



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE EFECTOS LETALES Y SUBLETALES DE
AMONIO, NITRITOS Y NITRATOS SOLOS Y COMBINADOS EN
POSTLARVAS Y JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* EN AGUAS
DE BAJA SALINIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:
M. EN C. GLADYS VALENCIA CASTAÑEDA

TUTORES PRINCIPALES:

DR. FEDERICO PÁEZ OSUNA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO

COMITÉ TUTOR:

DR. MARTÍN GABRIEL FRÍAS ESPERICUENTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
DRA. RUTH CECILIA VANEGAS PÉREZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DR. MIGUEL BETANCOURT LOZANO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO

MÉXICO, CD.MX., JUNIO, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



**EVALUACIÓN DE EFECTOS LETALES Y SUBLETALES DE
AMONIO, NITRITOS Y NITRATOS SOLOS Y COMBINADOS EN
POSTLARVAS Y JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* EN AGUAS
DE BAJA SALINIDAD**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

M. EN C. GLADYS VALENCIA CASTAÑEDA

TUTORES PRINCIPALES:

DR. FEDERICO PÁEZ OSUNA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO

COMITÉ TUTOR:

DR. MARTÍN GABRIEL FRÍAS ESPERICUENTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
DRA. RUTH CECILIA VANEGAS PÉREZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DR. MIGUEL BETANCOURT LOZANO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO

MÉXICO, CD.MX., JUNIO, 2018.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán y en las instalaciones del módulo experimental Yum Kaax (YK), con la dirección del Dr. Federico Páez Osuna y la Dra. María Cristina Chávez Sánchez. Se agradece el financiamiento recibido a través del proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IN201916 titulado “Evaluación de efectos letales y subletales de amonio, nitritos y nitratos en camarón *Litopenaeus vannamei* en aguas de baja salinidad” con el cual se llevó a cabo este estudio.

AGRADECIMIENTOS

“Cada persona que conocemos en la vida es como una hoja que enriquece un árbol... muchas se sueltan con el viento, pero otras no se desprenden jamás”.

- ❖ Al **Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología**, por aceptarme en el programa de doctorado y el apoyo otorgado durante mi estancia en el posgrado.
- ❖ Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por otorgarme una beca durante estos cuatro años y a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por darme la oportunidad de seguir preparándome profesionalmente.
- ❖ Con aprecio, respeto y admiración, un agradecimiento especial a mi director de tesis el **Dr. Federico Páez Osuna**: por confiar en mí desde el primer día que pedí trabajar con usted. Por todo el apoyo brindado en cada uno de los proyectos en lo que me dio la oportunidad de involucrarme y trabajar; por sus enseñanzas, paciencia, por los conocimientos que me transmitió, por ilustrarme que existen personas grandes con un corazón lleno de humildad. Agradecida siempre estaré por cada uno de sus consejos académicos, profesionales y de vida durante estos siete años.
- ❖ A mi codirectora de tesis la **Dra. María Cristina Chávez Sánchez**, por darme la oportunidad de trabajar con usted, por la disposición que siempre me dedico y por el apoyo brindado en su grupo de trabajo, por mostrarme otro mundo bajo un objetivo de microscopio y que aún hay mucho más por aprender...; gracias por las palabras de motivación para poder concluir esta etapa y así poder iniciar otras.
- ❖ A los miembros de mi comité tutor: **Dra. Cecilia Vanegas Pérez**, **Dr. Martín Frías Espericueta** y **Dr. Miguel Betancourt Lozano**, agradezco las observaciones y sugerencias que hicieron al documento de tesis y a los artículos publicados, así como su participación en cada uno de mis exámenes tutorales.
- ❖ Al **Químico Humberto Bojórquez Leyva**, por la ayuda en los análisis químicos, asesoramiento en cuestiones de química, por las charlas y consejos recibidos, gracias por su amistad.
- ❖ A la **M. en C. Selene María Abad Rosales** del Laboratorio de Histopatología del Centro de Investigación en Desarrollo y Alimentación, por los cursos impartidos sobre histopatología en camarones y en el asesoramiento en el procesamiento de muestras histológicas; por la amistad y confianza brindada.

- ❖ Al personal del **Laboratorio de Ecotoxicología Acuática** de la Facultad de Ciencias, de la UNAM, en especial al **M. en C. Sebastián Ricardo Zúñiga Lagunes** por el apoyo y asesoría en el análisis de presión osmótica; un agradecimiento especial a la **Dra. Cecilia Venegas Pérez**, por la oportunidad que me dio de trabajar en su laboratorio y las asesorías que me brindó en mi estancia académica; así también, gracias por las observaciones que hizo a mi proyecto durante todo el proceso de mi doctorado.
- ❖ Al **Biol. Fernando Marino Pinzón** y al persona que trabaja en el Laboratorio de postlarvas de camarón **FITMAR S.A. de C.V.**, por la donación de manera desinteresada de postlarvas y juveniles de camarón para la realización de los experimentos de este trabajo.
- ❖ Al **Sr. Fidel Casares** de la granja de camarón Nueva Generación, por la disposición de organismos para las diferentes pruebas realizadas.
- ❖ Al **Dr. Martín G. Gabriel Frías Espericueta**, por cada uno de los consejos y asesoramientos académicos que recibí durante mi estancia en el posgrado; le agradezco a usted y a la **Dra. Maricela Aguilar** por la confianza que me dieron al abrirme las puertas del **Laboratorio de Estudios Ambientales** de la **FACIMAR** y hacer uso del equipo para realizar los análisis bioquímicos de este proyecto. Gracias a la **c. Dra. Sarahí Roos Muñoz**, al **Dr. Juan Carlos Bautista** y el **M. en C. Víctor Nuñez**, por el apoyo, entrenamiento y disposición para la utilización del equipo del laboratorio.
- ❖ A los compañeros del centro de cómputo y biblioteca: Al **Mat. German Ramírez, Lic. Carlos Suarez** y **Lic. Herlinda Rojas**, por su ayuda en mis exámenes tutoriales y asesoramiento técnico durante el desarrollo de este proyecto.
- ❖ Al **Mat. German Ramírez**, por asesorías en temas de estadísticas para la realización de esta tesis y los artículos publicados.
- ❖ Agradezco al **Ing. Eliseo Ortega León**, por el apoyo bilateral académico, por las experiencias y los consejos personales y profesionales recibidos durante una parte importante de este camino.
- ❖ **Diana Juárez, Guadalupe Godoy, Gabriela Almaraz, Yazmín Valenzuela, Margarita Cordero, Natalia Medina, Marcela Cisneros** y **Mónica Schuette**, por el apoyo en los trámites académicos y administrativos durante mi estancia en el posgrado.
- ❖ A mis grandes y queridos amigos: mi confidente **Nayely Perea**, por tu apoyo y por todas esas tardes de café donde hacías que se me olvidaba el mundo de pendientes que tenía que entregar, por dejarme entrar en tu familia y pasar gratos momentos; mi colega

y próximo doctor, **Uriel Arreguin Rebolledo**, por los consejos académicos y los buenos ratos, por siempre escuchar a una estudiante de doctorado estresada a pesar de la distancia; a mi ex-roomie **José Eduardo Carvajal Uribe** (Infe...), gracias por ser parte de este camino, aunque no olvidaré que me abandonaste y te fuiste a tierras sagradas.

- ❖ A la **M. en C. Gloria Ana María Arroyo Bustos**, por su valiosa amistad, por seguir siendo mi maestra académica y de vida, por compartir gratos momentos.
- ❖ A mis queridas amigas, **Itzel y Herlinda**, por la gran amistad que encontré en ustedes, por esas buenas charlas con regaños cuando eran necesarios, no se libran de mí, aquí seguiré para seguir conviviendo.
- ❖ A **Ana Karina Luna**, por la amistad que en poco tiempo encontré en ti, por estar en los momentos buenos y los no tan buenos.
- ❖ A mis compañeros del Laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera (**Juan Francisco, Alfreto, Javier, Aldivar, Ahtziri, Suammy, Armando, Magda, Cristy, Marcela y Alfredo**) de la Unidad Académica Mazatlán del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM (**Yazmín, Omar Alejandro, José Roberto**) y del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (**Selene, Karla y Sonia**), gracias por los buenos ratos de convivencia y gran amistad de muchos de ustedes.
- ❖ A **Alfredo, Valeria, Lety e Isidro**, gracias por el apoyo en la realización de cada uno de los experimentos de este proyecto.
- ❖ A **Fabiola Martínez y Paola Vázquez**, por darme esos ánimos, por apoyarme y entenderme que hay caminos complicados, pero nunca imposibles de llegar a la meta, las quiero niñas y a darle.

Una disculpa por omitir a aquellas personas que contribuyeron de manera directa o indirecta en la realización de este proyecto y etapa de mi vida; les agradezco por haber dejado huella importante en este camino que aún seguiré...

Gladys Valencia Castañeda

DEDICATORIA

A **Dios**: a pesar de que más de una vez he negado tu existencia y tu presencia en mi vida, nunca me has dejado sola en los momentos más difíciles y me has dado la fuerza para salir adelante. Gracias por permitirme hoy cumplir un gran sueño, llegar a una nueva meta profesional y por tener a mi lado a lo más valioso de mi vida que es mi familia.

A mis papás **Javier Valencia Juárez** y **Nelida Castañeda Peñaloza**, no hay palabras suficientes para agradecer la confianza, el amor y el apoyo que me han dado durante cada meta que me he propuesto, gracias por esas palabras de aliento que me han dado en los momentos donde he querido tirar la toalla y salir corriendo.

A mis hermanos, **Ulises, Jesús Antonio** y **Montserrat**, y a **Norman Elí** quien llego de manera indirecta a ser parte de nuestra familia.

Familia, esta tesis y grado es de ustedes y para ustedes con mucho amor, gracias por todo. Los amo con todo mi corazón y los llevaré siempre conmigo a donde quiera que vaya.

Gladys Valencia Castañeda

"La vida es maravillosa, sin duda, y es importante entenderla así, como maravillosa, como también es importante entenderla en todos sus matices agridulces, y sobre todo, en su temporalidad. Es importante entender que lo bueno, lo saboreable, lo dulce, lo apetitoso, va siempre acompañado - siempre- de lo amargo, de lo agrio, de lo tóxico, de lo venenoso."

Marcelino Perelló Valls (1944-2017)

"All things are poison, and nothing is without poison; only the dose permits something not to be poisonous"

Paracelsus (1493-1541)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xv
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Camaronicultura e impacto de enfermedades	1
1.2. Cultivo de camarón en baja salinidad	2
1.3. Problemática de los compuestos nitrogenados en la camaronicultura.....	4
1.4. Camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	5
1.5. Pruebas de toxicidad en organismos acuáticos	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1. Estudios sobre toxicidad de amonio	8
2.2. Estudios sobre toxicidad de nitritos	10
2.3. Estudios sobre toxicidad de nitratos	11
2.4. Estudios sobre toxicidad de mezclas	13
3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	15
4. PREGUNTAS E HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos específicos	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Caracterización química del agua de prueba	21
6.1.1. Determinación de compuestos nitrogenados.....	22
6.1.2. Determinación de alcalinidad (método volumétrico).....	23
6.1.3. Determinación de iones mayoritarios.....	23

6.1.4. Determinación de cobre, cadmio, hierro, manganeso, plomo, zinc, mercurio y arsénico por espectrofotometría de absorción atómica	25
6.2. Transporte y aclimatación.....	25
6.3. Pruebas de toxicidad	27
6.3.1. Prueba para comparar cuatro diferentes métodos para evaluar la toxicidad aguda de nitritos en postlarvas <i>L. vannamei</i>	27
6.3.2. Pruebas de toxicidad letal aguda individual de amonio, nitritos y nitratos en postlarvas.....	28
6.3.3. Pruebas de toxicidad letal aguda por separado de amonio, nitritos y nitratos en juveniles	29
6.3.4. Pruebas de toxicidad letal aguda de amonio, nitritos y nitratos combinados en postlarvas y juveniles	30
6.3.5. Pruebas de toxicidad subletal de amonio, nitritos y nitratos en el corto plazo (48 horas) en juveniles de <i>L. vannamei</i>	31
6.3.6. Pruebas de toxicidad subcrónica de amonio y nitritos solos y combinados en el mediano plazo (28 días) en juveniles de <i>L. vannamei</i>	32
6.4. Medición de indicadores de estrés (oxihemocianina, glucosa y lactato) en la hemolinfa	33
6.5. Medición de iones Na ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺ y Mg ⁺² en la hemolinfa	34
6.6. Niveles de seguridad de amonio, nitritos y nitratos para postlarvas y juveniles de <i>L. vannamei</i>	34
6.7. Análisis de los datos	35
7. RESULTADOS	37
7.1. Características químicas de las aguas de prueba.....	37
7.2. Comparación de cuatro métodos para evaluar la toxicidad letal aguda de nitritos en postlarvas <i>L. vannamei</i>	38
7.3. Toxicidad aguda de amonio, nitritos y nitratos por separado en postlarvas de <i>L. vannamei</i>	43
7.3.1. Toxicidad aguda de amonio	43
7.3.2. Toxicidad aguda de nitritos	45
7.3.3. Toxicidad aguda de nitratos	47
7.4. Toxicidad letal aguda de amonio, nitritos y nitratos combinados en postlarvas de <i>L. vannamei</i>	49

7.4.1. Mezcla amonio-nitritos-nitratos	49
7.4.2. Mezcla amonio-nitritos	53
7.4.3. Mezcla de amonio-nitratos	54
7.4.4. Mezcla nitritos-nitratos	55
7.5. Toxicidad letal aguda de amonio, nitritos y nitratos por separado en juveniles de <i>L. vannamei</i>	56
7.5.1. Toxicidad aguda de amonio	56
7.5.2. Toxicidad aguda de nitritos	57
7.5.3. Toxicidad aguda de nitratos	58
7.6. Toxicidad letal aguda de amonio, nitritos y nitratos combinados en juveniles de <i>L. vannamei</i>	59
7.7. Toxicidad subletal en el corto plazo (48 h).....	62
7.7.1. Niveles de oxihemocianina en la hemolinfa de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos por separado a amonio, nitritos y nitratos	62
7.7.2. Niveles de glucosa en la hemolinfa de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos por separado a amonio, nitritos y nitratos.....	66
7.7.3. Niveles de lactato en la hemolinfa de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos por separado a amonio, nitritos y nitratos.....	69
7.7.4. Concentraciones de iones en la hemolinfa de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos por separado a amonio, nitritos y nitratos	72
7.8. Toxicidad subcrónica en el mediano plazo (28 días).....	76
7.8.1. Tasa de supervivencia de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a amonio y nitritos solos y en combinación	76
7.8.2. Tasa de crecimiento.....	78
7.9. Consumo de alimento	82
7.10. Niveles de seguridad.....	85
8.0. DISCUSIÓN.....	87
8.1. Toxicidad aguda de amonio	87
8.2. Toxicidad aguda de nitritos.....	91
8.3. Toxicidad aguda de nitratos	95
8.4. Toxicidad aguda de mezclas	98

8.5. Toxicidad subletal de amonio, nitritos y nitratos: oxihemocianina, glucosa y lactato	103
8.6. Toxicidad subcrónica de amonio y nitritos solos y en combinación	107
8.7. Niveles de seguridad	109
9.0. CONCLUSIONES	114
10. LITERATURA CITADA	117
11. ANEXOS	139
Anexo I. Diferentes pruebas de toxicidad de compuestos nitrogenados realizadas en postlarvas y juveniles de <i>L. vannamei</i>	139
Anexo II. Artículo “Comparison of four treatments to evaluate acute toxicity of nitrite in shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> postlarvae: Influence of feeding and the renewal water”.	140
Anexo III. Artículo “Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> postlarvae in low-salinity water”	147

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Valores medios de CL_{50} (\pm desviación estándar) de $N-NO_2^-$ (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei* estimadas con las concentraciones iniciales de nitritos (0 h, barras sin relleno) y determinadas cada 24 h (barras grises) en las diferentes soluciones de prueba. Diferentes letras en cada tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre CL_{50} . Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la CL_{50} de cada tratamiento calculada con la concentración inicial (nominal). T1 (estática + sin alimentación); T2 (estática con renovación + alimentación); T3 (estática con renovación + no alimentación) y T4 (estática + alimentación). 40
- Figura 2.** Valores promedio de CL_{50} (\pm desviación estándar) de $N-NO_2^-$ (mg/L) a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición para postlarvas *L. vannamei* calculadas con las concentraciones iniciales de nitritos (0 h) y los valores de CL_{50} cada 24 h. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores CL_{50} 42
- Figura 3.** Niveles de oxihemocianina (mmol/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones. 64
- Figura 4.** Niveles de oxihemocianina (mmol/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de $N-NO_2^-$ (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones. 65
- Figura 5.** Niveles de oxihemocianina (mmol/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de $N-NO_3^-$ (mg/L) durante de 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones. 66
- Figura 6.** Niveles de glucosa (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones. 67
- Figura 7.** Niveles de glucosa (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de $N-NO_2^-$ (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones. 68
- Figura 8.** Niveles de glucosa (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de $N-NO_3^-$ (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones. 69
- Figura 9.** Niveles de lactato (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones. 70

Figura 10. Niveles de lactato (mg/mL) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de N-NO ₂ ⁻ (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas (p <0.05) entre las concentraciones.	71
Figura 11. Niveles de lactato (mg/mL) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de N-NO ₃ ⁻ (mg/L) durante un periodo de 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas (p <0.05) entre las concentraciones.	72
Figura 12. Concentraciones de magnesio, calcio, potasio y sodio (mmol/L) en la hemolinfa de camarones <i>L. vannamei</i> expuestos por 48 h a concentraciones subletales de NAT.	73
Figura 13. Concentraciones de magnesio, calcio, potasio y sodio (mmol/L) en la hemolinfa de camarones <i>L. vannamei</i> expuestos por 48 h a concentraciones subletales de N-NO ₂ ⁻ ...	74
Figura 14. Concentraciones de magnesio, calcio, potasio y sodio (mmol/L) en la hemolinfa de camarones <i>L. vannamei</i> expuestos por 48 h a concentraciones subletales de N-NO ₃ ⁻ ...	75
Figura 15. Porcentaje de supervivencia (%) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) durante 28 días.	76
Figura 16. Porcentaje de supervivencia (%) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de N-NO ₂ ⁻ (mg/L) durante 28 días.	77
Figura 17. Porcentaje de supervivencia (%) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones combinadas de NAT y N-NO ₂ ⁻ (mg/L) durante un periodo de 28 días.	78
Figura 18. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de <i>L. vannamei</i> durante la exposición subcrónica de NAT en salinidades de 3 y 25 g/L. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma salinidad. Letras minúsculas diferentes entre mismas concentraciones del tóxico significan diferencias significativas entre las dos diferentes salinidades.	81
Figura 19. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de <i>L. vannamei</i> durante la exposición subcrónica de N-NO ₂ ⁻ en salinidades de 3 y 25 g/L. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma salinidad. Letras minúsculas diferentes entre mismas concentraciones del tóxico significan diferencias significativas entre las dos diferentes salinidades.	82
Figura 20. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de <i>L. vannamei</i> durante la exposición subcrónica NAT y N-NO ₂ ⁻ combinados en salinidades de 3 y 25 g/L. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma salinidad. Letras minúsculas diferentes entre mismas concentraciones del tóxico significan diferencias significativas entre las dos diferentes salinidades.	82
Figura 21. Propuesta estratégica para determinar el factor de aplicación para establecer los niveles de seguridad de compuestos nitrogenados para el camarón <i>L. vannamei</i> basado en los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de toxicidad (adaptado de Abel (1989) y después por Abel y Axiak (1991)).	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización química del agua de mar y agua dulce utilizada al inicio y final de las pruebas de toxicidad.....	37
Tabla 2. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) a 1 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.....	44
Tabla 3. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.	44
Tabla 4. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL ₅₀ de NAT (mg/L) para postlarvas de <i>L. vannamei</i> en agua de mar diluida a 1 y 3 g/L de salinidad. Las letras diferentes en los mismos tiempos de exposición indican diferencias significativas (p <0.05).	45
Tabla 5. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL ₅₀ de N-NH ₃ (mg/L) para postlarvas de <i>L. vannamei</i> en agua de mar diluida a 1 y 3 g/L de salinidad. Las letras diferentes en los mismos tiempos de exposición indican diferencias significativas (p <0.05).	45
Tabla 6. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones de N-NO ₂ ⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 1 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.	46
Tabla 7. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones de N-NO ₂ ⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.	46
Tabla 8. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL ₅₀ de N-NO ₂ ⁻ (mg/L) para postlarvas de <i>L. vannamei</i> en agua de mar diluida a 1 y 3 g/L de salinidad.....	47
Tabla 9. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones de N-NO ₃ ⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 1 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.	48
Tabla 10. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones de N-NO ₃ ⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.	48
Tabla 11. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL ₅₀ de N-NO ₃ ⁻ (mg/L) para postlarvas de <i>L. vannamei</i> en agua de mar diluida a 1 y 3 g/L de salinidad.....	48
Tabla 12. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes unidades tóxicas de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 1 g/L de salinidad.....	49

Tabla 13. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes unidades tóxicas de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.....	50
Tabla 14. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes unidades tóxicas de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 25 g/L de salinidad.....	50
Tabla 15. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de <i>L. vannamei</i> (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) a una salinidad de 1 g/L.	51
Tabla 16. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de <i>L. vannamei</i> (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ (RT=1:1:1) a una salinidad de 3 g/L.....	52
Tabla 17. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de <i>L. vannamei</i> (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) en agua de mar a 25 g/L.....	52
Tabla 18. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de <i>L. vannamei</i> (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) en diferentes salinidades. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las CL ₅₀	53
Tabla 19. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes unidades tóxicas de NAT/N-NO ₂ ⁻ (RT=1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad. 53	
Tabla 20. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas <i>L. vannamei</i> (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N-NO ₂ ⁻ (RT=1:1) a una salinidad de 3 g/L.	54
Tabla 21. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes unidades tóxicas de NAT/ N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.54	
Tabla 22. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas <i>L. vannamei</i> (PL20) expuestos a la mezcla de NAT/N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:) a una salinidad de 3 g/L.....	55
Tabla 23. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a diferentes unidades tóxicas de N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.	56
Tabla 24. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas <i>L. vannamei</i> (PL20) expuestas a la mezcla de N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:) a una salinidad de 3 g/L.....	56
Tabla 25. Porcentajes de mortalidad de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.	57
Tabla 26. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL ₅₀ de NAT (mg/L) para juveniles de <i>L. vannamei</i> en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.	57

