat 2009)	86
iii. Mortalidades (96h) obtenidas de las postlarvas frente a As + AH	88
iv. Curva de calibración de [As] _{nominal} <i>versus</i> [As] _{real} mediante ICP-MS.....	89
v. Curva de Calibración concentración de ácidos húmicos <i>versus</i> Concentración de carbono orgánico disuelto (COD).....	89
vi. Prueba estadística para diferencia entre CL ₅₀ (Sprague y Fogels, 1977)	90
vii. Valores de pH y potencial de oxido-reducción (Eh) en milivolts (mV) a diferentes condiciones de temperatura-salinidad en medio salino	90

Índice de Figuras

Figura 1. Especies inorgánicas y orgánicas de As más comunes en ambientes acuáticos y en organismos; ácido metilarsónico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), tetrametilarsonio (TETRA),	18
Figura 2. Diagrama de especiación de As en solución acuosa pH-Eh (potencia redox).....	19
Figura 3. Porcentaje de a) arsenitos As +3 (Eh muy reductor) y b) arsenatos As +5 (Eh muy oxidante) en función de pH	19
Figura 4. Fuentes principales de sustancias húmicas	28
Figura 5. Características y propiedades fisicoquímicas de las SH.....	30
Figura 6a. Reacciones de un metal hipotético con los grupos funcionales de un ácido húmico	34
Figura 6b. Formas de enlaces de un ión metálico M^{2+} con las SH a) por quelación entre carboxilos e hidroxilos fenólicos, b) por quelación entre dos grupos carboxilos y c) por formación de complejos con grupo carboxilo	34
Figura 7. Ciclo de vida del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	37
Figura 8. Esquema general del diseño experimental del proyecto.....	47
Figura 9. Variación de la concentración de AH referido como COD ($mg L^{-1}$) en relación al tiempo (h) de exposición al As en los juveniles a diferentes combinaciones de temperatura-salinidad	55

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales fuentes de As naturales y por actividades humanas	14
Tabla 2. Concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD), sustancias húmicas (SH) y ácidos húmicos (AH) en diferentes ambientes acuáticos	28
Tabla 3. Composición elemental (% en peso) de las principales fracciones de sustancias húmicas: ácidos húmicos (AH) y ácidos fúlvicos (AF).....	30
Tabla 4. Condiciones de recepción, aclimatación y mantenimiento de los juveniles de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	43
Tabla 5. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos durante el inicio y final de las pruebas toxicológicas con As en presencia de AH en condiciones óptimas para el crecimiento de <i>L. vannamei</i> (25°C-25 ups).....	48
Tabla 6. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos obtenidos al inicio y final de las pruebas toxicológicas con As en presencia de AH en bajas condiciones para el crecimiento de <i>L. vannamei</i> (20°C-17 ups y 20°C-33 ups).....	49
Tabla 7. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos obtenidos al inicio y final de las pruebas toxicológicas con As en presencia de AH en altas condiciones para el crecimiento de <i>L. vannamei</i> (30°C-17 ups y 30°C-33 ups).....	50
Tabla 8. Peso vivo (g) p. h. y edad de los juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> al inicio de todas las condiciones experimentales expuestos a As y AH.....	53
Tabla 9. Concentración de carbono orgánico disuelto total (COD) durante las 0 y 96h de duración de los bioensayos de toxicidad aguda con As expuestas en juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i>	54
Tabla 10. Valores de CL ₅₀ -96h (promedio e intervalos de confianza) de As sin y con presencia de AH (50 mg L ⁻¹) calculadas para juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> a diferentes combinaciones de temperatura-salinidad.....	58

Índice de Fotografías

Fotografías 1, 2, 3 y 4. Estanques y peceras de aclimatación y mantenimiento para juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> a 25°C-25 ups, 17 y 33 ups	85
Fotografías 5, 6, 7 y 8. Alimento para camarón (35% proteína), ácidos húmicos (<i>Sigma-Aldrich</i>), AH disueltos en agua destilada (1000 mg L ⁻¹), trióxido de arsénico As ₂ O ₃ (<i>Sigma-Aldrich</i>)	85
Fotografías 9, 10, 11 y 12. Cuarto de bioensayos, medición de pH durante un bioensayo, disposición de las peceras durante las pruebas con As + AH a 96h a 25°C-25 ups	85
Fotografías 13 y 14. Determinación de AH como COT en muestras de agua marina artificial de los bioensayos	85

Resumen

El objetivo del proyecto experimental fue evaluar si la presencia de la materia orgánica disuelta en forma de ácidos húmicos (AH) reduce el efecto tóxico agudo del arsénico (As) mediante la determinación de la concentración letal media (CL₅₀-96h) en diferentes escenarios de temperatura-salinidad (bajas, óptimas y altas de crecimiento) sobre juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Esto porque, en México en años recientes se han reportado en algunos sitios costeros como estuarios y lagunas, concentraciones de As en sedimentos y agua con valores por arriba de los naturales y de los que recomiendan las agencias ambientales de gobierno para protección a la fauna, para la explotación pesquera y usos recreativos. *L. vannamei* es una especie que se caracteriza por soportar amplios cambios ambientales de temperatura-salinidad durante su ciclo de vida en dichos ambientes. Los estuarios y lagunas costeras a su vez presentan elevada tasa de producción de carbono orgánico disuelto como los ácidos húmicos (AH). A partir de estudios previos, los AH han demostrado su capacidad para reducir la toxicidad y biodisponibilidad de varios metales pesados en algunas especies acuáticas. La concentración experimental promedio utilizada en este estudio fue de 38.4 mgAH L⁻¹ determinándose como la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) al inicio de las pruebas de toxicidad aguda.

Los resultados de CL₅₀-96h del As e intervalos de confianza (señalados entre paréntesis) en presencia de AH fueron como sigue: en condiciones de crecimiento óptimas de temperatura y salinidad a 25°C-25 ups fue de 8.58 mgAs L⁻¹ (7.60-9.57) y para las demás escenarios: a 20°C-17 ups de 11.27 mgAs L⁻¹ (9.67-12.94), para 20°C-33 ups de 8.38 mgAs L⁻¹ (7.64-9.16), para 30°C-17 ups de 7.64 mgAs L⁻¹ (6.80-8.5) y para 30°C-33 ups de 5.50 mgAs L⁻¹ (3.45-6.69). Se asumió que la principal forma inorgánica arsenical a la que estuvieron expuestos los juveniles de camarón fue As⁵⁺. La presencia de AH comerciales logró reducir significativamente la toxicidad del As en el escenario de baja temperatura-salinidad (20°C-17 ups). En cambio al aumentar estas variables (30°C-33 ups) la reducción de la toxicidad no es tan efectiva, debido posiblemente a una pérdida de la actividad para ligar al As. La condición menos tóxica frente al As en presencia de AH fue a 20°C-17 ups y la más letal fue a 30°C-33 ups. En los escenarios de baja temperatura-salinidad en donde hubo una mayor concentración de AH esta se relaciono con una menor toxicidad del As sobre los juveniles, en cambio, a una mayor temperatura-salinidad en donde hubo una menor concentración de AH, se obtuvo una mayor toxicidad del metaloide, por lo que es posible que los AH modifiquen indirectamente la biodisponibilidad del As. Se observó que la concentración de los AH durante las 96h de prueba fue disminuyendo significativamente en los diferentes escenarios de temperatura-salinidad. La toxicidad del As en ausencia de AH sobre los juveniles, parece estar modulada por la salinidad pero solo a baja temperatura. En cambio la toxicidad del As en presencia de AH, parece ser más compleja y estar modulada por los siguientes efectos: la interacción AH-temperatura-salinidad y temperatura-salinidad-patrones de osmoregulación en los juveniles de camarón. En cuanto a la sensibilidad al As⁵⁺, los juveniles de *L. vannamei* mostraron mayor sensibilidad que otras especies de crustáceos (i. e. cangrejos), pero son menos sensibles que otras especies pequeñas (i. e. copépodos, anfípodos).

I. Antecedentes

Arsénico en ambientes acuáticos, elemento traza: presencia, orígenes y concentraciones

Dentro de la amplia gama de contaminantes que se presentan en los ambientes acuáticos, podemos encontrar a los elementos traza y los metales pesados. Los elementos traza son elementos que están normalmente presentes en relativamente bajas concentraciones en agua, suelos u organismos en el orden de partes por millón (mg L^{-1}) o menos (Manahan, 2007) y pueden ser o no esenciales para el crecimiento y desarrollo de plantas, animales y el hombre (Pierzynski *et al.*, 1994). Los elementos traza pueden volverse tóxicos cuando superan ciertos umbrales, lo cual depende de diversos factores como son: la especie biológica, tiempo y vía de exposición, concentración y forma química en el medio ambiente (Nriagu, 1993; Galán y Romero, 2008). Así un elemento traza esencial puede volverse tóxico cuando rebasa la concentración en que es necesario. Elementos traza y metales pesados como Ag, As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb y Sn no tienen una función biológica conocida en animales, con efectos tóxicos incluso a baja concentración (Soto-Jiménez, 2011). Sin embargo el arsénico (As) es considerado actualmente como un elemento traza esencial, pues se utiliza a muy bajas concentraciones como promotor de crecimiento en aves de engorda y ganado porcino (Alarcón, 2009). Se le considera muy tóxico cuando se supera cierto umbral y aumenta su biodisponibilidad en suelos y ambientes acuáticos, fácilmente movilizado por la actividad humana en proporciones que exceden en gran medida la de los procesos geológicos (Galán y Romero, 2008). Micronutrientes y metales pesados son dos términos que a veces se usan para describir categorías de elementos traza, y no se deben usar en sustitución de estos últimos porque los micronutrientes implican siempre que los elementos son necesarios para el organismo y muchos elementos traza no son micronutrientes (Pierzynski *et al.*, 1994). Respecto a los metales pesados, sólo se consideran aquellos con peso atómico mayor que el hierro (55.8 g mol^{-1}) o con una densidad mayor que 5.0 g cm^{-3} lo que excluiría a muchos elementos traza, sin embargo el As por sus propiedades de metal y por la densidad (5.74 g cm^{-3}) de la forma sólida alfa también entraría en la categoría de metal pesado (Pierzynski *et al.*, 1994; Cervantes y Moreno, 1999). Algunos metales pesados pueden ser esenciales o no para diversos organismos, por ejemplo el hierro es esencial mientras que Cd y Hg no lo son (Manahan, 2007). Otros términos que se pueden incluir son metales traza, microelementos, elementos menores, trazas inorgánicas, etc. (Pierzynski *et al.*, 1994; Cervantes y Moreno, 1999; Schinitman, 2004).

La presencia y origen de As en los ambientes acuáticos ocurre por dos vías principalmente, por vía natural (por ejemplo, ascenso de fluidos magmáticos e hidrotermales, emisiones volcánicas a la atmósfera, desorción y disolución de minerales con As durante la meteorización), y por vía antropogénica con actividades como la minería, procesos metalúrgicos, combustión de combustibles fósiles, uso de plaguicidas y preservantes de madera (Tabla 1) (Eisler, 1988; Armienta y Rodríguez, 2005; Galindo *et al.*, 2005; Castro de Esparza, 2006).

Tabla 1. Principales fuentes de As naturales y por actividades humanas.

Natural	Antropogénico
Vulcanismo, flujos de lava	Explotación minera, drenajes ácidos de minas, Lixiviados de jales mineros.
Géiseres, aguas termales	Refinación de metales y procesos electrolíticos
Fumarolas	Producción de vidrio
Ventilas hidrotermales	Curtido de pieles
Intemperismo químico, físico y biológico Disolución de minerales, hidrólisis, oxidación	Electrónica Desechos Industriales Semiconductor y componente de circuitos y microchips en aparatos electrónicos: GaAs, InAs, GaInAs, AlAs, GaAsP
Erosión y desintegración de rocas	Preservantes de madera Cu-Cr-As
Deposición atmosférica	Empleo de plaguicidas-herbicidas a base de As
Incendios forestales	Quema de combustibles fósiles: petróleo y carbón
	Petroquímica
	Incendios forestales
	Esmaltes cerámicos y pinturas
	Aditivo coccidiostático y promotor del crecimiento en aves de engorda y ganado porcino

La contaminación por arsénico está asociada comúnmente a cuerpos de agua subterránea (agua dulce) debida a origen geológico, ya que el As se encuentra asociado con sulfuros y óxidos en más de 250 minerales, algunos tales como la pirita (FeS), arsenopirita (FeAsS), escorodita (FeAsO₄ 2H₂O), sulfuro (AsS), arsenolita (As₂O₃), cobaltita (CoAsS), nicolita (NiAs), etc. (Smedley y Kinniburgh, 2002; Ravenscroft *et al.*, 2009). El arsénico presente por vía natural en ambientes acuáticos es lixiviado, removido de los minerales y movilizado a los cuerpos de agua mediante procesos atmosféricos (lluvia, viento, etc.) y por la disolución de minerales, como la disolución reductiva de los óxidos de hierro, la desorción alcalina a pH > 8, la sulfo-oxidación de la pirita y arsenopirita, y por la acción de aguas geotermales de elevada temperatura sobre los minerales (Ravenscroft *et al.*, 2009). Sin embargo, muchos sistemas acuáticos de agua dulce como los ríos y sistemas de aguas subterráneas, con excepción de los

lagos, tienen conexión con los ecosistemas costeros, lo cual facilita el transporte del As hasta estos ambientes.

Las concentraciones naturales o basales de As en la corteza terrestre y en suelos van desde 0.2 a 15 mgAs kg⁻¹ (Nriagu, 1993; Eisler, 1988; Smedley y Kinniburgh, 2002) mientras que en el agua marina van de 0.05 a 5 µgAs L⁻¹; en cuerpos de agua dulce subterránea no contaminados son de 0.5 a 10 µgAs L⁻¹, en ríos son de 0.13 a 2.1 µgAs L⁻¹, en lagos van de 0.2 a 1.9 µgAs L⁻¹ y en estuarios son de 0.7 a 4 µgAs L⁻¹ (Ferguson y Gavis, 1972; Eisler, 1988; Smedley y Kinniburgh, 2002). En cuerpos de agua subterránea sometidos a contaminación natural y/o antropogénica, los valores pueden fluctuar entre 10 a 5,000 µgAs L⁻¹, en aguas con influencia geotermal se pueden encontrar intervalos de 10 a 50,000 µgAs L⁻¹, en el drenaje de minas se pueden encontrar valores por arriba de 850,000 µgAs L⁻¹, mientras que en agua intersticial proveniente de sedimentos marinos y de estuarios, se pueden encontrar valores desde 166 a 300 µgAs L⁻¹ (Smedley y Kinniburgh, 2002).

Contaminación por As en ambientes costeros en México

En México a partir de la última década y en años recientes se ha reportado un incremento en la presencia de As en ambientes costeros como bahías y sistemas estuarino-lagunares por arriba de los valores naturales en concentraciones que van desde 8-111 mgAs kg⁻¹ en sedimentos y 0.0005-10.19 mgAs L⁻¹ en la columna de agua. Algunos sitios en la costa del Pacífico, donde se reportan concentraciones elevadas son por ejemplo la Laguna La Paz-Estero Zacatecas, en las Lagunas Magdalena-Almejas, en la playa Santispac y en la bahía Concepción ubicadas en Baja California Sur (Shumilin *et al.*, 2001 y 2005; Leal-Acosta *et al.*, 2010; Rodríguez-Meza *et al.*, 2009). En la costa del Golfo de México, se ha detectado As en el estero Jácome, Tuxpan, Ver., donde las concentraciones elevadas de As se atribuyen a las descargas industriales que son transportadas por el río Tuxpan (Chavira, 2008). Es de mencionarse que la fuente de arsénico en las regiones de Baja California Sur, como en bahía Concepción, es principalmente de tipo geológico, por fluidos y depósitos hidrotermales adyacentes a dichos sitios, y a la presencia de rocas magmáticas y volcánicas que contienen pirita y arsenopirita. Por ejemplo, es posible observar la afloración de la Formación Comondú, donde el As en algunas playas como la de Santispac puede alcanzar concentraciones en sedimentos de hasta 1,650 mgAs kg⁻¹ (Rodríguez-Meza *et al.*, 2009). Otra región donde se ha encontrado concentraciones de As que están incrementándose ligeramente arriba de los niveles naturales es en la Bahía de Salina Cruz,

Oaxaca, donde González *et al.* (2010) reportaron $10.2 \mu\text{gAs g}^{-1}$ en sedimentos para una estación de muestreo cercana al puerto principal, esta concentración, aunque no rebasa los niveles naturales demostró mediante bioensayos de toxicidad aguda sobre *Artemia franciscana*, que ejerce efecto tóxico sobre los organismos a las 48h de exposición. La bahía de Salina Cruz, se ha visto negativamente afectada las últimas décadas, debido al incremento constante de las actividades de refinación de petróleo, al transporte marítimo y a derrames accidentales de petróleo crudo, ocasionando un aumento de las concentraciones de elementos traza, como el As (Botello *et al.*, 1998; González *et al.*, 2010).

La contaminación por As en los ambientes costeros también ocurre debido al uso descontrolado en la frecuencia y cantidad de aplicación de herbicidas órganoarsenicales en diversas áreas agrícolas adyacentes a ríos. Tales herbicidas como el metilarsonato monosódico (MSMA) y metilarsonato disódico (DSMA) todavía se comercializan bajo los nombres de Citripol y Novansar usándose para abatir el crecimiento de pastos y malezas, previo al cultivo de cítricos, algodón y caña de azúcar (CICLOPLAFEST, 2004). Este tipo de compuestos se degradan en gran parte, pero la fracción de elementos traza tales como el As, logra movilizarse a través de arroyos, ríos y sistemas de drenaje hasta llegar a los ambientes costeros.

Un factor para que los sistemas acuáticos presenten una relativa facilidad a la contaminación deriva de su elevado poder disolvente para una amplia gama de productos de desecho, a la vez que es un vehículo excelente para el transporte de materiales de diverso origen; así las aguas superficiales y subterráneas se convierten en el medio a través del cual se realiza el drenaje de compuestos orgánicos e inorgánicos ocasionados por causas naturales o antropogénicas (Capó, 2007). En México para regular y controlar las descargas industriales, urbanas y agrícolas se ha creado un marco normativo que indica los niveles de metales pesados y la composición aceptable que deberían de tener las aguas residuales. Estas normas son: la NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996 que establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales y en los sistemas de alcantarillado, en las cuales se señala que el contenido de As proveniente de descargas residuales no debe sobrepasar en ríos y en aguas costeras los 0.2 mgAs L^{-1} y en los sistemas de alcantarillado no debe rebasar de 0.75 mgAs L^{-1} como promedio diario. En cuanto al agua para uso y consumo humano, proveniente de pozos y mantos freáticos, existe la NOM-127-SSA1-1994 que señala el límite máximo permisible de $0.025 \text{ mgAs L}^{-1}$.

Los ecosistemas costeros, tales como los estuarios y lagunas, se caracterizan porque presentan una relativa tolerancia y una gran capacidad de filtración frente a diversos contaminantes, esto gracias a sus características biológicas y fisicoquímicas. Por ejemplo, Foroughbakhch *et al.* (2004) estudiaron un componente biológico como son los manglares de la región del Golfo de México entre Tampico y Veracruz, determinando que las franjas de manglares juegan un papel muy importante en la fijación de metales pesados como Cr, Cd y Pb, ayudando como agentes biorremediadores en cuerpos de agua. A los humedales se les ha denominado los “riñones” de la Tierra, debido a su gran capacidad de filtrar y retener ciertos contaminantes dentro de los ciclos químicos e hidrológicos, así como por ser receptores de aguas naturales o artificiales (Cervantes, 2007). Por lo que estos humedales y otros cuerpos acuáticos, se convierten a su vez en depósitos y reservorios de contaminantes que puede generar alteraciones en la biota de estos ecosistemas.

Características químicas del arsénico en ambientes acuáticos

El arsénico (As) pertenece al grupo 5A de la tabla periódica con una masa atómica de 74.92, es un elemento tóxico para una gran diversidad de especies; clasificado como metaloide tiene características entre metal y no metal por lo que su comportamiento difiere de un elemento metálico (Galvão y Corey, 1987). El As es considerado un elemento traza que se presenta en ambientes acuáticos y en suelos en formas químicas diversas como los oxianiones (AsO_4^-) (Galán y Romero, 2008). En ambientes acuáticos predominan las características de no metal y forma más fácilmente aniones que cationes y presenta propiedades comunes con N y P, especialmente con éste último (Albores *et al.*, 1997; Moreno, 2010). Presenta los estados de oxidación -3, 0, +3 y +5, pero los más conocidos son +3 y +5, donde la toxicidad del As^{3+} es 10 veces mayor que la del As^{5+} . Las formas inorgánicas generalmente son altamente tóxicas respecto de sus formas orgánicas; por ejemplo, la escala de toxicidad del arsénico decrece en el siguiente orden: arsina > As^{3+} inorgánico > As^{3+} orgánico > As^{5+} inorgánico > As^{5+} orgánico > compuestos arsenicales y arsénico elemental (Castro de Esparza, 2006). Sin embargo, la toxicidad de algunos organoarsenicales ha sido reevaluada recientemente, siendo que para algunas especies animales (por ejemplo; mamíferos roedores) las especies químicas tales como el ácido monometil arsonoso MMA^{3+} y el ácido dimetil arsinoso DMA^{3+} han resultado ser más tóxicas que las formas inorgánicas +3 y +5 (Del Razo *et al.*, 2004). Las especies químicas que existen de As en agua y organismos son muy diversas (Fig. 1).

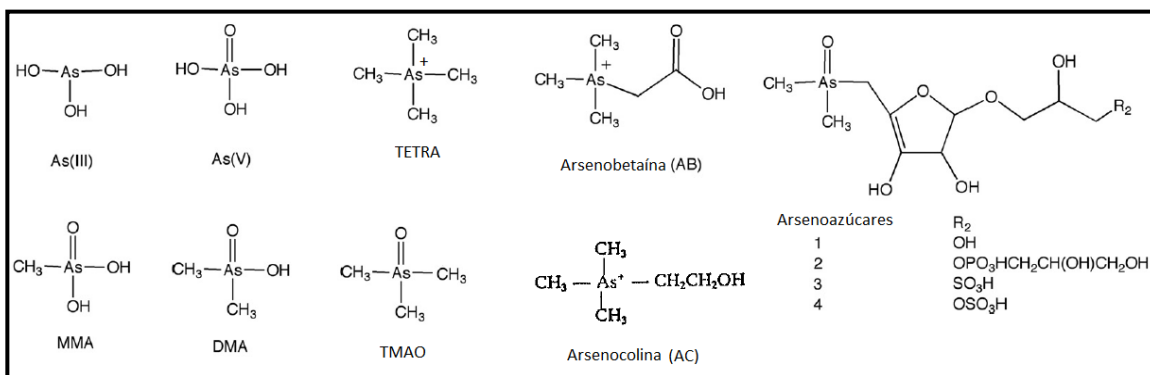


Figura 1. Especies inorgánicas y orgánicas de As más comunes en ambientes acuáticos y en organismos; Ácido metilarsonico (MMA), Ácido dimetilarsonico (DMA), Tetrametilarsonio catión (TETRA), Óxido de trimetilarsina (TMAO), Arsenobetaina (AB), Arsenocolina (AC) y arsenoazúcares (López, 1995; Burguera y Burguera, 1997; Goessler y Kuehnelt, 2002).

Muchos compuestos de arsénico pueden disolverse en agua (Galvão y Corey, 1987; ATSDR, 2007). Las formas químicas de As presentes en sistemas acuáticos son los arsenitos (+3) y los arsenatos (+5); pueden existir las formas As^0 y As^{3+} , pero son formas de menor importancia en cuerpos de agua (Ravenscroft *et al.*, 2009). El arsenito en soluciones acuosas es más móvil y tóxico que el arsenato, debido a su mayor solubilidad (Moreno, 2010). El dominio de cada especie depende principalmente del pH y el potencial de oxido-reducción (Eh) del ambiente (Ravenscroft *et al.*, 2009). Los arsenatos como: H_3AsO_4^0 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-} (con constantes de disociación de $\text{pK}_{1,2,3} = 2.2, 6.94$ y 11.5 , respectivamente) predominan en aguas superficiales, con más oxígeno disuelto y elevado potencial redox mientras que en cuerpos de agua muy ácida se encuentra la forma H_3AsO_4^0 . En cambio, en cuerpos de agua con condiciones reducidas, con bajo oxígeno disuelto y potencial redox, y/o con presencia de materia orgánica, se presentan los arsenitos dominando las especies H_3AsO_3^0 , H_2AsO_3^- y HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-} ($\text{pK}_{1,2,3} = 9.2, 14.22$ y 19.22); estas formas también dominan en aguas subterráneas (Mandal y Suzuki, 2002; Smedley y Kinniburgh, 2002; Ravenscroft *et al.*, 2009). La proporción de las especies químicas As^{3+} y As^{5+} depende del pH y del Eh y se sabe que la forma As^{5+} es más estable termodinámicamente (Le, 2002). Por ejemplo, Del Razo *et al.* (1990) encontraron una mayor proporción de As^{5+} (93%) en muestras de agua de pozo subterránea de la Comarca Lagunera, Coahuila, México; el pH del agua subterránea en general oscila entre 6.5 a 8.5 (Smedley y Kinniburgh, 2002). En ambientes acuáticos dulceacuícolas y en agua subterránea, la proporción de ambas especies también dependen de la actividad biológica como los microorganismos presentes, la presencia de As^{3+} puede ser mantenida en condiciones oxidantes por reducción biológica del As^{5+} , de igual manera se pueden incrementar las especies orgánicas como MMA y

DMA por reacciones de metilación catalizadas por actividad bacteriana (Smedley y Kinniburgh, 2002). En un ambiente acuático bien oxigenado con pH de 6 a 9 se encontrarían las formas de arsenatos: H_2AsO_4^- y HAsO_4^{2-} y en condiciones reductoras los arsenitos: H_3AsO_3^0 y H_2AsO_3^- , (Figs. 2 y 3) (Smedley y Kinniburgh, 2002).

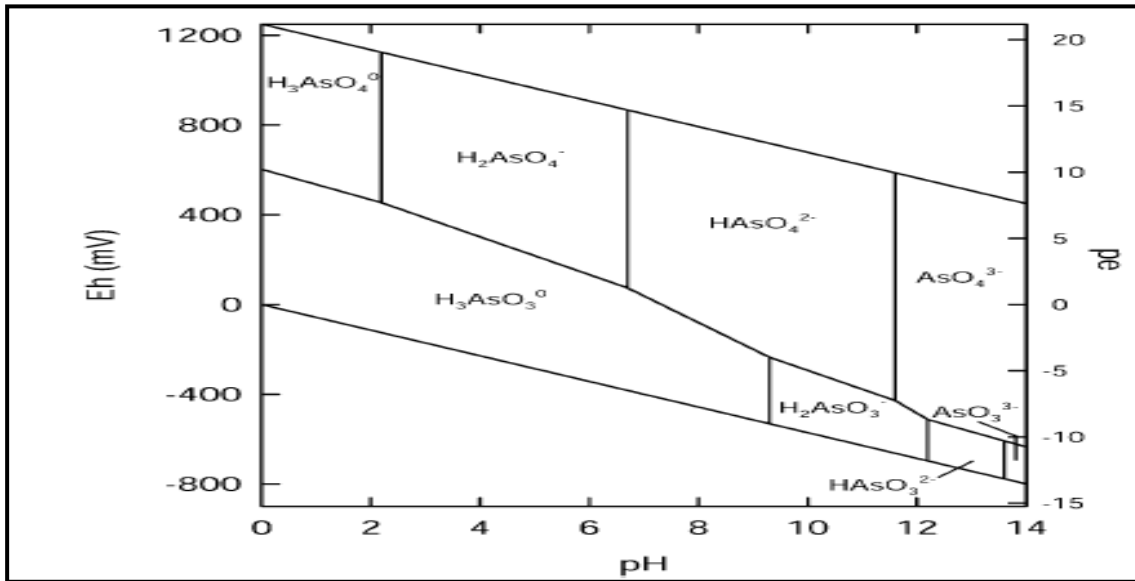


Figura 2. Diagrama de especies químicas del As en solución acuosa pH-Eh (a 25°C y 1bar de presión) (Smedley y Kinniburgh, 2002; Ravenscroft *et. al.*, 2009).