Tabla 27. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL ₅₀ de N-NH ₃ (mg/L) para juveniles de <i>L. vannamei</i> en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad	57
Tabla 28. Porcentajes de mortalidad de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de N-NO ₂ ⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.	58
Tabla 29. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL ₅₀ de N-NO ₂ ⁻ (mg/L) para juveniles de <i>L. vannamei</i> en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.	58
Tabla 30. Porcentajes de mortalidad de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de N-NO ₃ ⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.	59
Tabla 31. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL ₅₀ de N-NO ₃ ⁻ (mg/L) para juveniles de <i>L. vannamei</i> en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.	59
Tabla 32. Porcentajes de mortalidad de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes unidades toxicas de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.....	60
Tabla 33. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de juveniles de <i>L. vannamei</i> (3 g) expuestos a la mezcla de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) a una salinidad de 3 g/L.....	60
Tabla 34. Porcentajes de mortalidad de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes unidades toxicas de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 25 g/L de salinidad.....	61
Tabla 35. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de juveniles de <i>L. vannamei</i> (3 g) expuestos a la mezcla de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) a una salinidad de 25 g/L.....	62
Tabla 36. Valores de UT ₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de <i>L. vannamei</i> (PL20) expuestos a la mezcla de NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻ (RT=1:1:1) en diferentes salinidades. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las CL ₅₀	62
Tabla 37. Peso promedio y desviación estándar (g) de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos durante 4 semanas a concentraciones subcrónicas por separado y en combinación de NAT y N-NO ₂ ⁻ a una salinidad de 3 g/L. Letras diferentes en la misma semana de exposición indican diferencias significativas (p <0.05) entre los tratamientos.	79
Tabla 38. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de <i>L. vannamei</i> durante la exposición subletal de NAT y N-NO ₂ ⁻ solos y en combinación a una salinidad de 3 g/L. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas (p <0.05) entre los tratamientos.	79
Tabla 39. Peso promedio y desviación estándar (g) de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos durante 28 días a concentraciones subcrónica por separado y en combinación de NAT y N-NO ₂ ⁻ a una salinidad de 25 g/L. Letras diferentes en la misma semana de exposición indican diferencias significativas (p <0.05) entre los tratamientos.	80
Tabla 40. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de <i>L. vannamei</i> durante la exposición subcrónica de NAT y N-NO ₂ ⁻ solos y en combinación a	

una salinidad de 25 g/L. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.	80
Tabla 41. Consumo de alimento (%) de postlarvas de <i>L. vannamei</i> expuestas a concentraciones inferiores a la CL_{50-96} h y UT_{50-96} h de NAT, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ (mg/L) solos y combinados, respectivamente, a 1 y 3 g/L de salinidad.	83
Tabla 42. Consumo de alimento (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a concentraciones inferiores a la CL_{50-96} h y UT_{50-96} h de NAT, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ (mg/L) solos y combinados a 1 y 3 g/L de salinidad.	84
Tabla 43. Niveles de seguridad e intervalos de confianza propuestos para el cultivo de camarón blanco <i>L. vannamei</i> en aguas de baja salinidad del presente estudio.	86
Tabla 44. Valores de CL_{50} de NAT (mg/L) en diferentes especies de postlarvas de camarones peneidos.	88
Tabla 45. Valores de CL_{50} de NAT (mg/L) en diferentes especies de juveniles de camarones peneidos.	89
Tabla 46. Valores de CL_{50} de $N-NO_2^-$ (mg/L) en diferentes especies de larvas y postlarvas de camarones peneidos.	93
Tabla 47. Valores de CL_{50} de $N-NO_2^-$ (mg/L) en diferentes especies de juveniles de camarones peneidos.	95
Tabla 48. Valores de CL_{50} (mg/L) de $N-NO_3^-$ para la especie <i>P. monodon</i> y <i>L. vannamei</i> a diferentes salinidades.	98
Tabla 49. Niveles de seguridad de NAT y $N-NO_2^-$ para postlarvas y juveniles de <i>L. vannamei</i> a diferentes salinidades.	112
Tabla 50. Niveles de NAT, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ (mg/L) presentes en cultivos de <i>L. vannamei</i> en aguas de baja salinidad.	106

RESUMEN

En el presente estudio se determinó, mediante pruebas de toxicidad los efectos agudos (96 h), subletales (48 h) y subcrónicos (28 días) de amonio, nitritos y nitratos solos y combinados en postlarvas (PL20) y juveniles (3.2 g) de *Litopenaeus vannamei* expuestos a salinidades de 1 y 3 g/L; así mismo, se establecieron los niveles de seguridad para el cultivo de *L. vannamei* bajo condiciones de laboratorio. Los valores estimados de la concentración letal media (CL_{50}) a 96 h de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitrógeno como nitritos ($N-NO_2^-$) y nitrógeno como nitratos ($N-NO_3^-$) para PL20 a salinidades de 1 y 3 g/L fueron 10.8 y 16.3, 3.3 y 4.9, y 112.8 y 340.0 mg/L, respectivamente; mientras que las unidades tóxicas medias (UT_{50}) a 96 h de las mezclas (1:1:1 y 1:1) de NAT/ $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$, NAT/ $N-NO_2^-$, NAT/ $N-NO_3^-$ y $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ a la salinidad de 3 g/L fue de 0.68, 1.12, 0.64 y 0.78 UT, respectivamente; y para la mezcla de NAT/ $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ a 1 g/L de salinidad fue de 0.44 UT. Las CL_{50} a las 96 h de NAT, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ y las UT_{50} a las 96 h de la mezcla de NAT/ $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ para juveniles en la salinidad de 3 g/L fue 29.0, 10.6 y 900.1 mg/L, y 0.99 UT, respectivamente. Los efectos de la interacción de las mezclas (1:1:1 y 1:1) en postlarvas fueron en general, antagónico en las primeras 24 h y sinérgico después de las 48 h; mientras que en la mezcla (1:1:1) de juveniles el efecto fue antagónico en la mayoría de los tiempos de exposición. En la prueba subletal de los tres compuestos nitrogenados fueron evaluados los niveles de oxihemocianina, glucosa y lactato en juveniles, los cuales mostraron alteraciones en sus niveles conforme pasaron los tiempos de exposición y fue más evidente cuando fueron expuestos a niveles del 50 % del valor de la CL_{50} a las 96 h de cada tóxico. Las tasas de crecimiento en la prueba subcrónica de juveniles expuestos al 10 % del valor de la CL_{50} a las 96 h de NAT y $N-NO_2^-$ a la salinidad de 3 g/L, exhibieron tasas más bajas con 0.46 ± 0.21 , 0.41 ± 0.09 y 0.36 ± 0.14 g/sem para NAT, $N-NO_2^-$ y NAT/ $N-NO_2^-$, respectivamente. Los niveles de seguridad del NAT, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ a la salinidad de 1 y 3 g/L para postlarvas (PL20) fueron 0.54 y 0.82, 0.170 y 0.190, 5.64 y 21.50 mg/L, respectivamente; mientras que para los juveniles (3.2 g) a la salinidad de 3 g/L fueron de 1.45, 0.53 y 45 mg/L, respectivamente. Los niveles de seguridad de amonio, nitritos y nitratos para el cultivo de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad (1 y 3 g/L), son menores que los establecidos para cultivos en aguas marinas o salobres; además de que la toxicidad

de los tres compuestos del nitrógeno es más aguda conforme disminuye la salinidad de 3 a 1 g/L. Esta investigación generó información sobre la toxicidad individual y en combinación de los compuestos nitrogenados para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en ambientes de aguas de baja salinidad. Los resultados obtenidos de las diferentes pruebas de toxicidad fueron trascendentales para proponer los niveles de seguridad que serán útiles para la camaronicultura desarrollada tierra adentro y para aquellos ecosistemas acuáticos con aportes de agua dulce y marina que en diferentes épocas del año su salinidad es < a 3 g/L y que son vulnerables a recibir descargas con niveles moderados o altos de compuestos nitrogenados donde *L. vannamei* puede estar presente por el desarrollo de su ciclo de vida.

ABSTRACT

In the present study, acute (96 h), sublethal (48 h) and subchronic (28 days) effects of ammonia, nitrite and nitrate individual and combined in postlarvae (PL20) and juveniles (3.2 g) of *L. vannamei* exposed to salinities of 1 and 3 g/L were determined; similarly, safety levels for culture of *L. vannamei* under laboratory conditions were established. The estimated values of the mean lethal concentration (LC_{50}) at 96 h of total ammonia nitrogen (TAN), nitrogen as nitrite (NO_2^- -N) and nitrogen as nitrate (NO_3^- -N) for PL20 at salinities of 1 and 3 g/L were 10.8 and 16.3, 3.3 and 4.9, and 112.8 and 340.0 mg/L, respectively; while the average toxic units (UT_{50}) at 96 h of the mixtures (1:1:1 and 1:1) TAN/ NO_2^- -N/ NO_3^- -N, TAN/ NO_2^- -N, TAN/ NO_3^- -N and NO_2^- -N/ NO_3^- -N at the salinity of 3 g/L was 0.68, 1.12, 0.64 and 0.78 UT, respectively; and for the mixture of TAN/ NO_2^- / NO_3^- -N at 1 g/L of salinity was 0.44 UT. The LC_{50} at 96 h of TAN, NO_2^- -N and NO_3^- -N and the UT_{50} at 96 h of the mixture of TAN/ NO_2^- -N/ NO_3^- -N for juveniles at salinity of 3 g/L were 29.0, 10.6 and 900.1 mg/L, and 0.99 UT, respectively. The effects of the interaction of the mixtures (1:1:1 and 1:1) on postlarvae were, in general, antagonistic in the first 24 h and synergistic after 48 h; while in the mixture (1:1:1) of juveniles the effect was antagonistic in most of the exposure times. In the sublethal tests of the three nitrogenous compounds, the levels of oxyhemocyanin, glucose and lactate in juveniles hemolymph were evaluated, which showed alterations in their levels during the exposure times and it was more evident when they were exposed to levels of 50 % of the value of the LC_{50} at 96 h of each toxic. Growth rates in the subchronic test of juveniles exposed to 10 % of the LC_{50} at 96 h of TAN and NO_2^- -N at salinity of 3 g/L, showed lower rates with 0.46 ± 0.21 , 0.41 ± 0.09 and 0.36 ± 0.14 g/week for TAN, NO_2^- -N and TAN/ NO_2^- -N, respectively. Safety levels of TAN, NO_2^- -N and NO_3^- -N at salinity of 1 and 3 g/L for postlarvae (PL20) were 0.54 and 0.82, 0.050 and 0.190, 5.64 and 21.50 mg/L, respectively; while for juveniles (3.2 g) at a salinity of 3 g/L were 1.45, 0.53 and 45 mg/L, respectively. The safety levels of ammonia, nitrite and nitrate for the culture of *L. vannamei* in low salinity waters (1 and 3 g/L), are lower than those established for culture in marine or brackish waters; in addition, the toxicity of the three nitrogen compounds is more acute as the salinity decreases from 3 to 1 g/L. This investigation generated information on the individual and combination toxicity of nitrogen

compounds for postlarvae and juveniles of *L. vannamei* in environments of low salinity water. The results obtained from the different toxicity tests were transcendental to propose the safety levels that will be useful for the shrimp farming developed inland and for those aquatic ecosystems with influences of fresh and marine water that at different times of the year the salinity can be equal to or < at 3 g/L and that are vulnerable to receive discharges moderate to high levels of nitrogen compounds where the *L. vannamei* may be present due to the development of its life cycle

1. INTRODUCCIÓN

La tasa de producción de proteínas de origen animal ha demostrado una tendencia creciente y, por lo menos en las dos décadas más recientes, este incremento ha sido en gran parte debido al crecimiento de la acuicultura que, no obstante el continuo aumento de la población humana, ha permitido mantener estable el consumo individual de proteínas de origen animal (Brown, 2009). Los avances recientes en las tecnologías que se aplican en la acuicultura han permitido elevar los volúmenes de producción, tanto a través de la diversificación de sus actividades, como mediante el diseño de nuevos sistemas de producción, además de nuevas especies o de variedades más eficientes para los fines de cultivo (Piferrer, 2005).

1.1. Camaronicultura e impacto de enfermedades

Un ejemplo de este crecimiento ha sido la camaronicultura, actividad que consiste en la cría y engorda de camarones para consumo humano, realizada en ambientes costeros y continentales utilizando aguas de tipo salobre, marino e hipersalino (Moss *et al.*, 2001; Páez-Osuna, 2001a; 2001b); empleando distintas tecnologías de cultivo: extensivo, semi-intensivo, intensivo, e hiperintensivo. En los últimos años esta actividad ha alcanzado un crecimiento acelerado en las áreas tropicales y subtropicales costeras del mundo; sin embargo, ha sido significativamente afectada por el impacto de enfermedades virales como, mancha blanca (WSSV), cabeza amarilla (YHV) y virus del síndrome de Taura (TSV); las cuales afectan directamente la producción (Moss *et al.*, 2001; Wang, 2003) y siguen siendo la fuente más común de importantes pérdidas económicas en muchas granjas de cultivo de camarón de diferentes partes del mundo (Israngkura y Sae-Hae, 2002). México no ha escapado a ello, y las enfermedades más frecuentes que se presentan son el virus de la mancha blanca, vibriosis y enfermedades causadas por parásitos (Páez-Osuna *et al.*, 2003). La aparición de un nuevo patógeno bacteriano (*Vibrio parahaemolyticus*) conocido como síndrome de la muerte temprana (EMS por sus siglas en inglés) o AHPDN (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) que ha afectado dramáticamente el cultivo de *Litopenaeus vannamei* en los países del sudeste asiático (Leaño y Mohan, 2012; NACA, 2012; FAO, 2013; Schryver *et al.*, 2014). El patógeno recientemente ha disminuido el

cultivo de *L. vannamei* en los estados del norte de México, incluido Nayarit, Sinaloa y Sonora. Los productores de camarón de esos estados proyectaron un descenso del 65 % de camarón en el 2013 en comparación con 2011 debido al patógeno (The Fish Sitio, 2018).

Cuando se examina a fondo el origen de las enfermedades finalmente se concluye que en la mayoría de los casos, estas se presentan debido a que se conjugan generalmente una combinación de factores que involucran a la triada hospedero-ambiente-patógeno. La triada epidemiológica se refiere al modelo de la causalidad de las enfermedades transmisibles; esto es, la enfermedad es el resultado de la interacción entre el agente, el huésped susceptible y el ambiente (Lightner y Redman, 1998; Lemonnier *et al.*, 2006). Los agentes pueden ser infecciosos o no infecciosos y son necesarios, pero no siempre suficientes, para causar la enfermedad; los agentes no infecciosos pueden ser químicos o físicos. En el caso del camarón, estos se ven afectados en su sistema inmune por el deterioro de la calidad de agua, lo cual coadyuva a las altas mortalidades. El deterioro de la calidad de agua se debe principalmente a 3 razones (Porubcan, 1996; Ebeling *et al.*, 2006; Pascual-Jiménez, 2013): (i) los niveles de oxígeno; (ii) los cambios bruscos de temperatura o temperaturas inadecuadas; y (iii) los niveles tóxicos de los compuestos nitrogenados.

1.2. Cultivo de camarón en baja salinidad

Como una medida para contrarrestar el problema de las enfermedades en la camaronicultura, surge como una alternativa el cultivo de camarón con agua dulce o de baja salinidad o también denominado cultivos tierra adentro. Se cree que el control de las enfermedades es más fácil de implementar en aguas interiores que en los ambientes costeros (Boyd, 2002). En años recientes se ha desarrollado y experimentado esta actividad en diversas regiones de Estados Unidos (McGraw *et al.*, 2002), Ecuador, Tailandia (Roy *et al.*, 2007), China (Cheng *et al.*, 2005) y México (Esparza-Leal *et al.*, 2010; Valencia-Castañeda *et al.*, 2017). De acuerdo a la FAO (2017), en el 2015 la producción por camaronicultura a nivel mundial fue de 4 875 793 toneladas, de las cuales el 79 % correspondió a producción en agua salobre, 6 % en agua marina y el 15 % en agua dulce. El desarrollo del cultivo de camarón bajo estas condiciones ha partido de la suposición de que, las áreas están libres de patógenos de camarones, y que en ellas no se presentan las enfermedades comúnmente registradas en ambientes costeros (Flaherty y Vandergeest,

1998; Flaherty *et al.*, 2000). En México, se implementó el cultivo de camarón tierra adentro utilizando agua de baja salinidad en el año de 1997, para 2007 se contaba con cerca de 350 hectáreas y una producción de 1500 toneladas en el estado de Colima, principal estado en México con producción de camarón en baja salinidad (Industria acuícola, 2008), y de acuerdo al Comité Estatal de Sanidad Acuícola del estado de Baja California (CESAIBC) en este estado se cuentan con 14 granjas acuícolas que hacen un total de 22 hectáreas de superficie de cultivo de camarón blanco utilizando agua de dulce o de baja salinidad, donde en el 2013 registraron una producción de 354.8 toneladas.

Lo que ha permitido cultivar camarón marino en agua dulce o de baja salinidad se debe a la gran capacidad que tienen los camarones de regular el agua y los solutos inorgánicos internos, manteniendo un medio apropiado para las interacciones moleculares (Nunes y Velázquez, 2001; Re *et al.*, 2004; Palacios y Racotta, 2007). Independientemente del régimen halino en que se desarrolle el cultivo de camarón, el fundamento científico para lograr un cultivo exitoso de *L. vannamei* está en la disponibilidad de agua cuya composición iónica sea adecuada en términos no sólo de la salinidad, sino de los niveles de concentración individuales y relativos (proporciones) de los iones mayoritarios. Para su óptimo desarrollo, el camarón requiere concentraciones y proporciones específicas de los principales iones, como el bicarbonato, sulfato, cloruro, calcio, sodio, magnesio y potasio. Esto implica que cualquier agua con esta característica puede servir para desarrollar un cultivo exitoso, independientemente de si es o no agua de mar; algunas aguas de pozo y superficiales (río, lagos, presas) son adecuadas para el cultivo de camarón y otras no (Páez-Osuna y Valencia-Castañeda, 2013). Sin embargo, la principal característica de las aguas dulces o de baja salinidad es que ambas por lo regular carecen de las concentraciones adecuadas de ciertos iones entre los que destacan K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} y Cl^- (McGraw y Scarpa, 2002; Davis *et al.*, 2004; 2005). En cuanto a la importancia de los iones con respecto a la toxicidad de compuestos nitrogenados, se tiene documentado que el ión Cl^- y Na^+ disminuyen la toxicidad de nitritos y amonio, respectivamente, debido a que disminuyen la absorción de estos compuestos tóxicos en la hemolinfa (Williams y Eddy, 1988; Chen y Chen, 1992a; 1992b; Chen y Lee, 1997; Yildiz y Benli, 2004).

La variabilidad en el contenido iónico de las aguas subterráneas y las superficiales está estrechamente controlada por la naturaleza geológica y geoquímica de los suelos y rocas con las que están en contacto, es por ello que no todas estas aguas son aptas para el cultivo de camarón (Collins *et al.*, 2005). Por lo general en cultivos de camarón tierra adentro, donde las aguas presentan deficiencia de los iones más importantes para la supervivencia de los organismos, tradicionalmente se han suplementado sales en el alimento o directamente en el agua de cultivo obteniendo resultados satisfactorios en crecimiento y supervivencia (Roy *et al.*, 2007; 2009; Saoud *et al.*, 2011; Wudtisin y Boyd, 2011; Mariscal-Lagarda *et al.*, 2012).

1.3. Problemática de los compuestos nitrogenados en la camaronicultura

Existen muchas ventajas de llevar a cabo el cultivo de camarón marino en aguas dulce o de baja salinidad (Van Wyk, 1999; Ingram *et al.*, 2000; Fernado y Halwart, 2000; McIntosh y Fitzsimmons, 2003; Samocha *et al.*, 2004); sin embargo, para poder cultivar camarones marinos en ambientes de menor salinidad, primero es necesario encontrar una especie que pueda mantener un equilibrio isosmótico entre los ambientes internos y externos. Un problema al desarrollar el cultivo bajo estas condiciones, es que la capacidad de tolerancia al amonio y al nitrito disminuye en los organismos (Sowers *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2004; Schuler, 2008); lo cual, representa un gran problema debido a que a medida que avanza el periodo de cultivo, también aumentan las concentraciones de estos compuestos, los cuales pueden ocasionar bajas tasas en el consumo de alimento y por lo tanto una disminución en el crecimiento, y eventualmente mortalidad (Chen *et al.*, 1989). Aunado a esto, las aguas de baja salinidad disponibles frecuentemente se caracterizan por tener mayores concentraciones de compuestos nitrogenados que las aguas marinas, debido a que reciben regularmente efluentes contaminados por actividades antropogénicas o de manera natural.

Después del oxígeno disuelto, el control de amonio y nitritos en la acuicultura es el segundo factor más importante que impacta en la supervivencia y crecimiento de los organismos cultivados (Ebeling *et al.*, 2006). Con respecto a los nitratos, estos son el producto final de la nitrificación aeróbica (Pierce y Weeks, 1993), y son los compuestos nitrogenados inorgánicos menos tóxicos, sin embargo, pueden ser un potencial problema

cuando sus niveles aumentan y se acumulan. En sistemas cerrados y semi-cerrados, como los sistemas de cultivo, los nitratos frecuentemente se hallan presentes en niveles más elevados que los encontrados en las aguas costeras naturales.

1.4. Camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

Una de las especies más cultivadas en el mundo es el camarón blanco *L. vannamei* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997). En la naturaleza, se encuentra en las aguas tropicales del Pacífico, desde México hasta Perú. Esta especie se encuentra en aguas con una amplia gama de salinidades (de 1 a 40 g/L) debido a sus mecanismos de osmorregulación (Castille y Lawrence, 1981). La alta tolerancia de *L. vannamei* a baja salinidad y posibilidad de producir postlarvas durante todo el año, hacen de esta especie una excelente candidata para el cultivo tierra adentro. En el 2015, la producción mundial por camaronicultura de *L. vannamei* fue de 3 879 786 toneladas, de las cuales 739 168 toneladas corresponden a cultivo en aguas dulces o de baja salinidad (FAO, 2017).