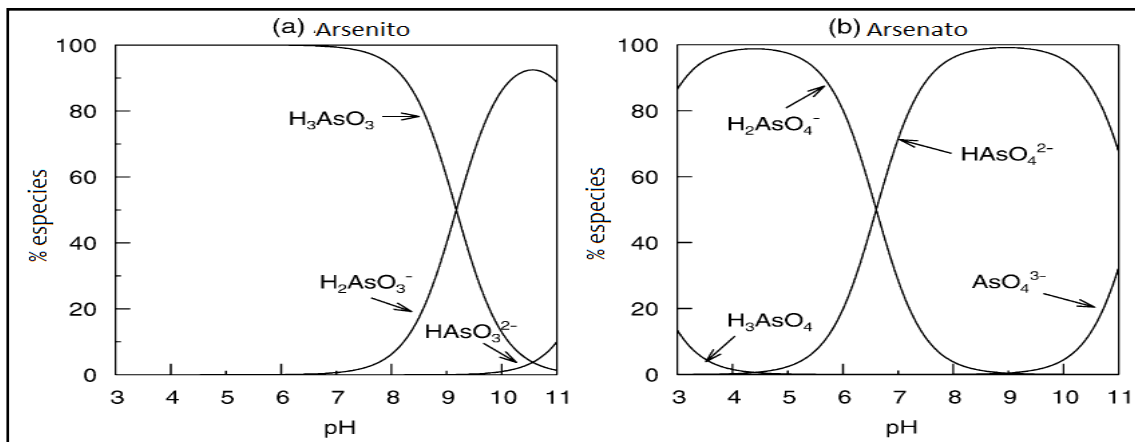


Figura 3. Porcentaje de a) arsenitos As^{+3} (Eh muy reductor) y b) arsenatos As^{+5} (Eh muy oxidante) en función de pH (Smedley y Kinniburgh, 2002; Ravenscroft *et. al.*, 2009).

En ambientes marinos la especie química de mayor predominio es As^{5+} , en cambio As^{3+} y otras formas inorgánicas se presentan en menos de 10% (Le, 2002). En mar abierto, por ejemplo, se ha reportado la concentración de As de 1.27-2.10 $\mu\text{g L}^{-1}$, esto para el océano Atlántico en la forma de HAsO_4^{2-} , es decir, la especie As^{5+} a una salinidad de 35 ups (Clark, 1992). Las especies químicas de los elementos traza en cuerpos de agua, puede alterarse por el pH y el potencial

redox, pero también por la temperatura, la fuerza iónica y la salinidad (Rainbow *et al.* 1993). A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados y elementos traza como el As no pueden degradarse biológica o químicamente en el ambiente una vez incorporados en las cadenas tróficas, ocurriendo procesos tales como; bioconcentración, bioacumulación, biotransformación y biomagnificación, tanto en vertebrados como invertebrados acuáticos (Cervantes y Moreno, 1999; Kirby y Maher, 2002; Del Razo *et al.*, 2004; Barrento *et al.*, 2009). Por lo anterior, es innegable que el As cuando llega a ser ingerido o captado por la biota, y dependiendo de la especie animal, tiempo de exposición, concentración y forma química presente, puede llegar a ejercer una serie de efectos dañinos o tóxicos en las poblaciones, alterando la estructura y funcionalidad de los ecosistemas acuáticos.

Efectos del As a nivel bioquímico en especies acuáticas

La tolerancia de los organismos marinos a la toxicidad de los elementos traza y metales pesados, está determinada tanto por la intensidad de la captación de estos, como por la vía de absorción, ya sea directamente por el agua o a través del tubo digestivo en el alimento absorbido mientras que la sensibilidad a éstos es modificada por los estadios de desarrollo y por la capacidad de adaptación de las especies (Espina y Vanegas, 2005). La bioacumulación de elementos traza por arriba de determinadas concentraciones; afecta a los organismos acuáticos que viven en los sedimentos y en la columna de agua, ocasionando disminución de las poblaciones, mortandad, cambios en la morfología y modificaciones en el funcionamiento de los principales órganos, alteraciones neurológicas, efectos cancerígenos y cambios en la regulación metabólica o bien inhibición de la actividad enzimática, así como alteración en el crecimiento y la reproducción (Páez-Osuna y Frías-Espericueta, 2001; Cervantes y Moreno, 1999). Páez-Osuna y Frías-Espericueta (2001) señalan que los órganos que más captan metales pesados en crustáceos peneidos son el hepatopáncreas, el músculo, las vísceras y el exoesqueleto.

En el caso del As, Ferguson y Gavis (1972) mencionan que As^{3+} ejerce efecto tóxico en organismos acuáticos desde concentraciones de 1 hasta 45 mg L⁻¹. Los contenidos de As total en organismos marinos van de 1 a 12 mg kg⁻¹ en plantas y de 0.1 a 50 mg kg⁻¹ en animales según Ferguson y Gavis (1972). El As se presenta generalmente en organismos terrestres, marinos y en plantas en sus formas orgánicas metiladas como DMA, MMA y TMAO, trimetilarsina,

arsenobetaína y arsenocolina. Estos son productos de biotransformación comúnmente menos tóxicos y provienen de la reducción de las formas inorgánicas As^{5+} y As^{3+} incorporadas. Por ejemplo se ha encontrado en langostas y camarones valores de trimetilarsina de 200 mg kg^{-1} (Ferguson y Gavis, 1972). En general se conoce que los productos organoarsenicales son mucho más rápidamente excretados que las formas inorgánicas (Mandal y Suzuki, 2002).

A nivel celular, en el citoplasma el As^{5+} compite con el fosfato en las reacciones de fosforilación, por ejemplo en la síntesis de ATP, pudiendo formar ADP-As altamente inestable que altera el ciclo energético celular, desacoplando la fosforilación oxidativa (Scott-Fordsmand y Pedersen, 1995; Mandal y Suzuki, 2002). Mientras que As^{3+} tiene una alta afinidad por los grupos tióles (-SH) de las biomoléculas (enzimas y proteínas) uniéndose fácilmente, alterando e inhibiendo sus funciones (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002; Ventura-Lima *et al.*, 2011). En animales y en distintas especies vegetales se ha comprobado la complejación de As^{3+} por biomoléculas ricas en grupos tiólicos como la de glutatión (GSH) (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Las enzimas de la familia glutatión S transferasa (GST) son una serie de moléculas multifuncionales, que ayudan a la desintoxicación de agentes contaminantes protegiendo a las células, estas moléculas antioxidantes como glutatión (GSH) ayudan a proteger de daño contra especies reactivas de oxígeno (ROS), como radicales libres y peróxidos (Ventura-Lima *et al.*, 2011). Algunas otras moléculas a las cuales el As^{3+} se une mediante enlaces -SH son las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que son una serie de proteínas de regulación muy importantes que responden a una gama de estímulos; como el estrés oxidativo celular, factores de crecimiento, proteínas tales como: ERKs, JNK o P38. Estas son activadas por un determinado estímulo que desencadenan cascadas de respuestas implicadas en la regulación de la división celular (proliferación, crecimiento y diferenciación), y en la muerte celular programada (apoptosis) (Ventura-Lima *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 1996). Sin embargo, son muy susceptibles de inducir un crecimiento descontrolado de células ante la presencia de moléculas estresantes u oxidantes; así la presencia de As afecta la cascada de señales de MAPKs generando un incremento de las señales, desórdenes y mutaciones que se traducen en efectos cancerígenos (Ventura-Lima *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 1996). Se conoce también que As^{3+} inhibe la enzima piruvato deshidrogenasa, alterando la producción de ATP y bloqueando el ciclo del ácido cítrico (Tseng, 2004). Sin embargo y como menciona Aposhian (1989), el enlace con grupos -SH de la forma trivalente de As, puede representar una

importante ruta de desintoxicación para los organismos. Otras enzimas que el As inhibe son: piruvato oxidasa, S-amino oxidasa, colina oxidasa y transaminasa (Mandal y Suzuki, 2002).

Otro efecto importante que ejerce el As es el remplazo del fósforo en las moléculas de ADN aunque esto sólo se ha comprobado en bacterias del género *Halomonadaceae* y aún existe polémica al respecto. Se conoce que en muchas especies el As ocasiona daño en la síntesis y en los mecanismos de reparación del ADN, al generar ROS, los cuales interaccionan por ejemplo con guanina alterando la estructura del ADN (Wolfe-Simon *et al.*, 2010; Tawfik y Viola, 2011; Flora, 2011; Mandal y Suzuki, 2002). En mamíferos se ha observado que las formas organoarsenicales como MMA y DMA, las cuales son intermediarios del proceso de biometilación, muestran una mayor citotoxicidad, genotoxicidad y poder de inhibición de enzimas que la forma inorgánica As^{3+} (Yamanaka *et al.*, 2004).

En especies acuáticas los efectos tóxicos que ocasiona el As, tienen que ver con la alteración a nivel celular del balance en la producción de moléculas prooxidantes y con la actividad antioxidante, resultando finalmente en un estrés oxidante; así por ejemplo, algunos de los efectos más importantes de los que se ha encontrado evidencia experimental ante una exposición con As^{3+} son: un incremento de la citotoxicidad en líneas celulares de peces, estrés oxidativo, disminución y modulación de la actividad antioxidante y enzimática en hígado de pez dorado *Carassius auratus*, del pez *Clarias batrachus* y en el poliqueto *Laoenereis acuta* (Wang *et al.*, 2004; Bagnyukova *et al.*, 2007; Seok *et al.*, 2007; Ventura-Lima *et al.*, 2009b), así como estrés oxidativo por As^{5+} en diferentes tejidos de la carpa común *Cyprinus carpio* (Ventura-Lima *et al.*, 2009b; Bhattacharya y Bhattacharya, 2007; Ventura-Lima *et al.*, 2007 y 2011). También se ha observado incremento de la respuesta antioxidante en branquias del pez zebra *Danio rerio* expuesto por dos días a As^{5+} (Ventura-Lima *et al.*, 2009a).

En peces como el pez zebra *Danio rerio*, el As induce la formación de micronúcleos en células sanguíneas de las branquias, provoca daño neuromotor, lipoperoxidación en branquias, lesiones en riñones como fibrosis, disminución de la producción de eritrocitos y hemoglobina, cambios histológicos, reducción de la capacidad de transporte de oxígeno, menor porcentaje de huevos viables, efectos teratogénicos como malformaciones en columna y efectos carcinogénicos (Baéz-Ramírez *et al.*, 2004; Prieto-García *et al.*, 2006). Los efectos del As sobre algunos moluscos han sido investigados por Diniz *et al.*, (2008) quienes estudiaron por 28 días la toxicidad de As a concentraciones crecientes y la capacidad de regulación en el molusco

bivalvo *Corbicula fluminea*, encontrando una acumulación de forma gradual de gránulos de As en el tejido del tracto digestivo y una mayor producción de metalotioneínas como mecanismo de desintoxicación. Ünlü y Fowler (1979) encontraron que un incremento de la temperatura aumenta la incorporación y excreción de As del medio en el mejillón de aguas estuarinas *Mytilus galloprovincialis*. En relación al efecto de la salinidad, observaron que a 19 ups el As se acumuló tres veces más que a 38 ups, la talla también influyó en la acumulación, observándose que los mejillones de menor talla acumularon mucho más As que los ejemplares de mayor talla.

En crustáceos como en el cangrejo *Somanniathelphusa pax* el As^{5+} ($10 \mu g L^{-1}$) ejerce alteraciones en la capacidad de reproducción, en el desarrollo de las gónadas, disminución de la vitelogénesis y acumulación en hepatopáncreas (Yamaguchi *et al.*, 2008). Otros investigadores como Madsen (1992) evaluó cambios metabólicos y los efectos tóxicos del As^{5+} en el cangrejo *Crangon crangon* observando que la sobrevivencia se vio afectada a concentraciones por arriba de $25 mgAs L^{-1}$; los individuos pequeños con pesos entre 0.5 a 0.29 g fueron menos tolerantes que los sujetos de talla mediana y grande (0.5 a 0.59 g y 0.8 a 0.89 g respectivamente) expuestos a una concentración de $50 mgAs L^{-1}$. En cuanto a los cambios metabólicos por ejemplo, el metabolismo de rutina disminuyó en relación directa a la talla de los organismos, las concentraciones de glucosa en hemolinfa, glucógeno en músculo, no cambiaron y las de fosfato de adenilato se mantuvieron constantes durante los experimentos con la exposición al As^{5+} (Madsen, 1992). Los crustáceos más jóvenes, como en cangrejos de la especie *Cherax destructor* pueden incorporar más As que los adultos, debido a que crecen con mayor rapidez y son capaces de eliminarlo por el exoesqueleto mediante el proceso de ecdisis (Williams *et al.*, 2008).

En crustáceos, los elementos traza generalmente modifican el metabolismo de las proteínas, los mecanismos de osmorregulación, también por ejemplo alteran la actividad de diversas enzimas tales como la acetilcolinesterasa, relacionada con el funcionamiento del sistema nervioso (Camacho-Sánchez, 2007). Sin embargo las especies acuáticas han desarrollado estrategias de regulación, tolerancia y desintoxicación frente al efecto adverso de los metales pesados como el arsénico. Algunos ejemplos son, la biotransformación y metilación del As hacia formas orgánicas, la inducción de metalotioneínas (MTs), la formación de gránulos o precipitados insolubles, el almacén o inactivación del metal en estructuras lisosomales o vacuolas, de forma que se reduce su concentración en forma libre o iónica en la célula (Reyes-

Gil, 1999; Ahearn *et al.*, 2004), mientras que otros autores han encontrado un aumento de la frecuencia de muda y una mayor concentración de As en el exoesqueleto en comparación con el tejido muscular de algunos crustáceos como en *Lysmata seticaudata*, proceso que posiblemente ayude a desintoxicar el As incorporado previamente (Fowler y Ünlü, 1978). En especies dulceacuícolas se han reportado bajas concentraciones corporales de As; en cambio, se reportan mayores concentraciones en organismos marinos, lo cual de acuerdo a Clowes y Francesconi (2004) puede deberse a la mayor capacidad de acumulación de As de los animales marinos la cual puede ser modulada por factores abióticos como la salinidad. Según estos autores, a partir de estudios de incorporación a 10 días y de eliminación a 20 días de As a diferente salinidad (32, 24 y 16 ups) en mejillones de *Mytilus edulis* (probando con una sustancia igual a la arsenobetaína), encontraron que esta forma organoarsenical, conocida como arsenobetaína, se incorpora a mayor salinidad (32 ups) y que la eliminación a los 20 días fue mayor a una menor salinidad (16 ups) comparado con 24 y 32 ups, por lo que Clowes y Francesconi (2004), señalan que la arsenobetaína a una mayor salinidad presenta una función comparada a la de un osmolito o ion orgánico implicado en la regulación del volumen celular (por ejemplo; aminoácidos como la glicina, alanina o prolina), esto es posible porque además, la arsenobetaína tiene una baja toxicidad para los mejillones y otras especies en general, funcionando como una respuesta adaptativa al medio ambiente enriquecido con As.

Diversidad y características ambientales de los sistemas estuarino-lagunares de México

México tiene una gran diversidad de ambientes costeros; debido en parte a la extensa zona litoral con aproximadamente 11,592.77 km, de los cuales 1, 567, 300 ha (hectáreas) son áreas estuarinas; el Pacífico posee 892,000 ha y el Golfo de México 674,500 ha (Contreras, 1985). De las 32 entidades federativas, 17 estados presentan zona costera, con aproximadamente 62 bahías (14,043.43 km²), 19 estuarios (293.42 km²), 164 lagunas (13,119.83 km²), 361 esteros (1,112 km²), 1,441 albuferas (2,150.7 km²), y una superficie de marismas aproximadamente de 18,087.89 km² (Ortiz y De la Lanza, 2006).

Los sistemas estuarino-lagunares presentan fenómenos físicos, químicos y biológicos muy importantes, algunas como son: mezcla de agua dulce y salada, aporte constante de nutrientes provenientes de la zona terrestre, entrada de organismos provenientes del mar (tal como el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*), elevada diversidad y adaptabilidad a los cambios ambientales por parte de las especies residentes y/o que están de visita temporal,

donde se pueden encontrar desde; protozoos, zooplancton, fitoplancton, macrófitas acuáticas, árboles de mangle, algas, peces, crustáceos, moluscos, insectos, reptiles, anfibios, aves y mamíferos (Contreras, 1985; Gómez y Flores, 2003). Los parámetros fisicoquímicos que tienen gran variabilidad en estos sistemas son la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y el pH, en general predominan los fondos lodosos, con sedimentos finos, hay una alta turbidez y la topografía es irregular (Carbajal y Chavira, 1985). Las variaciones de temperatura y salinidad, pueden alcanzar varias unidades, tanto diurnas como estacionales, por ejemplo, variar desde 28.9°C a 32.5°C y de salinidad desde 1.3 a 65.3 ups (Pantaleón-López, *et al.*, 2005). Respecto al oxígeno disuelto, este parámetro tiene una marcada variación espacial y temporal, por ejemplo, De la Lanza *et al.* (2008), encontraron en la laguna de Tres Palos, Guerrero, en época de lluvias un contenido de oxígeno disuelto de 19.9 mg L⁻¹, en cambio en secas un contenido de 4.3 mg L⁻¹ a nivel superficial, pero también encontraron una severa disminución respecto de la profundidad con valores de 0.3 hasta 1.5 mg L⁻¹. Las variaciones de pH pueden ser muy marcadas; por ejemplo en estuarios puede variar desde 7 a 7.5 en las zonas con aporte de agua dulce y entre 8 a 8.6 en las zonas más cercanas al mar; en cambio, en lagunas costeras del Golfo de México se han encontrado variaciones desde 6 a 8.5 si bien en el mar el pH permanece más constante, alrededor de 8 a 8.2 (Libes, 1992; Ohrel y Register, 2006; Flores-Baca, 2010). El pH que se registra en los sedimentos en lagunas costeras puede variar desde 7.35 a 8.9 y en ocasiones bajo condiciones muy anóxicas (Flores-Baca, 2010).

El tipo de clima y el régimen de precipitación pluvial determinan cambios de temperatura y salinidad; sin embargo la morfología de la cuenca, el tipo de sedimento, la presencia de ríos, arroyos, la vegetación acuática, también contribuyen a las variaciones de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto (Contreras, 1985). La variabilidad de los parámetros fisicoquímicos de los ambientes costeros puede contribuir a modificar la biodisponibilidad de los elementos traza, entre estos al As, aumentando la probabilidad o el riesgo de ser incorporados en los sistemas biológicos. Sin embargo, el tipo y naturaleza del sedimento en estos ambientes puede contribuir a la retención de los contaminantes. Se ha demostrado que los arsenatos son rápidamente absorbidos por los sedimentos ricos en hidróxidos y óxidos de Fe, Al y Mn lo que reduce su capacidad, velocidad de percolación y disponibilidad para los sistemas biológicos (Barrachina *et al.*, 1995). En sedimentos de lagunas, las fracciones de arena y limo muestran capacidad de adsorción reducida, mientras que las arcillas adsorben mejor los arsenatos por

tener cationes adsorbidos en su superficie como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} (Barrachina *et al.*, 1995). Los hidróxidos de Fe adsorben arsenatos en soluciones acuosas a un pH 7.9-8.2 (Romero *et al.*, 2004). También sedimentos ricos en calcita o carbonatos son un control natural en la movilidad y especiación de este metaloide. Goldberg y Glaubig (1988) encontraron que el As se adsorbe sobre calcita a un pH alrededor de 10, y Romero *et al.* (2004) demostraron en sedimentos ricos en calcita en la zona de Zimapán, Hidalgo, una adsorción de 98% para el As^{5+} a un pH de 10.5 a 10.8.

Importancia del carbono orgánico disuelto y de las sustancias húmicas en los sistemas estuarino-lagunares de México: fuentes, concentraciones y estructuras químicas

Un aspecto importante que caracteriza a las zonas costeras y en especial a los sistemas estuarino-lagunares y humedales, es la riqueza en materia orgánica disuelta. Específicamente los humedales de manglar, marismas, estuarios y lagunas, presentan una elevada producción primaria durante gran parte del año, característica que los hace muy importantes para la productividad y diversidad de la zona costera. Se ha registrado que estos sistemas en general pueden producir de 170-1,700 $\text{g m}^{-2} \text{año}^{-1}$ de materia vegetal como hojarasca (Wafar *et al.*, 1997; Arreola-Lizárraga *et al.*, 2004); por ejemplo, la productividad de hojarasca en humedales de manglar puede llegar a 2,610 kg (peso seco) $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ en Quintana Roo (Navarrete y Oliva-Rivera, 2002). Esta productividad se refleja en un abundante aporte de materia orgánica que es susceptible de ser degradada hasta carbono orgánico disuelto (COD) y particulado (COP) (González-Farías y Mee, 1988). El carbono orgánico disuelto se origina a partir de la descomposición de plantas, animales y los productos de excreción de estos y sus principales componentes son; proteínas, aminoácidos, péptidos, hidrocarburos, carbohidratos, lípidos, vitaminas y compuestos húmicos (Wetzel, 1975; McKnight y Aiken, 1998). En los ambientes costeros la disponibilidad de COD y COP está influenciada por diversos factores; por sus orígenes, composición, presencia de nutrientes, acción microbiana, hidrodinámica del cuerpo de agua, geomorfología. Dentro de estos se pueden mencionar la estacionalidad, la mezcla de la columna de agua, la velocidad y dirección del viento, así como, la marea junto con la corriente que esta produce, que en conjunto determinan la disponibilidad del COD y COP, que potencialmente puede ser alimento para los organismos filtradores bentónicos (Smaal y Haas, 1997). La alta productividad primaria en forma de carbono COD y COP de los ecosistemas de

manglar se debe por ejemplo, a la gran disponibilidad de nutrientes provenientes de los ríos y escurrimientos terrestres y al efectivo reciclamiento de estos durante los procesos de mineralización microbiana (Mee, 1978; Nixon, 1981). Gran parte del humus terrestre, definido como el producto de transformación de los residuos de plantas y animales (Kononova, 1966; Hayes *et al.*, 1989), también es exportado a los ecosistemas costeros, por diversos factores físicos, como la lluvia, el viento, arroyos y ríos. En ambientes acuáticos la suma de los valores de COD y COP es decir carbono orgánico total (COT), asociada a la materia inerte “no viva”, es mayor que la biomasa viva (Roldán y Ramírez, 2008). La fracción mayoritaria de COD está constituida casi en su totalidad (entre 50% a 90%) por los compuestos húmicos tanto en forma disuelta y coloidal (Mastrángelo *et al.*, 2005; Roldán y Ramírez, 2008). Otros autores mencionan que los compuestos húmicos o sustancias húmicas (SH) están en concentraciones hasta en un 80% del COD, en los sistemas estuarino-lagunares, y en algunos sitios tienen una marcada variación estacional incrementándose en épocas de lluvias (González-Farías y Mee, 1988). Las SH son una serie de compuestos orgánicos, de colores oscuros y marrones, de elevado peso molecular, de carácter ácido y estructuras químicas complejas, formados por reacciones inespecíficas de síntesis y polimerización microbianas a partir de proteínas, lípidos, carbohidratos y ligninas (Fig. 4) (Wetzel, 1975; Stevenson, 1994). Las principales fracciones que constituyen a las SH son los ácidos fúlvicos (AF), los ácidos húmicos (AH) y la humina (Stevenson, 1994). La principal fuente de las SH es la materia vegetal de origen alóctono y autóctono (como frutos, hojas, ramas, troncos, plantas fibrosas ricas en taninos, ligninas, celulosas, etc.). Esta se degrada por acción de agentes fisicoquímicos y biológicos, descomponiéndose en detritus y remineralizándose hasta constituyentes monoméricos, principalmente como fenoles, taninos, ligninas, que experimentan una repolimerización (proceso de humificación por acción enzimática bacteriana) en la cual se forman las principales fracciones de las SH (Fig. 4) (Wetzel, 1975; Stevenson, 1994). Otras fuentes importantes de SH son las macrófitas acuáticas y el fitoplancton (Roldán y Ramírez, 2008).

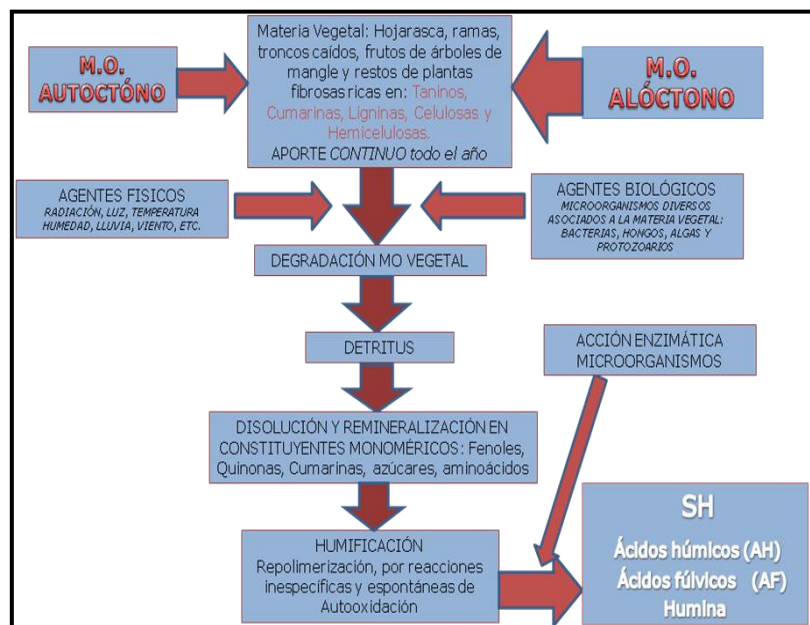


Figura 4. Fuentes principales de sustancias húmicas.

En ambientes costeros se ha observado que la mayor concentración de SH es debido al mayor aporte de lignina con una floculación y depositación del complejo resultante entre los límites de mezcla del agua dulce y marina, además de que existe una recombinación de materiales alóctonos y autóctonos de diferente naturaleza; también las SH marinas son altamente autigénicas, ya que tienen escasa influencia de vegetación lignulolítica o de transición (De la Lanza, 1990). La concentración de carbono orgánico, sustancias húmicas y ácidos húmicos en diversos ambientes acuáticos es variable (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD), sustancias húmicas (SH) y ácidos húmicos (AH) en diferentes ambientes acuáticos.

COD (mg L ⁻¹) / Ambiente	SH (mg L ⁻¹) / Ambiente	AH (mg L ⁻¹) / Ambiente	Referencia
0.1-2.0 Agua marina y subterránea	0.03-0.6 Agua marina y subterránea	-	(Thurman, 1985)
1-10 Ríos	0.5-4.0 Ríos	-	(Thurman, 1985)
1-50 Lagos	0.5-40 Lagos	-	(Thurman, 1985)
1-100 Lagunas costeras	-	-	(Steinberg et al., 2006)

Cont. Tabla 2.