1.5. Pruebas de toxicidad en organismos acuáticos

Las pruebas de toxicidad acuática son procedimientos donde la respuesta de los organismos es utilizada para detectar o medir el efecto de una o más sustancias. La concentración letal media (CL_{50}) y la concentración efectiva media (EC_{50}) son parámetros de toxicidad estandarizadas, que permiten conocer las concentraciones de tóxico que produce la muerte (CL) o el efecto (CE) en 50% de los organismos en un tiempo determinado (APHA-AWWA-WPCF, 1992). Las buenas prácticas de manejo en la acuicultura procuraran mantener la concentración de elementos tóxicos por debajo de las concentraciones que causan mortalidad o efectos adversos sobre el crecimiento y la reproducción de los organismos de cultivo. Esta información se calcula generalmente por medio de un parámetro de toxicidad por un periodo de 96 h (Boyd y Tucker, 1998). Los valores de la CL_{50} pueden ser útiles para calcular las concentraciones seguras que permiten que los organismos prosperen (Sprague, 1971). Sin embargo, algunos trabajos además de conocer los niveles de seguridad a partir de pruebas de toxicidad, analizan factores de estrés como son el intercambio de gases, el equilibrio ácido/base, las respuestas inmunológicas, la

osmorregulación, y la histopatología, que a menudo revelan alteraciones significativas aún a concentraciones relativamente bajas (Dahl *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, *L. vannamei* tiene una gran capacidad osmorreguladora debido a que una parte de su ciclo de vida se desarrolla en ambientes salobres o de baja salinidad; sin embargo, estos ambientes eventualmente reciben descargas de tipo industrial, agrícola, doméstico o municipal, que se caracterizan por estar enriquecidas con compuestos nitrogenados y ocasionan problemas sobre las poblaciones silvestres que se encuentran en dichas aguas receptoras, incluyendo a esta especie, es por ello, que tiene una doble importancia establecer con precisión las concentraciones letales agudas y subletales de los compuestos nitrogenados para este camarón; por un lado, para entender a los posibles efectos en las poblaciones silvestres de esta especie que eventualmente se exponen en dichos ambientes, y por el otro, para la acuicultura en aguas de baja salinidad resulta fundamental entender la dinámica de los compuestos nitrogenados y en especial los efectos letales y subletales que causan éstos en los sistemas de cultivo, que se traducen en una baja producción y pérdidas para el sector.

Como ya se mencionó anteriormente, el cultivo puede fallar por un manejo inadecuado o porque no se tienen las condiciones apropiadas para desarrollar dicho cultivo. En este último caso, es trascendental la ubicación de las granjas en cuánto al clima, fuente de agua y recepción de desechos y aguas contaminadas. En el caso del manejo inadecuado es frecuente que el granjero con el afán de tener un mejor cultivo sobre alimento y sobre-fertilize; o se haga un uso incorrecto de los alimentos y fertilizantes, subutilice el alimento natural del estanque, se trate inadecuadamente los estanques entre ciclos de cultivo y lo que parece más simple, se exponga el cultivo a temperaturas extremas, por adelantar o retrasar la siembra y cosecha, respectivamente (Boyd, 1995). Diversos especialistas han reiterado que la calidad del agua es determinante para la supervivencia y crecimiento del camarón, debido a que esta afecta la tasa de alimentación, tasa de respiración, tasa de crecimiento y al sistema inmune; por ello es importante la implementación de buenas prácticas y medidas de bioseguridad en los diferentes sistemas de cultivo.

Dada la importancia en nuestro país y en el mundo, el cultivo de camarón blanco en agua dulce o de baja salinidad y a la escasa información sobre la toxicidad de compuestos

nitrogenados, esta investigación tiene como objetivo examinar por separado y en combinación, el efecto tóxico de amonio, nitritos y nitratos en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* expuestos en aguas de baja salinidad (1 y 3 g/L), para establecer las concentraciones letales medias, así como estimar los niveles de seguridad para el cultivo de esta especie. Además se plantean conocer algunos efectos subletales y subcrónicos en los organismos al exponerse a diferentes concentraciones de estos compuestos en el corto (48 h) y mediano plazo (28 días), evaluando tasas de crecimiento, supervivencia, así como los niveles de oxihemocianina, glucosa y lactato en la hemolinfa como respuesta al estrés por la presencia de los tóxicos.

2. ANTECEDENTES

En 1998, Tailandia inicia el desarrollo de la tecnología de la camaronicultura en agua dulce o baja salinidad, produciendo el camarón tigre (*Penaeus monodon*), esto con el fin de contrarrestar las enfermedades virales. Actualmente, es una práctica común no solo en Tailandia, sino también en muchos países del mundo entre los que destacan China, Vietnam, Ecuador, Brasil, México y Estados Unidos (Roy *et al.*, 2010). Con el desarrollo de esta actividad en aguas dulces o de baja salinidad se han venido realizando investigaciones desde procesos de aclimatación, osmorregulación, crecimiento, supervivencia (McGraw *et al.*, 2002; Balbi *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007; Valencia-Castañeda, 2013) hasta estudios sobre la viabilidad de las aguas para desarrollar el cultivo de camarón (Saoud *et al.*, 2003; Esparza-Leal *et al.*, 2009; Millán-Almaraz, 2013; Valencia-Castañeda *et al.*, 2017). Así también, existen investigaciones sobre la toxicidad de los compuestos nitrogenados en camarones peneidos en ambientes de aguas marinas y salobres; sin embargo, a pesar de que la toxicidad de estos aumenta conforme disminuye la salinidad, se cuenta con poca o nula información en ambientes de aguas dulces y de baja salinidad para diferentes especies de camarones peneidos.

2.1. Estudios sobre toxicidad de amonio

Chin y Chen (1987) sometieron postlarvas (PL6) de *P. monodon*, en una salinidad de 34 g/L, a diferentes concentraciones de amonio; la CL₅₀ a las 96 h fue de 11.51 mg/L NAT (nitrógeno amoniacal total) y de 1.04 mg/L de N-NH₃ (N-amonio no ionizado). Chen y Kou (1991) expusieron a *Penaeus japonicus* con peso promedio de 13.91±0.65 g en agua de mar (36 g/L) a cuatro diferentes concentraciones de NAT (5, 10, 50 y 100 mg de NAT/L), no encontraron ninguna diferencia significativa en la concentraciones de amonio en la hemolinfa entre camarones expuestos a los controles y a 5 mg/L durante las primeras 16 h. Sin embargo, el amonio en la hemolinfa de los camarones expuesto a 10, 50 y 100 mg/L de NAT fue significativamente mayor a los controles después de 2 h de exposición. Alcaraz *et al.* (1999a) estudiaron el efecto de amonio en el consumo de oxígeno en postlarvas del camarón *Penaeus setiferus* sometido a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en agua de mar artificial (25 g/L); encontraron que la adición de 0.4 mg/L de N-NH₃ tiende a

reducir el consumo de oxígeno en los organismos; a una exposición de 0.7 mg/L de N-NH₃, causó graves efectos sobre la frecuencia respiratoria y fue letal a bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Barbieri *et al.* (2010) expusieron a diferentes concentraciones de amonio y salinidades de 5, 25 y 35 g/L a juveniles de *Litopenaeus schmitti* durante 96 h; los valores de la CL₅₀ a las 24, 48, 72 y 96 h de NAT fueron 40.72, 32.63, 24.63 y 19.12 mg/L a 5 g/L; 53.52, 38.60, 27.76 y 25.55 mg/L a 20 g/L; 54.32, 47.87, 41.67 y 38.88 mg/L a 35 g/L de salinidad, respectivamente. Los valores de las CL₅₀ a las 24, 48, 72 y 96 h de N-NH₃ fueron 1.46, 1.17, 0.88 y 0.69 mg/L a 5 g/L; 1.80, 1.30, 0.93, 0.86 mg/L a 20 g/L y 1.67, 1.47, 1.28 y 1.20 mg/L a 35 g/L de salinidad, respectivamente.

Sobre la toxicidad de amonio en el camarón blanco *L. vannamei*: Frías-Espericueta *et al.* (2000) expusieron a postlarvas de *L. vannamei* (PL12) a diferentes concentraciones de amonio en una salinidad de 35 g/L; la CL₅₀ a las 24, 48, 72 y 96 h fueron de 17.9, 12.5, 12.2 y 12.2 mg/L de NAT, respectivamente; con estos valores proponen que el nivel de seguridad para el cultivo de las postlarvas de *L. vannamei* sea de 1.22 mg/L de NAT (0.048 mg/L de N-NH₃). Frías-Espericueta *et al.* (1999) evaluaron la toxicidad aguda en juveniles de *L. vannamei* de 0.99 y 3.8 g a diferentes concentraciones de NAT y una salinidad de 34 g/L. Las CL₅₀ a las 24, 48, 72 y 96 h para camarones de 0.99 g fueron de 113.4, 92.5, 71.2 y 65.2, y 110.6 mg/L de NAT, respectivamente; mientras que las CL₅₀ a las 48, 72 y 96 h para camarones de 3.8 g fueron de 110.63, 85.3 y 70.9 mg/L de NAT. Por otro lado, Lin y Chen (2001) expusieron a juveniles de *L. vannamei* a diferentes concentraciones de NAT, usando el método estático de renovación a salinidades de 15, 25 y 35 g/L. Las CL₅₀ a las 24, 48, 72 y 96 h como NAT fueron 59.72, 40.58, 32.15 y 24.39 mg/L para una salinidad de 15 g/L; 66.38, 48.83, 43.17 y 35.4 mg/L a 25 g/L; 68.75, 53.84, 44.93 y 39.54 mg/L a 35 g/L, respectivamente. Concluyeron que a medida que la salinidad disminuye de 35 a 15 g/L, la susceptibilidad al NAT aumenta en un 115, 132, 140 y 162 % después de 24, 48, 72 y 96 h de exposición, en el orden. Cobo *et al.* (2014) expusieron durante 24 h a diferentes concentraciones de amonio y una salinidad de 34 g/L a zoea, mysis y postlarvas de *L. vannamei* durante 24 h; las CL₅₀ a las 24 h en zoea (1-2,3), mysis (1-2,3) y postlarva (PL1) fueron de 4.2, 9.9 y 16.0; 19.0, 17.3 y 17.5; y 13.2 mg/L de NAT, respectivamente. En

cuanto a la CL_{50} de N-NH₃ fueron de 0.6, 1.5 y 2.4; 2.8, 2.5 y 2.6; y 1.9 mg/L de N-NH₃ respectivamente.

2.2. Estudios sobre toxicidad de nitritos

En cuanto a la toxicidad de nitritos en camarones peneidos: juveniles (1.40 ± 0.05 g) de *P. monodon* fueron expuestos a diferentes concentraciones de nitrógeno como nitritos (N-NO₂⁻) y una salinidad de 25 g/L. Los resultados mostraron diferencias significativas después de 80 días de exposición en los pesos promedio de los camarones expuestos a las concentraciones de 2, 4, 8 y 20 mg/L de N-NO₂⁻ con respecto al control (0 mg/L de N-NO₂⁻), estos mismos resultados fueron observados en la longitud de los camarones (Chen y Chen, 1992c). Para postlarvas de *P. setiferus*, Alcaraz *et al.* (1999a) en agua de mar (25 g/L) observaron que la exposición de nitritos disminuyó la frecuencia respiratoria en concentraciones altas de oxígeno disuelto, mientras que en organismos expuestos a nitritos bajo condiciones de hipoxia mostraron un mayor consumo de oxígeno. Chen y Cheng (1995) examinaron las concentraciones de oxihemocianina, proteína y urea en la hemolinfa, y la tasa de excreción de NAT de *P. japonicus*, después de que fueron expuestos individualmente a diferentes concentraciones (5.12, 10.46, 20.57 y 58.86 mg/L) de N-NO₂⁻ por 24 h a una salinidad de 30 g/L. La acumulación de N-NO₂⁻ y urea en la hemolinfa, y la excreción de NAT aumentaron con el incremento de nitritos en el ambiente, además las concentraciones de nitritos disminuyeron la oxihemocianina en la hemolinfa. Cheng y Chen (1999) estudiaron en *P. monodon* la afinidad de la hemocianina por el oxígeno y el fraccionamiento de la oxihemocianina y deoxihemocianina en la hemolinfa al exponerlos a 0.001 (control), 0.07, 0.36, 0.72 y 1.44 mmol/L de nitritos de 3 a 48 h en una salinidad de 30 g/L. Xian *et al.* (2011) encontraron que cuando *P. monodon* se expone a diferentes concentraciones de N-NO₂⁻ se inducía una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, después se daña el ADN y se observa apoptosis (muerte celular programada) de las células, y, posteriormente, se presenta una reducción del número total de hemocitos (TAC).

Lin y Chen (2003) expusieron a diferentes concentraciones de N-NO₂⁻ a juveniles de *L. vannamei* de 3.9 ± 1.42 g para determinar la CL_{50} en salinidades de 15, 25 y 35 g/L, encontrando que los valores de CL_{50} de N-NO₂⁻ a las 24, 48, 72, 96 y 144 h mantuvieron

una tendencia a disminuir cuando los camarones eran expuestos a una salinidad menor. Wang *et al.* (2006) evaluaron la CL₅₀ a las 24, 48 y 96 h de nitritos sobre intermediarios reactivos del oxígeno en hemocitos (ROIs), superóxido dismutasa (SOD), actividad catalítica (CAT), actividad glutatión peroxidasa (GPX), en el músculo y hemocitos de *L. vannamei* en agua de mar a 3 g/L. Los organismos fueron alimentados con una dieta basal y una dieta experimental alta en selenio; los resultados mostraron que los camarones que fueron alimentados con la dieta alta en selenio, tuvieron una CL₅₀ significativamente menor a las 24 h, 48 h y 96 h de nitritos, lo que indica que el selenio aumenta la toxicidad de nitritos, asimismo se incrementaron los valores de ROIs en el alimento del camarón a medida que se incrementaba la concentración de nitritos en el ambiente. Encontraron también un desequilibrio entre fuerzas oxidativas y defensas antioxidantes.

Gross *et al.* (2004) estudiaron la toxicidad de nitritos en juveniles de *L. vannamei*, donde los valores de CL₅₀ a las 96 h de nitritos cultivados en agua de baja salinidad empleando agua de mar diluida (2 g/L) fue aproximadamente 9 mg/L de N-NO₂⁻, usando un factor de aplicación de 0.5 del valor de la CL₅₀, sugirieron que para la producción de camarón en estanques, la concentración debe ser inferior a 0.45 mg/L. Al igual que con el amonio, se ha documentado que los nitritos a medida que la salinidad disminuye aumenta la toxicidad en *L. vannamei* (Lin y Chen, 2003). Sowers *et al.* (2004) en una serie de experimentos caracterizaron la captación, depuración y toxicidad de los nitritos en el ambiente al exponer a *L. vannamei* en agua de mar artificial preparada con sales marinas artificiales a una salinidad a 2 g/L, demostraron que los nitritos se fueron concentrando en la hemolinfa en forma dependiente de la dosis a las cuales fueron expuestos los organismos y de manera rápida (en aproximadamente 2 días); sin embargo, al pasar a los organismos que fueron expuestos a nitritos a un ambiente libre de nitritos para su depuración, ésta ocurrió en un día; en cuanto a la toxicidad de nitrato, ésta fue determinada por medio de la CL₅₀ a las 96 h a una salinidad de 2 g/L (8.4 mg/L N-NO₂⁻).

2.3. Estudios sobre toxicidad de nitratos

Respecto a la toxicidad por nitratos, es muy escasa la información que existe. Muir *et al.* (1991) examinaron aparentemente por primera vez, los efectos de los nitratos en protozoas de *P. monodon*, y encontraron que se presentan mortalidades significativas

dentro de las primeras 40 h en concentraciones de nitratos tan bajas como de 1 mg/L de nitrógeno como nitratos (N-NO_3^-). Los efectos subletales de esta concentración resultaron en cambios en las neuropilas gangliónicas y los músculos. En concentraciones más elevadas (10-100 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$) fueron adicionalmente afectadas la hipodermis, la glándula digestiva y el proventrículo. Arrellano (1993) menciona que para larvicultura y engorda de *L. vannamei*, la concentración de nitratos en el agua no parece ser de gran relevancia, mientras que Lee y Wickins (1997) mencionan que en el cultivo de peneidos, una concentración entre 100 y 200 mg/L se considera razonable y que no les afecta.

Tsai y Chen (2002) expusieron juveniles de *P. monodon* a diferentes concentraciones de N-NO_3^- (250 a 4500 mg/L) usando el método estático con renovación a diferentes niveles de salinidad. Las CL_{50} a las 48, 72 y 96 h fueron 2876, 1723 y 1449 mg/L de N-NO_3^- en agua de mar de 15 g/L; 3894, 2506 y 1575 mg/L de N-NO_3^- en 25 g/L; 4970, 3525 y 2316 mg/L de N-NO_3^- en 35 g/L, respectivamente. El nivel de seguridad estimado para el cultivo de juveniles de *P. monodon* fue de 145, 158 y 232 mg/L de N-NO_3^- en 15, 25 y 35 g/L de salinidades, respectivamente. Cheng *et al.* (2002) expusieron a *P. monodon* a concentraciones de N-NO_3^- en una salinidad de 25 g/L; fue examinada la acumulación de nitratos en la hemolinfa, branquias, pedúnculo, corazón, intestino, hepatopáncreas y músculo; se encontró que la concentración de nitratos en los tejidos aumentó directamente con la concentración de nitratos en el ambiente y el tiempo de exposición, excepto el músculo. Después de 24 h de exposición a nitratos, la concentración de nitrato muscular fue la más baja (0.202 $\mu\text{mol/g}$), y la concentración de nitrato intestinal fue la más alta (1.529 $\mu\text{mol/g}$) entre los tejidos analizados.

Para el camarón blanco *L. vannamei*, Kuhn *et al.* (2010) llevaron a cabo experimentos en sistemas de recirculación para determinar a largo plazo el efecto de nitratos en el crecimiento, supervivencia, biomasa y longitud de las antenas, y patología del tejido en los organismos. Llevaron a cabo un experimento con duración de seis semanas a 11 g/L de salinidad el cual consistió en un control A (35 mg/L de N-NO_3^-), tratamiento A1 (220 mg/L de N-NO_3^-), tratamiento A2 (435 mg/L de N-NO_3^-) y tratamiento A3 (910 mg/L de N-NO_3^-). No se observaron diferencias entre el control A y el tratamiento A1 en términos de supervivencia, crecimiento, biomasa y longitud antenal. El tratamiento A2 no mostró

diferencias con el control en cuanto a la supervivencia y el crecimiento, pero si mostró en cuanto a biomasa y longitud de las antenas. Por último, el tratamiento A3 presentó un impacto negativo significativo en la supervivencia, crecimiento, biomasa y longitud antenal. En cuanto a los cambios patológicos, todos los camarones mostraron lesiones en el hepatopáncreas. Los túbulos del hepatopáncreas mostraron una variedad de lesiones. Algunos túbulos tenían una reducción en el número y tamaño de vacuolas de lípidos almacenados, mientras que otros túbulos estaban completamente desprovistos de células epiteliales y dilatadas.

2.4. Estudios sobre toxicidad de mezclas

Los trabajos sobre la toxicidad de mezclas de compuestos nitrogenados en crustáceos, son escasos a pesar de que en los sistemas naturales y de cultivo se presenta la interacción de estos; Chen y Chin (1988), expusieron a postlarvas (PL6) de camarón tigre *P. monodon* a una mezcla de amonio y nitritos con una relación de toxicidad de 1:1, encontrando que el efecto combinado de amonio y nitritos fue antagónico para las 48 y 72 h de exposición, pero sinérgico después de las 96 h. Por su parte, Alcaraz *et al.* (1999b) expusieron postlarvas de *P. setiferus* a niveles agudos de mezcla de amonio y nitritos, los valores de la CL₅₀ a las 24, 48 y 72 h de NAT fueron 1.49, 1.21 y 1.12 mg/L, respectivamente, y para nitritos las CL₅₀ fueron 268.06, 248.84 y 167.33 mg/L de N-NO₂⁻, encontrando que el efecto conjunto de amonio y nitritos en postlarvas fue sinérgico a las 48 h y antagónico a las 72 h de exposición.

Cheng y Chen (2002a) expusieron juveniles de *P. monodon* (11.47±0.71 g) a diferentes concentraciones por separado y en combinación de nitritos y nitratos a una salinidad de 30 g/L. El nitrito ambiental a una concentración de 0.359 mM causó la reducción de la oxihemocianina y la proteína en un 27 y 11 %, respectivamente, mientras que el nitrato ambiental (7.458 mM) causó la reducción de la oxihemocianina y la proteína en un 10 y 7 %. El nitrito ambiental a una concentración de 1.456 mM causó aumentos de P_{50} (indicando una reducción a la afinidad del oxígeno) y pO_2 (presión parcial del oxígeno), pero causó la reducción en pCO_2 (presión parcial del dióxido de carbono), pH, HCO₃⁻ (bicarbonato) y TCO₂ (total de dióxido de carbono) de la hemolinfa. Tras la exposición a soluciones combinadas de nitritos (1.456 mM) y nitratos (7.458 mM) no hubo cambios adicionales en

la oxihemocianina, proteína, P_{50} , pO_2 , pCO_2 , HCO_3^- y TCO_2 de la hemolinfa, pero hubo una reducción significativa del pH.

Schuler *et al.* (2010) estudiaron la toxicidad de amonio y nitritos de manera individual y combinada sobre PL_{25} y PL_{45} de *L. vannamei* en agua de baja salinidad (10 g/L) y salobre (18 g/L) bajo condiciones de temperatura de 28 °C y pH de 7.8; encontrando que en los experimentos realizados con NAT a 18 g/L (sin nitrito), 10 g/L (sin nitrito), y a 10 g/L con $N-NO_2^-$ la CL_{50-48} h fue de 42.9, 39.72 y 153.75 mg/L de $N-NO_2^-$, respectivamente. Sin embargo, al llevar a cabo los bioensayos combinando, los tóxicos (amonio y nitritos), los cuales se realizaron a 10 g/L de salinidad, se observó que al exponer a los organismos a 133 mg/L de $N-NO_2^-$ valor considerado como la concentración más baja a la que se observan efectos (LOEC) y concentraciones variantes de NAT (29.1, 36.2, 39.7, 43.6 y 54.2 mg/L de NAT) se calculó una CL_{50-48} h de 28.2 mg/L $N-NO_2^-$, la cual fue 29 % más tóxica con respecto a la estimada en el bioensayo con nitritos (sin amonio). Por otro lado cuando se realizó el experimento con 30 mg/L de NAT (LOEC) y concentraciones variantes de nitritos (128.0, 145.5, 153.7, 162.5 y 184.6 mg/L de $N-NO_2^-$), la CL_{50-48} h estimada fue 187 mg/L de NAT, la cual fue 21.4 % menos tóxica que la determinada en el bioensayo con amonio (sin nitritos) por lo que se demostró que el efecto combinado de amonio y nitritos debe ser considerado cuando se lleva a cabo un cultivo de camarón.