160-300 Lagunas costeras	-		(Suhett <i>et al.</i> , 2004; Blodau <i>et al.</i> , 2004)
0.5-100 Arroyos, Ríos y Lagos	1-3 Lagos	-	(Tipping, 2002)
0.5-1 Mar abierto	-	-	(Tipping, 2002)
0-6.72 Aguas Naturales	0-16 Aguas Naturales	-	(Mastrángelo <i>et al.</i> , 2005)
-	0.03-0.6 Agua marina y subterránea	-	(Ephraim y Allard, 1997)
-	0.5-4.0 Arroyos, ríos y lagos	-	(Ephraim y Allard, 1997)
-	10-30 Marismas, pantanos y ciénagas	-	(Ephraim y Allard, 1997)
2-25 Aguas templadas, Pantanos y humedales	-	-	(Keskitalo y Eloranta, 1999)
0.63-0.98 Mar abierto	-	29-105 µg Húmicos L ⁻¹ 223-754 µg Fúlvicos L ⁻¹ Mar abierto	(Harvey <i>et al.</i> , 1983)
-	17.2-79 Agua de Estuario	-	(González-Farías y Mee, 1988)
-	44.7-52 Agua de Estero	-	(González-Farías, 1985)
-	-	3-300 Sedimento marino	(Musani <i>et al.</i> , 1980)
-	-	0-150 Agua de Estuario	(Flores-Verdugo <i>et al.</i> , 1990)
-	-	0.3-17.4 (Particulado) 0.2-2.3 (Disuelto) Agua de Estuario	(Hair y Bassett, 1973)
-	-	2.6-44.1 Lagos Tropicales	(Moreno-Arbeláez y Ramírez-Restrepo, 2010)
-	-	30 Bahía	(Imai <i>et al.</i> , 2009)
-	-	150-200 Sedimento marino	(Poutanen, 1986)
-	-	0.5-50 Arroyos y lagos	(Stackhouse y Benson, 1988)
-	0-10 Aguas Naturales	-	(Glover y Wood, 2004)

En cuanto a la estructura química, las fracciones de ácidos húmicos y humina contienen un esqueleto de carbono con un elevado grado de aromaticidad y con un alto porcentaje de peso molecular incorporado en grupos funcionales, la mayoría de los cuales contiene oxígeno. Las SH en conjunto en fase disuelta, presentan características hidrofílicas, consisten de partículas globulares con carga negativa en su superficie debida a la ionización de grupos funcionales ácidos como los carboxilos. El peso molecular medio va de 500 a 5,000 Daltones (Da) para la

fracción de ácidos fúlvicos y de 3,000 a 1,000,000 Da para AH y humina (Stevenson, 1994). La composición elemental de la mayoría de las sustancias húmicas está dentro de los siguientes intervalos: C 45-55%; O 30-45%; H 3-6%; N 1-5% y S 0-1% (Manahan, 2007). Los principales grupos funcionales que contienen las SH son grupos ácidos (carboxilo, enol, hidroxilo fenólico y quinonas), grupos neutrales (alcoholes, éter, cetona, aldehído y ésteres) y grupos básicos (aminas y amidas). Los AF, por ejemplo, presentan mayor contenido de oxígeno, azufre y de grupos funcionales como carboxilos y alcoholes (Tabla 3).

Tabla 3. Composición elemental (% en peso) de las principales fracciones de sustancias húmicas: ácidos húmicos (AH) y ácidos fúlvicos (AF) (Tomado y adaptado de Schnitzer, 1978).

Elemento	AH	AF
C	53.6-58.7	40.7-50.6
H	3.2-6.2	3.8-7.0
N	0.80-5.5	0.9-3.3
O	32.8-38.3	39.7-49.8
S	0.10-1.5	0.10-3.6
Grupos Funcionales (meq g ⁻¹)	AH	AF
Grupos Ácidos en Total	5.6-8.9	6.4-14.2
Ácidos carboxílicos (COOH)	1.5-5.7	5.2-11.2
Fenoles (Ar-OH)	2.1-5.7	0.30-5.7
Alcoholes (OH)	0.20-4.9	2.6-9.5
Quinona/Cetona (C=O)	0.10-5.6	0.30-3.1
Metoxilo (OCH ₃)	0.30-0.80	0.30-1.2

Un esquema que puede ayudar a conocer las propiedades y predecir las interacciones de las SH en el medio soluble es el que propone Cuesta (1994) (Fig. 5).

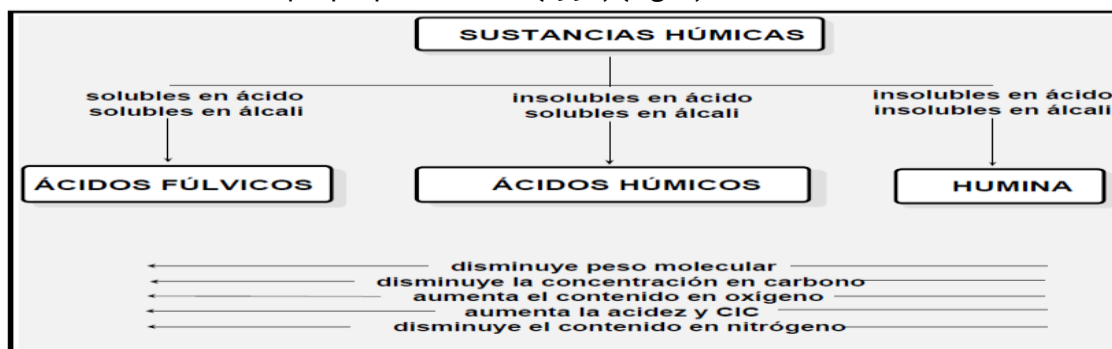


Figura 5. Características y propiedades fisicoquímicas de las sustancias húmicas. CIC es la capacidad de intercambio iónico (Tomado de Cuesta, 1994).

Las propiedades fisicoquímicas de las sustancias húmicas pueden explicarse por las variaciones en el peso molecular, tipo y número de grupos funcionales y el grado de condensación de sus estructuras (Gara, 2008). Mientras que el comportamiento fisicoquímico de las SH y sus fracciones respectivas puede verse alterado por diversos factores tales como cambios de pH, temperatura, fuerza iónica del solvente, presencia de iones, compuestos orgánicos diversos y de su misma concentración en disoluciones (Stevenson, 1994; Gara, 2008; Conte y Piccolo, 2002). En soluciones acuosas la estructura macromolecular secundaria de los AH también es muy importante en la adsorción y asociación con diversos compuestos presentes (Gara, 2008). A partir de estudios fisicoquímicos con SH y AH, se ha encontrado que estas moléculas adoptan una estructura en espiral encogida con el incremento de pH o bien con la disminución de la fuerza iónica (Conte y Piccolo, 2002). Mientras que en condiciones de baja fuerza iónica, alto pH o baja concentración de materia orgánica disuelta, los AH se presentan como moléculas extendidas, lineales, flexibles y de alto peso molecular (Gara, 2008; Warwick *et al.*, 2001). Mientras que en condiciones de alta fuerza iónica, bajo pH y alta concentración de materia orgánica, se forman esferas globulares compactas, también con el aumento de la fuerza iónica, el radio de los coloides disminuye (Gara, 2008; Warwick *et al.*, 2001). También se conoce que el aumento de temperatura genera un enrollamiento intramolecular de los AH, que resulta en estructuras micelares más rígidas, así para diversos compuestos orgánicos las constantes de asociación con las SH aumentan al disminuir la temperatura (Engebretson y von Wandruszka, 1994; Gara, 2008).

Las SH y AH: funciones ambientales e interacciones con los elementos traza y metales pesados

Las funciones ambientales que se adjudican a las sustancias húmicas en los ambientes acuáticos son muy diversas, son una fuente constante y reservorio de carbono que sedimenta en los ambientes terrestres y acuáticos; ayudan a la movilización y concentración de nutrientes en la cadena trófica; en ambientes terrestres ayudan a retener minerales, el calor y la humedad; ayudan a un mejor intercambio catiónico con los sistemas biológicos vegetales y actúan como un buffer impidiendo cambios de pH abruptos en los suelos (Stevenson, 1994). En ambientes acuáticos funcionan como transportadores y concentradores de sustancias minerales, además movilizan agentes xenobióticos de origen orgánico e inorgánico y actúan como agentes oxidantes o reductores según las condiciones ambientales modificando la toxicidad de las sustancias xenobióticas (Stevenson, 1994). Bittner (2007) y Cuesta (1994) clasifican los diversos efectos de las sustancias húmicas en efectos indirectos y directos. Los primeros se refieren a que las sustancias húmicas interactúan con el medio externo, por ejemplo, formando enlaces complejos, quelando minerales, disminuyendo la permeabilidad a determinados nutrientes o incrementando la capacidad de intercambio catiónico. En cambio los efectos directos se refieren a cuando las macromoléculas de SH se absorben dentro del tejido (vegetal o animal) resultando en determinados efectos benéficos o no para el organismo.

De la Lanza (1990) señala que las SH son importantes en la quelación de metales traza especialmente en el ambiente marino, los estuarios y lagunas, las cuales reciben grandes cargas de materia orgánica particulada y disuelta procedentes del sistema terrestre aportado por escurrimientos. Así es probable que el contenido de SH sea importante en la regulación de metales traza, lo que a su vez determina una mayor productividad primaria en dichos sitios, pues los metales traza son indispensables para los organismos que inician las cadenas tróficas. Diversos trabajos sobre las SH y AH en ambientes acuáticos señalan la cualidad natural de éstas, de acarrear sustancias xenobióticas y de captar y quelar metales disueltos y otros compuestos diversos, reduciendo su biodisponibilidad y toxicidad, como en el caso de Al y Cu en peces (Stevenson, 1994; Steinberg *et al.*, 2008). En ambientes acuáticos las SH pueden reaccionar con una gran variedad de metales para formar complejos órgano-metálicos que pueden ser muy solubles, estables o bien precipitarlos (Abate y Masini, 2005). En general la absorción y complejación de las SH aumenta con el incremento de pH pero esto depende del

tipo y cantidad de grupos funcionales que tengan las sustancias húmicas; también el grado de polimerización de éstas puede influir en esta capacidad de interaccionar con los metales del medio acuático (Abate y Masini, 2005). La reactividad de las SH y sus efectos están estrechamente relacionadas con el tipo y concentración de los grupos funcionales constitutivos, por ejemplo los AF presentan mayor carácter ácido por contener carboxilos y fenoles y en los AH la mayor parte del oxígeno se encuentra formando parte del núcleo o estructura central, con uniones éter o éster (Stevenson, 1994). Se sabe, además, que en general la materia orgánica disuelta y particulada de los ambientes costeros y marinos influye y ejerce un control muy importante en los ciclos biogeoquímicos de los diversos elementos de la corteza terrestre, reduciendo o aumentando la biodisponibilidad de elementos traza, y modificando su especiación química (Stevenson, 1994; Perminova y Hatfield, 2005).

Es de mencionarse que las SH se pueden unir mediante enlaces covalentes de coordinación o complejos, tanto a elementos necesarios nutricionalmente (Cu, Zn o Mn) como a elementos tóxicos como As, Pb y Cd (Anderson *et al.*, 2001). Otros mecanismos de unión entre los contaminantes y los AH incluyen además intercambio de cationes, formación de enlaces de hidrógeno y covalentes, transferencia de carga, fuerzas de Van der Waals, intercambio de ligandos, adsorción hidrofóbica y reacciones de oxido-reducción, por lo que las SH y AH muestran ser polifuncionales en ambientes acuáticos (Perminova y Hatfield, 2005; Van Stempvoort *et al.*, 2005). Las SH pueden comportarse como agentes oxidantes o reductores dependiendo con cual especie química interacciona. En contaminantes como los metales de transición, hidrocarburos clorados y compuestos amino-aromáticos que presentan un alto grado de oxidación, las SH han mostrado funcionar como agentes reductores disminuyendo el estado de oxidación; tal es el caso de metales como Ni, Cr, Ti, Cu y algunos actínidos Plutonio y Neptunio (Perminova y Hatfield, 2005). Las sustancias húmicas presentan valores de constantes de estabilidad elevadas al formar complejos con diversos metales, pero esta estabilidad se puede ver afectada por factores tales como: pH, temperatura, fuerza iónica, tamaño de los complejos, número, tipo y tamaño de ligando, tipo de metal e impedimentos estéricos (Mantoura *et al.*, 1978; Boggs *et al.*, 1985). Existen diferentes modelos que explican la unión de las SH frente a iones metálicos en ambientes acuáticos (Figs. 6a y 6b) (Baker y Khalili, 2007):

- 1.-Por quelación entre grupos carbonilo e hidroxil-fenoles.
- 2.-Por quelación entre dos grupos carbonilo.
- 3.-Por complejación con un grupo carboxilo.
- 4.-Por interacción con fenoles y éteres fenólicos.

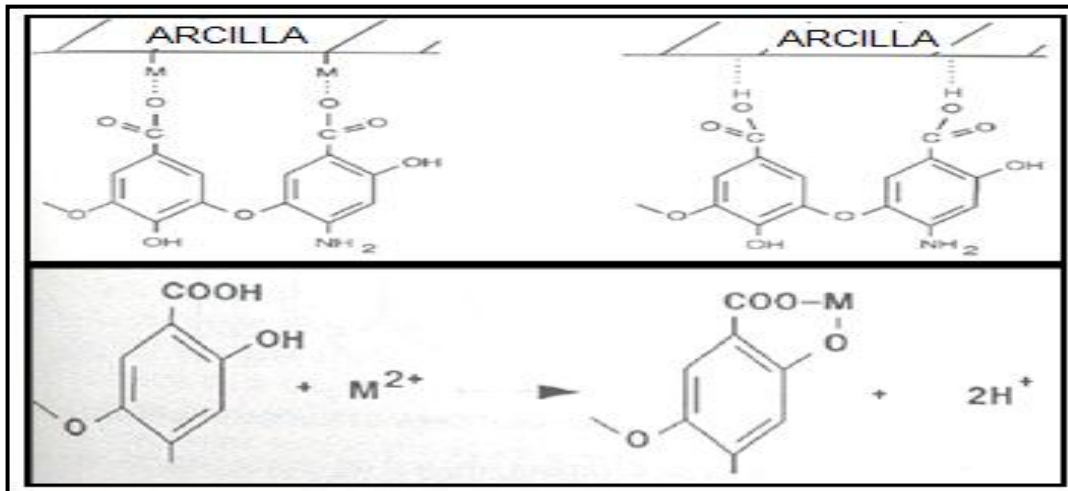


Figura 6a. Reacciones de un metal hipotético (M) con los grupos funcionales de un ácido húmico, presente en los sedimentos de un sistema acuático (Adaptado de Stevenson, 1994).

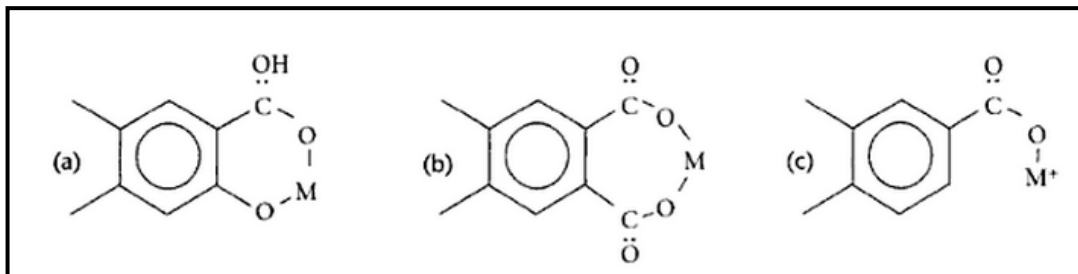


Figura 6b. Formas de enlaces de un ion metálico M^{2+} con sustancias húmicas; a) por quelación entre carboxilos e hidroxilos fenólicos; b) por quelación entre dos grupos carboxilos; c) por formación de complejos con grupos carboxilo (Tomado de Manahan, 2007).

Una vez formados los complejos organometálicos a partir de las SH, existe el riesgo o la probabilidad de incorporación de estos y de los iones metálicos hacia los diferentes organismos marino-costeros, entre estos tenemos a los crustáceos que presentan hábitos detritívoros y omnívoros.

Importancia ecológica y económica de los crustáceos peneidos en los sistemas estuarino-lagunares de México

La importancia ecológica de los crustáceos peneidos estriba en que desempeñan diversas funciones en los ecosistemas lagunares, estuarinos, costeros (Cifuentes *et al.*, 1997; Vinuesa, 2005; Brusca y Brusca, 2005), tales como:

- a) Las primeras etapas larvales de desarrollo forman parte del zooplancton, el cual sirve de eslabón entre el fitoplancton y los primeros niveles de las cadenas tróficas.
- b) Forman parte de diferentes niveles tróficos, sirviendo de alimento a muchas otras especies de niveles tróficos superiores como peces, reptiles, aves y mamíferos.
- c) Numerosas especies son detritívoras bentónicas, ayudando a reciclar y recircular la materia orgánica, participando en los procesos biogeoquímicos.

En el ámbito económico la importancia de los crustáceos peneidos es alta, pues son parte medular de la economía pesquera de muchos países. La FAO (2010a) reportó 3,4 millones de toneladas anuales de capturas de camarón, donde China, India e Indonesia son los principales países camaroneros; el 60% de la producción de camarón procede de la pesca de captura y el otro 40% de la camaronicultura, la cual es una rama de la acuicultura a nivel mundial muy rentable. Los principales países con producción de camarón de granja son China, Tailandia, Vietnam, Indonesia, India y México. En el periodo de 2000-2005, México ocupó el décimo lugar en capturas de camarón a nivel mundial según la FAO (2010a), con 63,622 toneladas en promedio y en la producción de camarón de granja (principalmente *Litopenaeus vannamei* en el litoral del Pacífico) ocupó el quinto sitio con un promedio de 51,307 toneladas. La producción de camarón nacional hasta el 2009, por su volumen se encuentra en el 2° sitio de la producción de especies marinas, pero por su valor y sus exportaciones se encuentra en primer lugar, siendo U.S.A., Japón y España los principales destinos (CONAPESCA, 2009). Las especies de camarones peneidos más producidas en granjas camaronícolas a nivel mundial por mayor volumen de producción son: *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsupenaeus japonicus*, *Fenneropenaeus indicus*, *Litopenaeus stylirostris* y *Metapenaeus* spp. (FAO, 2010a).

Ciclo de vida del camarón blanco peneido *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Litopenaeus vannamei es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde el Norte de Sonora, México, hacia Centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú y habita en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20°C durante todo el año (FAO, 2010b). Se encuentra en ambientes marinos tropicales y subtropicales; en donde la plataforma continental desciende gradualmente y está cubierta por una capa de fango o de arena fina, los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la postlarva migra a las costas a pasar la etapa juvenil en estuarios, lagunas costeras, litorales y manglares (FAO, 2010a; Cifuentes et al., 1997). La entrada de las larvas a las lagunas es facilitada por las corrientes, las que a la vez facilitan el regreso de los pre-adultos o adultos para su reproducción (Fig. 7) (Cifuentes et al., 1997). La puesta de huevos por las hembras se produce en forma masiva con aproximadamente 200 mil huevos por puesta, de un tamaño entre 200 y 500 µm (Cifuentes et al., 1997). Después de 12 a 14 horas de la fecundación, se desarrolla la larva "nauplio", en el que no hay segmentación y presenta un ojo central y tres pares de apéndices solamente, todos adaptados a la natación (Cifuentes et al., 1997). Luego suceden diversos cambios morfológicos, con incorporación de nuevos segmentos y apéndices, pasando por "metanauplio", "protozoa ó zoea" y "mysis"; esta última fase es la que presenta los apéndices en su forma definitiva. Después de este estadio, comienza la fase "postlarva" y queda formado un individuo que posteriormente llega a la etapa juvenil semejante al adulto (Cifuentes et al., 1997). Las postlarvas con hábitos bentónicos penetran en las lagunas o esteros en comunicación con el mar, teniendo un tamaño de 6 a 8 mm de largo total; ahí se nutren intensamente y aumentan de talla variando entre 7 y 50 mm mensualmente, y llegando al estadio juvenil luego de 4 o 5 meses alcanzando una longitud de entre 7 y 10 cm (Cifuentes et al., 1997). Posteriormente, se alejan de las zonas de crianza e ingresan a mar abierto para reproducirse. Estos animales, viven un periodo corto, de un año y medio a dos años, aproximadamente, por lo que están una sola vez en la región costera, lo mismo que en la zona de reproducción (Cifuentes et al., 1997; Martínez et al., 1999).

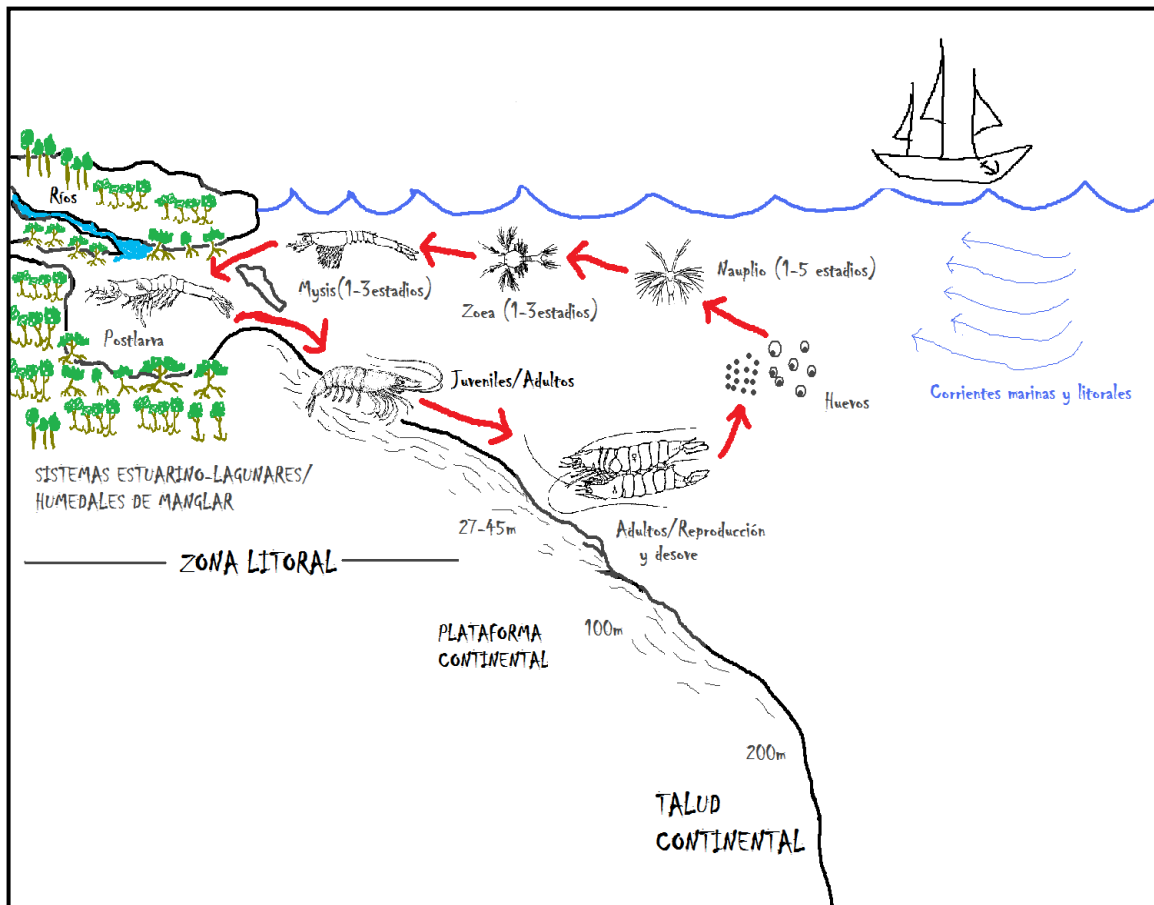


Figura 7. Ciclo de vida del camarón *Litopenaeus vannamei*.

Características fisiológicas y condiciones ambientales óptimas de temperatura y salinidad para el crecimiento de *Litopenaeus vannamei*

Muchos crustáceos peneidos poseen diferente tolerancia a la salinidad, los de limitada tolerancia se denominan estenohalinos y los que toleran grandes variaciones en la concentración del medio salino se llaman eurihalinos (Gordon, 1979). Se ha reconocido a la especie de camarón peneido *Litopenaeus vannamei* como un fuerte osmorregulador eurihaliño (Lucena et al., 2006). Por osmorregulador se refiere a aquellos organismos que deben controlar su osmolaridad interna porque sus líquidos corporales no son isosmóticos con el ambiente externo, estableciéndose una diferencia de presión osmótica entre los solutos de los líquidos corporales y los del medio externo; tal diferencia de presión hace que el agua o los solutos fluyan de un lugar de mayor a menor concentración, debido a esto, los organismos

osmorreguladores deben descargar el exceso de agua si viven en un ambiente hipoosmótico, o captar agua para compensar la pérdida osmótica si habitan en un ambiente hiperosmótico (Campbell y Reece, 2007). Valdez *et al.* (2008) han encontrado que *L. vannamei* exhibe un patrón de regulación hiperosmótico en bajas salinidades y un patrón de regulación hipoosmótico en altas, con un punto isosmótico entre 25-26 ups. Así entonces *L. vannamei* ha demostrado ser una especie muy adaptable; en granjas de cultivo, las postlarvas presentan sobrevivencia elevada de 81-95% en 4 ups, 26 a 29°C y de 7.7 a 8.1 de pH (Lucena *et al.*, 2006). En sistemas de cultivo el intervalo óptimo de salinidad es de 28 a 32 ups; las postlarvas de *L. vannamei* se adaptan bien a un intervalo amplio de temperatura (15-35°C) y salinidad (3-35 ups) y en general a una mayor temperatura hay un mayor crecimiento. El crecimiento óptimo de *L. vannamei* ocurre a temperaturas de 25 a 30°C, mientras que para su reproducción oscila de 27 a 29°C (Martínez, 1999), por lo que *L. vannamei* es reconocido como un organismo poiquiloterma, es decir aquellos animales cuya temperatura corporal tiende a fluctuar más o menos con la temperatura ambiente cuando las temperaturas del aire o del agua varían (Eckert *et al.*, 1990). En estadio de juvenil y adulto se considera que tienen principalmente hábitos omnívoros oportunistas, buscando su alimento en los sedimentos (Santamaría, 2009; Cifuentes *et al.*, 1997).

Dado que los crustáceos presentan un esqueleto externo o caparazón, para poder crecer lo hacen por medio de "mudas" proceso también llamado ecdisis, es decir que el organismo abandona el caparazón para aumentar de talla y posteriormente forma uno nuevo, por lo que el crecimiento en los crustáceos se realiza por saltos (Cifuentes *et al.*, 1997). La frecuencia de mudas y el aumento de talla en cada muda (exuviación) se encuentra en relación no solo con las condiciones del medio (temperatura, salinidad, oxígeno, fotoperíodo, etc.) sino de igual manera con los nutrientes requeridos por los organismos (Fernández-Luna, 1998).

II. Justificación

Se consideró importante estudiar la toxicidad aguda del arsénico (As) en solución y la reducción de la misma en presencia de carbono orgánico disuelto en forma de ácidos húmicos (AH), los cuales, en base a otros estudios han demostrado reducción en la toxicidad de algunos elementos traza, por ejemplo: Al, Cd y Ni en organismos acuáticos, siendo así, se propone como modelo biológico al camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* mediante pruebas a nivel de laboratorio y a diferentes condiciones de temperatura-salinidad. El proyecto surge como una manera de conocer la letalidad del arsénico y su reducción sobre organismos marino-costeros que habitan ambientes ricos en materia orgánica disuelta, puesto que se ha registrado en la última década a partir de la información de artículos científicos; incrementos por arriba de las concentraciones naturales de As en agua y sedimentos de algunos ambientes costeros mexicanos. Los daños que el As puede causar en la calidad del agua de las zonas costeras, las alteraciones en la estructura y funcionalidad de las poblaciones y ciclos de vida de diversas especies marinas pueden presentar serias repercusiones ecológicas y económicas a corto y largo plazo. Así, en base a lo anterior, se eligió a *L. vannamei* ya que es una especie que pasa gran parte de su ciclo de vida en lagunas y estuarios en fase de postlarva y juvenil, soportando amplios cambios de temperatura y salinidad, y donde existe incluso, un aporte constante de carbono orgánico disuelto en forma de sustancias húmicas durante la mayor parte del año. Además, es una de las especies más utilizadas y conocidas para estudios de contaminación marina y tiene alto valor comercial porque sustenta gran parte de la camaronicultura y pesca de altamar en México (CONAPESCA, 2009).