3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La actividad de la camaronicultura en los últimos años ha disminuido su tasa de desarrollo por el impacto de las enfermedades, principalmente virales, es por ello, que como alternativa surge el cultivo de camarón en agua dulce o de baja salinidad; sin embargo, por un lado, se tiene que las aguas de baja salinidad y tierra adentro se caracterizan por recibir eventualmente grandes aportes de nitrógeno; y por el otro, hay evidencia científica, para un amplio intervalo de salinidades, de que los compuestos del nitrógeno se vuelven más tóxicos para los organismos en condiciones de baja salinidad, y no existe información al respecto en salinidades bajas (1 y 3 g/L) que son a las que actualmente se cultiva *L. vannamei* tierra adentro en México; además, se tiene conocimiento científico y por parte del sector productivo que bajo estas condiciones de salinidad se pueden también presentar problemas de enfermedades, debido a un deterioro de la calidad de agua, siendo los nitritos los que incrementan considerablemente a partir de las primeras semanas de cultivo y causan una mayor toxicidad en este tipo de ambientes (Chen y Chen, 1992c; Tacon *et al.*, 2002).

Existe información sobre la toxicidad de amonio, nitritos y nitratos en las especies de camarón que más se cultivan a nivel mundial (*L. vannamei*, *P. monodon*, *L. schmitti*) en aguas marinas, salobres y de menor salinidad (<3 g/L) (e.g. Chen y Lin, 1991; Frías-Espéricueta *et al.*, 2000; Lin y Chen, 2001; Tsai y Chen, 2002; Gross *et al.*, 2004; Romano y Zeng, 2009a); sin embargo, a pesar de que está documentado que conforme baja la salinidad estos compuestos nitrogenados se vuelven más críticos para los organismos, la información en aguas con salinidades <3 g/L es escasa, y se conoce muy poco sobre las afectaciones que llegan a presentar los organismos al exponerse a altas o moderadas concentraciones de compuestos nitrogenados. Algunos trabajos han demostrado modificaciones en la concentración de oxihemocianina en la hemolinfa de algunos crustáceos al exponerlos a compuestos nitrogenados, lo que da como resultado posiblemente una alteración, que pueden ser moderada o significativa en las concentraciones de metabolitos como glucosa, glutamato, lactato, acilglicerol, colesterol, urea y glucógeno (Chen y Cheng, 1993, 1994; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Liu y Chen, 2004; Tseng y Chen, 2004; Hong *et al.*, 2007, 2009).

La mayoría de los estudios existentes sobre la toxicidad de compuestos nitrogenados en camarones se han realizado por separado, y tanto en sistemas naturales como de cultivo los organismos se exponen a mezclas de estos. Los pocos trabajos de mezclas de compuestos nitrogenados han observado reacciones sinérgicas y antagónicas en diferentes tiempos de exposición y solo se han hecho en combinación de dos compuestos nitrogenados (Chen y Chin, 1988b; Alcaraz *et al.*, 1999b; Schuler *et al.*, 2010). Es por ello también la gran importancia de realizar pruebas de toxicidad con la mezcla de los tres compuestos nitrogenados y conocer si existen reacciones antagónicas y/o sinérgicas bajo condiciones de menor salinidad, ya que los estudios existentes, han sido en aguas con salinidades mayores a 10 g/L con *P. monodon* y *P. setiferus*.

Por tanto, dada la importancia de la actividad acuícola a nivel mundial y nacional y a que son limitados los estudios sobre toxicidad de amonio, nitritos y nitratos en *L. vannamei* en aguas de baja salinidad (<3 g/L), además que esta especie cada vez se cultiva más a nivel regional y mundial, y a que no se dispone de información sobre los niveles de seguridad para desarrollar esta tecnología; se justifica plenamente el desarrollar estudios en este contexto, para contribuir así al mejor conocimiento de esta especie tanto en los ecosistemas naturales como en los de cultivo. El estudio de los efectos subletales en *L. vannamei* permitiría avanzar en un mejor entendimiento de los mecanismos de disparo de algunas de las enfermedades más frecuentes en esta especie al verse sometidos a estos factores estresantes y con ello verse afectado su sistema inmunológico; por tanto identificar manifestaciones tempranas es un punto clave para poder implementar medidas de manejo oportunas y efectivas.

4. PREGUNTAS E HIPÓTESIS

La presente propuesta se basa en las premisas de una susceptibilidad diferencial de los camarones a compuestos nitrogenados respecto a la salinidad y a las mezclas que producen un efecto sinérgico, antagónico o aditivo, por lo que se pretende contribuir al conocimiento respondiendo la siguiente hipótesis:

Las concentraciones de amonio, nitritos y nitratos serán más tóxicas en postlarvas que en juveniles de *L. vannamei*; además la toxicidad aguda de estos compuestos resultará ser mayor a medida que son expuestos a menores salinidades. Las mezclas de los tres compuestos nitrogenados (amonio-nitritos-nitratos) producirán reacciones antagónicas, sinérgicas, aditivas y/o de potenciación en diferentes tiempos de exposición en ambientes de salinidades de 1 y 3 g/L.

Al exponer a *L. vannamei* a moderadas y altas concentraciones de amonio, nitritos y nitratos solos y combinados en salinidades de 1 y 3 g/L, se espera que los efectos subletales se manifiesten a través de una reducción en la tasa de consumo de alimento, nado errático con movimientos descoordinados y lesiones en órganos y tejidos; las concentraciones de oxihemocianina mostrarán una disminución, y los niveles de glucosa y lactato en la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* como indicadores de estrés, serán modificados por los niveles subletales de los tóxicos.

Los niveles de seguridad para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad bajo condiciones de laboratorio, serán menores que las concentraciones establecidas para cultivos en aguas marinas (33-37 g/L) y salobres (10-33 g/L).

Por tal motivo, en éste trabajo se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál será la diferencia de toxicidad por amonio, nitritos y nitratos solos y combinados en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* al exponerlas en de 1 y 3 g/L de salinidad?

¿Habrá efectos antagónicos, sinérgicos, aditivos y/o potenciación en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* cuando se presentan las combinaciones de los tres compuestos nitrogenados (amonio-nitritos-nitratos) en ambientes de baja salinidad (1 y 3 g/L)?

¿Cuáles son los efectos subletales más evidentes y de que magnitud se presentan en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* al exponerlos a diferentes concentraciones solas y combinadas de amonio, nitritos y nitratos; y cómo influye la toxicidad de los diferentes

compuestos nitrogenados en las concentraciones de iones, oxihemocianina, glucosa y lactato en la hemolinfa de los juveniles de *L. vannamei*?

¿Bajo condiciones de laboratorio, cuáles son los niveles de seguridad de amonio, nitritos y nitratos para sistemas de cultivo de postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en salinidades menores a 3 g/L?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar, mediante pruebas de toxicidad, la concentración letal media de amonio, nitritos y nitratos solos y combinados en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* expuestos a aguas de baja salinidad (1 y 3 g/L), así como establecer efectos subletales y subcrónicos al exponerlos a diferentes concentraciones de los compuestos nitrogenados.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar la toxicidad aguda de nitritos en postlarvas de *L. vannamei* mediante la comparación de cuatro diferentes tratamientos influenciados por la alimentación y renovación de la solución en aguas de baja salinidad (3 g/L).
- Evaluar la toxicidad aguda de amonio, nitritos y nitratos en postlarvas de *L. vannamei* (PL20) en aguas de baja salinidad (1 y 3 g/L).
- Evaluar la toxicidad aguda de amonio, nitritos y nitratos en juveniles de *L. vannamei* (3 g) en aguas de baja salinidad (3 g/L).
- Evaluar la toxicidad aguda de la mezcla amonio-nitritos-nitratos (1:1 y 1:1:1, unidades de toxicidad) en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*, y determinar si existe un efecto antagónico, sinérgico, aditivo o potenciación en ambientes de baja salinidad (1 y 3 g/L).
- Evaluar la toxicidad aguda de la mezcla amonio-nitritos, amonio-nitratos y nitritos-nitratos (1:1, unidades de toxicidad) en postlarvas de *L. vannamei*, y determinar si existe un efecto antagónico, sinérgico, aditivo o potenciación en ambientes de baja salinidad (3 g/L).
- Evaluar la toxicidad aguda de la combinación-interacción de los compuestos nitrogenados (amonio-nitritos-nitratos) bajo diferentes escenarios de salinidad (1, 3 y 25 g/L) en postlarvas y juveniles.
- Determinar y cuantificar el efecto que causan las concentraciones letales y subletales de amonio, nitritos y nitratos sobre la tasa de consumo de alimento, movilidad y proceso de ecdisis en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en ambientes de baja salinidad.

- Determinar la tasa de crecimiento específico en juveniles de *L. vannamei* al exponerlo en el mediano plazo a diferentes concentraciones de amonio y nitritos solos y combinados en salinidad de 3 y 25 g/L.
- Evaluar parámetros bioquímicos de juveniles de *L. vannamei* expuestos a concentraciones subletales de amonio, nitritos y nitratos, a partir de los niveles de lactato, glucosa y oxihemocianina en la hemolinfa en el corto plazo (48 h).
- Determinar cambios en algunos cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2}) de la hemolinfa en juveniles de *L. vannamei* al exponerlos a concentraciones subletales de amonio, nitritos y nitratos en el corto plazo (48 h).
- Mediante los efectos de toxicidad aguda y subletales, proponer los niveles de seguridad de amonio, nitritos y nitratos para el cultivo de postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad (1 y 3 g/L) bajo condiciones de laboratorio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron una serie de pruebas para determinar la toxicidad de amonio, nitritos y nitratos en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* (Anexo I), los cuales se llevaron a cabo en el módulo experimental Yum Kaax (YK) ubicado a los 23° 12' 10.81" latitud Norte y 106° 25' 42.23" longitud Oeste, en la Cd. de Mazatlán, Sinaloa.

6.1. Caracterización química del agua de prueba

El agua de mar utilizada para las diferentes pruebas fue obtenida de un laboratorio de producción comercial de larvas de camarón (Fitmar S.A de C.V.) que se ubica en las playas del Camainero, Municipio de El Rosario, Sinaloa. Esta agua es la misma que utilizan en las pilas, tanto para el llenado inicial como para los recambios que se practican durante el proceso de producción, se obtiene de una serie de puntas de pozo que consisten en tubos de PVC de 4" de diámetro y 7 m de largo, ranurados en el extremo inferior, ubicadas en la playa contigua al laboratorio y se bombea hacia un depósito adyacente al área de tratamiento del agua. En esta área, el agua se pasa por filtros rápidos de arena, de cartucho (10 y 5 μm) y de carbón activado, se trata con ozono y radiación ultravioleta, antes de entrar a las salas donde se realizan los cultivos larvarios, el agua pasa a través de bolsas filtrantes que tienen la capacidad de retener partículas de 5 y 1 μm de diámetro, con el fin de eliminar las partículas no retenidas en los sistemas de filtros anteriores. El agua dulce utilizada para reducir la salinidad, fue filtrada por medio de un sistema de filtro de lecho profundo, el cual consiste en capas de grava, zeolita, arena, arcilla y carbón activado, y cuenta además con un filtro de cartucho de 10 μm . Tanto al agua de mar como el agua dulce que se utilizó para las diferentes pruebas de toxicidad se les realizó una caracterización química la cual permitió descartar que la mortalidad de los organismos se pudiera deber a las concentraciones de amonio, nitritos y nitratos y no a otras sustancias tóxicas presentes en el agua. Cabe mencionar que el agua de mar utilizada para los experimentos fue almacenada en tanques de polietileno tipo rotoplas de 450 L, además se realizó una caracterización química de ambas aguas (mar y dulce) al inicio y final de las pruebas. Para determinar la salinidad se empleó un refractómetro marca ATAGO; para el pH y los sólidos disueltos totales (TDS) (a través de la conductividad eléctrica) se empleó

un potenciómetro pHTestr 1 y una sonda de conductividad OAKTON TDS5, respectivamente, los cuales fueron calibrados antes de cada medición con las soluciones correspondientes (buffer de pH de 4 y 7; solución de calibración de conductividad de 1423 y 12880 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

A continuación se describen el principio de cada uno de los análisis que se realizaron a las aguas de prueba:

6.1.1. Determinación de compuestos nitrogenados

6.1.1.1. Amonio

Principio: La determinación de amonio se basa en el método de Solórzano (1969). El método consiste en tratar las muestras de agua en un medio alcalino de citrato de hipoclorito de sodio y fenol, en presencia de nitroprusiato de sodio como catalizador. Se forma el compuesto azul de indofenol formado con el amoniaco y este se mide por su absorbancia a 640 nm. La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 1.2 %.

6.1.1.2. Nitritos

Principio: La determinación de nitritos se basa en el método colorimétrico descrito por Strickland y Parsons (1972) y Grasshoff *et al.* (1990), en el cual el nitrito presente en la muestra de agua se hace reaccionar con sulfanilamida en medio ácido, al compuesto que se forma se hace reaccionar con N-1-naftiletildiamina (NED), y éste produce una coloración rosa debido al compuesto azo. Una vez producida la coloración se lee la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 543 nm. La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 0.9 %.

6.1.1.3. Nitratos

Principio: El método para la determinación de nitratos se basa en la reducción cuantitativa (90 a 95 %) de nitratos a nitritos en una columna de limaduras de cadmio cubiertas con cobre coloidal, en presencia de cloruro de amonio el cual produce un efecto buffer en la disolución y forma un complejo con el cadmio que ha sido oxidado durante la reducción del nitrato (Strickland y Parsons, 1972). La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 1.0 %.

6.1.2. Determinación de alcalinidad (método volumétrico)

Principio: Los iones hidroxilo presentes en una muestra como resultado de la disociación o hidrólisis de los solutos reaccionan con la adición de un ácido estándar. Por lo tanto, la alcalinidad depende del pH usado en el punto final. Para tener la posibilidad de distinguir entre los tres tipos de alcalinidad, es decir, la debida a hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos, se hace distinción entre dos tipos: la alcalinidad a la fenolftaleína y la alcalinidad al anaranjado de metilo. Ambas formas se determinan por titulación con un ácido mineral fuerte de concentración conocida (HCl 0.01 M) (Clesceri *et al.*, 1989). La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 1.5 %.

6.1.3. Determinación de iones mayoritarios

6.1.3.1. Cloruros (método argentométrico)

Principio: En una solución neutra o ligeramente alcalina, el cromato de potasio indica el punto final de la titulación de cloruros con nitrato de plata. El cloruro de plata es precipitado cuantitativamente antes de que se forme el cromato de plata y se vuelva rojo-ladrillo (Clesceri *et al.*, 1989). La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 0.6 %.

6.1.3.2. Sulfatos (método turbidimétrico)

Principio: El ion sulfato (SO_4^{2-}) es precipitado en un medio ácido con cloruro de bario (BaCl_2), para formar cristales de sulfato de bario (BaSO_4) de tamaño uniforme. La absorbancia de la luz de la suspensión de BaSO_4 es medida por un fotómetro y la concentración de SO_4^{2-} es determinada por la comparación de las lecturas con la curva estándar (Armienta *et al.*, 1987). La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 2.1 %.

6.1.3.3. Calcio (emisión de flama)

Principio: La determinación de calcio se llevó a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) empleando una flama de óxido nitroso-acetileno. Utilizando dicha flama la principal interferencia es causada por la ionización del mismo calcio. Esto es solucionando por la adición de uno o más elementos fácilmente ionizables tales como potasio (2000-5000 $\mu\text{g/ml}$). Se determina a una longitud de onda de 422.7 nm (Clesceri *et*

al., 1989). La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 0.9 %.

6.1.3.4. Magnesio (emisión de flama)

Principio: La determinación de magnesio se lleva a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) empleando una flama de óxido nitroso-acetileno. Utilizando dicha flama no se presenta interferencia, por lo que no es necesario usar un supresor iónico. Se determinó a una longitud de onda de 258.2 nm (Clesceri *et al.*, 1989). La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 0.8 %.

6.1.3.5. Sodio (emisión de flama)

Principio: Cantidades bajas de sodio pueden ser determinadas por fotometría de emisión de flama a una longitud de onda de 589 nm. La muestra es rociada en una flama de un gas y la excitación es llevada a cabo bajo condiciones cuidadosamente controladas y reproducibles. La intensidad de la luz a 589 nm es aproximadamente proporcional a la concentración del elemento (Clesceri *et al.*, 1989). Debido a que el sodio es parcialmente ionizado en flama de aire-acetileno, para suprimir la ionización, se añade una solución de cloruro de potasio para dar una concentración final de 2000 µg/ml de potasio en todas las soluciones, incluyendo el blanco. La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 0.8 %.

6.1.3.6. Potasio (emisión de flama)

Principio: Cantidades bajas de potasio pueden ser determinadas ya sea por una lectura directa o por un tipo patrón estándar de fotometría de flama a una longitud de onda de 766.5 nm. Como el potasio es parcialmente ionizado en flama de aire-acetileno, para suprimir la ionización se añade nitrato de cesio (CsNO₃) para dar una concentración final de 1000 µg/ml de cesio en todas las soluciones, incluyendo el blanco. El cesio debe ser usado para evitar la contaminación por potasio (Clesceri *et al.*, 1989). La precisión expresada como el coeficiente de variación para esta técnica fue de 0.6 %.

6.1.4. Determinación de cobre, cadmio, hierro, manganeso, plomo, zinc, mercurio y arsénico por espectrofotometría de absorción atómica

Principio: Este método consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La especie atómica se logra por atomización de la muestra, siendo los distintos procedimientos utilizados para llegar al estado elemental del átomo lo que diferencia las técnicas y accesorios utilizados (Clesceri *et al.*, 1989). La precisión expresada como el coeficiente de variación para la técnica de Cu, Fe, Mn, Pb, Zn, Hg y As fue de 1.2, 0.9, 1.0, 1.1, 0.8, 2.3 y 2.7 %, respectivamente.

6.2. Transporte y aclimatación

De acuerdo con APHA-AWWA-WPFC (1992), para garantizar la calidad de los métodos de pruebas de toxicidad se deben considerar todos los aspectos que puedan afectar la calidad de los datos. Estos incluyen los propios procedimientos de muestreo y la manipulación, la fuente y las condiciones de los organismos de prueba, y los procedimientos de prueba. Se obtuvieron postlarvas de *L. vannamei* en edad de PL15 de un laboratorio de producción comercial de la región de reconocida calidad (FITMAR S. A. de C. V.), aclimatadas a una salinidad de 5 ± 1 g/L, aproximadamente. Las postlarvas contaron con un certificado de salud sanitario que indica que están exentas de los virus IHNV (virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa), TSV, WSSV, IMNV (virus mionecrosis infecciosa) y PvNv (Nodavirus), así como de las bacterias HPB y HMS. Para el transporte se colocaron en bolsas de plástico a las cuales se les proporcionó oxígeno y alimento y se llevaron en una hielera para mantener la temperatura durante el transporte (Vanegas *et al.*, 2008). Una vez transportadas al módulo experimental Yum Kaax, se colocaron en tanques de 400 L previamente lavados y desinfectados con hipoclorito diluido (cloro comercial) que tuvieron agua a la salinidad y temperatura de transporte, donde posteriormente se evaluó la supervivencia (<98%). A partir de las 24 h después del transporte se inició la aclimatación de las postlarvas a las salinidades de 1 y 3 g/L con agua de mar diluida siguiendo los protocolos de Van Wyk *et al.* (1999). Una vez aclimatados a las salinidades deseadas se mantuvieron en periodo de adaptación al medio hasta la edad de PL20 (± 48 h). Las postlarvas fueron alimentadas diariamente al 10 % de su biomasa total con alimento comercial para postlarvas (S-Pak 2/5, INVE Aquaculture, 40 % de proteína, 6

% lípidos y 3 % fibra) y se realizaron recambios de agua diarios del 50 % para evitar la acumulación de compuestos nitrogenados hasta PL20; para determinar la calidad de las postlarvas se realizó una prueba de estrés de salinidad, la cual consistió en someter 200 organismos a 35 g/L de salinidad durante 30 minutos y después llevarlos a la salinidad a la que se encontraban originalmente, se dejaron transcurrir otros 30 minutos para después contar las postlarvas vivas y muertas; el % de mortalidad fue menor del 10%, por lo tanto, los organismos mostraron una excelente calidad (Rojas *et al.*, 2005).

Para el caso de los juveniles, estos se obtuvieron de una granja comercial (Nueva Generación) de camarón cultivados en baja salinidad y que contaban con organismos de aproximadamente 3 g y que su ubicación fue cerca a las instalaciones del YK para reducir estrés en los organismos durante su captura y transporte. Los organismos contaron de la misma manera que las postlarvas con un certificado de salud libre de los patógenos anteriormente mencionados y fueron transportados al módulo experimental en bidones de 50 L y con saturación de oxígeno. En el módulo experimental, los juveniles se colocaron en tanques de 400 L a la salinidad inicial a la que se encontraban. En dichos tanques, los organismos se mantuvieron por 5 días, tiempo en que se aclimataron a la salinidad de 1 y 3 g/L. Durante este tiempo se realizaron recambios de agua diarios del 50 % para evitar acumulación de compuestos nitrogenados y se alimentaron 3 veces al día con alimento comercial para camarón Provimi de la compañía Animalnutri México S.A. de C. V. (40 % de proteína, 5 % grasa, 5 % fibra, 13.5 % cenizas, 12.0 % humedad y 24.5 % E.L.N.). Solamente los camarones juveniles en fase de intermuda fueron seleccionados para las diferentes pruebas. La etapa de muda fue determinada mediante la observación de los urópodos (Wassenberg y Hill, 1984).

Durante el proceso de la aclimatación y pruebas de toxicidad de postlarvas y juveniles, se mantuvieron a una temperatura de aproximadamente 28 ± 1 °C con periodos de día (luz) - noche (oscuridad) de 12 h (Saoud *et al.*, 2003). Diariamente se monitorearon las variables físico-químicas, para medir el oxígeno disuelto y la temperatura se utilizó un oxímetro YSI DO 200, mientras que para el pH y los sólidos disueltos totales (TDS) (a través de la conductividad eléctrica) se empleó un potenciómetro pHTestr 1 y una sonda de conductividad OAKTON TDS5, respectivamente.