III. Hipótesis

Se espera que la presencia de AH reduzca significativamente la toxicidad del As en juveniles de camarón en comparación con la toxicidad que el As ejerce individualmente; esto dependerá principalmente de las condiciones experimentales de temperatura-salinidad en que los AH sean más efectivos para ligarse al As y de las condiciones fisiológicas que adopten los organismos ante los escenarios de baja, óptima o alta temperatura-salinidad; específicamente se espera que los AH reduzcan la toxicidad del As en una condición de baja temperatura-salinidad, en cambio al incrementarse las condiciones este efecto se vera disminuido.

IV. Objetivo General y Específicos

Objetivo general

Evaluar si los ácidos húmicos reducen la toxicidad aguda del As medida a través de la concentración letal media CL_{50} -96h en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) en diferentes escenarios de temperatura-salinidad.

Objetivos específicos

- 1.-Determinar la CL_{50} -96h de As de manera individual y luego en presencia de AH comerciales sobre juveniles de *Litopenaeus vannamei* en diferentes escenarios de temperatura-salinidad; a bajas (20°C-17 ups, 20°C-33 ups), óptimas (25°C-25 ups) y altas (30°C-17 ups y 30°C-33 ups) condiciones de crecimiento para la especie.
- 2.-Comprobar que la presencia de AH comerciales en forma disuelta reducen la toxicidad aguda del As en las diferentes condiciones experimentales.
- 3.-Determinar las combinaciones de temperatura-salinidad más y menos favorables de reducción de toxicidad del As en presencia de AH.

V. Materiales y Métodos

V. 1. Obtención de los juveniles de *Litopenaeus vannamei*

Las postlarvas de 13 días de edad (PL13) de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) utilizadas en este estudio, fueron adquiridas de FITMAR PROVEEDORA DE LARVAS, S. A. de C.V., unidad de producción acuícola con sede en Mazatlán, Sinaloa. Un lote de aproximadamente 5,000 postlarvas se transportó por vía aérea, con medio salino a 30 ups-25°C y oxígeno previamente incorporado por burbujeo, con el fin de mantenerlas viables hasta su llegada a la Ciudad de México. Seguidamente fueron trasladadas a las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), Ciudad Universitaria, al Bioterio de Peces y Crustáceos donde se tenían preparados acuarios con las mismas condiciones (salinidad, temperatura, aireación) del envío para reducir el estrés por manejo y transporte. Posteriormente, las postlarvas se aclimataron durante un periodo de 15 a 20 días bajo las condiciones óptimas de temperatura 25°C (Martínez *et al.*, 1999) y salinidad 25 ups (Valdez *et al.*, 2008) y se fueron aclimatando y manteniendo bajo las condiciones de evaluación de los bioensayos propuestos, siguiendo las recomendaciones de Vanegas *et al.* (2008). La aclimatación de los juveniles a las combinaciones de temperatura-salinidad fue de manera gradual incrementando dos unidades por semana con el fin de lograr plena adaptación y ajuste de los procesos fisiológicos. Para los fines de este estudio una vez que los organismos cumplieron 35 días de edad se consideraron como juveniles tempranos, etapa en la que el sistema digestivo se encuentra completamente desarrollado.

V. 2. Aclimatación, mantenimiento y alimentación

El mantenimiento y aclimatación de los camarones se llevó a cabo en estanques y peceras adaptadas con filtros mecánicos con sistema de recirculación, aireación constante, calentadores sumergibles y recambios parciales de agua marina artificial cada tercer día. Se emplearon estanques de plástico rígido de (500L) dividiendo el lote de postlarvas en dos muestras independientes una de la otra, designadas como sistema 1 y sistema 2; ambos con equipo de filtración mecánica, recirculación de agua (FLUVAL 405L[®] y FLUVAL 105[®]) y sistema de filtración biológico. Se utilizaron calentadores con termostato de 200W (ELITE SUBMERSIBLE 55[®]), termómetros para acuarios (MARINA AQUARIUM de HAGEN[®]) y bombas

de aireación con difusores de piedra (ELITE[®]). Para la aclimatación a las condiciones óptimas de crecimiento (25°C-25 ups) y diferentes de los óptimos (20°C-17 ups, 20°C-33 ups, 30°C-17 ups y 30°C-33 ups) se utilizaron peceras de vidrio con capacidad de 100L colocándose 15 organismos por litro de juveniles de *L. vannamei*.

Para mantener las condiciones fisicoquímicas óptimas del agua de los estanques y peceras (Tabla 4), se realizó semanalmente recambio parcial de medio salino (2/3 del volumen total) preparado éste con sal marina artificial (Instan Ocean M. R.) y agua de grifo, retirándose la materia orgánica acumulada con ayuda de un sifón manual. Diariamente se realizó un monitoreo de la temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto (mg L⁻¹), utilizándose un oxímetro con sensor de membrana (YSI INCORPORATED MODEL 50B, YELLOW SPRINGS OHIO, USA), pH-metro (WTW pH 3310 SET 4, GERMANY) con electrodo (Sentix[®] 51, de WTW, GERMANY), refractómetro manual para medir salinidad (ATAGO[®], Cat. No. 2493, TOKIO, JAPON) y termómetro con precisión de 1°C y rango de -35 a 50°C (TAYLOR PENMARK, Cat. No. 6331-G). Cada 15 días se registró en muestras de agua amonio (mg L⁻¹), nitritos y nitratos (mg L⁻¹) por fotometría, utilizándose para este fin el fotómetro multi-parámetros mod. C99 (HANNA Instruments Inc., Woonsocket, Rhode Island, USA).

Las postlarvas PL13 recién llegadas se alimentaron con pellets de tamaño de partícula menor a 1mm, el cual se incremento conforme fueron creciendo los organismos. El alimento utilizado fue camaronina en pellets con 35% de proteína (Camaronina 35[®] PURINA). Los pellets se molieron en mortero de cerámica y se realizó un tamizado manual a través de mallas de plástico a fin de obtener los tamaños de partícula del alimento adecuados para garantizar la ingesta por los organismos a medida que aumentaron de edad (Akiyama *et al.*, 1992; Dominy *et al.* 1998). La porción de alimento suministrado se ajustó entre un 15 a 20% de la biomasa total de cada contenedor, considerando para esto el peso promedio de los organismos (submuestras de 20 individuos) y el número total en cada pecera y estanque.

Cada semana se registró la talla y peso de una submuestra de organismos (n=20) de cada pecera (con pesos aproximados entre 0.5 a 1.5g peso húmedo, p. h.). Se realizó un análisis de varianza completamente al azar con nivel de confianza al 95% y prueba de Tuckey para asegurar la similitud de los pesos entre los diferentes tratamientos experimentales. Previo a los bioensayos, los camarones se encontraron en periodo de intermuda, para lo cual se llevo

una calendarización aproximada de los periodos de muda e intermuda, el cual estuvo entre 5 y 6 días.

Tabla 4. Condiciones de recepción, aclimatación y mantenimiento de juveniles de *L. vannamei*.

Especie	<i>Litopenaeus vannamei</i>
Estadios: recepción/ aclimatación/ Pruebas de toxicidad	Postlarvas/ Postlarvas/ Juveniles tempranos
Sistema de Mantenimiento	Filtración de agua mediante filtros de arena y mecánicos con recambio parcial de agua dos veces a la semana
Medio de Mantenimiento	Agua marina artificial (Instant Ocean M.R.)
Alimentación	Pellet CAMARONINA (35%proteína) de partícula menor a 1mm , y 1-5mm, 2 veces al día.
Salinidad (ups)	30 ups para la recepción; 17, 25 y 33 ups para aclimatación y mantenimiento previo a los bioensayos.
Temperatura óptima crecimiento y mantenimiento (°C) (Martínez, 1999)	25-26°C para la recepción; 20, 25 y 30°C para aclimatación y bioensayos
Punto Isosmótico (ups) (Valdez et al., 2008)	25-26 ups
pH	7.5 a 7.8
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	≥ 5.0
Amonio NH ₄ (mg L ⁻¹)	≤ 0.2
Nitrito NO ₂ (mg L ⁻¹)	≤ 5.0
Fotoperíodo (Luz: Oscuridad)	12h:12h
Velocidad del flujo (L min ⁻¹)	3-5
Recipientes de aclimatación	Estanques capacidad de 100L y de 500L.
Densidad (organismos L ⁻¹)	15-20

V.3. Preparación de Ácidos Húmicos (AH)

Preparación de la solución patrón y determinación de la concentración de AH en solución como carbono orgánico disuelto (COD) en agua marina artificial

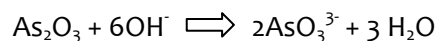
La solución de AH se realizó a partir de ácidos húmicos comerciales, en sus sales de sodio grado técnico (SIGMA-ALDRICH®, número CAS. 68131-04-4). Se preparó una solución patrón de 1,000 mg L⁻¹ de AH, en agua destilada con agitación magnética por 1h (23-25°C) (Mastrángelo et al., 2005). La concentración nominal utilizada en este estudio fue de 50 mgAH L⁻¹, este valor se seleccionó con base en los valores típicos reportados para concentraciones de AH en diversos ambientes costeros como estuarios y lagunas (Tabla 2). La concentración de AH se determinó en cada uno de los acuarios experimentales, durante los bioensayos, mediante un análisis de la concentración de carbono orgánico disuelto (COD mg L⁻¹). Para ello se tomaron muestras de agua de cada condición experimental a las 0, 24, 48, 72 y 96h, de iniciado el

bioensayo. Las muestras se analizaron *in situ* mediante un equipo multiparámetros con sensor para COD (mg L^{-1}) (Model. IQ SENSOR NET System 184 XT, WTW®) y se utilizó como blancos o testigos, muestras de agua marina artificial (sin adición de AH) a la salinidad experimental respectiva (17, 25 y 33 ups).

V.4. Pruebas de toxicidad aguda del arsénico

Preparación de la solución patrón y determinación de la concentración real de As de exposición a partir de las concentraciones nominales

Para las pruebas de toxicidad aguda del arsénico se usó el reactivo trióxido de arsénico (As_2O_3) grado (QP) químicamente puro (SIGMA-ALDRICH; CAS. 1327-53-3; peso molecular de $197.84 \text{ g mol}^{-1}$). Se preparó una solución patrón de arsénico con una concentración de 10 gAs L^{-1} en medio básico (NaOH , 0.6N) con agitación magnética (45°C por 30 min). La relación estequiométrica fue la siguiente: de $197.84 \text{ mg As}_2\text{O}_3$ corresponden a 74.92 mgAs suponiendo una disolución total del As_2O_3 . Hay que tomar en cuenta que al disolverse el As_2O_3 en medio básico se obtuvo la disolución de arsénitos (+3) de acuerdo a la siguiente reacción (Baeza, 2004):



Pero debido a las condiciones experimentales prooxidantes de los bioensayos, y de acuerdo a la literatura, la forma química As^{3+} se puede convertir a As^{5+} , ya que el estado de oxidación del As depende del pH y del potencial redox; por lo que se determinó pH en los bioensayos, y por separado de los bioensayos de toxicidad, el potencial redox en soluciones de agua marina artificial a las diferentes condiciones experimentales de temperatura-salinidad, para inferir la forma arsenical predominante en las pruebas tóxicas con los organismos (anexo vii) (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013).

Para analizar la concentración real de As, al inicio de cada prueba de toxicidad se tomaron muestras de agua salina (500mL) por cada concentración experimental. Las muestras se acidificaron hasta $\text{pH} < 2$ adicionando HNO_3 concentrado (grado ultrapuro) por goteo y fueron tratadas por digestión (HNO_3 conc.) y luego analizadas por espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS Model. 7500ce Agilent Technologies). Se utilizó un

estándar de As en 2% HNO₃ para calibrar el equipo (1,000 µg mL⁻¹, HIGH-PURITY® STANDARDS, USA). La eficiencia de recuperación fue mayor de 95% para el As en las muestras de agua.

Bioensayos de toxicidad aguda de As versus AH en juveniles de *L. vannamei*

El diseño experimental seguido en el presente estudio se basa en un estudio previo en el que se evaluó la toxicidad aguda del As (CL₅₀-96h) a nueve diferentes combinaciones de temperatura-salinidad (20, 25 y 30°C x 17, 25 y 33 ups) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* con concentraciones reales de 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 hasta 15 mgAs L⁻¹ y en ausencia de AH (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013). De tal manera, en el presente estudio se definieron las mismas interacciones de temperatura-salinidad (25°C-25 ups) condiciones óptimas de crecimiento y de (20°C-17 ups, 20°C-33 ups) y (30°C-17 ups y 30°C-33 ups) condiciones bajas y altas respectivamente en presencia de AH (50 mgAH L⁻¹) para evaluar la acción tóxica aguda del arsénico. Para cada interacción de temperatura-salinidad, As y AH, las pruebas de toxicidad aguda se efectuaron considerando las mismas concentraciones del estudio previo.

Los bioensayos fueron de tipo estático (sin recambio) por duplicado, empleando medio salino preparado con sal marina (Instant Ocean M. R.) y agua destilada (Reasol®). En cada condición experimental se utilizaron 8 organismos los cuales se transfirieron al azar de los acuarios de aclimatación a las peceras de exposición de vidrio, con un volumen de 4.5L de medio salino y manteniendo una carga de biomasa total de 0.8 a 1g (p. h. L⁻¹) de acuerdo a las recomendaciones y métodos de referencia para estudios de contaminación marina (UNEP-FAO, 1989), APHA (1995) y Vanegas *et al.* (2008). Se consideraron tres grupos control; Control 1: con agua marina sin As ni AH; Control 2: con agua marina sin AH ni As pero con disolvente del As (NaOH, 0.6N) y Control 3: con agua marina sin As, con disolvente del As (NaOH, 0.6N) y con AH (50 mg L⁻¹). Antes de cada bioensayo, los organismos previamente aclimatados a las condiciones experimentales de temperatura-salinidad, se pesaron individualmente por el método de “peso por volumen” mediante balanza analítica (OHAUS®) y se colocaron aleatoriamente en cada pecera. Antes de las pruebas, se mantuvieron los camarones en ayunas por 24h y se comprobó que estuvieran en periodo de intermuda, (5-6 días). El montaje del sistema de aireación se realizó utilizando mangueras de silicón sumergidas en cada pecera conectadas a bombas de aireación (modelo ELITE 802, HAGEN). El control de temperatura en el cuarto de bioensayos se realizó con un calefactor con regulador de temperatura (DELONGHI®). El fotoperiodo de iluminación fue de 12h de luz y 12h de oscuridad. El registro de

los parámetros fisicoquímicos se realizó cada 12h hasta finalizar las pruebas a las 96h, y se midió: temperatura (°C), salinidad (ups), pH y oxígeno disuelto (OD, mg L⁻¹). A lo largo de los bioensayos se registró la mortalidad de los juveniles y cambios de comportamiento (canibalismo, cambios en los movimientos natatorios, color anómalo o muda de exoesqueleto). Los juveniles sobrevivientes al final de las 96h fueron sacrificados por hipotermia inducida y posteriormente se almacenaron en congelación en bolsas de plástico herméticas (Ziplock®) para cada bioensayo. Los residuos de medio marino con contenido de As disuelto se colectaron en bidones de plástico etiquetados, para su posterior manejo y tratamiento residual.

Las CL₅₀-96h (mgAs L⁻¹) y los intervalos de confianza en presencia de AH, se obtuvieron mediante el análisis de supervivencia Probit con distribución Lognormal por el método clásico de Finney. Para determinar diferencias significativas entre los valores de CL₅₀-96h de las diferentes condiciones experimentales se utilizó la prueba de la diferencia del error estándar de Sprague y Fogels (1977) con un nivel de confianza del 95% (ver anexo vi). Se utilizó la función estadística Probit, mediante el software BioStat version 5.8.1.0. 2009 (AnalystSoft®, 2009).

Dosificación de la solución de As y AH

La dosificación de As se hizo considerando en agregar un volumen máximo de la solución patrón no mayor de 0.5% del volumen de cada acuario experimental, de acuerdo a Vanegas *et al.* (2008), con el fin de no modificar las características del medio experimental (i. e. salinidad, pH). La dosificación de As se realizó agregando el tóxico de manera cuidadosa y lentamente, agitando poco a poco con el fin de homogenizar el arsénico en cada pecera. La dosificación de los controles con NaOH (0.6N) se realizó considerando el mayor volumen agregado con la máxima concentración de As.

Una vez dosificado el arsénico se procedió a dosificar los AH a partir de la solución patrón [1,000 mgAH L⁻¹] agregando 225 ml a cada acuario experimental y al control 3 para obtener una concentración nominal de 50 mgAH L⁻¹ en cada pecera de 4.5 L de capacidad.

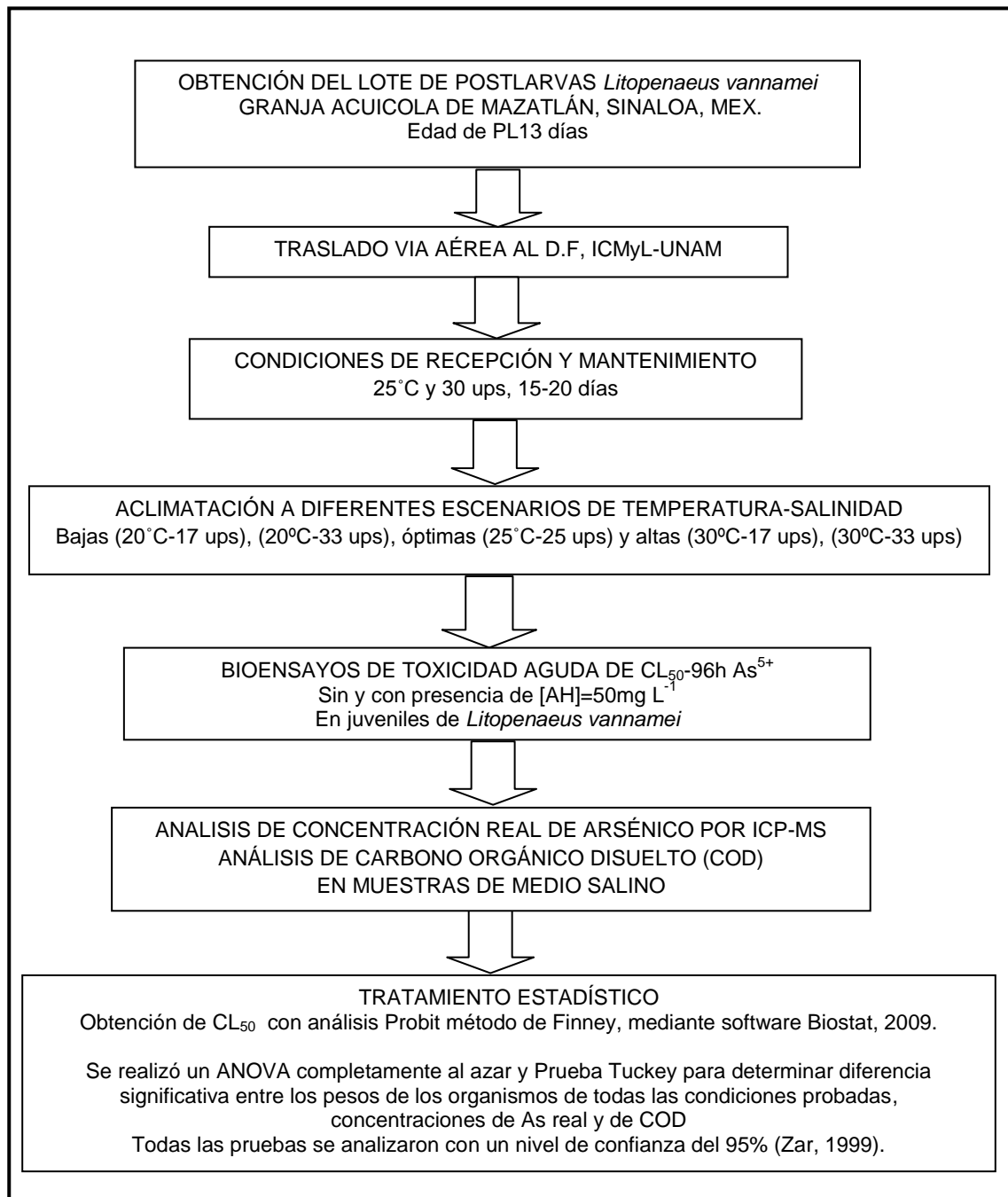


Figura 8. Esquema general del diseño experimental del proyecto.

VI. Resultados y discusión

Parámetros fisicoquímicos y forma arsenical predominante

En las condiciones consideradas como óptimas para el crecimiento de los juveniles de *L. vannamei* (25°C-25 ups) durante la exposición al As, no hubo cambios significativos en las variables de temperatura-salinidad y en el oxígeno disuelto (Tabla 5). El pH también se mantuvo de acuerdo a lo recomendado y a lo que se reporta para ambientes estuarinos (UNEP-FAO, 1989; Ohrel y Register, 2006; Flores-Baca, 2010). Para todas las pruebas realizadas en los controles 1, 2 y 3 se obtuvo 100% de sobrevivencia. Es de mencionarse que durante la recepción del lote de organismos la mortalidad fue cercana al 0.1%, y se registró una concentración de oxígeno disuelto de 5.70 mgO L⁻¹ y salinidad de 30 ups.

Tabla 5. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos durante el inicio y final de las pruebas toxicológicas con As en presencia de AH en condiciones óptimas para el crecimiento de *L. vannamei* (25°C-25 ups).

Parámetro Estadístico*	Temperatura (°C)		Salinidad (ups)		pH		Oxígeno disuelto OD (mg L ⁻¹)	
	0h	96h	0h	96h	0h	96h	0h	96h
Promedio	25.25 ^a	25.02 ^a	25.80 ^a	25.64 ^a	7.70 ^a	7.86 ^a	5.52 ^a	5.46 ^a
Desviación Estándar	0.19	0.10	0.76	0.77	0.10	0.25	0.19	0.38
CV (%)	0.76	0.10	2.97	3.00	1.34	3.12	3.53	7.00

*Nota: El número de muestra fue n= 20, se incluyen por duplicado los registros de 7 concentraciones y 3 grupos control. CV= coeficiente de variación. Letras iguales en los promedios indican que no hubo diferencia significativa. (ANOVA y prueba Tuckey, 95% de confianza).

En los escenarios de baja temperatura-salinidad para los juveniles durante las pruebas de toxicidad a 20°C-17 ups y 20°C-33 ups, se observó que los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos presentaron algunas variaciones significativas durante las 96h de prueba, así la temperatura a las 0h fue de 20°C para finalizar con 22°C. También en la salinidad siendo de 33 ups al inicio y registrando al final 31 ups, pero observando, los coeficientes de variación la dispersión de los valores fue mínima (Tabla 6). El oxígeno disuelto durante las 96h de prueba presentó algunas diferencias significativas y coeficientes de variación elevados, respecto de la temperatura y la salinidad, sin embargo las concentraciones registradas se mantuvieron dentro

de los límites recomendados para evaluaciones y bioensayos de contaminación marina (UNEP-FAO, 1989; Vanegas et al., 2008). El pH durante las 96h de prueba no tuvo variaciones significativas manteniéndose con coeficientes de variación bajos y valores esperados (Tabla 6) (UNEP-FAO, 1989).

Tabla 6. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos obtenidos al inicio y final de las pruebas toxicológicas con As en presencia de AH en bajas condiciones para el crecimiento de *L. vannamei* (20°C-17 ups, 20°C-33 ups).

Parámetro Estadístico*	Temperatura (°C)				Salinidad (ups)			
	20°C-17 ups		20°C-33 ups		20°C-17 ups		20°C-33 ups	
	0h	96h	0h	96h	0h	96h	0h	96h
Promedio	20.83 ^a	22.57 ^b	21.28 ^a	22.08 ^a	17.09 ^a	17.0 ^a	32.58 ^a	31.02 ^b
Desviación Estándar	0.50	0.68	0.41	0.45	0.42	0.12	0.42	1.03
CV (%)	2.42	3.05	1.96	2.06	2.46	0.10	1.31	3.32

*Nota: El número de muestra fue n= 20, se incluyen por duplicado los registros de 7 concentraciones y 3 grupos control. CV= coeficiente de variación. Letras iguales en los promedios indican que no hubo diferencia significativa. (ANOVA y prueba Tuckey, 95% de confianza).

Cont. Tabla 6.

Parámetro Estadístico*	pH				Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)			
	20°C-17 ups		20°C-33 ups		20°C-17 ups		20°C-33 ups	
	0h	96h	0h	96h	0h	96h	0h	96h
Promedio	7.59 ^a	7.90 ^b	7.70 ^a	7.77 ^a	5.89 ^a	5.81 ^a	5.8 ^a	5.52 ^b
Desviación Estándar	0.09	0.41	0.09	0.11	0.20	0.40	0.52	0.60
CV (%)	1.30	5.21	1.22	1.45	3.52	6.88	9.12	10.85

Mientras en los escenarios de alta temperatura-salinidad, durante las 96h de las pruebas a 30°C-17 ups y 30°C-33 ups, se observaron algunas variaciones significativas en algunos valores promedio de los parámetros fisicoquímicos como el pH y el oxígeno disuelto. A pesar de lo

anterior, dichas variaciones fueron mínimas por lo que se considera que no hubo efecto significativo sobre los organismos de prueba (Tabla 7).

Tabla 7. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos obtenidos al inicio y final de las pruebas toxicológicas con As en presencia de AH en altas condiciones para el crecimiento de *L. vannamei* (30°C-17 ups, 30°C-33 ups).

Parámetro Estadístico*	Temperatura (°C)				Salinidad (ups)			
	30°C-17 ups		30°C-33 ups		30°C-17 ups		30°C-33 ups	
	0h	96h	0h	96h	0h	96h	0h	96h
Promedio	30.25 ^a	30.7 ^b	30.24 ^a	30.38 ^a	16.9 ^a	15.57 ^b	32.75 ^a	32.15 ^a
Desviación Estándar	0.18	0.76	0.23	0.47	0.30	0.70	0.52	0.86
CV (%)	0.6	2.49	0.76	1.56	1.82	4.51	1.60	2.67

*Nota: El número de muestra fue n= 20, se incluyen por duplicado los registros de 7 concentraciones y 3 grupos control. CV= coeficiente de variación. Letras iguales en los promedios indican que no hubo diferencia significativa. (ANOVA y prueba Tuckey, 95% de confianza).

Cont. Tabla 7.