6.3. Pruebas de toxicidad

Los experimentos de toxicidad aguda se llevaron a cabo con 8 concentraciones diferentes y con un testigo para cada compuesto tóxico (amonio, nitritos y nitratos), y en cada una de las salinidades (1 y 3 g/L), tanto en postlarvas y juveniles. Las pruebas con cada concentración y su control se realizaron por triplicado en todos los casos (30 organismos por batería de triplicado). Para que las pruebas puedan considerarse aceptables es necesario contar con controles que no contengan el tóxico (0 mg/L) y que al finalizar las pruebas se observen supervivencias superiores al 90 %, de esta manera se determina si la muerte de los organismos fue a causa del tóxico o por otro agente (APHA, 1992). Las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo con el método estático con renovación, en el cual las soluciones del tóxico se renuevan diariamente (Buikema *et al.*, 1982). Se tomaron muestras de las soluciones antes y después de los recambios para determinar analíticamente la concentración del compuesto tóxico de prueba (Vanegas *et al.*, 2008). Todos los recipientes utilizados para las pruebas de toxicidad contaron con sistema de aireación constante por medio de un soplador durante las 96 h. Cada 24 h se cuantificó la concentración del tóxico en el agua contenida en los recipientes por medio del método de colorimetría correspondiente (Solórzano, 1969; Strickland y Parsons, 1972; Grasshoff *et al.*, 1990).

6.3.1. Prueba para comparar cuatro diferentes métodos para evaluar la toxicidad aguda de nitritos en postlarvas *L. vannamei*

Esta prueba de toxicidad se realizó por triplicado en recipientes de PET (Tereftalato de polietileno) de 1 L previamente lavados y desinfectados (con hipoclorito de sodio) que contenían 500 ml de agua de mar diluida a la salinidad de 3 g/L y la concentración correspondiente del tóxico, se colocaron en cada recipiente grupos de 10 postlarvas (PL18) previamente pesadas en una balanza analítica SHIMADZU TX223L (precisión de 0.1 mg).

La solución madre de N-NO_2^- se preparó disolviendo 12.321 g de NaNO_2^- en 1 L de agua mili-Q (2500 mg/L de N-NO_2^-). Las concentraciones nominales de N-NO_2^- seleccionadas fueron 0 (control), 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 y 35 mg/L, y se alcanzaron mediante la adición de volúmenes adecuados de la solución madre a la solución de prueba. Las concentraciones de N-NO_2^- en las soluciones de prueba se determinaron analíticamente cada 24 h usando un método estándar (Strickland y Parsons, 1972; APHA, 1989). La

precisión de las medidas expresadas como coeficiente de variación fue inferior al 3.5 %. La prueba de toxicidad consistió en cuatro tratamientos experimentales con sus respectivas concentraciones, controles y triplicados; los tratamientos T1 y T4 se desarrollaron con el método estático, mientras que T2 y T3 incluyeron renovación diaria de la solución (100 %) de la solución de nitrito (estática con el método de renovación). Durante el experimento, los camarones de los tratamientos T1 y T3 no fueron alimentados, mientras que T4 y T2 fueron alimentados.

Durante las pruebas de aclimatación y toxicidad, los organismos se mantuvieron a una temperatura de 26.1 ± 0.2 °C, 6.5 ± 0.3 mg/L de oxígeno disuelto y un pH de 8.2 ± 0.2 . La supervivencia se verificó cada 24 h durante 96 h. Se asumió la muerte cuando los camarones estaban inmóviles y no mostraron respuesta cuando se tocaron con una varilla de vidrio. Los camarones muertos fueron retirados diariamente de los contenedores.

Un problema en el cálculo de la CL_{50} es identificar la concentración a la cual los organismos están expuestos. Esto es debido a que los tóxicos como el nitrógeno en sus distintos compuestos pueden ser alterados en sus concentraciones a través del tiempo de exposición. La CL_{50} se calculó utilizando las concentraciones de $N-NO_2^-$ con tres procedimientos: (i) con los medidos en el período inicial (0 h) de exposición al camarón, que fue consistentemente similar o igual a la concentración nominal preparada a partir de la solución madre; convencionalmente, este procedimiento es usualmente el más usado; (ii) con los niveles de $N-NO_2^-$ cuantificados después de cada 24 h de exposición (24, 48, 72 y 96 h); y (iii) con los valores medios entre la CL_{50} obtenida a partir de la concentración inicial (o nominal) de $N-NO_2^-$ y la CL_{50} de los obtenidos a partir de las mediciones cada 24 h. Se supone que este último procedimiento corresponde más con los niveles de exposición reales, o al menos es el más representativo.

6.3.2. Pruebas de toxicidad letal aguda individual de amonio, nitritos y nitratos en postlarvas

Las pruebas de toxicidad aguda en postlarvas de *L. vannamei* se llevaron a cabo en recipientes de PET de 1 L previamente lavados y desinfectados (con hipoclorito de sodio) que contenían 500 ml de agua de mar diluida a las salinidades requeridas (1 y 3 g/L) y la concentración correspondiente del tóxico, se colocaron en cada recipiente grupos de 10

postlarvas previamente pesadas en una balanza analítica SHIMADZU TX223L (precisión de 0.1 mg).

Las concentraciones de amonio, nitritos y nitratos fueron elegidas a partir de corridas preliminares para conocer el intervalo de toxicidad (Vanegas *et al.*, 2008) y los trabajos de diferentes autores. Para la prueba de amonio, las concentraciones utilizadas para una salinidad de 1 y 3 g/L fueron 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 mg de NAT/L, y 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mg de NAT/L, respectivamente (Frías-Espericueta *et al.*, 1999; Lin y Chen, 2001; Schuler *et al.*, 2010); para la preparación de las soluciones se utilizó cloruro de amonio (NH₄Cl). En el caso de los nitritos, las concentraciones establecidas para la salinidad de 1 g/L fueron 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, y 35 mg N-NO₂⁻/L, y para la salinidad de 3 g/L fueron 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25, 35 y 45 mg N-NO₂⁻/L, utilizando el reactivo nitrito de sodio (NaNO₂) (Gross *et al.*, 2004; Schuler *et al.*, 2010). Para las pruebas de toxicidad de nitratos las concentraciones fueron 0, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 700 y 800 mg de N-NO₃⁻/L y 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 y 1600 mg de N-NO₃⁻/L para las salinidades de 1 y 3 g/L, respectivamente; la solución utilizada se preparó con nitrato de sodio (NaNO₃) (Lee y Wickins, 1997; Romano y Zeng, 2009a; Kuhn *et al.*, 2010).

Las pruebas de toxicidad aguda tuvieron una duración de 96 h, durante este tiempo se realizaron observaciones cada 12 h, con la ayuda de una vara de vidrio se determinó si los organismos estaban vivos o muertos, se efectuaron recambios de agua cada 24 h de acuerdo al método estático con renovación para pruebas de toxicidad (Buikema *et al.*, 1982) y se alimentaron 2 veces al día con alimento comercial para postlarvas (S-Pak 2/5, INVE Aquaculture).

6.3.3. Pruebas de toxicidad letal aguda por separado de amonio, nitritos y nitratos en juveniles

Para las pruebas de toxicidad en juveniles se utilizaron recipientes de polietileno de 20 L previamente lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio diluido, los cuales contenían 10 L de agua a las salinidades correspondientes (1 y 3 g/L) y la concentración del tóxico correspondiente, la cual fue suministrada directamente en el agua, donde se colocaron grupos de 10 organismos en cada recipiente (densidad 142.9 organismos/m²).

Los grupos de organismos fueron pesados con una balanza analítica SHIMADZU TX223L (precisión de 0.1 mg) antes de transferirlos a los recipientes de experimentación. En cuanto a las concentraciones de prueba, estas fueron elegidas a partir de pruebas preliminares usadas en diferentes estudios con *L. vannamei* y otras especies de peneidos. Para la prueba de amonio, las concentraciones fueron 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 150 mg NAT/L con la solución de cloruro de amonio (NH_4Cl) (Chen *et al.*, 1990a, 1990b; Frías- Espericueta *et al.*, 1999). Para nitritos las concentraciones fueron 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90 y 100 mg N- NO_2 /L con nitrito de sodio (NaNO_2) (Chen y Chen, 1992a; 1992b; Lin y Chen, 2003; Gross *et al.*, 2004 y Schuler *et al.*, 2010). Para las pruebas de nitratos las concentraciones fueron 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500 y 1800 mg N- NO_3^- /L preparadas con nitrato de sodio (NaNO_3) (Kuhn *et al.*, 2010; Romano y Zeng, 2009a). De la misma manera que en las pruebas de toxicidad con postlarvas se realizaron observaciones cada 12 h utilizando una vara de vidrio hasta finalizaron las 96 h de prueba. Cada 24 h se efectuaron recambios totales de agua con las concentraciones del tóxico correspondiente (Buikema *et al.*, 1982) y los organismos fueron alimentados 2 veces al día con alimento comercial para camarón Provimi con 40 % de proteína (Balbieri, 2010).

6.3.4. Pruebas de toxicidad letal aguda de amonio, nitritos y nitratos combinados en postlarvas y juveniles

Después de realizar las pruebas de toxicidad por separado de amonio, nitritos y nitratos tanto en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*, se procedió a realizar pruebas combinadas de estos tres compuestos nitrogenados (amonio-nitritos-nitratos) para determinar si existe un efecto sinérgico, antagónico, aditivo y/o potencial considerando una razón de toxicidad (RT) de 1:1:1 y 1:1, donde las concentraciones de amonio, nitritos y nitratos dependieron de la CL_{50} individual a las 96 h. De acuerdo a la fórmula descrita por Lloyd (1961), Chen y Chin (1988b), Vanegas *et al.* (1997) y Frías-Espericueta (2002) se calcularon tanto la razón de toxicidad como las unidades tóxicas, si en un ensayo se observa una respuesta mayor que la esperada de los organismos cuando éstos son expuestos a una unidad tóxica (UT) menor a 1, el tipo de interacción de los componentes es sinérgico, cuando es igual a 1 UT es estrictamente aditiva, y si no se observan respuestas o éstas son menores que la esperada cuando la UT es mayor a 1, el efecto es antagónico. Considerando

que un efecto aditivo es muy estricto por su valor igual a 1, en este trabajo se consideró como efecto aditivo aquel valor de UT_{50} de un tiempo determinado que fuera igual o cercano a 1 en el intervalo de los límites superior e inferior. Las pruebas se realizaron con postlarvas PL20 a salinidades de 1, y 3 g/L; y en juveniles de 3 g a una salinidad de 3 g/L. Al igual que las pruebas anteriores, éstas se llevaron a cabo por el método estático con renovación por 96 h. Cada concentración de prueba combinada que se realizó se llevó a cabo por triplicado, además se contó con una batería como control que estuvo libre de los tóxicos. Tanto las postlarvas y juveniles de *L. vannamei* que se utilizaron para estas pruebas fueron transportadas y aclimatadas de la misma manera que en las pruebas de toxicidad letal aguda individuales para después transferir grupos de 10 organismos a cada uno de los recipientes que contenían el agua de mar diluida y las concentraciones de los tóxicos. Los recipientes contaron con sistema de aireación constante, cada 12 h se realizaron observaciones y se alimentó a los organismos 2 veces al día hasta finalizar la prueba (96 h).

Para poder comparar los efectos de las mezclas de compuestos nitrogenados en aguas de baja salinidad con los efectos en ambientes de aguas marinas, se realizó una prueba combinada (amonio-nitritos-nitratos) en postlarvas y juveniles en agua de mar diluida (25 g/L); tanto la razón de toxicidad como las unidades tóxicas fueron calculadas de acuerdo a las CL_{50} individuales de amonio, nitritos y nitratos estimadas en las pruebas individuales para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* a una salinidad de 3 g/L. Las pruebas de toxicidad aguda de mezclas en agua de mar diluida (25 g/L) con postlarvas y juveniles fueron desarrolladas de la misma manera que las desarrolladas en ambientes de baja salinidad (1 y 3 g/L).

6.3.5. Pruebas de toxicidad subletal de amonio, nitritos y nitratos en el corto plazo (48 horas) en juveniles de *L. vannamei*

Para poder identificar los efectos (niveles de lactato, glucosa, oxihemocianina) que causan concentraciones subletales de amonio, nitritos y nitratos por separado en los organismos, se procedió a realizar pruebas de 48 h. Las concentraciones de exposición de cada compuesto nitrogenado se eligieron a partir de los resultados de las pruebas por separado de toxicidad letal aguda a 96 h en juveniles, es decir, se utilizó el 0, 10, 25 y 50 % del valor de la CL_{50} de cada tóxico por separado (Sprage, 1971; Frías-Espericueta *et al.*,

2008; Mariño-Balsa *et al.*, 2000; Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014). Estas pruebas se llevaron a cabo con juveniles de *L. vannamei* (3 g) previamente aclimatados a una salinidad de 3 g/L, los cuales se transfirieron en grupos de 20 camarones a acuarios que contenían 80 L de agua de mar diluida con agua dulce filtrada (densidad 100 organismos/m²), cada uno de los recipientes contenían un difusor de aire. Por triplicado se manejaron las concentraciones del tóxico (amonio, nitritos y nitratos) y como control se tuvo una batería por triplicado que estaba libre del tóxico (0 % del valor de la CL₅₀). Esta prueba se llevó a cabo por el método estático sin renovación, 24 h antes de iniciar la prueba y durante el desarrollo de la misma, los organismos no se alimentaron (Cheng y Chen, 1998; Lee y Chen, 2003; Cheng *et al.*, 2013). Una vez expuestos los organismos a las diferentes concentraciones del tóxico, se tomaron 3 organismos de cada réplica a las 6, 12, 24 y 48 h para extraer hemolinfa para los análisis correspondientes (oxihemocianina, glucosa, lactato e iones).

6.3.6. Pruebas de toxicidad subcrónica de amonio y nitritos solos y combinados en el mediano plazo (28 días) en juveniles de *L. vannamei*

Se procedió a realizar pruebas por separado y en combinación de amonio y nitritos en el mediano plazo (28 días) con juveniles de *L. vannamei*. Las concentraciones de exposición de casa compuesto nitrogenado se eligieron a partir de los resultados de las pruebas por separado de toxicidad letal aguda a 96 h en juveniles, es decir, se utilizaron 3 diferentes porcentajes (0, 5 y 10%) del valor de la CL₅₀ de cada tóxico por separado (Sprage, 1971; Mariño-Balsa *et al.*, 2000; Frías-Espericueta *et al.*, 2008; Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014). Estas pruebas se llevaron a cabo con juveniles de *L. vannamei* (3 g aprox.) previamente aclimatados a una salinidad de 3 g/L, los cuales se transfirieron en grupos de 20 camarones a acuarios que contenían 80 L de agua de mar diluida con agua dulce filtrada (densidad 100 organismos/m²), cada uno de los contenedores contó con un filtro mecánico que sirvió para remover materia orgánica mismo que era cambiado cada 5 días, así también, cada contenedor tenía un difusor de aire. Las diferentes concentraciones del tóxico (amonio y nitritos) se manejaron por triplicado y como control se contó con una batería por cada prueba a la salinidad de 3 g/L que estuvo libre del tóxico. Para poder comparar los efectos a evaluar en camarones expuestos solos y combinados con amonio y

nitritos en ambientes de baja salinidad con los de aguas marinas, se realizó una prueba bajo las mismas condiciones que en agua de baja salinidad; sin embargo, la salinidad de esta prueba fue a 25 g/L y los camarones utilizados fueron obtenidos de una granja comercial cultivados a 28 g/L de salinidad. Las pérdidas de agua por evaporación en los recipientes durante el desarrollo de las pruebas fueron recuperadas con agua de mar diluida a la salinidad correspondiente, la cual contenía la concentración del compuesto nitrogenado que se adicionó al inicio de la prueba, así también, se realizaron diariamente recambios de agua del 30 % con la concentración del tóxico correspondiente. Se realizó un monitoreo de la calidad del agua, la cual incluía: temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad en el agua/salinidad, amonio, nitritos y nitratos.

Diariamente se revisaron los organismos para anotar señales clínicas que indicaban alguna desviación de su estado de salud, tales como cambios de coloración, anorexia, letargia, etc. Los camarones fueron alimentados dos veces al día con alimento comercial Camaronina de la compañía Purina México S.A. de C. V., y cada semana se realizaron biometrías y la ración de alimento se ajustó en consecuencia. Para determinar la tasa de crecimiento (GR) se calculó con la fórmula (Araneda *et al.*, 2008): $GR = (W_f - W_i) / t$; donde: W_f = peso final, W_i = peso inicial; t = tiempo.

6.4. Medición de indicadores de estrés (oxihemocianina, glucosa y lactato) en la hemolinfa

La medición de indicadores de estrés en la hemolinfa solo se llevó a cabo en las pruebas de toxicidad subletal con juveniles, debido a que es factible y más fácil obtener el volumen de hemolinfa requerido para dichos análisis. Se obtuvieron aproximadamente 100 μ L de hemolinfa que se extrajeron del seno ventrolateral del abdomen con ayuda de una jeringa desechable hipodérmica con aguja ultrafina de 29G x 13 mm previamente enjuagada con una solución salina isotónica (Mendoza, 1992). La aguja se insertó suavemente a través de la membrana artrodial del quinto pleopodo, para tener acceso al seno. Para la determinación de oxihemocianina se tomaron 10 μ L que fueron diluidos en 990 μ L de agua destilada para hacer la lectura a una longitud de onda de 335 nm. Utilizando el coeficiente de extinción E^{mM} de 17.26, se calculó la concentración de oxihemocianina ($Hc =$

(Abs/17.36)*FD; dónde: Hc= concentración de hemocianina; Abs= absorbancia; FD= factor de dilución) (Nickerson y Van Holde, 1971; Chen *et al.*, 1994).

Se utilizaron kits comerciales, para la determinación de la glucosa (glucosa oxidasa–peroxidasa, Merck), y lactato (lactato oxidasa–peroxidasa, Sigma); del total de hemolinfa extraída se tomaron 50 μ L que fueron diluidos con 100 μ L de solución isotónica (SIC-EDTA), las muestras se centrifugaron a 800 g por 3 min a 4 °C para después leer a diferentes longitudes de onda con los kit comerciales. El método se basa en utilizar un reactivo cromógeno que se adiciona al plasma para después medir la absorbancia en un equipo de espectrofotometría (lector de microplacas), Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific (a 490 nm para glucosa y a 540 nm para lactato) (Bradford, 1976).

6.5. Medición de iones Na⁺, K⁺, Ca⁺ y Mg⁺² en la hemolinfa

En las mismas pruebas subletales con juveniles, fueron extraídos 150 μ L de hemolinfa con una jeringa desechable hipodérmica con aguja ultrafina de 29G x 13 mm la cual fue enjuagada previamente con una solución isotónica. Aproximadamente 100 μ L fue utilizada para las mediciones de iones (Ca⁺², Mg⁺², Na⁺ y K⁺). Las muestras de hemolinfa fueron colocadas en vasos de teflón que contenían 3 mL de ácido nítrico concentrado (HNO₃) grado trace metals (J.T. Baker) para después ser llevados a digestión en una plancha de arena a una temperatura de 120 °C por 3 h. Una vez realizadas las digestiones, las muestras fueron aforadas con agua Mili-Q a un volumen de 10 mL, aproximadamente. Para la determinación de los iones se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Varian modelo SpectrAA220 (técnica por emisión de flama). Para determinar la exactitud y precisión del método se analizaron blancos y material de referencia (NIST en tejido blando de ostión). Para Na⁺, K⁺, Ca⁺ y Mg⁺², los porcentajes promedios de recuperación fueron 97.5±2.6, 94.2±2.6, 104.7±2.2 y 93.7±1.7 %, respetivamente. Las diferentes concentraciones de iones en la hemolinfa fueron expresadas como mmol/L.

6.6. Niveles de seguridad de amonio, nitritos y nitratos para postlarvas y juveniles de *L. vannamei*

Después de determinar la concentración letal media de amonio, nitritos y nitratos solos y combinados en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* y con base en las pruebas de

toxicidad agudas letales y subletales bajo condiciones de laboratorio, se establecieron los niveles de seguridad, que son valores inferiores a la concentración letal media. De acuerdo a Sprague (1971) el nivel de seguridad es la concentración de un contaminante que a largo plazo no tiene un efecto adverso sobre los organismos, y puede ser obtenido multiplicando el valor de la CL_{50-96} h por un factor de aplicación de 0.1; aunque el factor de aplicación es usado a juicio de los investigadores debido a que los efectos adversos son percibidos de distinta manera. Por ejemplo, Frías-Espéricueta *et al.* (2008) propone un factor de aplicación de 0.005, mientras que Mariño-Balsa *et al.* (2000) propone de 0.01. El factor de aplicación utilizado en esta investigación fue de 0.05, factor establecido a partir de los resultados obtenidos de las pruebas letales, subletales y subcrónicas de cada uno de los compuestos nitrogenados a los cuales fueron expuestos los organismos.

Para las pruebas de toxicidad de amonio, las concentraciones fueron expresadas como mg/L de NAT y las de $N-NH_3/L$ se calcularon de acuerdo a la salinidad, pH, y temperatura del agua (Bower y Bidwell, 1978; Soderberg y Meade, 1991; Millero, 2006).

6.7. Análisis de los datos

Para determinar las concentraciones letales medias de amonio, nitritos y nitratos se hicieron mediante un programa de cómputo diseñado para ello y que utiliza modelos Probit. Este programa genera una línea de ajuste óptima entre el logaritmo de las concentraciones probadas y el porcentaje de mortalidad o mortalidad Probit, y al mismo tiempo calcula la concentración letal media (CL_{50}) para un tiempo determinado (24, 48, 72 y 96 h de exposición al tóxico), así como la normalidad y los límites de confianza de los datos al 95 % (Finney, 1971). Para establecer diferencias significativas entre las CL_{50} a salinidades de 1 y 3 g/L ($p > 0.05$), se llevó a cabo una prueba de comparación entre estas (prueba z) por el método propuesto por APHA (1992).

Para determinar si existen diferencias significativas entre los indicadores de estrés, iones en la hemolinfa, supervivencia y crecimiento en los diferentes tratamientos de cada una de las pruebas se compararon los valores medios mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía o su equivalente no paramétrico (Kruskal-Wallis) y en caso de encontrar diferencias ($p < 0.05$) se procedió a realizar una prueba de comparación múltiple de medias; esto mismo fue aplicado para determinar diferencias significativas

entre los valores de CL_{50} en el mismo tiempo de exposición pero diferentes salinidades (1, 3 y 25 g/L). En el caso de los valores promedios de porcentajes de supervivencia se les realizó una transformación a valores de la raíz cuadrada de arco-seno antes de realizar las comparaciones debido a que los datos de porcentajes tienden a no tener una distribución normal (Zar, 1984).

7. RESULTADOS

7.1. Características químicas de las aguas de prueba

En la Tabla 1 se muestran las características químicas del agua de mar y agua dulce filtrada que fueron utilizadas para las diferentes pruebas de toxicidad, se realizó una caracterización química al inicio y final de las pruebas. El agua de mar presentó una salinidad de 33 g/L al inicio y final de las pruebas de toxicidad. El agua dulce registró al inicio y final de las pruebas una salinidad de 0.182 y 0.175 mg/L, respectivamente. Los niveles de metales analizados en ambas aguas y diferentes periodos de pruebas estuvieron dentro de las concentraciones típicas y de seguridad máxima en aguas dulces y de mar destinados al cultivo de organismos acuáticos (Frías-Espericueta *et al.*, 2001; Boyd, 2009). En cuanto a los iones mayoritarios en el agua de mar, los niveles fueron muy similares a los típicos registrados para una salinidad de 33 g/L (Millero, 2006), y en el agua dulce las concentraciones de mayoritarios estuvieron por arriba de la concentración teórica de un agua de mar diluida a la misma salinidad (Boyd y Thunjai, 2003; Roy *et al.*, 2010).

Tabla 1. Caracterización química del agua de mar y agua dulce utilizada al inicio y final de las pruebas de toxicidad.

Variable	Inicio		Final	
	Agua de mar filtrada	Agua dulce filtrada	Agua de mar filtrada	Agua dulce filtrada
Salinidad (g/L)	33	0.182	33	0.175
Potasio (mg/L)	429.1 (372.9)	6.8 (2.05)	445.2 (372.9)	6.5 (1.97)
Sodio (mg/L)	11 224.0 (10117.8)	43.6 (55.80)	10 805.0 (10117.8)	39.8 (53.66)
Calcio (mg/L)	345.4 (386.1)	47.4 (2.13)	380.8 (386.1)	44.5 (2.04)
Magnesio (mg/L)	1 439.1 (1204.5)	13.9 (6.64)	1415.6 (1204.5)	14.1 (6.39)
Mercurio (µg/L)	0.314	0.015	0.321	0.009
Cobre (µg/L)	15	33	11	35
Zinc (µg/L)	4	1	5	1
Plomo (µg/L)	*	*	*	*
Cadmio (µg/L)	*	*	*	*
Hierro (µg/L)	*	*	*	*
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0.002	0.002	0.002	0.003
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	0.903	10.73	0.885	11.2
NAT (mg/L)	0.024	0.006	0.020	0.004

* Por debajo del límite de detección (plomo <0.089 µg/L; cadmio <0.017 µg/L; hierro <0.034 µg/L)

() Concentraciones teóricas de iones en un agua de mar diluida a la salinidad correspondiente

Las concentraciones de nutrientes en el agua de mar y dulce (NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃) en los ambos periodos de pruebas (inicio y final) estuvieron por debajo de las concentraciones seguras para el cultivo de *L. vannamei* (Van Wyk y Scarpa, 1999; Frias-Espericueta *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2004) (Tabla 1).

7.2. Comparación de cuatro métodos para evaluar la toxicidad letal aguda de nitritos en postlarvas *L. vannamei*

Las diferencias en las concentraciones de N-NO₂⁻ para los cuatro tratamientos entre los niveles reales medidos al inicio y las concentraciones nominales fueron mínimas entre el 0.5 y 0.9 % de los niveles seleccionados. Durante el desarrollo de las pruebas, las concentraciones de N-NO₂⁻ medidas cada 24 h en los dos tratamientos estáticos con renovación, T2 (alimentación) y T3 (sin alimentación) estuvieron dentro del 5 % de las concentraciones nominales, que son aceptables para las pruebas de toxicidad aguda (Buikema *et al.*, 1982). Sin embargo, en los tratamientos estáticos T4 y T1, las concentraciones de N-NO₂ se modificaron significativamente durante el período de prueba; la concentración inicial en relación con la concentración final (96 h) de N-NO₂⁻ en T4 y T1 se redujo 56.3 y 40.3 %, respectivamente. Claramente, esto indica que en las pruebas estáticas los niveles de N-NO₂⁻ disminuyen significativamente, siendo más evidente cuando los camarones son alimentados. Esta reducción de los nitritos podría estar relacionada con la captura del camarón y acumulación en la hemolinfa y en otros tejidos de nitritos como lo han demostrado Chen y Chen (1992a,1992b) en *P. monodon* y *P. japonicus*.

Otro punto que puede ser relevante durante el desarrollo de las pruebas es el amonio, que es un compuesto altamente tóxico. Es evidente que los camarones que no fueron alimentados probablemente estuvieron expuestos a niveles más bajos de amonio en comparación con el grupo de camarones que fueron alimentados. Además, los niveles de amonio deberían verse afectados por la renovación de la solución; la renovación reduce el amonio y el método estático acumula el amonio generado por la excreción del camarón (Chen y Chen, 1997). Zhang *et al.* (2009) encontraron en juveniles de *L. vannamei* en agua de baja salinidad (5 g/L) que la tasa de excreción de amonio fue de 0.05 μmol de NAT g/h. Teniendo en cuenta que dicha tasa de excreción es similar para PL18 (30 mg), entonces, 10 PL generarían apenas 5 μg de NAT por 24 h. Esto indica la baja magnitud del amonio que

podría excretarse por PL's. Además, Boyd (1990) indica que la aireación es uno de los mejores métodos para oxidar el amonio a nitrato y para volatilizar el amonio. Por lo tanto, por la aireación continua se supone aquí que los niveles de amonio fueron insignificantes. Durante la prueba de los cuatro tratamientos, se monitoreó el pH cada 12 h, se encontró que los valores se mantuvieron entre 8.1 y 8.3; valores que están dentro del rango recomendado para *L. vannamei* (Bardach *et al.*, 1986). La acumulación de nitritos en la hemolinfa en función del pH ha sido estudiada por Chen y Cheng (2000) en *P. monodon*, encontrando que el nitrito en pH de 6.8 se incorpora más fácilmente en comparación con el pH de 8.2 y 9.8. Dichos resultados son difíciles de extrapolar a *L. vannamei*, por lo que esto revela la necesidad de desarrollar futuros estudios sobre la influencia del pH en la toxicidad de los nitritos.

Los porcentajes de mortalidad en los grupos control fueron diferentes en cada uno de los cuatro tratamientos: 6.6, 0.0, 23.3 y 3.3 % para T1, T2, T3 y T4, respectivamente. Considerando que para la validación de las pruebas de toxicidad, es necesario que la mortalidad en los controles permanezca por debajo del 10 % (Buikema *et al.*, 1982), esta afirmación debe rechazarse en el tratamiento T3. En los tratamientos T1 y T3 donde los organismos no se alimentaron durante la exposición a nitritos, se observó canibalismo en concentraciones inferiores a 5 mg/L de N-NO₂⁻; en T3, el canibalismo fue más evidente, lo que explica la mortalidad registrada del 23.3 %. A partir de estos resultados, cuando el tratamiento implica renovación estática y sin alimentación, está claro que este tipo de pruebas con camarones no son favorables, debido a su comportamiento de alimentación y de agresión.

En Figura 1 se presenta la CL₅₀ de N-NO₂⁻ a las 24, 48, 72 y 96 h para las postlarvas de *L. vannamei* calculadas con las concentraciones determinadas a 0 y cada 24 h para los cuatro tratamientos. La CL₅₀ de N-NO₂⁻ a las 96 h calculada con las concentraciones iniciales (0 h) para cada uno de los tratamientos fue de 5.28±0.13, 6.67±0.22, 4.93±0.41 y 4.32±0.14 mg/L, en T1, T2, T3 y T4, respectivamente.

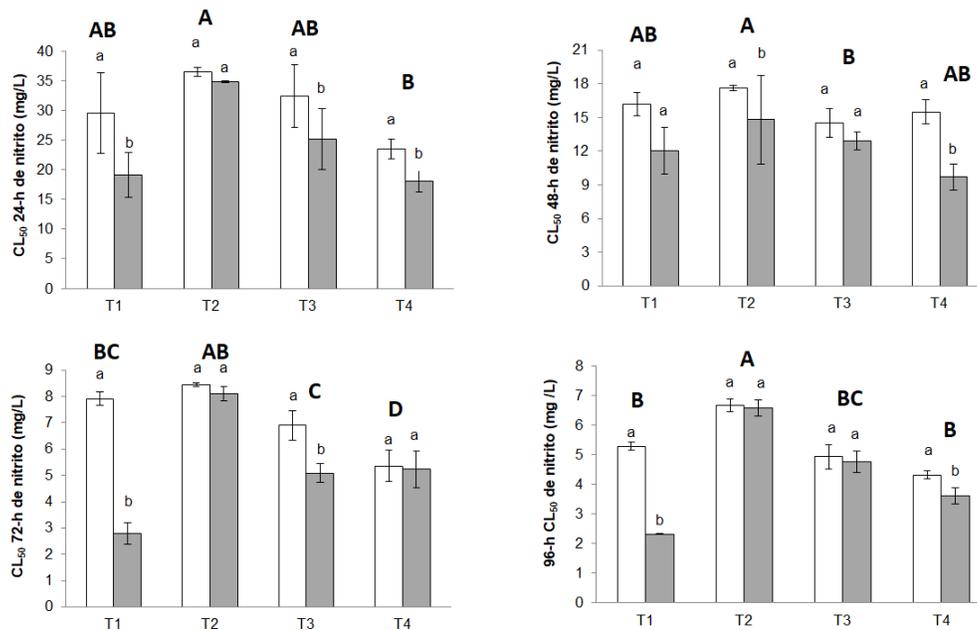


Figura 1. Valores medios de CL_{50} (\pm desviación estándar) de $N-NO_2^-$ (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei* estimadas con las concentraciones iniciales de nitritos (0 h, barras sin relleno) y determinadas cada 24 h (barras grises) en las diferentes soluciones de prueba. Diferentes letras en cada tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre CL_{50} . Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la CL_{50} de cada tratamiento calculada con la concentración inicial (nominal). T1 (estática + sin alimentación); T2 (estática con renovación + alimentación); T3 (estática con renovación + no alimentación) y T4 (estática + alimentación).

La CL_{50} de $N-NO_2^-$ a las 96 h calculadas con las concentraciones determinadas cada 24 h en los tratamientos indicados fueron de 2.32 ± 0.10 , 6.57 ± 0.28 , 4.76 ± 0.35 y 3.61 ± 0.27 mg/L para T1, T2, T3 y T4, respectivamente. A las 96 h de exposición, hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la CL_{50} de $N-NO_2^-$ calculada con los niveles de nitritos cuantificados inicialmente (o nominal) y los medidos cada 24 h en T1 y T4. Por el contrario, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) para el T2 y T3. Esto indica que la alimentación modifica la concentración inicial del tóxico, y por lo tanto puede influir en los valores CL_{50-96} h cuando las pruebas se desarrollan con el método estático (Figura 1).

Las CL_{50} de $N-NO_2^-$ calculadas con el promedio de las CL_{50} obtenidas de las concentraciones iniciales (nominal) de $N-NO_2^-$ y las concentraciones medidas cada 24 h, se supone que representa más de cerca la exposición a nitritos, y por lo tanto, tales CL_{50} , son más representativas. La Figura 2 muestra tales valores de la CL_{50} a 24, 48, 72 y 96 h de

exposición a nitrito en postlarvas de *L. vannamei*. Para una exposición de 48 h, T2 mostró diferencias significativas con T4 y con T3 pero no con T1; sin embargo, a las 24 h de exposición no se observaron diferencias entre los cuatro tratamientos. Los valores promedio de CL₅₀ a las 96 h fueron 3.8±1.62, 6.62±0.23, 4.85±0.35 y 3.97±0.43 mg/L de N-NO₂⁻ en los tratamientos T1, T2, T3 y T4, respectivamente; T2 solo fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al tratamiento T3; sin embargo, es importante mencionar que no hay diferencias significativas entre T2 y T4, y entre T2 y T1. En el control de T3 ocurrió una mortalidad importante (23.3 %) debido al canibalismo. Es relevante la magnitud de la variación de los valores de CL₅₀ obtenidos para cada tratamiento, de los cuales T2 consistentemente exhibió la desviación estándar más baja para los cuatro periodos de exposición examinados (Figura 2). En general, los valores de CL₅₀ de N-NO₂⁻ obtenidos para los cuatro periodos siguieron el orden decreciente: T2>T3>T1, T4. La magnitud de estos valores de la CL₅₀ y las diferencias significativas observadas indican que las concentraciones de nitrito en las soluciones de prueba se modifican al alimentar cuando se usa el método estático con renovación, en contraste con las pruebas estáticas.

Existe una gran variabilidad en las diferentes estrategias utilizadas para las pruebas de toxicidad de diferentes compuestos de nitrógeno. Sin embargo, la estrategia seleccionada depende del objetivo de la investigación, la edad de los organismos y el período de exposición. Se han realizado estudios para evaluar la acumulación de amonio, nitritos y nitratos, las tasas de excreción y la evaluación de diferentes metabolitos (glucosa, lactato) en hemolinfa de diferentes especies de camarones peneidos expuestos a estos tóxicos, donde la alimentación está suspendida antes y durante el desarrollo de la prueba para evitar alteraciones en la hemolinfa debido a la influencia de la alimentación (Chen y Kou, 1991; Chen y Nan, 1992; Chen y Chen, 1997; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Cheng *et al.*, 2013). Estos estudios han sido conducidos con el método estático y por <48 h de tiempo de prueba. Sin embargo, los estudios donde evalúan el efecto subcrónico de los compuestos de nitrógeno en el crecimiento y daños histopatológicos en diversos camarones (*P. japonicus*, *Penaeus penicillatus*, *L. vannamei* y *P. monodon*) han sido evaluados con el método de toxicidad utilizado la renovación estática y alimentación durante el tiempo de exposición al tóxico (Chen y Lin, 1992a; Chen y Chen, 1992c; Kuhn *et al.*, 2010).

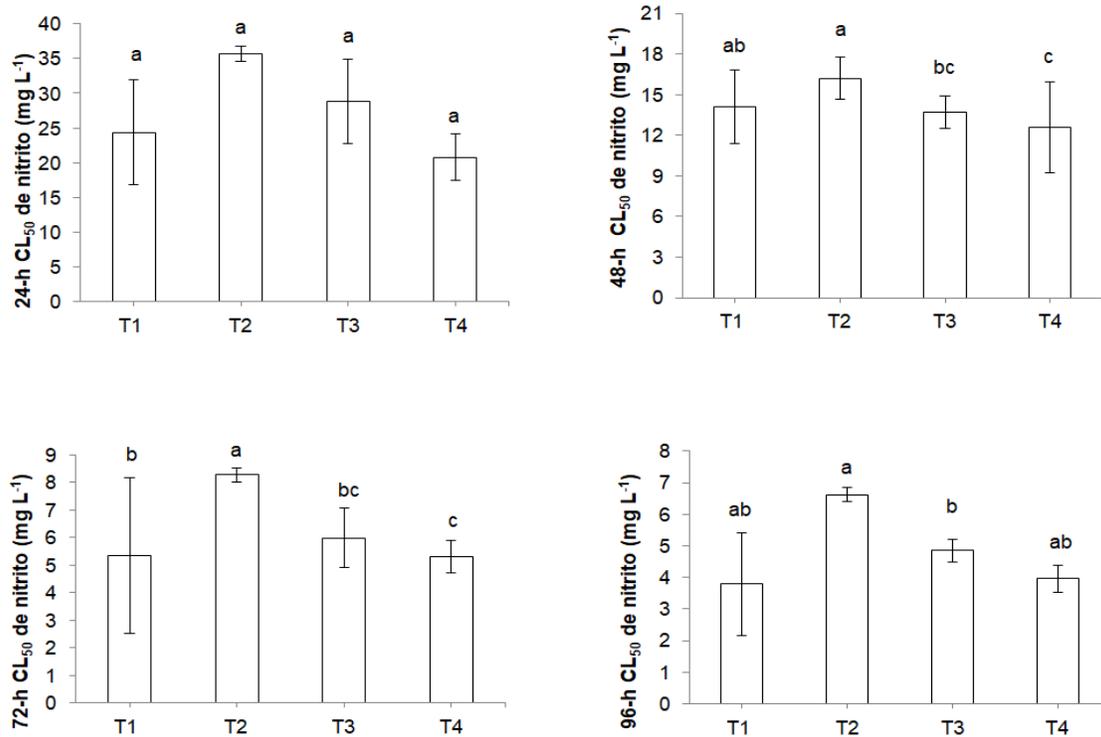


Figura 2. Valores promedio de CL₅₀ (\pm desviación estándar) de N-NO₂⁻ (mg/L) a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición para postlarvas *L. vannamei* calculadas con las concentraciones iniciales de nitritos (0 h) y los valores de CL₅₀ cada 24 h. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores CL₅₀.

Investigaciones conducidas para determinar la CL₅₀ y los niveles de seguridad de amonio y nitrito en diferentes especies de peneidos, han utilizado los métodos estático y estático con renovación, y en algunos casos la alimentación se ha suspendido antes y durante el desarrollo de las pruebas (Lin *et al.*, 1993; Alcaraz *et al.*, 1999b; Kir y Kumlu, 2006); sin embargo, hay estudios con el mismo objetivo donde la alimentación no se ha suspendido (Chin y Chen, 1987; Lin y Chen, 2003; Gross *et al.*, 2004). De una investigación bibliográfica en la base de datos Scopus de Elsevier se encontraron un total de 51 estudios; 11.7 % usaron el método de renovación estático y no alimentación (definida aquí T3), 42.2% estático y no alimentación (T1), 34.6 % estático con renovación y alimentación (T2), y 7.8 % estático y alimentación (T4). El porcentaje más alto es para aquellos estudios que usan el método de toxicidad estático y no alimentación (T1); pruebas

destinadas principalmente a determinar los efectos subcrónicos de los compuestos del nitrógeno y donde en algunos casos son evaluados diferentes componentes en la hemolinfa, el consumo de oxígeno y la tasa de excreción; en algunos casos este método también se usa para determinar la CL_{50} . El método T2 (estática con renovación + alimentación) es dirigido principalmente a determinar la CL_{50} . Cabe señalar que un número significativo de estudios se llevan a cabo donde los organismos son alimentados y un porcentaje de la solución de prueba no se reemplaza (T4), y un número menor de estudios se realizan con el método estático y alimentación, el último método se ha utilizado generalmente para evaluar el efecto agudo y cuando el tiempo de exposición no excede las 96 h. Mayor información al respecto se puede encontrar en Valencia-Castañeda *et al.* (2018) (Anexo 2).

7.3. Toxicidad aguda de amonio, nitritos y nitratos por separado en postlarvas de *L. vannamei*

7.3.1. Toxicidad aguda de amonio

En las pruebas de toxicidad aguda de NAT a 1 g/L de salinidad, las mortalidades a las 24 h de exposición en las concentraciones de 20, 25, 30, 35 y 40 mg/L de NAT fueron 3.3, 23.3, 63.3, 60 y 63.3 %, respectivamente. La mortalidad a las 48 h en las concentraciones de 30, 35 y 40 mg/L y a las 72 h en 25 mg/L de NAT fue del 100 % (Tabla 2). Para la salinidad de 3 g/L, se observaron mortalidades de 3.3, 26.7, 33.3, 60 y 73.3 % a las 24 h de exposición en las concentraciones de 30, 35, 40, 45 y 50 mg/L de NAT, respectivamente. Se registró una mortalidad del 100 % en las concentraciones de 40, 45 y 50 mg/L a las 48 h; a las 72 h en 35 mg/L; y a 96 h en 30 mg/L de NAT (Tabla 3).

Se sabe que los factores externos, como la luz y la temperatura, pueden estimular el sistema nervioso central y la secreción de hormonas, afectando el ciclo de muda de los crustáceos (Wassenberg y Hill, 1984). De acuerdo con Dall *et al.* (1990) los peneidos mudan en intervalos de unos pocos días o semanas, por lo que es prácticamente un proceso continuo, con características morfológicas y cambios fisiológicos que ocurren casi a diario. Antes e inmediatamente después de la muda, los camarones son más sensibles (Wajsbrodt *et al.*, 1990). En los organismos expuestos a amonio y una salinidad de 1 g/L, el número mayor de mudas (exuvias) se dio a las 72 h de exposición en las concentraciones de 15, 20 y 25

mg/L de NAT con 6, 2 y 6 exuvias (organismos que alcanzaron la etapa de ecdisis), respectivamente (Tabla 2). En la concentración de 25 mg/L de NAT a las 72 h de organismos en salinidad de 1 g/L fue observado el mayor número de mudas (3) (Tabla 3). Durante la pre-ecdisis tardía y la ecdisis los camarones toman agua para aumentar su tamaño, lo que resulta en la hidratación de sus tejidos y un aumento en el volumen de sangre (Dall *et al.*, 1990). En consecuencia, se aumenta la cantidad de amonio en la hemolinfa y causa el efecto letal (Chen y Kou 1993). En estas pruebas de exposición aguda a amonio en postlarvas a salinidades de 1 y 3 g/L no fue observada una relación entre el número de mudas y las mortalidades.

Tabla 2. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) a 1 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	5	10	15	20	25	30	35	40
24	0	0	0	0	3.3	23.3	63.3	60	63.3
48	0	0	0	0 ¹	20 ²	63.3	100	100	100
72	0	0	0	26.7 ⁶	43.3 ²	100	100	100	100
96	0	0	0 ²	60	93.3	100	100	100	100

Tabla 3. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	10	20	25	30	35	40	45	50
24	0	0	0	0	3.3	26.7	33.3	60	73.3
48	0	0	0 ¹	20	40	90	100	100	100
72	0	0 ¹	10 ¹	76.7 ³	86.7	100	100	100	100
96	0	0 ¹	36.7 ¹	90	100	100	100	100	100

Los valores de la CL₅₀ de NAT en las postlarvas de *L. vannamei* para 24, 48, 72 y 96 h, con sus respectivos intervalos de confianza se presentan en la Tabla 4. A una salinidad de 1 g/L la CL₅₀ para 24, 48, 72 y 96 h fue de 38.9, 14.0, 11.8 y 10.8 mg/L de NAT, respectivamente; sin embargo, para una salinidad de 3 g/L los valores fueron 48.4, 22.5, 11.8, 10.8 mg/L de NAT, respectivamente. Mientras que los valores de la CL₅₀ de N-NH₃

para postlarvas a las salinidades de 1 y 3 g/L a las 24, 48, 72 y 96 h fueron 3.6, 1.3, 1.1 y 1.0; y 3.7, 1.7, 1.4 y 1.2, mg/L, respectivamente. Los valores de CL_{50} de $N-NH_3$ en el mismo tiempo de exposición pero a diferentes salinidades mostraron diferencias significativas a las 24, 48, 72 y 96 h ($p < 0.05$) (Tabla 5).