Parámetro Estadístico*	pH				Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)			
	30°C-17 ups		30°C-33 ups		30°C-17 ups		30°C-33 ups	
	0h	96h	0h	96h	0h	96h	0h	96h
Promedio	7.48 ^a	7.82 ^b	7.83 ^b	7.97 ^b	5.06 ^a	5.01 ^a	5.05 ^a	4.96 ^b
Desviación Estándar	0.14	0.37	0.11	0.22	0.15	0.34	0.25	0.38
CV (%)	1.98	4.71	1.50	2.76	2.93	6.73	5.02	7.63

Al utilizar el NaOH como disolvente de la sal de As₂O₃, en las primeras 12h el pH se incrementó en un promedio de 8.43 ± 0.33 (CV=3.98%), luego se mantuvo estable en un intervalo de 7-8 durante el resto de las pruebas. El valor de pH de los controles sin adición de NaOH y AH durante el inicio y final de las 96h, para todas las condiciones de temperatura-salinidad fue de 7.60 ± 0.18 (CV= 2.35%) y la solución stock de AH tuvo un pH= 8-8.3. Este valor aunque parece ilógico por ser una sustancia ácida tiene una explicación; hay que recordar que la definición operacional de AH se refiere a la fracción de alto peso molecular de las SH que son solubles en medio alcalino, pero insolubles en medio ácido (Stevenson, 1994); así en una solución acuosa,

el agua debido a sus propiedades ácido-base, funciona como una base frente a un ácido (como los AH), logrando su disolución en medio alcalino, así los grupos COOH y OH fenólicos de los AH donan su protón H^+ a los OH^- del agua, pues el agua experimenta una ligera ionización basado en la siguiente ecuación química: $H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$ (Chang, 2002), por lo que la presencia de OH^- en el medio hace que se registre un pH alcalino, como en el caso anterior. Ahora, en relación a estos cambios temporales de pH ligeramente alcalinos durante las primeras 12h de los bioensayos, se estima que no generaron un cambio importante en la forma química del As a la que se expusieron los organismos, y podemos considerar por los parámetros de pH y pE medidos en el medio salino de las diferentes condiciones experimentales que predominó la forma arsenical As^{5+} considerando los modelos teóricos existentes, asumiéndose para efectos del presente estudio que el As^{5+} fue la principal forma a la que estuvieron expuestos los juveniles de *L. vannamei* (Figs. 2 y 3; anexo vii). Se considero además que los diferentes escenarios de temperatura-salinidad no afectaron a la forma química y solubilidad del As^{5+} durante las pruebas toxicológicas.

Cambios de comportamiento (etológicos)

Durante el desarrollo de los bioensayos los juveniles presentaron cambios de comportamiento, mientras transcurrían las primeras 48h algunos organismos a las concentraciones más altas de exposición al As, independientemente de las condiciones de temperatura-salinidad, presentaron cambios natatorios y posteriormente mantuvieron una baja actividad de nado, manteniéndose en reposo durante el resto de las pruebas. Los controles por su parte mostraron una mayor actividad, nadando constantemente y de forma normal en las peceras.

En algunos individuos expuestos a las concentraciones más altas de As hubo casos de muda del exoesqueleto. Para explicar el porqué hubo casos de ecdisis aislados, esto pudiera deberse; como una posible consecuencia en la alteración de procesos biológicos que ocurren al incorporar el As, durante el proceso de ecdisis. Se conoce que el As una vez que ingresa a las células, se ha reconocido que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como parte del proceso de estrés oxidativo a nivel celular, una de esas especies reactivas es el superóxido (O_2^-) el cual está asociado con alteraciones en la señalización del ciclo celular y afecta procesos dependientes de calcio (Ca^{2+}) (Del Razo *et al.*, 2004), como podría ser la ecdisis. También se sabe que el As en estudios de toxicidad subcrónica induce el proceso de

muda en algunos crustáceos, así Fowler y Ünlü (1978) determinaron la bioacumulación y eliminación de As (radioisótopo ^{74}As) en el crustáceo *Lysmata seticaudata* expuesto por 16 días (tanto a 13 y 20°C). Estos autores observaron que los organismos comenzaban a mudar con más frecuencia, encontrando niveles elevados de As en exoesqueleto, seguido de tejido muscular y luego en vísceras (Fowler y Unlu, 1978). Es posible, entonces, que la incorporación de As durante las 96h de exposición en algunos juveniles de *L. vannamei* acelerará el proceso de ecdisis, como una respuesta de eliminación del metaloide a través de la exuvia, sin olvidar que algunos de los factores primordiales que afectan y regulan el ciclo de muda son por ejemplo; el fotoperiodo, la temperatura y estado nutricional (Díaz et al., 2003). Hay que aclarar que en el presente estudio las pruebas duraron solo 4 días (96h), y que las tasas de incorporación y eliminación del As son diferentes en estudios de toxicidad subcrónica, pero podría suponerse, en el presente estudio, que las tasas de incorporación y eliminación de As bajo el escenario de toxicidad aguda fueran mucho más elevadas a 30°C que a 20°C o 25°C en los juveniles expuestos, y como respuesta, estos trataran de eliminar el As mucho más rápido a través del proceso de ecdisis; lo anterior podría indicar que el metaloide As, a diferencia de los iones metálicos, induciría el proceso de ecdisis en crustáceos decápodos como *L. vannamei*. Otra posible opción es que el As podría alterar los procesos de control y regulación endocrina del proceso de muda, donde está involucrada la hormona inhibidora de la muda (MIH) aunque no se conocen los mecanismos específicos de alteración del As sobre la regulación hormonal en crustáceos; sin embargo, está reconocido que el As es considerado un disruptor endocrino en diversos vertebrados (mamíferos roedores), bloqueando los receptores de las hormonas glucocorticoides y los estrógenos inhibiendo sus funciones básicas y habría que considerar, además, que las estructuras de las hormonas de invertebrados y vertebrados podrían diferir estructuralmente (Georgescu et al., 2011; Iavicoli et al., 2009).

Peso promedio de los juveniles

Al inicio de los experimentos de toxicidad aguda, se observaron diferencias significativas entre los pesos promedio de los juveniles para las diferentes condiciones de temperatura-salinidad, esto se explica por las diferencias en edad de los organismos, por la variabilidad biológica intrínseca de los diferentes lotes y a las condiciones específicas de manejo previo de las postlarvas, sin embargo, el peso promedio de los juveniles se mantuvo dentro del intervalo de 0.5 a 1.5g (p. h.) requerido para realizar los bioensayos (Tabla 8).

Viendo en conjunto los pesos promedio de todos los grupos se observó que estuvieron dentro del intervalo propuesto de trabajo y se mantuvo la carga de biomasa entre 0.8 a 1g L⁻¹ de medio salino. En relación al peso entre tratamientos para un bioensayo, se desprende del análisis de varianza que no hubo diferencias significativas en peso en cada bioensayo, considerándose que todos los organismos se pueden caracterizar en intervalo similar de juveniles.

Tabla 8. Peso vivo (g; p. h.) y edad de los juveniles de *Litopenaeus vannamei* al inicio de todas las condiciones experimentales.

Combinación Temperatura-salinidad	Edad Juveniles PL(días)	Peso Promedio*	Desviación Estándar
(25°C-25ups)	PL120	0.51 ^B	0.14
(20°C-17ups)	PL174	0.71 ^A	0.26
(20°C-33ups)	PL188	0.89 ^C	0.35
(30°C-17ups)	PL114	0.54 ^{BD}	0.17
(30°C-33ups)	PL107	0.64 ^{AD}	0.20
	Total general	0.66	0.27

*Nota: El número de muestra fue de 144 y el total de 720. Letras iguales en los promedios indican que no hubo diferencia significativa (ANOVA y prueba Tuckey, 95% de confianza).

Concentraciones de AH referidos como COD en muestras de agua marina artificial e interacción fisicoquímica con el As disuelto a las diferentes condiciones experimentales

En la medición de la concentración de AH referidos como COD, se observó que en las concentraciones iniciales (0h) y finales (96h) de AH de todas las combinaciones de temperatura- salinidad experimentales hubo diferencias significativas (Tabla 9), atribuibles a una inmediata y fuerte tendencia de los AH comerciales a flocular, siendo más notorio a simple vista en los escenarios de alta temperatura-salinidad 30°C (17 y 33 ups) resultando en una menor concentración de AH; mientras en los escenarios de baja y en condiciones óptimas de crecimiento, las concentraciones de AH fueron más elevadas. Se observó que la tendencia general de los AH al transcurrir las 96h, en todas las condiciones de temperatura-salinidad fue disminuir su concentración respecto del valor inicial (Fig. 9).

Se sugiere por los resultados de COD, que las dos variables experimentales en conjunto (temperatura y salinidad) influyeron en la variación de la concentración de los AH, observándose diferencia significativa en las condiciones de 30°C comparadas con las de 20°C y 25°C; y también ante incrementos de salinidad a una misma temperatura, excepto para la condición de 30°C-17 ups y 30°C-33 ups a 96h donde no hubo diferencia (Tabla 9). Al respecto se sabe que la temperatura afecta la estructura molecular de los AH en solución formando estructuras micelares con carga negativa en su superficie, sin embargo, también el incremento de salinidad (fuerza iónica) o pH favorecen este tipo de estructuras (Gara, 2008; Conte y Piccolo, 2002; Warwick *et al.*, 2001; Engebretson y von Wandruszka, 1994).

Se resalta que la mayor concentración de COD inicial estuvo comprendida en la combinación experimental a 20°C-17 ups que fue de 87.80 ± 2.84 mgCOD L⁻¹ (43.74 ± 1.6 mgAH L⁻¹). La concentración de COD en el control 3 que incluyo AH (sin As) de cada condición experimental fue como sigue: 25°C-25 ups (0h: 80.8 ± 0.76 mgCOD L⁻¹ y a 96h: 55.6 ± 0.57 mgCOD L⁻¹), 20°C-17 ups (0h: 85.3 ± 1.52 mgCOD L⁻¹ y a 96h: 64 ± 1 mgCOD L⁻¹), 20°C-33 ups (0h: 82 ± 2 mgCOD L⁻¹ y a 96h: 61.6 ± 2.08 mgCOD L⁻¹), 30°C-17 ups (0h: 68.3 ± 1.5 mgCOD L⁻¹ y a 96h: 42.6 ± 2.51 mgCOD L⁻¹) y 30°C-33 ups (0h: 64.6 ± 1.52 mgCOD L⁻¹ y a 96h: 32.6 ± 3.21 mgCOD L⁻¹).

Tabla 9. Concentración de AH como COD durante las 0 y 96h de duración de los bioensayos de toxicidad aguda con As expuestas en juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

Temperatura-salinidad Tiempo (h)	(AH) medido como COD* (mg L ⁻¹)				
	20°C-17 ups	20°C-33 ups	25°C-25 ups	30°C-17 ups	30°C-33 ups
0	(43.74 ±1.6) 87.80 ±2.84 ^A	(40.79 ±1.2) 81.85 ±1.96 ^B	(40.87 ±1.0) 82.0 ±1.57 ^B	(34.73 ±1.3) 69.62 ±2.14 ^C	(32.25 ±0.57) 64.60 ±0.66 ^D
96	(30.49 ±1.9) 61.05 ±3.33 ^a	(27.72 ±2.55) 55.45 ±4.65 ^b	(28.69 ±3.7) 57.42 ±7.12 ^b	(19.68 ±1.6) 39.22 ±2.84 ^c	(15.49 ±2.5) 30.77 ±4.63 ^c

*Nota: Letras diferentes en COD indican diferencia estadísticamente significativa con 95% de confianza ($p < 0.05$) en relación al tiempo cero y 96h respectivamente. Se utilizo la prueba de la diferencia múltiple de medias de Tuckey. Número de muestras (n= 4). Los valores entre paréntesis de AH, se basaron en la curva de calibración del anexo v.

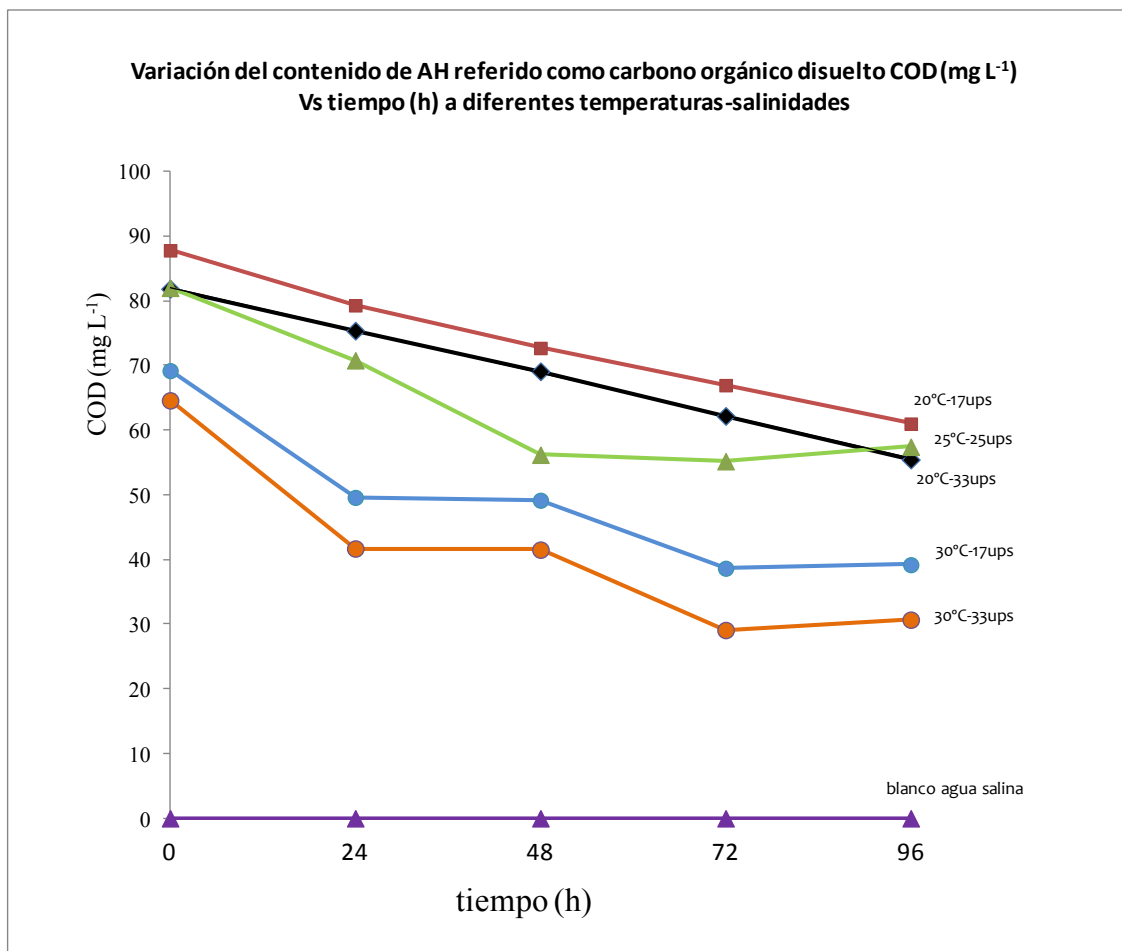


Figura 9. Variación de la concentración de AH, referido como COD (mg L^{-1}) en relación al tiempo (h) de exposición al As en juveniles de camarón a diferentes combinaciones de temperatura-salinidad.

La concentración nominal de AH se asumió de 50 mgAH L^{-1} y su concentración real equivalente como COD fue de $105.2 \text{ mgCOD L}^{-1}$ como se señala en la curva de calibración (Anexo v). Al observar los valores iniciales (oh) de COD (AH) durante las pruebas toxicológicas estos se mantuvieron por debajo del valor real equivalente a 50 mgAH L^{-1} , así en los diferentes escenarios de temperatura-salinidad experimentales la adición de AH real (oh) no se acercó al valor nominal propuesto, de hecho el promedio de la concentración real de AH al inicio de las pruebas para las cinco condiciones experimentales fue de $38.48 \text{ mgAH L}^{-1}$ (Tabla 9). Lo anterior podría deberse a la facilidad de floculación de los AH comerciales, la cual parece ser instantánea ante cambios de temperatura o salinidad del medio y también posiblemente a que los AH comerciales no son completamente de alta pureza (es decir grado QP, ACS, etc.) presentando probablemente cantidades importantes de ácidos fúlvicos y/o húmicos, que son las restantes fracciones de las sustancias húmicas, de las cuales la humina es conocido que

tiene una baja actividad para interactuar con elementos metálicos y otros compuestos (Stevenson, 1994).

Se sabe también que los AH comerciales no tienen una elevada pureza, estos en su forma de sal de sodio (Sigma Aldrich), tienen un origen terrestre y no marino-costero, generalmente son extraídos de carbón y en su composición presentan una variada distribución en las fracciones húmicas, en pesos moleculares y elevado contenido de cenizas (hasta un 31.21%), sin embargo estas cenizas no influyen en el contenido de carbono del producto (Harbour *et al.*, 2007; Malcom y MacCarthy, 1986). Una manera de conocer la pureza y calidad del producto de los AH comerciales es realizar previamente una caracterización química de las fracciones húmicas y el contenido neto de grupos funcionales, lo cual ayudaría en parte a predecir sus propiedades de unión con elementos tóxicos como el As.

Interacción AH y As

Se sugiere, en base a los resultados de AH como COD del presente estudio (Tabla 9 y Fig. 9) que la interacción molecular de los AH frente al As ante los escenarios de baja, óptimas y altas condiciones de temperatura-salinidad fue diferente, porque las concentraciones reales de AH no fueron semejantes entre sí al inicio de las pruebas en todas las condiciones experimentales y no se acercaron al valor nominal propuesto y en general este valor fue disminuyendo como ya se observó, además, de acuerdo a la literatura, existe una dependencia entre la estructura y funcionalidad de los AH en relación a la temperatura y fuerza iónica, entonces es posible que el As no estuviese en contacto con la misma cantidad de AH en cada condición experimental.

En cuanto a la forma molecular de los AH comerciales del presente estudio, podría esperarse de acuerdo a la literatura, que en un escenario de baja temperatura-salinidad (por ejemplo 20°C-17 ups) o menor fuerza iónica los AH adoptarán una estructura lineal y flexible (Gara, 2008; Warwick *et al.*, 2001; von Wandruzka, 2000) lo que pudo favorecer posiblemente que se mostraran más expuestos los grupos funcionales (COOH, OH) ocurriendo una mayor probabilidad de enlace con el oxianión de As⁺⁵. Mientras que en el caso de un aumento en temperatura y salinidad, como en el escenario de alta temperatura-salinidad (30°C-33 ups) los AH se plegarían sobre sí, adoptando una estructura micelar o globular de tamaño compacto presentando generalmente carga negativa en la superficie. Se conoce también que el tamaño molecular de los AH se incrementa con el incremento de la concentración de los mismos (Gara,

2008; Engebretson y von Wandruszka, 1994; Conte y Piccolo, 2002; von Wandruszka, 2000; Warwick *et al.*, 2001; Stevenson, 1994). Esto posiblemente atraería cationes, pero ocasionaría repulsiones con moléculas con carga negativa, como los oxianiones de As^{5+} , contribuyendo a una menor interacción AH-As en esas condiciones. Se ha demostrado experimentalmente la formación de estructuras micelares de AH comerciales en función del pH y la fuerza iónica a partir de estudios de microscopía, donde se encontró que la formación de pseudomicelas a pH= 4 es de tamaño pequeño, pero al aumentar el pH= 6-10 se pueden formar pseudomicelas grandes y pequeñas, además en presencia de algunos iones como Na^+ , Cl^- y Cu^{2+} aumenta el tamaño de los agregados y la capacidad de asociación entre AH y compuestos orgánicos (Gara, 2008; Gauthier *et al.*, 1986). Esto podría explicar la mayor floculación de manera visual de los AH en las condiciones de alta temperatura-salinidad, y además podría aumentar la carga negativa de la superficie de los agregados de AH generando una menor interacción AH-As.

Por otra parte es posible que el As^{5+} no se comporte como un típico ión metálico en solución y que probablemente sea difícil que se ligue frente a los AH comerciales de manera efectiva, debido a sus propiedades de elemento metaloide y porqué se sabe a partir de estudios fisicoquímicos que existe una baja afinidad para la formación de los complejos AH-As. Warwick *et al.* (2005) quienes calcularon las constantes de asociación (K_{cond}) en solución acuosa para AH y tres especies de As, entre estas As^{5+} , encontraron valores muy bajos de K_{cond} , sin embargo observaron que este valor y la formación de los complejos AH-As se favorecían con el aumento de pH y con la disminución de la fuerza iónica. Para estos estudios se asumió una estequiometría AH-As (1:1), temperatura 25°C, los autores señalan que la formación de los complejos As-AH tienden a ser débiles, que no existe un modelo de interacción entre los AH y los oxianiones como el As, además de que existe una gran complejidad para conocer la estequiometría a diferentes condiciones ambientales (Warwick *et al.*, 2005). Hay que recordar, además, que el As^{5+} se presenta en soluciones acuosas como una molécula oxianión del tipo $H_2AsO_4^-$, unido por enlaces covalentes a los átomos de oxígeno (Smedley y Kinniburgh, 2002; Ravenscroft *et al.*, 2009).

De lo anterior es posible que el As^{5+} no se ajuste completamente a los modelos teóricos de interacción para iones metálicos y AH como los propuestos por Baker y Khalili, (2007) y Manahan (2007) (Figs. 6a y b), sino que sería, así lo sugiero, posiblemente por interacciones momentáneas por puentes de hidrogeno (entre el H del oxianión de As^{5+} y los grupos

funcionales COOH y OH de los AH) las cuales podrían demostrarse mediante estudios con resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono (RMN ¹H y ¹³C).

Toxicidad del As en forma individual y en presencia de AH a diferentes escenarios de temperatura-salinidad sobre *L. vannamei*

De los resultados de toxicidad aguda del As⁵⁺ de manera individual sobre juveniles de *L. vannamei* a partir de un estudio previo, se observó que hubo algunas diferencias significativas en la toxicidad a las diferentes condiciones experimentales (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de CL₅₀-96h (promedio e intervalos de confianza) de As sin y con presencia de AH (38.4mg L⁻¹ valor real promedio) calculadas para juveniles de *Litopenaeus vannamei* a diferentes escenarios de temperatura-salinidad.

Condiciones experimentales (Temperatura-salinidad)	CL ₅₀ As + AH* (mg L ⁻¹)	CL ₅₀ As** (mg L ⁻¹)
(20°C-17 ups)	11.27 ^{B1} (9.67-12.94)	9.13 ^{A1} (7.70-10.71)
(20°C-33 ups)	8.38 ^{A1} (7.64-9.16)	6.23 ^{B2} (5.07-7.27)
(25°C-25 ups)	8.58 ^{A1} (7.60-9.57)	8.70 ^{AB1} (7.19-10.40)
(30°C-17 ups)	7.64 ^{A1} (6.80-8.58)	7.83 ^{AB1} (5.62-10.74)
(30°C-33 ups)	5.50 ^{C1} (3.44-6.69)	7.54 ^{AB1} (6.50-8.48)

*Letras diferentes indican en cada bioensayo (con y sin AH) diferencias estadísticamente significativas con 95% de confianza. Números diferentes indican en cada condición experimental (T-S) diferencias significativas por efecto de AH.

**CL₅₀-96h de As obtenidas a partir de un estudio previo (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013).

El As de manera individual fue más tóxico significativamente para los juveniles de *L. vannamei* en el escenario de 20°C-33 ups, en cambio fue menos tóxico en 20°C-17 ups y en el resto de las condiciones experimentales fue igualmente tóxico, incluidas las condiciones óptimas (Tabla 10). Estas diferencias de toxicidad a una temperatura por debajo del óptimo y ante cambios de salinidad por arriba y por debajo del punto isosmótico de crecimiento para los organismos, podrían deberse en parte a su asociación a los cambios en los patrones de regulación fisiológicos en los organismos expuestos (de los cuales se hablará más a detalle en la siguiente sección), en cambio, por los resultados obtenidos, en temperaturas por arriba de crecimiento de la especie a pesar de los cambios de salinidad en relación al punto isosmótico ya no se observaron diferencias en la toxicidad del As (Tabla 10). Esto puede deberse, a que en este escenario de alta temperatura, esta impondría un mayor efecto fisiológico sobre los organismos comparado con la salinidad, pues se sabe que la temperatura controla principalmente y desencadena mayores tasas en los procesos bioquímicos fisiológicos (Hill, 1980; Eckert *et al.*, 1990), uno de esos efectos sería favorecer la incorporación del metaloide en el organismo independientemente del patrón de osmorregulación que adoptarán en función de la salinidad del medio salino. Hay que mencionar que de acuerdo a la literatura, y para los fines de este estudio se considero 25°C-25 ups como las condiciones óptimas de crecimiento para la especie de camarón *L. vannamei* (Valdez *et al.*, 2008; Martínez, 1999). Los resultados sugieren que en ausencia de AH, la toxicidad del As⁵⁺ esta modulada por la salinidad pero solo en baja temperatura.

Al comparar la toxicidad del As en presencia de AH se encontraron diferencias significativas, primero se observó que al mantener la temperatura constante tanto a 20 como a 30°C ante un aumento de salinidad de 17 a 33 ups hubo una mayor toxicidad significativa (Tabla 10). Luego la condición más tóxica se dio a 30°C-33 ups y la condición menos tóxica fue a 20°C-17 ups, es decir por debajo de las condiciones óptimas de crecimiento mientras las demás condiciones permanecieron sin cambio significativo en la toxicidad del As, comparadas con las condiciones óptimas (Tabla 10). También podemos observar, a partir de los resultados obtenidos, que el efecto de reducción de la toxicidad fue el esperado en baja temperatura-salinidad, aunque se logro solo para una condición (20°C-17 ups), sin embargo, al observar los resultados la hipótesis propuesta se cumplió ya que el efecto de reducción de la toxicidad de los AH, como se

esperaba, fue disminuyendo conforme se incrementaron las variables temperatura-salinidad (Tabla 10).

Ahora al observar el efecto de reducción de la toxicidad del As sin y con presencia de AH, no se observaron diferencias significativas en todas las condiciones experimentales, excepto en una condición de baja temperatura 20°C-33 ups, donde, una vez más, la presencia de AH redujo la toxicidad del As, en cambio al incrementarse las condiciones experimentales este efecto va disminuyendo (Tabla 10, comparando ambas columnas), lo que reforzó, en cierto modo la hipótesis propuesta. De hecho la tendencia de los valores de CL_{50} -96h es disminuir conforme se incrementan la temperatura-salinidad experimental, es decir el As se vuelve más tóxico.

De los resultados anteriores, podemos relacionar el efecto de reducción de la toxicidad de los AH sobre el As a través de la interacción AH-As discutida en la sección anterior. No sin antes aclarar, como ya se mencionó en dicha sección, que al inicio de las pruebas de toxicidad la presencia de AH no fue la misma en cada condición experimental, aunque se adicionó una misma cantidad en todas las condiciones de temperatura-salinidad, los AH tuvieron una rápida floculación, no esperada, que estuvo en función de las condiciones de temperatura-salinidad establecidas al inicio de los experimentos, produciéndose así diferencias en la concentración real de AH al comenzar las pruebas. Es decir los AH fueron muy susceptibles de cambiar de fase disuelta a particulada. Aparte la tendencia general en todos los experimentos fue disminuir la concentración de AH durante el transcurso de las 96h de los bioensayos. Por lo que esto ocasiono en parte diferencias en la reducción de la toxicidad del As. Sin embargo, se sugiere, además que estas diferencias en la reducción de la toxicidad pudieron deberse en mayor parte al comportamiento fisicoquímico que exhibieron los AH, pues se sabe que estos pueden cambiar su estructura molecular y su actividad de ligarse frente a elementos metálicos en función del pH, temperatura y salinidad presentes en el medio acuoso. Así, retomando en parte la discusión de la sección anterior, podemos asociar que el efecto de reducción de la toxicidad del As frente a los AH en el escenario de baja temperatura-salinidad se debería a la conformación estructural desplegada y líneal que adoptan las moléculas de AH y donde sería posible una mayor interacción AH-As, es decir bajo esas condiciones los sitios activos de las moléculas de AH estarían más expuestos a ligarse con el As de la fase disuelta, en cambio, ante el incremento de dichas variables experimentales, las moléculas de AH tienden a agruparse

formando micelas con carga negativa en su superficie, lo que podría disminuir la interacción entre el As y los AH, en consecuencia habría una menor formación de los complejos AH-As y esto podría explicar la mayor toxicidad en los escenarios de mayor temperatura-salinidad.