Tabla 4. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL_{50} de NAT (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei* en agua de mar diluida a 1 y 3 g/L de salinidad. Las letras diferentes en los mismos tiempos de exposición indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tiempo (h)	Salinidad (g/L)					
	1			3		
	CL_{50}	Lim. Inf.	Lim. Sup.	CL_{50}	Lim. Inf.	Lim. Sup.
24	38.9b	30.2	50.1	48.4a	42.6	63.4
48	14.0b	13.0	15.2	22.5a	20.5	24.7
72	11.8b	10.7	13.0	18.1a	16.8	19.4
96	10.8b	9.9	11.8	16.3a	15.2	17.4

Tabla 5. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL_{50} de $N-NH_3$ (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei* en agua de mar diluida a 1 y 3 g/L de salinidad. Las letras diferentes en los mismos tiempos de exposición indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tiempo (h)	Salinidad (g/L)					
	1			3		
	CL_{50}	Lim. Inf.	Lim. Sup.	CL_{50}	Lim. Inf.	Lim. Sup.
24	3.6b	2.8	4.7	3.7a	3.2	4.8
48	1.3b	1.2	1.4	1.7a	1.6	1.9
72	1.1b	1.0	1.2	1.4a	1.3	1.5
96	1.0b	0.9	1.1	1.2a	1.1	1.3

7.3.2. Toxicidad aguda de nitritos

En esta prueba los organismos expuestos a 15, 20, 25 y 35 mg/L de $N-NO_2^-$ registraron el 100 % de mortalidad a las 48 h, mientras que en la concentración de 10 mg/L fue a las 96 h de exposición. El 73.3 % de mortalidad fue observado en las concentraciones de 5 y 7.5 mg/L de $N-NO_2^-$ a las 96 h, y en 2.5 mg/L de $N-NO_2^-$, mostró el 53.3 % de mortalidad (Tabla 6). Se ha encontrado que el ciclo de muda puede verse afectado por bajas concentraciones de nitrito en el cangrejo azul *Callinectes sapidus*, y el camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Armstrong *et al.*, 1976; Manthe *et al.*, 1984). En las

primeras 24 h de exposición se observó el mayor número de mudas en las concentraciones de 20, 25 y 35 mg/L de NAT con 2, 1 y 2, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de N-NO₂⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 1 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	2.5	5	7.5	10	15	20	25	35
24	0	0	3.3 ¹	0	0	36.7	36.7 ²	33.3 ¹	80 ¹
48	0	13.3	20	30	43.3	100	100	100	100
72	0	40	60	60 ¹	93.3	100	100	100	100
96	3.3	53.3	73.3 ²	73.3	100	100	100	100	100

Los organismos expuestos a nitritos en agua de mar diluida a 3 g/L registraron mortalidades del 100 % en las concentraciones de 45 mg/L a las 48 h, en 25 y 15 mg/L a las 72 h; mientras que los organismos expuestos a 35 mg/L mostraron el total de mortalidad a las 96 h de exposición. Las concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y 10 mg/L exhibieron 3.3, 20, 80 y 93.3 % de mortalidad a las 96 h, respectivamente (Tabla 7). En los organismos expuestos a N-NO₂⁻ a una salinidad de 3 g/L fueron observados 1 y 2 mudas en las concentraciones de 7.5 y 5 mg/L en los tiempos de 72 y 96 h, respectivamente.

Tabla 7. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de N-NO₂⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	2.5	5	7.5	10	15	25	35	45
24	0	0	0	0	6.7	16.7	43.3	40	70
48	0	0	3.3	53.3	60	86.7	90	93.3	100
72	0	0	10	70 ¹	86.7	100	100	96.7	100
96	0	3.3	20 ²	80	93.3	100	100	100	100

La Tabla 8 presenta los valores medios de las CL₅₀ de N-NO₂⁻ e intervalos de confianza en las salinidades de 1 y 3 g/L; indicando que 3.3 y 4.9 mg/L de N-NO₂⁻ ejercen un efecto letal en el 50 % de las postlarvas de *L. vannamei* expuestas a 96 h en 1 y 3 g/L de salinidad, respectivamente. Los valores de CL₅₀ de N-NO₂⁻ al mismo tiempo de exposición

pero a diferentes salinidades mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en 24 y 48 h, pero no fue significativo a las 72 y 96 h de exposición ($p > 0.05$) (Tabla 8).

Tabla 8. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL_{50} de $N-NO_2^-$ (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei* en agua de mar diluida a 1 y 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Salinidad (g/L)					
	1			3		
	CL_{50}	Lim. Inf.	Lim. Sup.	CL_{50}	Lim. Inf.	Lim. Sup.
24	29.3b	21.3	40.7	37.9a	26.5	54.3
48	5.1b	4.5	5.8	8.0a	7.0	9.2
72	4.0a	3.5	4.5	5.7a	5.1	6.3
96	3.3a	2.9	3.7	4.9a	4.3	5.5

7.3.3. Toxicidad aguda de nitratos

En la Tabla 9 se observan los porcentajes de mortalidades de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de $N-NO_3^-$; el 100 % fue observado en 800 mg/L a las 48 h, mientras que a 600 y 700 mg/L fue a las 72 h, y a 500 mg/L a las 96 h de exposición. Mortalidades de 3.3, 23.3, 53.3 y 93.3 % fueron observadas en los organismos expuestos a 50, 100, 200 y 400 mg/L a las 96 h, respectivamente.

El primer efecto letal de $N-NO_3^-$ a una salinidad de 3 g/L se observó a las 24 h después de iniciar la prueba en las concentraciones de 1000 a 1600 mg/L de $N-NO_3^-$, con porcentajes de mortalidad que aumentaron progresivamente desde 13.3 hasta 86.7 %; mientras que a las 48 h se registró el 100 % de mortalidad en 1400 y 1600 mg/L de $N-NO_3^-$. En las concentraciones de 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 mg/L de $N-NO_3^-$, las mortalidades obtenidas a las 96 h de exposición a nitratos fueron 6.7, 30, 46.7, 66.7 y 83.3 %, en el orden (Tabla 10). El número de mudas en los organismos expuestos a las diferentes concentraciones de $N-NO_3^-$ en las salinidades de 1 y 3 g/L fueron en total durante las 96 h de exposición de 6 y 5, respectivamente (Tabla 9 y 10).

Tabla 9. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de N-NO₃⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 1 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	50	100	200	400	500	600	700	800
24	0	0	0 ¹	0 ²	10	33.3	33.3	50	76.7
48	0	0	16.7	13.3	53.3	73.3	80	90	100
72	0	3.3	23.3 ²	43.3 ¹	73.3 ¹	86.7	100	100	100
96	0	3.3 ¹	23.3 ¹	53.3	93.3	100	100	100	100

Tabla 10. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de N-NO₃⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad. Superíndice indica el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600
24	0	0	0	0	0	13.3	30	53.3	86.7
48	0	0	3.3	23.3 ¹	23.3	26.7	90	100	100
72	0	0	10	30	56.7 ²	70 ¹	96.7	100	100
96	0	6.7	30	46.7 ¹	66.7	83.3	100	100	100

Los valores de las CL₅₀ de N-NO₃⁻ que se dan con sus respectivos intervalos de confianza, señalan que 112.8 y 430.0 mg/L de nitratos provocarían un efecto letal en postlarvas de *L. vannamei* (PL20) expuestas a 96 h en salinidades de 1 y 3 g/L, respectivamente. Los valores de la CL₅₀ de N-NO₃⁻ al mismo tiempo de exposición pero a diferentes salinidades mostraron diferencias significativas a las 24, 48, 72 y 96 h ($p < 0.05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL₅₀ de N-NO₃⁻ (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei* en agua de mar diluida a 1 y 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Salinidad (g/L)					
	1			3		
	CL ₅₀	Lim. Inf.	Lim. Sup.	CL ₅₀	Lim. Inf.	Lim. Sup.
24	774.8b	541.9	1107.8	1680.2a	5270.3	2165.8
48	221.4b	179.7	272.7	568.5a	516.5	625.7
72	140.2b	122.6	160.2	510.1a	465.7	558.7
96	112.8b	98.5	129.1	430.0a	390.7	473.3

7.4. Toxicidad letal aguda de amonio, nitritos y nitratos combinados en postlarvas de *L. vannamei*

7.4.1. Mezcla amonio-nitritos-nitratos

Como se señaló en el capítulo anterior, las CL_{50-96} h de NAT, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ a una salinidad de 1 g/L en postlarvas de *L. vannamei* fueron 1.0, 3.3 y 112.8 mg/L, respectivamente. Por lo tanto, la UT de esta mezcla se define como la suma de 0.333, 1.10 y 37.56 mg/L de NAT, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$, respectivamente. Durante la prueba, se observó a las 24 h mortalidades del 6.7, 10, 36.7, 53.3, 93.3 y 96.7 % en las UT de 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, respectivamente; a las 48 h se registró el 100 % de mortalidad en las UT de 3 y 4; mientras que en la UT 2 y 1.5 el 100 % de mortalidad fue a las 72 y 96 h, respectivamente. A las 96 h de exposición los porcentajes acumulados de mortalidad en las UT 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 fueron de 16.7, 30, 73.3 y 90 %, respectivamente (Tabla 12). En cuanto al número de mudas en los organismos expuestos a la mezcla de los 3 compuestos del nitrógeno, se tiene que fue mayor en las UT de 0.25, 0.5 y 0.75 UT; sin embargo, solo la UT de 0.75 mostró un incremento en la mortalidad 24 h después de observarse 6 mudas (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes unidades tóxicas de NAT/ $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 1 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica								
	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4
24	0	0 ²	0 ⁵	6.7 ¹	10 ¹	36.7	53.3	93.3	96.7
48	0 ⁴	0 ⁴	3.3 ⁵	36.7 ⁶	50	66.7	96.7	100	100
72	0 ²	0 ¹	3.3 ³	56.7	80 ³	93.3	100	100	100
96	0	16.7 ¹	30 ³	73.3	90	100	100	100	100

Los porcentajes de mortalidad en la mezcla de amonio-nitritos-nitratos a la salinidad de 3 g/L a las 24 h en las UT de 1, 1.5, 2, 3 y 4 fueron 10, 33.3, 43.3, 83.3 y 90 %, respectivamente. A las 48 h se registró el 100 % de mortalidad en las UT de 3 y 4; y las 72 h en la UT 2. A las 96 h la UT de 0.5, 0.75, 1 y 1.5 obtuvieron 3.3, 10, 70 y 93.3 % de mortalidad acumulada, respectivamente (Tabla 13). Después de transcurridas las primeras 24 h de exposición a la mezcla de los 3 tóxicos en la salinidad de 3 g/L, se observó el

mayor número de mudas en las primeras 7 UT. En la UT 1 se tuvieron registros de 5, 7 y 3 mudas a las 24, 48 y 76 h de exposición con una tendencia a aumentar el % de mortalidad (Tabla 13).

Para la mezcla de $\text{NAT/N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ a la salinidad de 25 g/L se observó el 100 % de mortalidad solo en las UT de 3 y 4 a las 48 h de exposición; en la UT 2 registró el 16.67, 53.3, 66.67 y 73.3 % de mortalidad acumulada a las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente; mientras que el resto de las UT no mostraron mortalidades durante la exposición a la mezcla de los tóxicos. El control (UT 0) se mantuvo con el 0 % de mortalidad durante todas las pruebas. El número mayor de mudas (4) fue observado a las 48 h en la UT 0.2 (Tabla 14).

Tabla 13. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes unidades tóxicas de $\text{NAT/N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica								
	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4
24	0 ⁵	0 ²	0 ⁴	0 ⁶	10 ⁵	33.3 ¹	43.3 ²	83.3	90
48	0 ²	0 ⁵	0 ²	0 ⁵	23.3 ⁷	76.7	90	100	100
72	0 ¹	0 ²	0 ¹	0	56.7 ³	93.3	100	100	100
96	0	0 ¹	3.3 ²	10 ⁴	70	93.3	100	100	100

Tabla 14. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes unidades tóxicas de $\text{NAT/N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 25 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica								
	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4
24	0	0	0 ¹	0	0 ¹	0	16.67	60	80
48	0	0 ⁴	0 ³	0	0	0	53.3	100	100
72	0 ³	0	0 ²	0 ³	0 ²	0	66.67	100	100
96	0	0	0	0 ²	0 ¹	0 ¹	73.3	100	100

En la Tabla 15 se muestran los valores de la UT_{50} y sus límites de confianza para postlarvas de *L. vannamei* expuestas a una mezcla de $\text{NAT/N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ a la salinidad de 1 g/L. La UT_{50} a las 24, 48, 72 y 96 h fue de 1.07, 0.74, 0.62 y 0.44, respectivamente. De acuerdo con Pedersen y Petersen (1996) y Vanegas *et al.* (1997), si la UT_{50} es menor que la unidad (1), el efecto es sinérgico; si la unidad es mayor a 1, el efecto es antagónico; y si es

igual a 1, el efecto es aditivo; sin embargo, en este trabajo se consideró como efecto aditivo en aquel tiempo de exposición donde el valor de la UT_{50} es 1 en el intervalo de los valores superior e inferior de la UT_{50} ; por lo tanto, a las 24 h se observa un efecto aditivo (UT 1.07), mientras que a las 48, 72 y 96 h el efecto es sinérgico (Tabla 15). Los valores de UT de postlarvas de la mezcla de $NAT/N-NO_2^-/N-NO_3^-$ a la salinidad de 3 g/L fueron 2.17, 0.89, 0.72 y 0.68 para los tiempos de 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente. A las 24 h el efecto de la mezcla fue antagonico; sin embargo, en las siguientes horas el efecto fue sinérgico (Tabla 16). No obstante, los valores de UT para la salinidad de 25 g/L fueron de 4.16, 1.13, 1.12 y 1.12 para 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente; el valor de UT_{50} a las 24 h fue mayor a las UT_{50} de la salinidad de 1 y 3 g/L, y mayor a la unidad 1, por lo tanto en este tiempo de exposición el efecto fue antagonico; mientras tanto, a las 48, 72 y 96 h la UT_{50} fue igual o cercana a 1 dentro de los límites superior e inferior, siendo efectos aditivos en esos tiempos de exposición (Tabla 17).

Tabla 15. Valores de UT_{50} y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL20) expuestas a la mezcla de $NAT/N-NO_2^-/N-NO_3^-$ (RT=1:1:1) a una salinidad de 1 g/L.

Tiempo (h)	UT ₅₀ de la mezcla				CL ₅₀ individuales		
	UT	Concentraciones equivalentes			NAT	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻
		NAT	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻			
24	1.07 (0.93, 1.25)	3.85	1.18	40.23	38.9	29.3	774.8
48	0.74 (0.67, 0.83)	2.66	0.81	27.86	14.0	5.1	221.4
72	0.62 (0.55, 0.68)	2.23	0.68	23.31	11.8	4.0	140.2
96	0.44 (0.39, 0.50)	1.58	0.48	16.54	10.8	3.3	112.8

En la Tabla 18 se muestran los valores de UT_{50} y sus límites de confianza a diferentes tiempos de exposición a las salinidades de 1, 3 y 25 g/L para postlarvas de *L. vannamei* expuestas a la mezcla de $NAT/N-NO_2^-/N-NO_3^-$. A las 24 h se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las 3 salinidades de exposición; sin embargo, a las 48, 72 y 96

h, solo existen diferencias significativas entre la UT de 1 y 25 g/L, pero no en la UT de 3 g/L de salinidad ($p > 0.05$).

Tabla 16. Valores de UT_{50} y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N- NO_2^- /N- NO_3^- (RT=1:1:1) a una salinidad de 3 g/L.

UT ₅₀ de la mezcla							
Tiempo (h)	Concentraciones equivalentes				CL ₅₀ individuales		
	UT	NAT	N- NO_2^-	N- NO_3^-	NAT	N- NO_2^-	N- NO_3^-
24	2.17 (1.66, 2.85)	11.79	3.54	311.03	48.4	37.9	1680.2
48	0.89 (0.79, 0.98)	4.84	1.45	137.57	22.5	8.0	568.5
72	0.72 (0.66, 0.80)	3.91	1.18	103.2	18.1	5.7	510.1
96	0.68 (0.61, 0.75)	3.69	1.11	97.45	16.3	4.9	430.0

Tabla 17. Valores de UT_{50} y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N- NO_2^- /N- NO_3^- (RT=1:1:1) en agua de mar a 25 g/L.

UT ₅₀ de la mezcla							
Tiempo (h)	Concentraciones equivalentes				CL ₅₀ individuales		
	UT	NAT	N- NO_2^-	N- NO_3^-	NAT	N- NO_2^-	N- NO_3^-
24	4.16 (2.98, 5.82)	22.60	6.79	596.27	48.4	37.9	1680.2
48	1.13 (1.00, 1.27)	6.14	1.45	161.97	22.5	8.0	568.5
72	1.12 (0.99, 1.25)	6.09	1.83	160.53	18.1	5.7	510.1
96	1.12 (0.99, 1.25)	6.09	1.83	160.53	16.3	4.9	430.0

Tabla 18. Valores de UT_{50} y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N- NO_2^- /N- NO_3^- (RT=1:1:1) en diferentes salinidades. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las CL_{50}

Salinidad (g/L)	1	3	25
Tiempo (h)	UT		
24	1.07 (0.93, 1.25) ^c	2.17 (1.66, 2.85) ^b	4.16 (2.98, 5.82) ^a
48	0.74 (0.67, 0.83) ^b	0.89 (0.79, 0.98) ^{ab}	1.13 (1.00, 1.27) ^a
72	0.62 (0.55, 0.68) ^b	0.72 (0.66, 0.80) ^{ab}	1.12 (0.99, 1.25) ^a
96	0.44 (0.39, 0.50) ^b	0.68 (0.61, 0.75) ^{ab}	1.12 (0.99, 1.25) ^a

7.4.2. Mezcla amonio-nitritos

Las CL_{50} a las 96 h de NAT y N- NO_2^- a una salinidad de 3 g/L en postlarvas de *L. vannamei* fueron de 1.2 y 4.9 mg/L, respectivamente. Por lo tanto, la UT de esta mezcla se define como la suma de 0.6 y 2.45 mg/L de NAT y N- NO_2^- , respectivamente. Los porcentajes de mortalidad de postlarvas *L. vannamei* expuestas a una mezcla de NAT/N- NO_2^- con una RT=1:1 en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad, son mostrados en la Tabla 19. El 100 % de mortalidad fue registrado a las 24 h en la UT 4, y a las 48 h en la UT 2 y 3, mientras que en la UT de 1 y 1.5 los % de mortalidad fueron de 43.33 y 63.33, respectivamente. A las 96 h de exposición, la mortalidad acumulada en las UT de 0.75, 1 y 1.5 fueron 10, 76.67 y 93.33, respectivamente. En las UT menores se observó el mayor número de mudas, las cuales no mostraron tendencia a aumentar el efecto letal de la exposición de la mezcla de los dos tóxicos.

Tabla 19. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes unidades tóxicas de NAT/N- NO_2^- (RT=1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica								
	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4
24	0 ¹	0 ³	0	0 ⁴	13.33	16.67	50 ³	93.33	100 ¹
48	0	0	0 ²	0	43.33 ³	63.33 ²	100	100	100
72	0 ⁶	0 ¹	0 ⁴	10	73.33 ⁵	93.33	100	100	100
96	0	0	0	10 ¹	76.67	93.33	100	100	100

En la Tabla 20, se encuentran los valores de UT_{50} obtenidos a diferentes tiempos de exposición; a las 24, 48, 72 y 96 h las UT de NAT/N- NO_2^- fueron 1.18, 0.8, 0.66 y 0.66, respectivamente. Los valores de UT_{50} obtenidos a las 48, 72 y 96 h son menores a la UT 1,

se deduce que el efecto de la mezcla de NAT/N-NO₂⁻ es sinérgico en esos tiempos de exposición.

Tabla 20. Valores de UT₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas *L. vannamei* (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N-NO₂⁻ (RT=1:1) a una salinidad de 3 g/L.

Tiempo (h)	UT ₅₀ de la mezcla		Concentraciones equivalentes		CL ₅₀ individuales	
	UT		NAT	N-NO ₂ ⁻	NAT	N-NO ₂ ⁻
24	1.18 (1.02, 1.35)		9.62	2.89	48.4	37.9
48	0.8 (0.72, 0.88)		6.52	1.31	22.5	8.0
72	0.66 (0.58, 0.73)		5.38	1.62	18.1	5.7
96	0.66 (0.59, 0.73)		5.38	1.62	16.3	4.9

7.4.3. Mezcla de amonio-nitratos

En la mezcla de NAT/N-NO₃⁻, se registraron mortalidad del 6.67, 50, 73.3, 93.3 y 100 % en las UT 1, 1.5, 2, 3 y 4, respectivamente; a las 48 h fue de 16.67 y 56.67 % en las UT de 1 y 1.5, respectivamente; mientras que el 100 % de mortalidad fueron para las UT 2 y 3. A las 72 h de exposición, la mortalidad acumulada en la UT de 1.5 registró el 100 %. Durante las 96 h de exposición las UT 0, 0.25 y 0.5 no presentaron mortalidad de los organismos. A las 24 h de exposición se registró el mayor número de mudas con 5, 4 y 5 en las UT de 0.75, 1 y 1.5, respectivamente; sin embargo, solo en las UT de 1 y 1.5 presentaron porcentajes de más del 50 % después de las 48 h de exposición (Tabla 21).

Tabla 21. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes unidades tóxicas de NAT/ N-NO₃⁻ (RT=1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica								
	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4
24	0 ²	0 ³	0	0 ⁵	6.67 ⁴	50 ⁵	73.3	93.3 ³	100
48	0 ⁵	0 ¹	0 ²	0 ⁴	16.67 ¹	56.67 ¹	100	100	100
72	0 ¹	0 ¹	0 ¹	6.67 ²	40 ³	100	100	100	100
96	0 ¹	0 ¹	0 ³	10 ²	63.3 ⁵	100	100	100	100

El efecto de la mezcla NAT/N-NO₃⁻ es de tipo aditivo a las 24 h; mientras tanto el efecto es sinérgico a las 48, 72 y 96 h de exposición, debido a que las UT₅₀ fueron de 0.82, 0.65 y 0.64, respectivamente, de acuerdo a las concentraciones equivalentes en la mezcla, estas son de una magnitud mayor a las CL₅₀-96 h obtenidas en las pruebas de toxicidad individuales (Tabla 22).

Tabla 22. Valores de UT₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas *L. vannamei* (PL20) expuestas a la mezcla de NAT/N-NO₃⁻ (RT=1:1:) a una salinidad de 3 g/L.