Ahora comparando la reducción de la toxicidad del As frente a los AH en la especie de camarón *L. vannamei* con otras especies, no se han encontrado estudios semejantes, pero si se han encontrado algunas investigaciones que han comprobado una reducción en la toxicidad o acumulación de diversos elementos metálicos sobre organismos de agua dulce y marino costeros ante la presencia de SH o AH. Así se tiene, por ejemplo, que Jones y Huang (2003) evaluaron la toxicidad mediante la determinación de la EC_{50} (concentración efectiva letal que afecta al 50% de los sujetos de estudio), frente al efecto del As (0.5 , 1 y 5 mg L^{-1}) y de un pesticida (clorpirifos) en presencia de SH (2.1 , 4.2 y 42 mgC L^{-1}) extraídas de composta orgánica. Las pruebas toxicológicas fueron realizadas con una batería de bioensayos rápidos (5 y 15min) llamada Microtox® que incluyó a la bacteria *Vibrio fischeri* como organismo indicador de respuesta tóxica. Ellos obtuvieron una reducción de la toxicidad de 100% del pesticida y del metaloide al emplear 4.2 mgC L^{-1} y 2.1 mgC L^{-1} respecto de las pruebas previas sin presencia de SH. Las concentraciones que se utilizaron de SH del estudio de Jones y Huang (2003) fueron mucho menores a la que se emplearon en el presente estudio, además el origen de las SH provino de una composta orgánica, sin embargo el efecto de reducción de la toxicidad del As fue del 100% sobre el modelo biológico que experimentaron, lo que indica que la concentración y el origen o fuente de SH o de AH es muy importante para lograr una mejora en la reducción de la toxicidad del As, pues, como señalan Jones y Huang (2003), concentraciones elevadas de SH pueden interferir en la reducción de la toxicidad debido a asociaciones intramoleculares entre las moléculas de SH. Esto también ya lo han señalado Conte y Piccolo, (2002) que con el incremento de concentración de AH aumenta el tamaño molecular y la formación de micelas, con carga negativa en su superficie.

Por otra parte, algunos estudios como el de Stackhouse y Benson (1988) comprobaron que las fracciones de AH y AF pueden modificar la biodisponibilidad de algunos metales traza y en consecuencia alterar su toxicidad. Estos autores evaluaron con varias concentraciones de AH (0 , 0.5 , 5 y 50 mg L^{-1}) el efecto tóxico de Cd y Cr (hexavalente) en *Daphnia pulex* a varias horas de exposición (24, 48, 72 y 96h) y encontraron que a las 96h para Cr hexavalente, no había una diferencia significativa en las CL_{50} para cada concentración de AH, pero si la hubo a las 48h,

donde el Cr no se vio afectado en el porcentaje de ión libre durante las primeras horas de exposición, en cambio para Cd si hubo una diferencia muy significativa en la toxicidad a las 24, 48, 72 y 96h en presencia de 0.5, 5 y 50 mg L⁻¹ de AH, sobre *Daphnia pulex*, además el porcentaje de ión Cd libre disminuyó significativamente durante las primeras 20h de exposición. De lo anterior, y en comparación con el presente estudio, se observa que influye mucho la concentración inicial de AH a la cual se expongan con el elemento traza; que es probable que los AH tengan una mayor capacidad quelante para iones netamente metálicos y que los AH también pueden modificar significativamente la biodisponibilidad del metal, sin embargo en la presente investigación no se evaluó la biodisponibilidad del As⁵⁺ en los camarones *L. vannamei*, aunque es de mencionarse que ésta depende de la forma química y física del elemento traza en la que se encuentra en el medio y de la capacidad de los organismos para absorberlo o ingerirlo (Galán y Romero, 2008).

Por otro lado Glover y Wood (2004), analizaron la interacción de SH sobre la toxicidad del ión plata (Ag⁺) en *Daphnia magna* conocida como pulga de agua. El ión Ag⁺ a una concentración de 1µg L⁻¹, produce una toxicidad aguda a las 24h, y observaron que la presencia de SH en una concentración de 7 mg L⁻¹, disminuye la acumulación de plata significativamente, regula el balance de sodio, retornando a parámetros normales respecto de los controles. Por su parte Kamunde y MacPhail (2011), demostraron que el carbono orgánico disuelto en forma de AH modera la respuesta tóxica crónica de Cu, Cd y Zn a 28 días sobre: el crecimiento, el estrés oxidativo a nivel de membrana celular de la branquia, en la desregulación de los iones internos del plasma y en la bioacumulación en varios tejidos de la trucha arcoíris juvenil, de los siguientes metales traza: Cu, Cd y Zn, al utilizar una concentración de AH de 5 mg L⁻¹. Exponiéndolos a la mezcla de los tres metales, dichos autores observaron que en presencia de AH, las truchas crecían significativamente en comparación a las expuestas solo a la mezcla de los tres metales, y encontraron también que los AH ejercían una menor bioacumulación significativa en este orden Cd < Cu < Zn, también encontraron que los AH regulan la pérdida de iones Na⁺ del organismo hacia el medio al estar expuesto a la mezcla de los metales, principalmente por exposición de Cu, ya que este ión es sabido que induce pérdida de iones Na⁺ hasta en un 30% (Taylor et al., 2003). También encontraron que la formación -en branquias y en plasma- de malonaldehído (MDA) como bioindicador de estrés oxidativo, no fue significativa ante la mezcla de los tres metales y la presencia de los AH. De acuerdo a lo anterior y en relación al presente estudio con juveniles de camarón blanco, en la condición

menos tóxica del As frente a los AH a 20°C-17 ups (Tabla 10); posiblemente la presencia de AH aunque tendría que demostrarse experimentalmente, pudiera contribuir a restablecer y regular los niveles de Na⁺ que se perdían durante la exposición a una baja salinidad ya que los juveniles de camarón tienden a perder sales bajo esa condición, demostrándose posiblemente una de las multifunciones que tienen los AH en los ambientes acuáticos (Likens, 2009). Sin embargo en la presente investigación se asumió que los AH no ejercieron efectos fisiológicos importantes y/o deletéreos, no se evaluó la toxicidad crónica ni la moderación de la respuesta tóxica del As, tampoco el crecimiento ni bioacumulación en los juveniles de *L. vannamei*, por lo que queda una ventana muy grande para seguir investigando los efectos de los AH en la reducción de la toxicidad de los elementos traza como el As.

Observando la concentración de AH (1-10mgAH L⁻¹) utilizada en los estudios arriba mencionados y comparándola con la del presente estudio (38.4 mgAH L⁻¹), se puede ver que muchas de las pruebas que se han realizado con AH han sido en ambientes de agua dulce y requiriéndose concentraciones de AH menores a la utilizada en este trabajo. Casi no hay estudios para poder comparar donde se evalúen los AH en un ambiente costero estuarino-lagunar, donde los niveles de COD y AH suelen ser elevados en relación con la reducción de la toxicidad de metales traza como el As en estos ambientes.

Mecanismos de regulación fisiológica en los camarones *L. vannamei* frente a los diferentes escenarios de temperatura-salinidad y su asociación con la toxicidad del As y los AH

Se sabe que cambios ambientales (i. e. temperatura, salinidad, pH) modifican una serie de respuestas en los camarones peneidos de tipo biológico, fisiológico, bioquímico, inmunológico, reproductivo, etc. Los organismos ponen en funcionamiento complejas estrategias de regulación fisiológica en relación a las condiciones experimentales de temperatura-salinidad en que se encuentren (Pascual, 2000; Gómez, 2007; Carreño, 2009). Se conoce que la especie de camarón *L. vannamei*, presenta una serie de mecanismos de regulación osmótica para mantener su homeostasis estable dentro de los límites de tolerancia ante un cambio en la salinidad de su entorno; adoptando una regulación hiperosmótica (hiperregulan) en bajas salinidades y una regulación hipoosmótica (hiporregulan) en alta salinidad (Valdez *et al.*, 2008). Tal capacidad de osmoregulación, es el resultado de la presión osmótica entre los líquidos corporales de los organismos acuáticos (como la hemolinfa en crustáceos) y el agua

circundante del medio acuático (Lignot *et al.*, 2000). Así en relación a las diferentes condiciones de salinidad a las que fueron sometidos los juveniles en este estudio, podemos decir que a una baja salinidad por debajo del óptimo de crecimiento (17 ups), los juveniles hiperregulan debido a que en esta situación el medio externo tiene una menor concentración de iones a diferencia del medio interno de los organismos, presentándose una serie de dificultades, como un flujo neto de las sales del interior hacia el exterior de los organismos, por lo que tienden a perder sales o electrolitos por difusión, y experimentan un aumento de volumen celular por entrada de agua vía ósmosis. Para compensarlo, tienden a producir una mayor cantidad de orina diluida con el fin de eliminar el exceso de agua e incorporan sales por transporte activo, algunas de estas pueden ser NaCl, KCl, CaCl₂ a través de mecanismos especializados que reabsorben eficientemente cantidades mínimas de las sales del exterior a pesar de ir en contra de un gradiente de concentración, es conocido que en organismos acuáticos que viven en baja salinidad el transporte de Na⁺ al interior de las células depende de una ATPasa H⁺ electrogénica de protón, que transporta H⁺ activamente de las células hacia el medio exterior, esto genera una diferencia de potencial que hace ingresar los iones Na⁺ al interior celular (Eckert *et al.*, 1990).

Asociando lo anterior, es posible y se sugiere, que la reducción de la toxicidad del As + AH en un escenario de baja salinidad sobre los juveniles de camarón consista en una inhibición o disminución, a través de algún mecanismo desconocido, de la actividad de los transportadores de fosfato (Pi) los cuales como ya se mencionó es por donde ingresan los iones fosfato (H₂PO₄), pero también aprovechan estos canales para ingresar los iones de As⁵⁺ (H₂AsO₄) debido a su similitud química y en dicho proceso se expulsan simultáneamente 2 H⁺; puesto que lo primordial para el organismo es incorporar los escasos iones Na⁺ del exterior, la bomba ATPasa Na⁺ /K⁺ también disminuiría su actividad puesto que bombea Na⁺ al exterior y transporta K⁺ al interior celular, pero la actividad de la ATPasa H⁺ electrogénica aumentaría su actividad, y los protones del interior celular que se usarían en el ingreso del H₂PO₄ o del H₂AsO₄ serían mejor usados para generar el potencial de membrana necesario para hacer ingresar al Na⁺, aunque este supuesto requeriría una evidencia experimental; sin embargo otras explicaciones a esta situación de disminución de la toxicidad del As en baja salinidad sería el hecho experimental de que se obtuvo una mayor concentración de AH en 20°C-17 ups, lo cual pudo favorecer una mejor interacción molecular AH-As y además se conoce que la temperatura es un factor controlador de las tasas bioquímicas, de la permeabilidad de la

membrana ante procesos de incorporación-eliminación de sustancias diversas, siendo que una disminución de temperatura como en 20°C pudiera haber contribuido la velocidad de incorporación del As.

En cambio, cuando los juveniles de *L. vannamei* fueron sometidos a un escenario de mayor salinidad y temperatura, por ejemplo, arriba del punto isosmótico (30°C-33 ups) dadas estas condiciones ambientales los organismos hiporregulan su composición interna de solutos, como respuesta a la diferencia de concentraciones que hay entre el medio externo (donde hay una mayor concentración de iones) y los líquidos corporales (que tienen una menor concentración de iones intracelulares), bajo este escenario ocurre una pérdida de agua del interior celular hacia el exterior de los organismos vía ósmosis puesto que el agua fluye desde una solución hipoosmótica hacia una solución hiperosmótica (Campbell y Reece, 2007); los organismos sufren una deshidratación por lo que para contrarrestar este efecto, incorporan agua del medio externo (que presenta una mayor concentración de sales) a través del tracto digestivo o lo que sería parecido a beber agua salada, sin embargo el exceso de sales incorporadas deben ser eliminadas mediante transporte activo a nivel de la membrana celular en las branquias principalmente mediante la ATPasa Na^+/K^+ y del cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ y también a través de unas células especializadas llamadas células de cloruro que exportan iones Cl^- al medio exterior (Campbell y Reece, 2007; Eckert et al., 1990).

Así, relacionando lo anterior, se podría explicar la mayor toxicidad del As + AH en alta salinidad (30°C-33 ups), posiblemente habría una mayor incorporación del As durante la absorción de agua y sales por los juveniles de *L. vannamei* para compensar la deshidratación, suponiendo que hiporregularon se pudo incorporar As por absorción en branquias y por el tracto digestivo; también es posible que estuviese aumentada la actividad de los transportadores de fosfato ingresando tanto iones H_2PO_4 y H_2AsO_4 a diferencia del patrón de regulación en baja salinidad, en que posiblemente la actividad de los transportadores fue menor, sin embargo, la anterior especulación requeriría una evidencia experimental. Sin embargo la mayor toxicidad del As bajo estas condiciones (30°C-33 ups) también se puede explicar porque en esta combinación de temperatura-salinidad hubo la menor concentración de AH presentando además una mayor floculación durante las pruebas toxicológicas, esto posiblemente debió generar una menor interacción molecular entre los iones de As^{5+} y los AH, además de que, como se comento en secciones anteriores, los AH tienden a modificar su estructura molecular formando micelas con

menor capacidad de interacción con elementos metálicos. También la temperatura por arriba del óptimo de crecimiento pudo contribuir a que se incrementara la velocidad de incorporación y transporte del As^{5+} en los juveniles de camarón.

En las condiciones óptimas de crecimiento para los juveniles (25°C -25 ups), es posible suponer, que la tasa de incorporación del As^{5+} por transporte pasivo, así como la de excreción, se hayan mantenido semejantes en velocidad, mostrándose en los resultados que la toxicidad se mantuvo en un nivel intermedio en comparación con la condición menos tóxica (20°C -17 ups) y la más tóxica (30°C -33 ups) (Tabla 10). En las restantes condiciones de temperatura-salinidad en donde no hubo diferencias en la toxicidad del As como en 20°C -33 ups y 30°C -17 ups comparadas con las condiciones óptimas (Tabla 10); es posible que se debiera al efecto conjunto de ambas variables, donde el patrón de osmoregulación y la temperatura modularon equitativamente la incorporación del As en los organismos.

De los resultados obtenidos, se ha observado que la temperatura experimental y la salinidad junto con el patrón de osmoregulación que adoptaron los organismos pudieron influir en algún grado en las respuestas tóxicas obtenidas para el As en presencia de AH comerciales. Sin embargo no hay que olvidar que el escenario de temperatura-salinidad afecta también a la concentración de AH y a la interacción AH-As.

Cabe comentar finalmente que la temperatura y salinidad tienen gran importancia, independientemente de la presencia de un agente tóxico como el As, en la sobrevivencia, crecimiento y otras respuestas fisiológicas sobre los camarones peneidos, así en general, un cambio de salinidad por arriba del punto isosmótico genera un mayor gasto energético como lo han demostrado Valdez *et al.* (2008) en *L. vannamei* donde los organismos aclimatados y mantenidos en su punto isosmótico (26 ups) tuvieron un gasto metabólico de rutina de $208.2 \text{ J g}^{-1} \text{ día}^{-1}$, en cambio este valor aumentó a una salinidad de 32 ups con $264.0 \text{ J g}^{-1} \text{ día}^{-1}$. En cuanto a la temperatura, se presenta un aumento significativo en las tasas metabólicas y los requerimientos energéticos con el incremento de esta variable, Spanopoulos-Hernández *et al.* (2005), quienes obtuvieron el coeficiente térmico (Q_{10}) para la especie de camarón *L. stylirostris* este valor se incrementó 2.3 a 2.6 veces por cada incremento de 10°C , cuando sometieron al organismo a temperaturas desde 20 a 35°C y salinidades desde 20 a 30 ups. Es de mencionarse que el Q_{10} es una medida de la capacidad metabólica de los organismos y refleja

los ajustes energéticos relacionados a los requerimientos fisiológicos y enzimáticos cuando se da un incremento de temperatura y salinidad.

Comparación de la toxicidad del As en otros crustáceos

En lo que respecta a la toxicidad individual del As, Curtis *et al.* (1979), determinaron una CL_{50} -96h para el trisulfuro de arsénico (As_2S_3) en *Penaeus setiferus* (juveniles a 25 ups y 22°C), siendo la CL_{50} -96h de 40.6 mg As_2S_3 L⁻¹, equivalente a 12.36 mgAs L⁻¹ lo que resulta similar al presente estudio en *L. vannamei*. Por su parte Krishnaja *et al.* (1987), evaluaron la toxicidad aguda a 24, 48, 72 y 96h de varios metales tóxicos (Hg, Cd, As, Se y Pb) en el cangrejo *Scylla serrata* y encontraron una CL_{50} -96h de 17 ± 1.60 mgAs L⁻¹ valor menos tóxico a los obtenidos en el presente estudio; los autores también analizaron el hepatopáncreas a las 96h, encontrando que el As producía necrosis celular y formación e infiltración de hemocitos en regiones de tejido conectivo (Krishnaja *et al.*, 1987). En otras especies de crustáceos, como en el cangrejo *Crangon crangon* se ha visto que el As^{5+} comienza a ser tóxico a concentraciones por arriba de 25 mgAs L⁻¹, es decir el As^{5+} es menos tóxico para el cangrejo comparado con el camarón *L. vannamei*, también se ha observado que los individuos pequeños de cangrejo con pesos entre 0.5 a 0.29 g fueron menos tolerantes que los sujetos de talla mediana y grande (0.5 a 0.59 g y 0.8 a 0.89 g respectivamente) expuestos a una concentración de 50 mgAs L⁻¹ (Madsen, 1992). Madsen (1992) también investigó algunas respuestas bioquímicas importantes en los cangrejos expuestos al As, por ejemplo, el metabolismo de rutina disminuyó en relación directa a la talla de los organismos, las concentraciones de glucosa en hemolinfa, glucógeno en músculo y las de fosfato de adenilato se mantuvieron sin cambios significativos durante los experimentos con la exposición al arsenato (Madsen, 1992). También a partir de las investigaciones de Fowler y Ünlü (1978) con el radioisótopo ⁷⁴As en el crustáceo *Lysmata seticaudata*, se conoce que la acumulación del As cambia inversamente con la salinidad y que los tejidos que más incorporaron As fueron el exoesqueleto, seguido del tejido muscular y de las vísceras. Por su parte Forget *et al.* (1998), determinaron la CL_{50} de As^{5+} , en diferentes estadios de vida en el copépodo marino *Trigriopus brevicornis* a 35 ups y 20°C, con un pH= 7.7-8.14. En la etapa nauplio se obtuvo una CL_{50} de 10.9 µg L⁻¹ (8.9-12.9), en la etapa juvenil (copepoditos) fue de CL_{50} de 19.8µg L⁻¹ (17.8-21.8) y en hembras adultas grávidas en etapa reproductiva, fue de CL_{50} de 27.5 µg L⁻¹ (25.4-29.6), lo que indica de algún modo que la resistencia al As se va incrementando con la edad ó que por la mayor talla se incorpora más As. Además, en relación

al presente estudio, *L. vannamei* mostraría ser una especie con mayor tolerancia al As^{5+} que el copépodo marino, sin embargo sería más sensible que el cangrejo *Crangon crangon* y *Scylla serrata* y resultaría de similar sensibilidad a *P. setiferus*.

Sobre la importancia en conocer que variable tiene un mayor predominio sobre el efecto tóxico del As en organismos marinos se ha encontrado el trabajo de Bryant et al. (1985), quienes evaluaron el efecto de la temperatura, salinidad y diferentes concentraciones de As pentavalente en tres invertebrados estuarinos –el anfípodo *Corophium volutator*, el bivalvo *Macoma balthica* y el oligoqueto anélido *Tubifex costatus*- encontraron que la temperatura influye principalmente sobre la toxicidad del As. Así al evaluar el efecto de la temperatura (5, 10 y 15°C) y la salinidad (5 hasta 35ups) frente a diferentes niveles de As pentavalente (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 250, 500 y 1,000 mgAs L⁻¹) encontraron que al incrementar la temperatura dentro de un margen de aguas templadas, en todos los casos el tiempo medio de sobrevivencia LT₅₀ y la CL₅₀ disminuyeron significativamente para las tres especies, siendo mucho más sensible el anfípodo (crustáceo), seguido del bivalvo, mientras que el oligoqueto fue el más resistente; en cambio el incremento de salinidad no fue significativo para las tres especies, pues éstas provienen de ambientes estuarinos donde la salinidad fluctúa desde 4 hasta 32ups, así las tres especies presentaron mejores estrategias adaptativas ante cambios de salinidad y frente al contaminante. Estos resultados muestran que la toxicidad del As dependió de la temperatura y de la especie a la que se expuso el metaloide; en cambio en el presente estudio por los resultados obtenidos estos sugieren una mayor complejidad de interacciones, donde posiblemente fue la temperatura-salinidad y la estrategia de osmoregulación en alta y baja salinidad que adoptaron los juveniles de *L. vannamei* los que determinaron la toxicidad del As para las condiciones más y menos tóxicas en presencia de AH, sin olvidar el efecto conjunto de ambas variables sobre la concentración e interacción molecular AH-As.

VII. CONCLUSIONES

De las pruebas de toxicidad aguda con As en presencia de AH sobre juveniles de *Litopenaeus vannamei* se desprende que:

- Se logró determinar la CL_{50-96h} (e intervalos de confianza) de As^{5+} en presencia de AH comerciales (38.4 mgAH L^{-1} valor promedio) en los diferentes escenarios propuestos, siendo a 25°C -25 ups de 8.58 mgAs L^{-1} (7.60-9.57), a 20°C -17 ups de $11.27 \text{ mgAs L}^{-1}$ (9.67-12.94), a 20°C -33 ups de 8.38 mgAs L^{-1} (7.64-9.16), a 30°C -17 ups de 7.64 mgAs L^{-1} (6.80-8.58) y a 30°C -33 ups de 5.50 mgAs L^{-1} (3.45-6.69).
- La presencia de 38.4 mgAH L^{-1} logró reducir significativamente la toxicidad del As en el escenario de baja temperatura-salinidad (20°C -17 ups). En cambio al aumentar estas variables (30°C 33 ups) la reducción de la toxicidad fue en menor grado, debido posiblemente a una pérdida de la actividad para ligar al As.
- La condición menos tóxica frente al As en presencia de AH fue a 20°C -17 ups.
- La condición más letal frente al As en presencia de AH fue a 30°C -33 ups.
- En los escenarios de baja temperatura-salinidad en donde hubo mayor concentración de AH esta se relacionó con una menor toxicidad del As sobre juveniles, en cambio, a una mayor temperatura-salinidad en donde hubo una menor concentración de AH, se obtuvo una mayor toxicidad del metaloide.
- La toxicidad del As en ausencia de AH sobre los juveniles, parece estar modulada por la salinidad pero solo en una baja temperatura. En cambio la toxicidad del As en presencia de AH, parece ser más compleja y estar modulada por los siguientes efectos: la interacción AH-temperatura-salinidad y temperatura-salinidad-patrones de osmorregulación en los juveniles.

VIII. Recomendaciones

Con el fin de aclarar nuevas cuestiones e inquietudes que surgieron a partir del presente estudio respecto a la toxicidad del As frente a los AH sobre las postlarvas de *L. vannamei*, se sugiere seguir trabajando en:

- Elucidar el mecanismo de interacción molecular entre los AH, AF y los oxioaniones de As^{5+} y As^{3+} , a diferentes condiciones de pH, T y salinidad, calculando las constantes de formación de As-AH y mediante resonancia magnética nuclear (RMN de 1H y ^{13}C).
- Determinar la toxicidad subcrónica del As con y sin presencia de AH, probando varias concentraciones de AH sobre las postlarvas a las condiciones de prueba óptimas y subóptimas de temperatura-salinidad. Midiendo además parámetros como la ganancia de peso, el crecimiento semanal y la frecuencia de muda. Evaluando además, biodisponibilidad, grado de estrés oxidativo (mediante algún biomarcador como el malonaldehído y la actividad de algunas enzimas como la ATP-asa) y la bioenergética en presencia del metaloide.
- Determinar la principal forma de acumulación y excreción de As a partir de un estudio de toxicidad subcrónica, ya sea evaluando formación de metalotioneínas y el grado de biotransformación de As analizando la distribución de compuestos organoarsenicales en diferentes tejidos (hepatopáncreas, músculo, exoesqueleto).
- Determinar la especiación química del As, fracciones de As disuelto (+3 y +5) y As ligado a AH en solución a diferentes condiciones de temperatura y salinidad durante la exposición subcrónica, realizando el seguimiento desde el inicio hasta el final de las pruebas toxicológicas.
- Investigar los efectos bioquímicos y fisiológicos que ejercen los AH o las SH de manera individual sobre un modelo biológico como el camarón *L. vannamei*.

Dado que en los ambientes acuáticos, los contaminantes no se encuentran aislados, sino que están en interacción con otros y con el COD, sería recomendable ampliar la investigación a largo plazo sobre la toxicidad del As frente a otros metales y:

- Evaluar la reducción de la toxicidad en una especie modelo (como el camarón *L. vannamei*) a partir de la exposición de mezclas binarias, ternarias de metales (Hg, Cd, Ni, Al, Pb, Sn, etc.) y/o metaloides (As, Sb, B, Si, etc.) reconocidos como muy tóxicos frente a las SH a partir de diversas fuentes como: lixiviados de hojarasca de árboles de mangle (rojo, blanco y negro), lixiviados de composta casera, lixiviados de tierra agrícola y AH comerciales. Realizando además una caracterización fisicoquímica de los grupos funcionales y de las fracciones de AH, AF y humina que estén presentes.
- Evaluar la actividad aditiva, sinérgica o antagónica que podría tener el As en combinación con otros metales o metaloides, sobre la toxicidad en una especie modelo como las postlarvas de camarón *L. vannamei* dada una combinación de temperatura-salinidad.

Por otra parte, algunas investigaciones recientes sobre cambio climático y acidificación de los océanos, sugieren que puede ocurrir a corto y mediano (100 a 200 años) un incremento gradual en la liberación y especiación de los metales pesados; esto puede dar pie para:

- Investigar probables relaciones entre un aumento de la temperatura, y la acidificación (disminución de pH) de los ambientes costeros y la liberación de As u otros metales pesados y su efecto sobre los organismos costeros.

IX. Referencias bibliográficas

Abate G., Masini J. C. 2005. Influence of pH, ionic strength and humic acid on adsorption of Cd (II) and Pb (II) onto vermiculite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 262: 33–39.

Ahearn G. A., Mandal P. K. y Mandal A. 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*. 174:439-452.

Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A.L., 1992. Penaeid shrimp nutrition. En: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.). *Marine Shrimp Culture: principles and practice*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp. 535–568.

Alarcón C. M. O. 2009. Los elementos traza. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa ULA*. 4 (3): 107-124.

Albore A. Quintanilla B. del Razo L, Cebrian M. 1997. Arsénico. En: Albert L. A. (ed). *Introducción a la toxicología ambiental*. OPS, OMS, CPEHSPA. Metepec: 247-261.

Anderson T., Shifley L., Amarasiriwardena D., Siripinyanond A., Xing B. y Barnes M. R. 2001. Characterization of trace metals complexed to humic acids derived from agricultural soils, annelid compost, and sediment by Flow Field-Flow fractionation-Inductively coupled plasma-mass spectrometry (Flow FFF-ICP-MS). En: Ghabbour Elham A. y Davies Geoffrey. (Eds.). 2001. *Humic substances: structures, models and functions*. Royal Society of Chemistry. UK. 387p.

APHA, 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th edition. American Public Health Association, Washington, D.C., USA.

Aposhian H. V. 1989. Biochemical toxicology of arsenic. *Revision Biochemical Toxicology*. Elsevier New York/North Holland. 10: 265-299.

Arreola-Lizárraga J. A., Flores-Verdugo F. J. y Ortega-Rubio A. 2004. Structure and litterfall of an arid mangrove stand on the Gulf of California, México. *Aquatic Botany* 79:137-143.

Armienta H. M. A. y Rodríguez C. R. 2005. Metales y Metaloides. Estudio de Caso: Contaminación por Arsénico en el agua subterránea de Zimapán, Hidalgo; Problemática ambiental y enfoque metodológico. En: Jiménez B. y Marín L. 2005 (eds.), 2005. *El agua en México vista desde la academia*. Academia Mexicana de Ciencias, México D. F., 411p.

ATSDR, 2007. Hoja Informativa de Arsénico (CAS # 7440-38-2). Agency for toxic substances and disease registry. División de toxicología y medicina ambiental ToxFAQs. USA. 2p.

Baeza, Alejandro, 2004. Química Analítica I. Primera serie de problemas integrales "Formación de disoluciones". Facultad de Química. UNAM. México, 22p. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Serie_de_problemas_de_FORMACION_DE_SOLUCIONES_2_144.pdf

Báez-Ramírez. O. A., Prieto-García F. y Galán-Vidal C. A. 2004. Bioacumulación y daños genotóxicos en pez cebra *Danio rerio* por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo, México. *Ensayos en cortos plazos*. *Revista Aquatic* 21:62-70.

- Bagnyukova, T.V., Luzhna, L.I., Pogribny, I.P., Lushchak, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48: 658–665.
- Baker H. y Khalili F. 2007. Effects of pH and temperature on the interaction of Pb(II) with Azraq Humic acid studied with Schubert's ion exchange method. *Annals of Environmental Science* 1:35-44.
- Barrachina Carbonell A. A., Burló Carbonell F. M., Mataix Beneyto J. J. 1995. Arsénico en el sistema suelo-planta: significado ambiental. Universidad de Alicante, Servicio de Publicaciones. España. 96p.
- Barrento S., Marques A., Teixeira B., Carvalho M. L., Vaz-Pires P. y Nunes M. L. 2009. Accumulation of elements (S, As, Br, Sr, Cd, Hg, Pb) in two populations of *Cancer pagurus*: Ecological implications to human consumption. *Food and Chemical Toxicology* 47:150-156.
- Bittner M., 2007. Ecotoxicological aspects of humic substances. University Masaryk, Faculty of Science, Research Centre for Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Brno, Czech Republic, Doctoral Thesis Dissertation, 78p. Disponible en: http://is.muni.cz/th/15440/prif_d/Dizertace_Bittner.pdf
- Boggs S., Livermore D. Jr. y Seltz M. G. 1985. Humic substances in natural waters and their complexation with trace metals and radionuclides: a Review. Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois. The University of Chicago and Department of Energy. 110p.
- Botello A. V., Villanueva S. F., Díaz G. y Escobar-Briones, E. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Salina Cruz harbour and coastal areas, Oaxaca, México. *Marine Pollution Bulletin* 36(7):554-558.
- Burguera M. y Burguera J. L. 1997. Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. *Talanta* 44:1581-1604.
- Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., 2007. Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66: 178–187.
- Blodau C. Basiliiko N. y Moore T. R. 2004. Carbon turnover in peatland mesocosms exposed to different water table levels. *Biogeochemistry* 67:331-351.
- Brusca, R. C. y Brusca, G. J., 2005. *Invertebrados*, 2ª edición. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, XXVI+1005 pp. ISBN 0-87893-097-3.
- Bryant V., Newberry D.M., McLusky D. S. y Campbell R. 1985. Effect of temperature and salinity on the toxicity of arsenic to three estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*, *Tubifex costatus*). *Marine Ecology Progress Series* 24:129-137.
- Camacho Sánchez M. I. 2007. Bioconcentración y toxicidad de metales en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Revista de Toxicología* 24 (1): 14-17.
- Campbell N. A. y Reece J. B. 2007. *Biología*. 7ª ed. Edit. Médica Panamericana. Madrid, España. 1392p.
- Carbajal P. J. L. y Chavira M. D. 1985. La contaminación en los sistemas Lagunar-Estuarino de las costas Mexicanas. *Elementos* no. 10. Año 3. Vol. 2: 58-64.

Carreño Mejía Atzin. 2009. Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México D. F. Tesis de Maestría. 127p.

Capó Martí, M. A. 2007. Principios de ecotoxicología. diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Editorial TÉBAR, S. L. Madrid. España. 320p.

Castro de Esparza, M. L. 2006. Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud pública. International Congress Natural Arsenic in Groundwaters of Latin America-As 2006, México City, 20-24 jun., CEPIS-BS/SDE/PAHO 14p.

Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd51/arsenico-agua.pdf>

Chang, R. 2002. Química, 7ª ed. McGraw-Hill Interamericana Editores S. A. de C. V. México, D. F. 1004p.

Cervantes C. y Moreno S. R. 1999. Contaminación ambiental por metales pesados, impacto en los seres vivos. A. G. T. Editor S. A. México, D. F. 171p.

Cervantes, M. 2007. Conceptos fundamentales sobre ecosistemas acuáticos y su estado en México. En: Sánchez Óscar, Herzig Mónica, Peters Eduardo, Márquez-Huitzil Roberto y Zambrano Luis. 2007. Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México. Instituto Nacional de Ecología. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, (INE-SEMARNAT). México D. F., 297p.

CICLOPLAFEST, 2004. Catálogo de plaguicidas. Secretaria de Salud. Sagarpa. Semarnat y Secretaría de Economía. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cofepris/bv/libros/l45.zip>

Cifuentes Lemus J. L., Torres-García M. P. y Frías M. M. 1997. El Océano y sus recursos VII. Flujos de energía en el mar: Reproducción y migraciones, Cap. X. Ciclos Reproductivos. (2ed). La Ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica S. A. de C. V. México D. F., Disponible en:

http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/063/htm/sec_14.html

Conte P. y Piccolo A. 2002. Effect of concentration on the self-assembling of dissolved humic substances. *Developments in Soil Science* (28A): 409-417.

Contreras F. 1985. Las lagunas costeras mexicanas. Centro de Ecodesarrollo, Secretaria de Pesca, México, D. F., 253p.

CONAPESCA, 2009. Anuario estadístico de acuacultura y pesca. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Mazatlán, Sinaloa, México. 311p.

Cuesta A. 1994. Aplicación a suelos calizos de fertilizantes fosforados en combinación con ácidos húmicos. Tesis Doctoral. Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Universidad de Alicante. Alicante, España. 150p.

Curtis M. W., Copeland T. L. y Ward C. H. 1979. Acute Toxicity of 12 Industrial Chemicals to freshwater and saltwater organisms. *Water Research* 13: 137-141.

Chavira M. D. 2008. Terminal multimodal y de contenedores riberas del Pantepec, puerto de Tuxpan, Veracruz. Resumen ejecutivo de la manifestación de impacto ambiental. Modalidad regional. 124p. Disponible en:

<http://sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/ver/resumenes/2008/30VE2008V0034.pdf>

- Clark, R. B. 1992. *Marine Pollution* (3ª ed). Clarendon Press Oxford. New York, USA. 182p.
- Clowes L. A., Francesconi K. A., 2004. Uptake and elimination of arsenobetaine by the mussel *Mytilus edulis* is related to salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology: CBP*. 137C (1): 35-42.
- De la Lanza E. G., 1990. Algunos conceptos sobre Hidrología y calidad del agua. En: De la Lanza E. G. y Arredondo F. J. L. 1990. *La Acuicultura en México: de los conceptos a la producción*. Instituto de Biología, UNAM, 315p.
- De la Lanza E. G., Alcocer D. J., Moreno R. J. L. y Hernández P. S. 2008. Análisis químico-biológico para determinar el estatus trófico de la Laguna de Tres Palos, Guerrero, México. *Hidrobiológica* 18(1):21-30.
- Del Razo L. M., Arellano M. A., Cebrián M. E. 1990. The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of Northern Mexico. *Environmental Pollution* 64:143-153.
- Del Razo L. M., Quintanilla-Vega B., Albores A. 2004. Arsénico. Cap. 16, 295-308p. En: *Toxicología Ambiental*, Albert L. A. (ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México, 455p.
- Díaz A. C., Petriella A. M., Fenucci J. L. 2003. Ciclo de muda y reproducción de la población del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea, penaeoidea) de mar de plata. *Ciencias Marinas* 29(3): 343-355.
- Diniz M. S., Santos H. M., Costa P. M., Peres I., Costa M. H., Alves S., Capelo-Martínez J. L. 2008. Effects of exposure to arsenic in *Corbicula fluminea*: Evaluation of the histological, histochemical and biochemical responses. *Ciencias Marinas* 34 (3): 307-316.
- Dominy W. G., Obaldo L. G., Terpstra J. C. y Behnke K. 1998. Does size matter? *International aquafeed*. The international Magazine for Aquaculture Feeds and feeding. Ene/Fe. 29-32p.
- Eckert R., Randall D. y Augustine G. 1990. *Fisiología animal*. Interamericana-McGraw-Hill. Mexico. 790p.
- Eisler R. 1988. Arsenic hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Contaminant Hazards Reviews*. No. 12. U.S. Fish and Wildlife Service. Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, MD 20708. Biological Report 85 (1.12).
- Engelbreton R. R. y R. Von Wandruszka. 1994. Microorganization in dissolved humic acids. *Environmental Science and Technology*, 28: 1934 - 1941.
- Ephraim J. H. y Allard B. 1997. Metal ion binding by humic substances. Chapter IV. En: Grenthe Ingmar y Allard Bert, 1997. *Modelling in aquatic chemistry*. OECD Nuclear Energy Agency. 724p.
- Espina, S. y Vanegas C. 2005. Ecofisiología y contaminación p. 53-78. En: Botello, A. V., J. Rendon von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández, 2005. *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. México. 696p.
- FAO. 2010a. Global study of shrimp fisheries. By Gillett R. Consultor de FAO. Fisheries Technical Paper 475. Rome, Italy, 386p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i0300s/i0300s00.htm>

FAO, 2010b. Hoja informativa *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Programa de información de especies acuáticas. Departamento de Pesca y Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Disponible en:
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es

Ferguson J. F. y Gavis J. 1972. A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water Research* 6:1259-1274.

Fernández-Luna, I. 1998. Enzymes digestives, croissance et aquaculture des crevettes *Penaeus schmitti* et *Penaeus notialis*. These de Docteur du museum national d'histoire naturelle. France. 187pp.

Forget J., Pavillon J. F., Menasria M. R. y Bocquené G. 1998. Mortality and LC₅₀ values for several stages of the marine copepod *Trigriopus brevicornis* (Müller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the Pesticides Atrazine, Carbofuran, Dichlorvos, and Malathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40:239-244.

Foroughbakhch P., Céspedes C. A. E., Alvarado V. M. A., Núñez G. A., Badii H. M. 2004. Aspectos ecológicos de los manglares y su potencial como fitorremediadores en el Golfo de México. *Ciencia UANL. Abril-junio, vol. VII (2): 203-208.*

Fowler Scott W. y Ünlü Yaşar M. 1978. Factors affecting bioaccumulation and elimination of arsenic in the shrimp *Lysmata seticaudata*. *Chemosphere* 9:711-720.

Flora S. J. S. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine* 51:257-281.

Flores Baca B. 2010. Tendencia Físicoquímica y estado trófico de la laguna “El Yucateco”, Tabasco de 2003 a 2009. Tesis maestría. Instituto Biología. UNAM, 94p.

Flores-Verdugo F., González-Farías F., Ramírez-Flores O., Amezcua-Linares F., Yañez-Arancibia A., Alvarez-Rubio M., Day Jr. J. W. 1990. Mangrove ecology, aquatic primary productivity, and fish community dynamics in the Teacapán-Agua Brava Lagoon-Estuarine System (Mexican Pacific). *Estuaries* 13(2):219-230.

Galán H. E. y Romero B. A. 2008. Contaminación de Suelos por metales pesados. *Macla Revista de la Sociedad Española de Mineralogía. (10):48-60.*

Galindo G., Fernández-Turiel. J. L., Parada M. A., Torrente D. G. (editores). 2005. Arsénico en aguas: origen, movilidad y tratamiento. II Seminario Hispano-Latinoamericano sobre temas actuales de hidrología subterránea. IV Congreso Hidrogeológico Argentino, Río Cuarto, 25 al 28 octubre 2005. 182p.

Gara P. M. D. 2008. Extracción y caracterización de sustancias húmicas y su empleo en procesos fotoquímicos de interés ambiental. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Depto. de Química. Tesis doctoral. 184p.

Galvão L. A. C. y Corey G. 1987. Arsénico. Serie Vigilancia 3. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud. OMS. Metepec, México, 70p.

Gauthier T. D., E. C. Shane, W. F. Guerin, W. R. Seitz y C. L. Grant. 1986. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology*, 20: 1162 - 1166.

- Georgescu B., Georgescu C., Dărăban S., Bouaru A., Pașcalău S. 2011. Heavy metals acting as endocrine disrupters. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 44 (2):89-93.
- Goldberg S. y Glaubig R. A. 1988. Anion sorption on a calcareous, montmorillonitic soil-Arsenic. *Soil Science American Journal* 52:1297-1300.
- Gómez F. R. M. 2007. Comparación del metabolismo respiratorio de juveniles de tres especies de peneidos. Análisis del crecimiento, sobrevivencia y requerimientos de energía de *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) bajo condiciones de laboratorio. Facultad de Ciencias. UNAM. México D. F. Tesis de Maestría. 59p.
- Gómez Lara, J. M. C. y Flores R. R. 2003. El fascinante mundo del manglar. Universidad de Quintana Roo, Programa de Manejo Integrado de Recursos Costeros. Secretaría de Marina Armada de México, IV Sector Naval Militar de Chetumal, Quintana Roo, México. 40p. il.
- González Fariás F. A. 1985. Importancia Ecológica de la materia orgánica y su biodegradación en el estero El Verde, Sinaloa, México. Tesis Doctoral. ICMYL-Mazatlán, UNAM, 171p.
- González-Fariás, F. y Mee L. D., 1988. Effect of mangrove humic-like substances on biodegradation rate of detritus. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 119(1):1-13.
- González Lozano M. C., Méndez-Rodríguez L. C., Maeda-Martínez A. M., Murugan G. y Vázquez-Botello A. 2010. Evaluation of toxicity of polluted marine sediments from Bahía Salina Cruz, México. *Journal of Experimental Science and Health Part A*.45:121-127.
- Gordon M. S. 1979. Fisiología Animal. Principios y adaptaciones al medio ambiente. Compañía Editorial Continental S. A., México, 747p.
- Goessler W. y Kuehnelt D. 2002. Analytical Methods for the determination of Arsenic and Arsenic compounds in the environment. En: Frankenberger, Jr. W. T. (ed.). Environmental Chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, Inc. New York, U. S. A. 27-49p.
- Glover C. N. y Wood C. M. 2004. Physiological interactions of silver and humic substances in *Daphnia magna*: effects on reproduction and silver accumulation following an acute silver challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139: 273–280.
- Hair M. E. y Bassett C. R. 1973. Dissolved and particulate humic acids in an East Coast Estuary. *Estuarine and Coastal Marine Science* 1:107-111.
- Harbour P. J., Dixon D. R., Scales P. J. 2007. The role of natural organic matter in suspension stability 1. Electrokinetic-rheology relations ships. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 295: 38-48.
- Harvey G. R., Boran D. A., Chesal L. A. y Tokar J. M. 1983. The structure of marine fulvic and humic acids. *Marine Chemistry*, 12:119-132.
- Hayes, M.H.B., MacCarthy, B., Malcolm, R.L., Swift, S.R. (eds.) 1989. Humic substances II, John Wiley & Sons, Ltd, 764 p.

- Hill R. W. 1980. Fisiología animal comparada, un enfoque ambiental. Ed. Reverte, Barcelona, España, 901p.
- Imai D., Dabwan A. H. A., Kaneco S., Katsumata H., Suzuki T., Kato T. y Ohta K. 2009. Degradation of marine humics acids by ozone-initiated radical reactions. *Chemical Engineering Journal* 148:336-341.
- Iavicoli I., Fontana L. and Bergamaschi A. 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of Toxicological Environmental Health* 12(3):206-23
- Jones K. D. y Huang Wi-Hao. 2003. Evaluation of toxicity of the pesticides, chlorpyrifos and arsenic, in the presence of compost humic substances in aqueous systems. *Journal of Hazardous Materials B*103:93-105.
- Kamunde C. y MacPhail R. 2011. Effect of humic acid during concurrent chronic waterborne exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:259-269.
- Keskitalo J. y Eloranta P, (eds). 1999. Limnology of humic lakes. Leiden: Backhuys Publishers. p. 284.
- Kirby J. y Maher W. 2002. Tissue accumulation and distribution of arsenic compounds in three marine fish species: relationship to trophic position. *Applied Organometallic Chemistry* 16:108-115.
- Kononova, M. M. 1966. Soil Organic Matter. Pergamon Press, Oxford, 450 p.
- Krishnaja A. P., Rege M. S., Joshi A. G. 1987. Toxic effects of certain heavy metals (Hg, Cd, Pb, As and Se) on the intertidal Crab *Scylla serrata*. *Marine Environmental Research* 21:109-119.
- Leal Acosta M.L. Shumilin E., Mirlean N., Sapozhnikov D. y Gordev V. 2010. Arsenic and Mercury contamination of sediments of geothermal springs, Mangrove lagoon and the Santispac Bight, Bahía Concepción, Baja California Península. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology* 85:609-613.
- Le C. X. 2002. Arsenic speciation in the environment and humans. En: Frankenberger, Jr. W. T. (ed.). *Environmental Chemistry of Arsenic*. Marcel Dekker, Inc. New York, U. S. A. 27-49p.
- Libes, S.M. 1992. An Introduction to Marine Biogeochemistry. John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 734 pp.
- Lignot J. H., Spanings-Pierrot C. y Charmantier G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191:209-245.
- Likens G. E. 2009. Encyclopedia of Inland Waters Vol. 1, 2 y 3. Elsevier, Amsterdam, 2500p.
- Liu Y., Guyton K. Z., Gorospe M., Xu Q., Lee J. C. y Holbrook N. J. 1996. Differential activation of ERK, JNK/SAPK and p38/CSBP/RK MAP kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Radical Biology & Medicine* 21:771-781.
- López G. M. A. 1995. Desarrollo de Métodos Analíticos para la determinación de seis especies químicas de Arsénico, en muestras medioambientales y orina, mediante acoplamiento: Cromatografía iónica de alta resolución-horno microondas-generación de hidruros-espectroscopía de absorción atómica. Tesis Doctoral. Depto. de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid, España, 239p.

- Lucena A., Leonardi G., Pichardo G. y Farci G. 2006. Sobrevivencia de las larvas de camarón a baja salinidad. *Educare* vol.10 (1). Sin paginación. Disponible en: <http://revistas.upel.edu.ve/index.php/educare/article/view/120>
- Madsen K. N. 1992. Effects of arsenic on survival and metabolism of *Crangon crangon*. *Marine Biology* 113: 37-44.
- Malcolm R. L., MacCarthy P. 1986. Limitations in the use of commercial Humic Acids in eater and soil research. *Environmental Science Technology* 20(9): 904-911.
- Manahan, S. E. 2007. Introducción a la química ambiental. Reverte Ediciones S. A. de C. V., México, 725p.
- Mandal B. K. y Suzuki K. T. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58: 201-235.
- Mantoura R. F. C., Dickson A. y Riley J. P. 1978. The complexation of metals with humic materials in natural waters. *Estuarine and Coastal Marine Science*. 6:387-408.
- Martínez C. L. R. 1999. Cultivo de camarones peneidos, principios y prácticas. AGT EDITOR, S. A. México, 301p.
- Mastrángelo M., Topalián M., Du Mortier C., Fernández C. 2005. Coeficientes de partición de hidrocarburos aromáticos policíclicos con sustancias húmicas: un método simple para su determinación. *Revista de Toxicología* 22:169-174.
- Mee, L. D. 1978. Coastal lagoons. En: Riley J. P. y Chester R. (eds). *Chemical Oceanography*. v. 7, 2nd Edition. Academic Press, London. xvi + 508p.
- Meharg A. A. y Hartley-Whitaker J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* 154:29-43.
- Moreno Arbeláez. D. P. y Ramírez Restrepo. J. J. 2010. Variación temporal de la condición trófica del Lago del Parque Norte, Medellín (Antioquia), Colombia. *Actualidades Biológicas* 92:75-87.
- Moreno Jiménez E. 2010. Recuperación de suelos mineros contaminados con arsénico mediante fitotecnologías. Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid, España, 208p.
- McKnight D. M. y Aiken G. R. 1998. Sources and age of aquatic humus. En: *Aquatic Humic Substances*. Hessen D. O. y Tranvik L. J. (Eds.). Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Musani Lj., Valenta P., Nürnberg H. W., Konrad Z. y Branica M. 1980. On the chelation of toxic trace metals by humic acid of marine origin. *Estuarine and Coastal Marine Science* 2: 639-649.
- Navarrete A. J. y Oliva-Rivera J. J. 2002. Litter production of *Rhizophora mangle* at Bacalar Chico, Southern Quintana Roo, México. *Universidad y Ciencia*, Vol.18 (36):79-86.
- Nixón S. W. 1981. Remineralization and nutrient cycling in coastal marine ecosystems. En: Nelson B. J. y Cronin L. E. (eds). *Estuaries and Nutrients*. Humana Press, Nueva Jersey, pp. 111-138.
- Nriagu J. O. 1993. Metales en sistemas biológicos. En: Mas A. y Azcue J. M. 1993. *Metales en sistemas biológicos*. Promociones y Publicaciones Universitarias S. A. Barcelona, España, 324p.

Ocampo V. L. 2000. Energía metabolizable y eficiencia neta de crecimiento bajo el efecto de variaciones medio ambientales en el camarón. Pp 187-201. En: Civera-Cerecedo R., Pérez-Estrada C. J., Ricque-Marie D y Cruz-Suárez L. E. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C. S., México.

Ohrel Jr. R. L. y Register K. M. 2006. Volunteer Estuary monitoring a methods manual. Second edition. EPA. U.S. 396p.

Ortiz Pérez M. A. y De la Lanza E. G. 2006. Diferenciación del espacio costero de México: un inventario regional. Instituto de Geografía. UNAM. México D. F., 138p.

Páez-Osuna F. y Frías-Espericueta M. G. 2001. Bioacumulación, distribución y efectos de los metales pesados en los peneidos. En: Páez-Osuna Federico. (comp.) Camaronicultura y Medio Ambiente (versión 1.0 Portable Document Format), [CD-ROM]. (Octubre, 2001). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México, 517p.

Panikkar N. K. 1968. Osmotic behavior of shrimps and prawns in relation to their biology and culture. *FAO Fisheries Report*. 57:527-538.

Pantaleón-López B., Aceves G. y Castellanos I. A. 2005. Distribución y abundancia del zooplancton del complejo lagunar Chacahua-La Pastoría, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 76:63-70.

Pascual J. M. 2000. Caracterización fisiológica e inmunológica de una población de machos adultos del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Linneo, 1767): línea base y efecto del estrés térmico. Facultad de Ciencias. UNAM. México D. F. Tesis de Maestría. 77p.

Perminova I. V. y Hatfield K. 2005. Remediation chemistry of humic substances: theory and implications for technology. En: Perminova Irina V., Hatfield K. y Hertkorn N. (Eds.). 2005. Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences-Vol. 52. Russia. Springer. 506p.

Pierzynski, G., J. Sims, and G. Vance, 1994. *Soils and Environmental Quality*. Lewis Pub., Boca Raton, FL.

Poutanen E. L. 1986. Characterization of humic and fulvic acids isolated from Baltic Sea sediments using ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance spectra. *Organic Geochemistry* 9 (4): 163-170.

Prieto-García F., Báez-Ramírez O. A., Scoot W., Gaytán-Oyarzún y Zúñiga E. A. 2006. Acumulación, toxicidad y teratogénesis provocada por presencia de arsénico en aguas en el pez cebra *Danio rerio*. *Revista Aquatic* 24:72-85.

Rainbow P. S., Malik I. y O'Brien P. 1993. Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolve zinc and cadmium by the amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*. *Aquatic Toxicology* 25:15-30.

Ravenscroft P., Brammer H. y Richards K. 2009. Arsenic Pollution, A *Global Synthesis*. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Ltd. U.K. 588p.

Re A. D., Díaz F., Sierra E. y Gómez-Jiménez S. 2004. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) Expuesto a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad. *Ciencias Marinas* 30(3):443-453.

Reyes-Gil R. E. 1999. Las metalotioninas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. *Interciencia* 24(6):366-371.

Rodrigues A., Brito A., Janknecht P., Proença M. F. y Nogueira R. 2009. Quantification of humic acids in surface water: effects of divalent cations, pH, and filtration. *Journal of Environmental Monitoring*. 11: 377-382.

Rodrigues S. C. y Bianchini A. 2007. Extraction and concentration of freshwater-and seawater-derived dissolved organic matter for use in aquatic toxicology studies. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 2(3): 275-281.

Rodríguez-Meza G. D., Shumilin E., Sapozhnikov D., Méndez-Rodríguez L., Acosta-Vargas B. 2009. Evaluación geoquímica de elementos mayoritarios y oligoelementos en los sedimentos de Bahía Concepción (B. C. S., México). *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 61(1):57-72.

Roldan P. G. A. y Ramírez R. J. J. 2008. Fundamentos de Limnología tropical (2ed.). Universidad de Antioquía, Bogotá, Colombia. 440p.

Romero F. M., Armienta M. A. y Carrillo-Chavez A. 2004. Arsenic sorption by carbonate-rich aquifer material, a control on arsenic mobility at Zimapán, México. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47:1-13.

Santamaría D. S. 2009. Conversión de dietas con proteína animal y vegetal en crecimiento supervivencia y balance bioenergético de *Litopenaeus vannamei*. Facultad de Ciencias. UNAM. México D. F. Tesis de Licenciatura, 44p.

Seok, S-H., Baek, M-W., Lee, H-Y., Kim, D-J., Na, Y-R., Noh, K-J., Park, S-H., Lee, H-K., Lee, B-H., Ryu, D-Y., Park, J-H., 2007. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicology In Vitro* 21: 870-877.

Simeoni M. A. y Hostetler P. B. 2006. Humic substances and arsenic in groundwater. En: Naidu R., Smith E. Owen G, Bhattacharya P. y Nadebaum P. (eds.). *Managing Arsenic in the Environment. From soil to human health*. CSIRO Publishing, Australia, 672p.

Soto-Jiménez, M. F. 2011. Transferencia de elementos traza en tramas tróficas acuáticas. *Hidrobiológica* 21(3): 239-248.

Scott-Fordsmand, J. J., y Bruus Pedersen, M. (1995). Quality criteria for selected inorganic compounds, working report from the Ministry of Environment No. 48, DK.

Schnitzer, M. 1978. Humic substances: chemistry and reactions. En: Schnitzer M. y Khan S. U. (eds.) 1978. *Soils Organic Matter*. Elsevier, New York. U. S. A. 319p.

Schlautman M. A. y J. J. Morgan. 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology*, 27: 961 - 969.

Schinitman, N. I. 2004. Metales pesados, ambiente y salud. Ecoportal.net, Buenos Aires. [http:// www.ecoportal.net/content/view/full/37429](http://www.ecoportal.net/content/view/full/37429)

Shumilin E., Páez-Osuna F., Green-Ruíz C., Sapozhnikov D., Rodríguez-Meza G. D., Godínez-Orta L. 2001. Arsenic, Antimony, Selenium and other trace elements in sediments of the La Paz Lagoon, Peninsula of Baja California, México. *Marine Pollution Bulletin* 42(3):174-178.

Shumilin E., Rodríguez-Meza G. D., Sapozhnikov D., Lutsarev S., Murrillo de Nava J. 2005. Arsenic concentrations in the surface sediments of the Magdalena-Almejas Lagoon complex, Baja California Peninsula, Mexico. *Bulletin of Environmental and Contamination* 74:493-500.

Smaal A. C. y Hass H. A., 1997. Seston dynamics and food availability on mussel and cicle beds. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 45: 247–259.

Smedley P.L. y Kinniburgh D. G. 2002. A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 17:517-568.

Spanopoulos-Hernández M., Martínez-Palacios C. A., Vanegas-Pérez R. C., Rosas C. y Ross L. G. 2005. The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juveniles shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture* 244:341-348.

Sprague J. B. y Fogels A. 1977. Wacth the Y in bioassay. En: Proceedings 3rd Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, Nova Scotia, November 2-3, 1976, EPS-5-AR-77-1, Halifax, Canada, pp. 107-118.

Disponible en: http://www.atw.ca/site_pages/Past%20Proceedings/Proceedings1976.PDF

Stackhouse A. R. y Benson W. H. 1988. The influence of humic acid on the toxicity and bioavailability of selected trace metals. *Aquatic Toxicology* 13:99-108.

Steinberg C. E. W. ,Kamara S. ,Yu V.P., Manusadžianas L., Karasyova T. A., Timofeyev M. A., Jie Z., Paul A., Meinelt T., Farjalla Vinicius F., Matsuo A. Y. O., Burnison B. K. y Menzel R. 2006. Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level?. *Freshwater Biology* 51:1189-1210.

Steinberg C. E. W. Meinelt T., Timofeyev M. A., Bittner M. y Menzel R. 2008. Humic substances (review series). Part 2: interactions with organisms. *Environmental Science Pollution Research* 15(2):128-135.

Stevenson F.J. 1994. Humus chemistry. genesis, composition, reactions. John Wiley and Sons. New York. 443p.

Suhett A.L., MacCord F., Amado A.M., Farjalla V.F. y Esteves F.A. (2004) Photodegradation of dissolved organic carbon in humic coastal lagoons (RJ, Brazil). En: Humic substances and soil and water environment (Eds.) L. Martin-Neto, D.M.B.P. Milori y W.T.L. da Silva, pp. 61–63. Embrapa, Saõ Carlos, Brazil.

Taylor N. L., Wood C. M. y Donald D. G. 2003. An evaluation of sodium loss and gill metal binding properties in rainbow trout and yellow perch to explain species differences in copper tolerance. *Toxicology Chemistry* 22:2159-2166.

Tawfik D. S. y Viola R. E. 2011. Arsenate replacing phosphate: alternative life chemistries and ion promiscuity. *Biochemistry* 50:1128-1134.

Tipping E. 2002. Cation binding by humic substances. Cambridge University Press, 434p.

- Thurman E.M., 1985. Organic geochemistry of natural waters, *Aquatic Humic Substances*, Nijhoff, Dordrecht pp. 325–333.
- Tseng C. 2004. The potential biological mechanism of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197:67-83.
- UNEP-FAO, 1989. Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates. Métodos de Referencia para Estudios de Contaminación Marina no. 43. 37p.
- Ünlü M. Y. y Fowler S. W. 1979. Factors affecting the flux of arsenic through the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology* 51:209-219.
- U.S. EPA. Environmental Protection Agency. 1980. Ambient water quality criteria for arsenic. Ref. No. PB82-117327.
- Valdez G., Díaz F., Re A. D. y Sierra E. 2008. Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica* 18(2): 105-115.
- Valentino-Álvarez J. A., Núñez-Nogueira G., Fernández-Bringas L., 2013. Acute toxicity of arsenic under different temperatures and salinity conditions on the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biological Trace Element Research* 152:350-357.
- Vanegas P. C., Gaxiola C. G., Robles M C., Zuñiga L. S., Betancourt L. M. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con camarones peneidos. En: Ramírez R. P. y Mendoza C. A. (compiladoras). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. 414p.
- Van Stempvoort D. R., Lesage S. y Molson J. 2005. The use of aqueous substances for *in situ* remediation of contaminated aquifers. Chapter 11. En: Perminova Irina V., Hatfield K. y Hertkorn N. (Eds.). 2005. Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences-Vol. 52. Russia. Springer. 506p.
- Von Wandruzka R. 2000. Humics acids: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation. *Geochemical Transactions* 1:10. DOI: 10.1186/1467-4866-1-10
- Ventura-Lima J., Reis B. M. y Monserrat J. M. 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:211-218.
- Ventura-Lima J., Sandrini J. Z., Ferreira-Cravo M., Piedras F. R., Moraes T. B., Fattorini D., Notti, A., Regoli, F., Geracitano, L. A., Marins L. F., Monserrat J. M., 2007. Toxicological responses in *Laonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after arsenic exposure. *Environment International*. 33(4): 559–564.
- Ventura-Lima, J., Fattorini D., Regoli F., Monserrat J. M., 2009a. Effects of different inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: bioaccumulation, biotransformation and biological responses. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*. 157(12): 3479–3484.
- Ventura-Lima, J, Castro M. R., Acosta D., Fattorini D., Regoli F., Carvalho L. M., Bohrer D., Geracitano L. A., Barros D. M., Silva R. S., Bonan C. D., Bogo M. R., Monserrat J. M., 2009b. Effects of arsenic (As)

- exposure on the antioxidant status of gills of the zebra fish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology: CBP* 149C (4): 538–543.
- Vinatea A. L. 2002. Principios Químicos de Calidad del Agua en Acuicultura. Una revisión para Peces y Camarones. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México, D. F. 92p.
- Vinuesa J. H. 2005. Distribución de crustáceos decápodos y estomatópodos del golfo San Jorge, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(1):7-21.
- Wafar S., Untawale A. G., Wafar M. 1997. Litter fall and energy flux in a mangrove ecosystem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44:111-124.
- Wang, Y. C., Chaung, R-T., Tung, L-C., 2004. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. *Aquatic Toxicology* 69: 67–69.
- Waqar A., Stanislav V. I. Zhao F.J. y Maathuis F. J. M. 2009. Arsenite transport in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:2329-2339.
- Warwick. P., Inam, E. y Evans, N., 2005. Arsenic's interactions with humic acid. *Environmental Chemistry*, 2(2): 119-124
- Warwick P., A. Hall, V. Pashley y N. Bryan. 2001. Investigation of the permeability of humic molecules using zeta potential measurements. *Chemosphere*, 45: 303 - 307.
- Wetzel, R. G. 1975. Limnology. W. B. Saunders Company, London.743p.
- Williams G., West J. M., Snow E. T. 2008. Total arsenic accumulation in yabbies (*Cherax destructor* Clark) exposed to elevated arsenic levels in Victorian gold mining areas, Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(6): 1332-1342.
- Wolfe-Simon, F., Blum, J. S., Kulp, T. R., Gordon, G. W., Hoefft, S. E., Pett-Ridge, J., Stolz, J. F., Webb, S. M., Weber, P. K., Davies, P. C., Anbar, A. D., y Oremland, R. S. 2010. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus, *Science* [online early access], DOI, 10.1126/science.1197258.
- Yamaguchi S., Celino F. T., Ito A., Agusa T., Tanabe S., Tuyen B. C., Miura C., Miura T. 2008. Effects of arsenic on gonadal development in freshwater crab, *Somaniathelphusa pax*, in Vietnam and *Geothelphusa dehaani* in Japan. *Ecotoxicology* 17(8): 772-780.
- Yamanaka K., Kato K., Mizoi M., Na Y., Takabayashi F., Nakano M., Hoshino M., y Okada S. 2004. The role of active arsenic species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198:385-393.
- Zhao F.J., Ma J. F., Meharg A. A. y McGrath S. P. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* 181:777-794, doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x
- Zar J. H. 1999. Biostatistical Analysis. (4ed). Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. USA. 663p.

X. Anexos

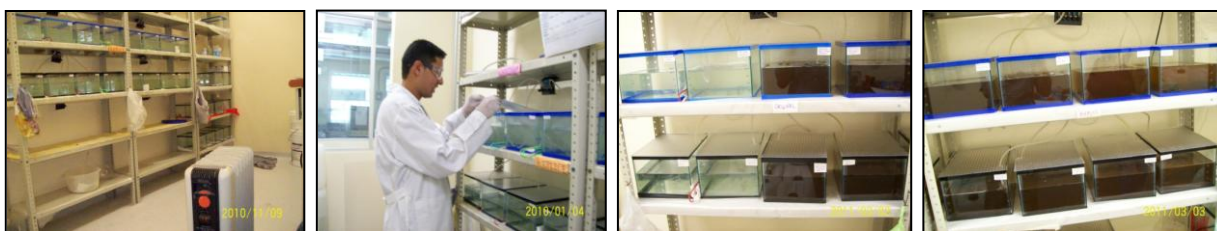
i. Fotografías



Fotografías 1, 2, 3 y 4. Estanques y peceras de aclimatación y mantenimiento para juveniles de *Litopenaeus vannamei* a 25°C.



Fotografías 5, 6, 7 y 8. Alimento para camarón (35% Proteína), Ácidos Húmicos (*Sigma-Aldrich*), AH disueltos en agua destilada (1000ppm), Trióxido de Arsénico As_2O_3 (*Sigma-Aldrich*).



Fotografías 9, 10, 11 y 12. Cuarto de bioensayos, Medición de pH durante un bioensayo, disposición de las peceras durante las pruebas con As+ AH a 96h a 25°C-25ups.



Fotografías 13 y 14. Determinación de AH como carbono orgánico total en muestras de agua de los bioensayos.

ii. Obtención de CL₅₀96h de As +AH por Análisis Probit, regresión de Finney
(Datos estadísticos con el software Biostat, 2009)

20°C-17ups

Nivel del intervalo de confianza		Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]						
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado	
0.4728	0.0156	0.0004	16	0.25	0.0066	0.2434	8.9278	
0.7764	0.0625	0.0559	16	1.	0.8947	0.1053	0.0124	
0.9779	0.3125	0.3346	16	5.	5.3542	-0.3542	0.0234	
1.0788	0.625	0.5617	16	10.	8.9867	1.0133	0.1143	
1.2304	0.75	0.8486	16	12.	13.5781	-1.5781	0.1834	
1.3426	0.9844	0.9533	16	15.75	15.2534	0.4966	0.0162	
Chi cuadrado								
Chi cuadrado	9.2775							
Grados de Libertad	4							
nivel p	0.0545							
Percentil de Dosis (Estímulo)								
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar			
1	2.6732	0.6488	0.0957	4.4545	0.9898			
5	3.3548	0.7669	0.0725	5.8463	0.9802			
10	3.7183	0.8298	0.0607	6.7585	0.9478			
16	4.0056	0.8796	0.052	7.5792	0.9094			
20	4.1585	0.9061	0.0477	8.056	0.8858			
25	4.3258	0.9351	0.0433	8.6119	0.8594			
30	4.476	0.9611	0.0397	9.1436	0.8378			
40	4.7471	1.0081	0.0347	10.1877	0.8157			
50	5.	1.0519	0.0322	11.2693	0.8374			
60	5.2529	1.0957	0.0324	12.4656	0.9297			
70	5.524	1.1427	0.0353	13.8891	1.1317			
75	5.6742	1.1687	0.0381	14.7467	1.2937			
80	5.8415	1.1977	0.0417	15.7642	1.5171			
84	5.9944	1.2242	0.0456	16.756	1.7615			
90	6.2817	1.2739	0.0537	18.7908	2.3276			
95	6.6452	1.3369	0.0649	21.7227	3.2604			
99	7.3268	1.455	0.0877	28.5096	5.7994			
Estadísticos de Regresión								
LD50	11.2693	LD50 Error Estándar	0.8374					
LD50 LCL	9.6755	LD50 UCL	12.9437					
Log10[LD50]	1.0519	Error Estándar	0.0322					
Beta	5.7723	Intercepto	-1.0719					
Beta Error Estándar	1.069							

20°C-33ups

Nivel del intervalo de confianza		Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]						
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado	
0.4728	0.0156	0.	16	0.25	0.	0.25	1.442.3216	
0.8438	0.25	0.2115	16	4.	3.3846	0.6154	0.1119	
0.9021	0.3125	0.4158	16	5.	6.6526	-1.6526	0.4105	
0.9534	0.6875	0.6202	16	11.	9.9235	1.0765	0.1168	
1.0788	0.9375	0.942	16	15.	15.0726	-0.0726	0.0003	
Chi cuadrado								
Chi cuadrado	1,442.9612							
Grados de Libertad	3							
nivel p	0.							
Percentil de Dosis (Estímulo)								
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar			
1	2.6732	0.6927	0.078	4.9286	0.8902			
5	3.3548	0.7602	0.0571	5.7572	0.7596			
10	3.7183	0.7962	0.0464	6.2546	0.6693			
16	4.0056	0.8247	0.0383	6.6781	0.5893			
20	4.1585	0.8398	0.0342	6.9151	0.5449			
25	4.3258	0.8564	0.03	7.1839	0.4967			
30	4.476	0.8712	0.0266	7.4341	0.4559			
40	4.7471	0.8981	0.0219	7.9081	0.3991			
50	5.	0.9231	0.0201	8.3775	0.3876			
60	5.2529	0.9482	0.0214	8.8749	0.4381			
70	5.524	0.975	0.0258	9.4407	0.5611			
75	5.6742	0.9899	0.0291	9.7695	0.6544			
80	5.8415	1.0064	0.0332	10.1493	0.7758			
84	5.9944	1.0216	0.0372	10.5095	0.9012			
90	6.2817	1.05	0.0452	11.221	1.171			
95	6.6452	1.086	0.0559	12.1905	1.5748			
99	7.3268	1.1535	0.0768	14.24	2.531			
Estadísticos de Regresión								
LD50	8.3775	LD50 Error Estándar	0.3876					
LD50 LCL	7.6408	LD50 UCL	9.1597					
Log10[LD50]	0.9231	Error Estándar	0.0201					
Beta	10.0991	Intercepto	-4.3227					
Beta Error Estándar	2.5034							

25°C-25ups

Nivel del intervalo de confianza		Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]						
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado	
0.6967	0.0156	0.0384	16	0.25	0.615	-0.365	0.2166	
0.8438	0.375	0.2515	16	6.	4.0237	1.9763	0.9707	
0.979	0.4375	0.6336	16	7.	10.1381	-3.1381	0.9714	
1.0409	0.9375	0.7893	16	15.	12.6283	2.3717	0.4454	
1.175	0.9375	0.9646	16	15.	15.4332	-0.4332	0.0122	
Chi cuadrado								
Chi cuadrado	2.6163							
Grados de Libertad	3							
nivel p	0.4546							
Percentil de Dosis (Estímulo)								
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar			
1	2.6732	0.6221	0.0752	4.1893	0.7292			
5	3.3548	0.7133	0.057	5.1678	0.6803			
10	3.7183	0.7619	0.0478	5.7799	0.6375			
16	4.0056	0.8003	0.041	6.3146	0.5967			
20	4.1585	0.8208	0.0376	6.6192	0.5737			
25	4.3258	0.8432	0.0342	6.9692	0.5489			
30	4.476	0.8633	0.0314	7.2991	0.5284			
40	4.7471	0.8995	0.0275	7.9346	0.5027			
50	5.	0.9334	0.0255	8.5774	0.5047			
60	5.2529	0.9672	0.0256	9.2722	0.547			
70	5.524	1.0034	0.0279	10.0795	0.648			
75	5.6742	1.0235	0.03	10.5567	0.7297			
80	5.8415	1.0459	0.0329	11.1148	0.8416			
84	5.9944	1.0664	0.0358	11.6509	0.9626			
90	6.2817	1.1048	0.0421	12.7288	1.2372			
95	6.6452	1.1534	0.051	14.2365	1.6743			
99	7.3268	1.2446	0.0688	17.5617	2.7937			
Estadísticos de Regresión								
LD50	8.5774	LD50 Error Estándar	0.5047					
LD50 LCL	7.6004	LD50 UCL	9.5707					
Log10[LD50]	0.9334	Error Estándar	0.0255					
Beta	7.4765	Intercepto	-1.9783					
Beta Error Estándar	1.4009							

30°C-17ups

Nivel del intervalo de confianza		Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]						
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado	
0.6967	0.1875	0.1218	16	3.	1.9489	1.0511	0.5669	
0.7764	0.25	0.2521	16	4.	4.0338	-0.0338	0.0003	
0.8438	0.375	0.4024	16	6.	6.4386	-0.4386	0.0299	
0.9394	0.5	0.6371	16	8.	10.1928	-2.1928	0.4718	
1.0409	0.875	0.8376	16	14.	13.4022	0.5978	0.0267	
1.175	0.9844	0.9658	16	15.75	15.4533	0.2967	0.0057	
Chi cuadrado								
Chi cuadrado	1.1011							
Grados de Libertad	4							
nivel p	0.8941							
Percentil de Dosis (Estímulo)								
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar			
1	2.6732	0.511	0.082	3.2434	0.6161			
5	3.3548	0.6201	0.0608	4.1692	0.5856			
10	3.7183	0.6782	0.0501	4.7667	0.5506			
16	4.0056	0.7242	0.0421	5.2989	0.5145			
20	4.1585	0.7487	0.0382	5.6061	0.4935			
25	4.3258	0.7754	0.0343	5.9625	0.4708			
30	4.476	0.7995	0.0312	6.3017	0.4527			
40	4.7471	0.8428	0.0271	6.9635	0.4349			
50	5.	0.8833	0.0257	7.6437	0.4531			
60	5.2529	0.9238	0.0271	8.3902	0.523			
70	5.524	0.9671	0.0311	9.2714	0.664			
75	5.6742	0.9912	0.0341	9.7989	0.7712			
80	5.8415	1.0179	0.0381	10.4218	0.9144			
84	5.9944	1.0424	0.042	11.026	1.0671			
90	6.2817	1.0884	0.0499	12.2571	1.4115			
95	6.6452	1.1465	0.0606	14.0136	1.963			
99	7.3268	1.2556	0.0818	18.0139	3.4149			
Estadísticos de Regresión								
LD50	7.6437	LD50 Error Estándar	0.4531					
LD50 LCL	6.8048	LD50 UCL	8.5835					
Log10[LD50]	0.8833	Error Estándar	0.0257					
Beta	6.2497	Intercepto	-0.5203					
Beta Error Estándar	1.1391							

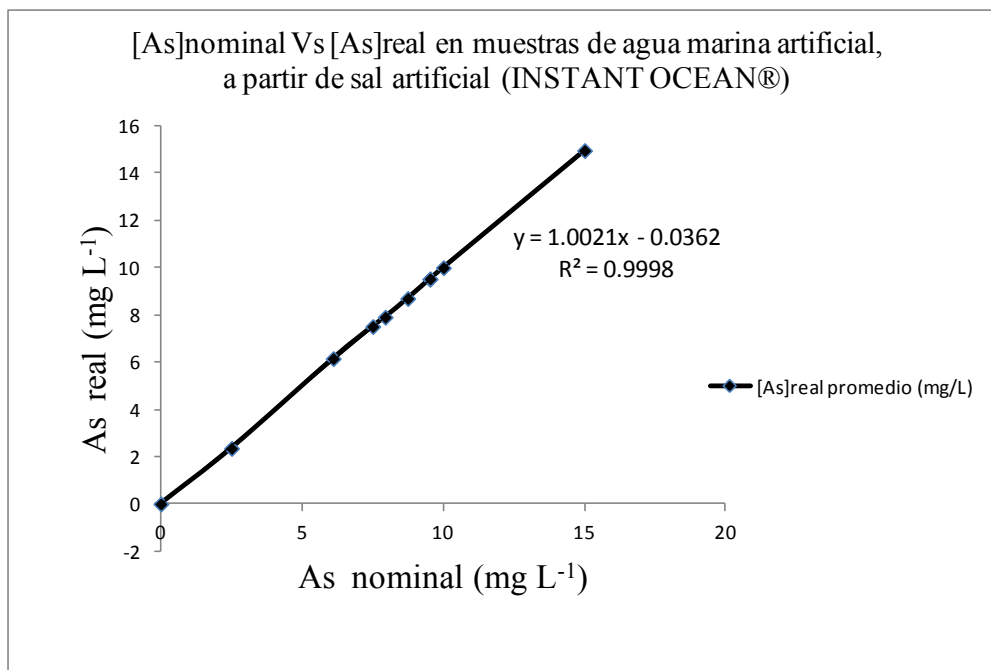
30°C-33ups

Nivel del intervalo de confianza		Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]						
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado	
0.6967	0.4375	0.4244	16	7.	6.7911	0.2089	0.0064	
0.898	0.6875	0.7535	16	11.	12.0567	-1.0567	0.0926	
0.9534	0.8125	0.8229	16	13.	13.1671	-0.1671	0.0021	
1.0409	0.9844	0.9045	16	15.75	14.4713	1.2787	0.113	
1.175	0.9375	0.9707	16	15.	15.531	-0.531	0.0182	
Chi cuadrado								
Chi cuadrado	0.2323							
Grados de Libertad	3							
nivel p	0.9722							
Percentil de Dosis (Estímulo)								
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar			
1	2.6732	0.2059	0.2601	1.6067	1.0206			
5	3.3548	0.3625	0.203	2.3042	1.1166			
10	3.7183	0.446	0.1729	2.7927	1.1412			
16	4.0056	0.512	0.1493	3.2512	1.1402			
20	4.1585	0.5472	0.137	3.5252	1.1304			
25	4.3258	0.5856	0.1236	3.8514	1.1111			
30	4.476	0.6201	0.1118	4.1698	1.0855			
40	4.7471	0.6824	0.0912	4.8128	1.0186			
50	5.	0.7405	0.0735	5.5019	0.935			
60	5.2529	0.7986	0.0583	6.2896	0.8472			
70	5.524	0.8609	0.048	7.2594	0.804			
75	5.6742	0.8954	0.0465	7.8597	0.8424			
80	5.8415	0.9338	0.0488	8.5869	0.9676			
84	5.9944	0.969	0.0543	9.3106	1.1674			
90	6.2817	1.035	0.0703	10.839	1.7611			
95	6.6452	1.1185	0.0958	13.1371	2.9217			
99	7.3268	1.2751	0.1495	18.8404	6.6134			
Estadísticos de Regresión								
LD50	5.5019	LD50 Error Estándar	0.935					
LD50 LCL	3.4497	LD50 UCL	6.6944					
Log10(LD50)	0.7405	Error Estándar	0.0735					
Beta	4.3525	Intercepto	1.7769					

iii. Mortalidad (96h) de las postlarvas frente al As+ AH, a las diferentes condiciones de temperatura-salinidad (se presentan las concentraciones reales de As)

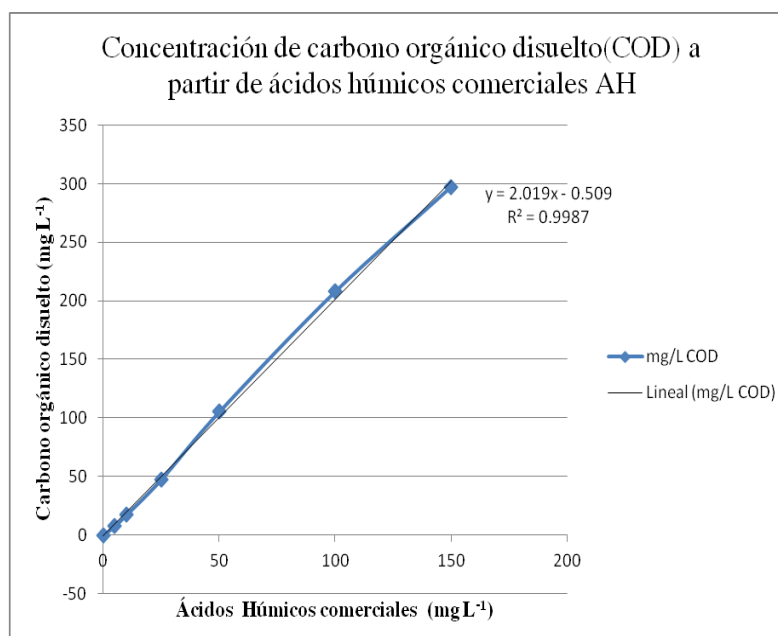
Con As+AH	muertos			muertos			muertos		
[As]real	total org exp	20°C-17ups	[As]real	total org exp	25°C-25ups	[As]real	total org exp	30°C-17ups	
0	16	0	0	16	0	0	16	0	
2.9701	16	0	4.9743	16	0	4.9743	16	3	
5.9764	16	1	6.9785	16	6	5.9764	16	4	
9.5038	16	5	9.5286	16	7	6.9785	16	6	
11.989	16	10	10.9869	16	15	8.6976	16	8	
16.9995	16	12	14.9611	16	15	10.987	16	14	
22.01	16	16				14.9611	16	16	
		muertos						muertos	
[As]real	total org exp	20°C-33ups				[As]real	total org exp	30°C-33ups	
0	16	0				0	16	0	
2.97	16	0				4.9743	16	7	
6.979	16	4				7.9076	16	11	
7.981	16	5				8.9827	16	13	
8.983	16	11				10.9869	16	16	
11.989	16	15				14.9611	16	15	

iv. Curva de Calibración de As nominal Vs As real por análisis de ICP-MS



v. Curva de calibración de ácidos húmicos (AH) Vs. Carbono orgánico disuelto (COD) 25°C-25ups

Ácidos Húmicos Comerciales (mgAH L ⁻¹)	COD (mg L ⁻¹)
0	0
5	7.8
10	17.5
25	47.5
50	105.2
100	207.8
150	297.1



Vi. Prueba estadística “Diferencia del Error Estándar” para conocer la diferencia entre dos o más valores de CL₅₀ (Sprague y Fogels, 1977).

1.-Una vez que se han obtenido los valores de dos o más CL₅₀ y su intervalo de confianza para un mismo agente tóxico, se pueden comparar si son significativamente diferentes o no, mediante la siguiente prueba; se calcula el parámetro estadístico “f”

$$f = \text{antilog} \sqrt{\left(\log \frac{LSIC_1}{CL_{50_1}} \right)^2 + \left(\log \frac{LSIC_2}{CL_{50_2}} \right)^2}$$

Donde LSIC₁ y LSIC₂ son los límites superiores del intervalo de confianza de las concentraciones letales (50%) del mismo agente tóxico (por ejemplo: del arsénico) que se quieren comparar: CL_{50_1} y de la CL_{50_2}.

2.-Una vez que se obtiene “f” se procede a comparar ambos valores de CL_{50_1} y CL_{50_2} de esta manera; se divide la CL₅₀ más grande entre la CL₅₀ más pequeña; por ejemplo si fuera el caso de que la CL_{50_1} fuera más grande que CL_{50_2}, sería así:

$$\frac{CL_{50_1}}{CL_{50_2}}$$

3.- El resultado anterior se compara con el estadístico “f” y si es más grande que f, entonces CL_{50_1} y CL_{50_2} son diferentemente significativas con un 95% de confianza.

vii. Valores de pH y potencial de oxidoreducción (Eh) milivolts (mV) a diferentes condiciones de temperatura-salinidad en medio salino

20°C-17 ups, pH= 8.099; Eh= 89.5 mV
 25°C-17 ups, pH= 8.025; Eh= 86.9mV
 30°C-17-ups, pH= 7.947; Eh= 84.0mV

20°C-25 ups, pH= 8.161; Eh= 93.1mV
 25°C-25 ups, pH= 8.108; Eh= 91.5 mV
 30°C-25 ups, pH= 8.036; Eh= 89.1 mV

20°C-33 ups, pH= 8.122; Eh= 91.1mV
 25°C-33 ups, pH= 8.092; Eh= 90.6 mV
 30°C-33 ups, pH= 8.022; Eh= 88.3 mV