Tiempo (h)	UT ₅₀ de la mezcla			CL ₅₀ individuales	
	UT	Concentraciones equivalentes		NAT	N-NO ₃ ⁻
24	1.08 (0.95, 1.22)	8.8	232.2	48.4	1680.2
48	0.82 (0.74, 0.90)	6.69	176.3	22.5	568.5
72	0.65 (0.59, 0.72)	5.3	139.75	18.1	510.1
96	0.64 (0.58, 0.71)	5.22	137.6	16.3	430.0

7.4.4. Mezcla nitritos-nitratos

Los porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a una mezcla de nitritos-nitratos (RT=1:1) a una salinidad de 3 g/L son mostrados en la Tabla 23. La mortalidad a las 24 h de exposición en las UT de 0.75, 1, 1.5, 2, 3 y 4 fueron 16.67, 20, 23.33, 26.67, 56.67 y 90 %, respectivamente. El 100 % de mortalidad fue registrado en las UT 4 a las 48 h, mientras que en la UT 3 fue a las 72 h. A las 96 h la mortalidad acumulada en las UT 0.75, 1, 1.5 y 2 fueron de 36.67, 70, 76.67 y 86.67 %, respectivamente. El número de mudas en los organismos expuestos a la mezcla de N-NO₂/N-NO₃⁻ no mostró un efecto letal ya que las mudas registradas fueron más en las UT menores (0.25 y 0.5) y durante las 96 h de exposición se registró el 0 % de mortalidad (Tabla 23). Las UT₅₀ de la mezcla de N-NO₂/N-NO₃⁻ a una salinidad de 3 g/L en postlarvas *L. vannamei*, indican un efecto antagónico y aditivo a las 24 h (2.25 UT) y 48 h, respectivamente (0.92 UT); sin embargo, a las 72 y 92 las UT fueron menores a 1 (0.84 y 0.78, en ese orden), lo que indica un efecto sinérgico (Tabla 24).

Tabla 23. Porcentajes de mortalidad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes unidades tóxicas de N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ (RT=1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica								
	0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4
24	0 ²	0 ³	0 ⁴	16.67	20	23.33 ⁴	26.67 ³	56.67 ³	90 ⁵
48	0	0	0 ³	26.67	53.33 ¹	56.67	56.67	96.67	100
72	0 ²	0 ²	0	33.33 ³	63.33 ²	66.67	73.33	100	100
96	0 ²	0 ¹	0 ³	36.67 ⁵	70 ⁴	76.67 ²	86.67	100	100

Tabla 24. Valores de UT₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas *L. vannamei* (PL20) expuestas a la mezcla de N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ (RT=1:1:) a una salinidad de 3 g/L.

UT ₅₀ de la mezcla		Concentraciones equivalentes		CL ₅₀ individuales	
Tiempo (h)	UT	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻
24	2.25 (1.60, 3.12)	5.51	483.75	37.9	1680.2
48	0.92 (0.81, 1.05)	2.26	197.8	8.0	568.5
72	0.84 (0.74, 0.94)	2.06	80.6	5.7	510.1
96	0.78 (0.70, 0.88)	1.91	167.7	4.9	430.0

7.5. Toxicidad letal aguda de amonio, nitritos y nitratos por separado en juveniles de *L. vannamei*

7.5.1. Toxicidad aguda de amonio

Los porcentajes de mortalidad en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de amonio son mostrados en la Tabla 25. El 100 % de mortalidad fue observado en la concentración de 110 mg/L de NAT a las 48 h, mientras que a 90 mg/L fue hasta las 96 h de exposición. La mortalidad acumulada a las 96 h en las concentraciones de 10, 20, 40, 50, 60 y 80 fueron de 3.3, 13.3, 16.7, 43.3, 63.3 y 90.0 %, respectivamente.

En cuanto a la CL₅₀ a las 24, 48, 72 y 96 h de NAT para juveniles de *L. vannamei* a una salinidad de 3 g/L fue de 116.29, 44.56, 39.62 y 29.00 mg/L, respectivamente (Tabla 26). No fue observado un efecto letal en los organismos expuestos a NAT con relación al número de mudas (Tabla 25). Los valores de la CL₅₀ de N-NH₃ a las 24, 48, 72 y 96 h para

juveniles de *L. vannamei* a la salinidad de 3 g/L fueron 10.12, 3.88, 3.45 y 5.52 mg/L, respectivamente (Tabla 27).

Tabla 25. Porcentajes de mortalidad de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	10	20	40	50	60	80	90	110
24	0	0	0	0	10	13.3	16.7 ¹	53.3 ²	76.7
48	0	0	0	3.3 ³	16.7	30 ¹	60 ¹	86.7	100
72	0	0 ¹	3.3	6.7 ³	20	40 ⁴	66.7	96.7	100
96	0 ²	3.3 ³	13.3	16.7 ¹	43.3	63.3 ²	90	100	100

Tabla 26. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL₅₀ de NAT (mg/L) para juveniles de *L. vannamei* en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	CL ₅₀	Lim. Inf.	Lim. Sup.
24	116.29	84.57	159.92
48	44.56	38.62	51.43
72	39.62	34.79	45.12
96	29.00	25.67	32.72

Tabla 27. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL₅₀ de N-NH₃ (mg/L) para juveniles de *L. vannamei* en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad

Tiempo (h)	CL ₅₀	Lim. Inf.	Lim. Sup.
24	10.12	7.36	13.91
48	3.88	3.36	4.47
72	3.45	3.03	3.92
96	5.52	2.23	6.85

7.5.2. Toxicidad aguda de nitritos

El porcentaje de mortalidad en la prueba de toxicidad aguda de nitritos a las 24 h fue de 10.0, 43.3 y 76.7 % en las concentraciones de 30, 40 y 50 mg/L de N-NO₂⁻, respectivamente; mientras que a las 48 h fue de 3.3, 6.7, 16.7, 20.0, 30.0, 93.3 y 100 % en 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 mg/L de N-NO₂⁻, respectivamente. El 100 % de mortalidad fue registrada a las 72 h en las concentraciones de 40 y 50 mg/L. Las mortalidades

acumuladas a las 96 h para 5, 7.5, 10, 15, 20 y 30 mg/L de N-NO₂⁻ fueron de 3.3, 16.7, 33.3, 46.7, 73.3 y 96.7 %, en ese orden (Tabla 28). Los valores de CL₅₀ para 24, 48, 72 y 96 h de N-NO₂⁻ a 3 g/L de salinidad fueron de 58.55, 15.39, 12.40 y 10.60 mg/L, respectivamente (Tabla 29). Se puede observar que en la prueba letal aguda de N-NO₂⁻ a 3 g/L de salinidad, el número de mudas no estuvo relacionado con el efecto letal.

Tabla 28. Porcentajes de mortalidad de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO₂⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	5	7.5	10	15	20	30	40	50
24	0 ¹	0 ¹	0 ³	0	0 ³	0	10 ¹	43.3	76.7
48	0 ¹	0	3.3 ²	6.7	16.7	20 ¹	30	93.3	100
72	0	0	10	26.7 ⁴	30 ³	43.3	73.3	100	100
96	0	3.3 ¹	16.7	33.3 ²	46.7	73.3	96.7	100	100

Tabla 29. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL₅₀ de N-NO₂⁻ (mg/L) para juveniles de *L. vannamei* en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	CL ₅₀	Lim. Inf.	Lim. Sup.
24	58.55	42.92	79.87
48	15.39	13.64	17.37
72	12.40	11.09	13.85
96	10.60	9.56	11.73

7.5.3. Toxicidad aguda de nitratos

En la prueba de toxicidad aguda de nitratos a 3 g/L de salinidad, el % de mortalidad a las 24 h en las concentraciones de 2000, 2400, 2600 y 2800 mg/L de N-NO₃ fueron de 3.3, 30, 46.7 y 50 %, respectivamente. A las 48 h los % de mortalidad fueron de 16.7, 23.3, 40, 53.3, 66.7 y 73.3 % en las concentraciones de 1200, 1600, 2000, 2400, 2600 y 2800 mg/L de N-NO₃⁻, respectivamente. El total de número de mudas durante las 96 h fue de 2 (Tabla 30).

Tabla 30. Porcentajes de mortalidad de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO₃⁻ (mg/L) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)								
	0	400	800	1200	1600	2000	2400	2600	2800
24	0	0	0	0	0	3.3	30 ¹	46.7	50
48	0	0	0	16.7	23.3	40	53.3	66.7	73.3
72	0	0	3.3	40	53.3	66.7	80	100	100
96	0	3.3 ¹	23.3	53.3	60	86.7	96.7	100	100

Las CL₅₀ de N-NO₃⁻ y sus límites de confianza estimados para una población de juveniles de *L. vannamei* en una salinidad de 3 g/L se muestran en la Tabla 31. Las CL₅₀ oscilaron entre 4873.87 y 900.09 mg/L N-NO₃⁻, lo cual indica que con estas concentraciones el 50 % de una población de juveniles de *L. vannamei* a una salinidad de 3 g/L no sobreviviría a 24 y 96 h, respectivamente.

Tabla 31. Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL₅₀ de N-NO₃⁻ (mg/L) para juveniles de *L. vannamei* en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	CL ₅₀	Lim. Inf.	Lim. Sup.
24	4873.87	3562.21	6669.38
48	2253.70	1764.62	2879.03
72	1091.29	987.56	1205.94
96	900.09	818.03	994.35

7.6. Toxicidad letal aguda de amonio, nitritos y nitratos combinados en juveniles de *L. vannamei*

De acuerdo a la toxicidad aguda de NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ en juveniles de *L. vannamei* las CL₅₀ a la salinidad de 3 g/L fueron de 29.00, 10.6 y 900.09 mg/L, respectivamente. Por lo tanto, la UT de esta mezcla se define como la suma de 9.67, 3.53 y 300.03 mg/L de NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻, respectivamente. Los porcentajes de mortalidad en la mezcla a las 24 h en la UT de 1.5, 2, 2.5, 2.75 y 3 fueron de 6.7, 16.7, 56.7, 73.3 y 83.3 %, respectivamente. A las 48 h se alcanzó el 100 % de mortalidad en las UT de 2.75 y 3. A las 96 h en las UT de 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 y 2.5 registraron las mortalidades acumuladas de 6.7, 13.3, 30, 73.3, 93.3 y 100 % de mortalidad, respectivamente (Tabla 32). El número

total acumulado de mudas durante las 96 h fue de 5, las cuales no mostraron un efecto letal a la exposición de la mezcla.

Tabla 32. Porcentajes de mortalidad de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes unidades toxicas de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 3 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica								
	0	0.5	0.75	1	1.5	2	2.5	2.75	3
24	0	0	0 ¹	0	6.7 ¹	16.7 ¹	56.7	73.3	83.3
48	0	0	0	6.7 ¹	40	53.3	93.3	100	100
72	0	0 ²	3.3	6.7	43.3	60	93.3	100	100
96	0 ¹	6.7	13.3	30	73.3	93.3	100	100	100

Los valores de las UT₅₀ de la mezcla de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ a las 24, 48, 72 y 96 h fueron 2.50, 1.17, 1.12 y 0.99, respectivamente (Tabla 33). Los valores a las 24, 48 y 72 h son mayores a la unidad 1; por lo tanto, el efecto de la combinación de los 3 tóxicos es antagónico en ese tiempo de exposición; en cambio, a las 96 h la UT es 0.99 lo que significa que el efecto es aditivo. Las concentraciones equivalentes a las 96 h de exposición hacen una suma similar a 1 UT (Tabla 33).

Tabla 33. Valores de UT₅₀ y sus límites de confianza (entre paréntesis) de juveniles de *L. vannamei* (3 g) expuestos a la mezcla de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ (RT=1:1:1) a una salinidad de 3 g/L.

Tiempo (h)	UT	UT ₅₀ de la mezcla					
		Concentraciones equivalentes			CL ₅₀ individuales		
		NAT	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	NAT	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻
24	2.50 (2.03, 3.07)	24.17	4.08	1125.1	116.29	37.9	4873.87
48	1.17 (1.08, 1.27)	11.31	1.91	351.03	44.56	8.0	2253.70
72	1.12 (1.04, 1.20)	10.04	1.83	336.03	39.62	5.7	1091.29
96	0.99 (0.90, 1.09)	9.57	1.62	297.03	29.00	4.9	900.09

La mortalidad de los organismos expuestos a la mezcla de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ a una salinidad de 25 g/L mostró a las 24 h porcentajes de 10, 30 y 46.7 en las UT de 25, 2.75

y 3, respectivamente. A las 48 h las mortalidades acumuladas en las UT de 2, 2.5, 2.75 y 3 fueron de 13.3, 33.3, 63.3 y 86.7, en ese orden; mientras que a las 72 h en las UT de 1.5, 2, 2.5, 2.75 y 3 fueron de 13.3, 30, 46.7, 100 y 100 %, respectivamente. A las 96 h en la UT de 1.5 se mantuvo el 13.3 % de mortalidad, mientras que en las UT de 2 y 2.5 fueron de 43.3 y 56.7, respectivamente. Las UT 0, 0.5, 0.75 y 1 no registraron mortalidades durante las 96 h de exposición a la mezcla de los tres tóxicos, así también, en ninguna concentración se observaron mudas (Tabla 34).

Tabla 34. Porcentajes de mortalidad de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes unidades toxicas de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ (RT=1:1:1) en agua de mar diluida a 25 g/L de salinidad.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica								
	0	0.5	0.75	1	1.5	2	2.5	2.75	3
24	0	0	0	0	0	0	10	30	46.7
48	0	0	0	0	0	13.3	33.3	63.3	86.7
72	0	0	0	0	13.3	30	46.7	100	100
96	0 ¹	0	0	0	13.3	43.3	56.7	100	100

Las UT₅₀ a las 24, 48, 72 y 96 h fueron 6.12, 3.07, 1.35 y 1.31, en ese orden. Estos valores de UT₅₀ indican claramente un efecto sinérgico en todos los tiempos de exposición; además, las concentraciones equivalentes muestran una orden de magnitud mayor a las concentraciones individuales de la CL₅₀ individual de cada compuesto nitrogenado (Tabla 35).

Al hacer una comparación de los valores de las UT₅₀ a la salinidad de 3 y 25 g/L de salinidad en organismos expuestos a la mezcla de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻, claramente se observan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en todos los tiempos de exposición (24, 48, 72 y 96 h), siendo las UT de 25 g/L de salinidad mayores a las UT₅₀ de 3 g/L de salinidad (Tabla 36).

Tabla 35. Valores de UT_{50} y sus límites de confianza (entre paréntesis) de juveniles de *L. vannamei* (3 g) expuestos a la mezcla de $NAT/N-NO_2^-/N-NO_3^-$ (RT=1:1:1) a una salinidad de 25 g/L.

Tiempo (h)	UT	UT_{50} de la mezcla					
		Concentraciones equivalentes			CL_{50} individuales		
		NAT	$N-NO_2^-$	$N-NO_3^-$	NAT	$N-NO_2^-$	$N-NO_3^-$
24	6.12 (4.39, 8.52)	59.16	10.00	1836.18	116.29	37.9	4873.87
48	3.07 (2.45, 3.84)	29.68	5.01	921.06	44.56	8.0	2253.70
72	1.35 (1.23, 1.48)	13.05	2.21	405.03	39.62	5.7	1091.29
96	1.31 (1.20, 1.43)	12.66	2.14	393.04	29.00	4.9	900.09

Tabla 36. Valores de UT_{50} y sus límites de confianza (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL20) expuestos a la mezcla de $NAT/N-NO_2^-/N-NO_3^-$ (RT=1:1:1) en diferentes salinidades. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las CL_{50}

Tiempo (h)	Salinidad (g/L)	
	3	25
	UT_{50}	
24	2.50 (2.03, 3.07)b	6.12 (4.39, 8.52)a
48	1.17 (1.08, 1.27)b	3.07 (2.45, 3.84)a
72	1.12 (1.04, 1.20)b	1.35 (1.23, 1.48)a
96	0.99 (0.90, 1.09)b	1.31 (1.20, 1.43)a

7.7. Toxicidad subletal en el corto plazo (48 h)

7.7.1. Niveles de oxihemocianina en la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* expuestos por separado a amonio, nitritos y nitratos

En la prueba subletal de juveniles de *L. vannamei* expuestos a amonio y una salinidad de 3 g/L, se utilizaron las concentraciones de 0 (control), 2.90, 7.25 y 14.50 mg/L de NAT equivalentes al 0, 10, 25 y 50 % del valor de la CL_{50} a las 96 h de NAT. Los niveles de oxihemocianina en la hemolinfa a las 0 h (inicio) fue de 1.598 ± 0.186 mmol/L, conforme pasaron las horas de exposición fue observada una disminución de oxihemocianina en las

diferentes concentraciones; sin embargo, en la concentración de 14.50 mg/L de NAT la disminución fue más evidente, en esta concentración los niveles de oxihemocianina a las 6, 12, 24 y 48 h de tiempo de exposición fueron de 1.582 ± 0.296 , 1.311 ± 0.077 , 1.168 ± 0.201 y 0.894 ± 0.05 mmol/L, respectivamente. En la concentración de 2.90 de NAT fue observada una recuperación en los niveles de oxihemocianina a partir de las 24 h, donde los niveles de oxihemocianina fueron de 1.251 ± 0.233 y 1.264 ± 0.205 mmol/L a las 24 y 48 h, respectivamente. Los organismos expuestos al control (0 mg/L de NAT) mantuvieron estables los niveles de oxihemocianina con 1.533 ± 0.183 , 1.52 ± 0.122 , 1.499 ± 0.292 y 1.582 ± 0.296 a las 6, 12, 24 y 48 h de exposición, en ese orden. A las 6 y 24 h de exposición, los niveles de oxihemocianina no registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguna de las concentraciones de NAT a las que fueron expuestos los organismos; sin embargo, a las 48 h la concentración de 14.50 mg/L de NAT mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con el control (0 mg/L de NAT), pero no con las concentraciones de 2.90 y 7.25 mg/L de NAT (Figura 3).

En la prueba de toxicidad subletal de nitritos, las concentraciones equivalentes al 0, 10, 25 y 50 % de la CL_{50} a las 96 h fue de 0, 1.06, 2.65 y 5.30 mg/L de $N-NO_2^-$, respectivamente. Durante las 48 h de exposición, los niveles de oxihemocianina en la hemolinfa disminuyeron y fue más evidente en las concentraciones de 2.65 y 5.30 mg/L de $N-NO_2^-$ ambiental, en las cuales los niveles a las 6, 12, 24 y 48 h fueron de 1.372 ± 0.268 , 1.422 ± 0.157 , 1.179 ± 0.045 y 0.886 ± 0.137 , y 1.204 ± 0.1814 , 1.124 ± 0.116 , 1.102 ± 0.142 y 0.782 ± 0.074 mmol/L, en ese orden. Mientras que en la concentración de 1.06 mg/L de $N-NO_2^-$ ambiental los niveles de oxihemocianina fueron de 1.476 ± 0.141 , 1.448 ± 0.156 , 1.222 ± 0.186 y 1.269 ± 0.138 para las 6, 12, 24 y 48 h de exposición, respectivamente. No fue evidenciado diferencias significativas ($p > 0.05$) en los niveles de oxihemocianina a las 6 y 12 h de exposición en ninguna de las concentraciones de $N-NO_2^-$ ambiental. A las 24 h la concentración de 5.30 mg/L de $N-NO_2^-$ ambiental mostró diferencias significativas menores ($p < 0.05$) con el tratamiento control, pero no con los otros dos tratamientos (1.06 y 2.65 mg/L de $N-NO_2^-$ ambiental). A las 48 h de exposición, los niveles de oxihemocianina de la concentración de 2.65 y 5.30 mg/L de $N-NO_2^-$ ambiental, mostraron diferencias significativas menores ($p < 0.05$) con el control y la concentración de 1.06 mg/L de $N-NO_2^-$;

sin embargo, estas dos últimas no fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p > 0.05$) (Figura 4).

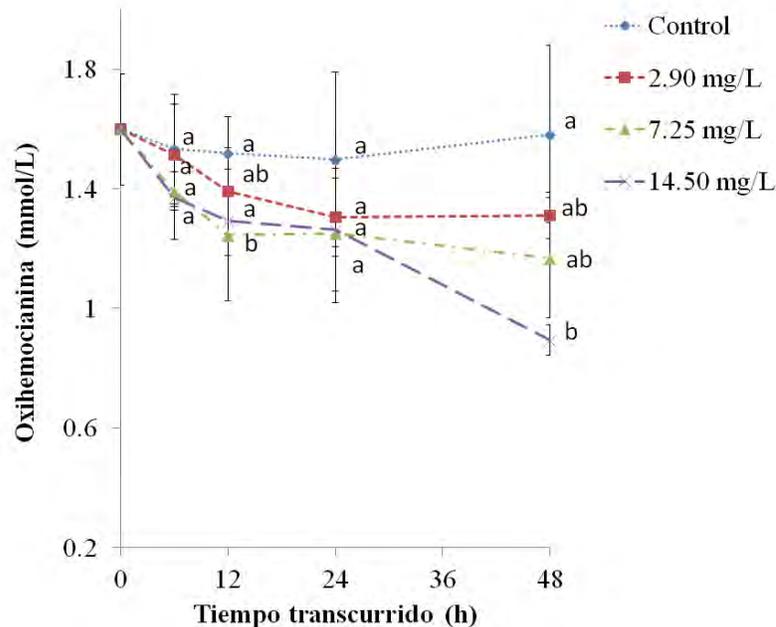


Figura 3. Niveles de oxihemocianina (mmol/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

Las concentraciones de N-NO_3^- ambiental para la prueba subletal fueron 0, 90.0, 225.02 y 400.05 mg/L correspondientes a 0, 10, 25 y 50 % del valor de la CL_{50} a las 96 h para juveniles de *L. vannamei*, respectivamente. Igual que en la exposición subletal de amonio y nitritos, los niveles de oxihemocianina en la hemolinfa de organismos expuestos a nitratos mostraron una tendencia a disminuir conforme pasó el tiempo de exposición; no obstante, fue menor el nivel en que disminuyeron a partir del nivel inicial (1.545 ± 0.219 mmol/L). Los niveles de oxihemocianina en los organismos del control ambiental (0 mg/L de N-NO_3^-) fueron de 1.515 ± 0.192 , 1.468 ± 0.316 , 1.429 ± 0.238 y 1.511 ± 0.234 mmol/L a las 6, 12, 24 y 48 de exposición, en ese orden. En el tratamiento de 225.02 mg/L de N-NO_3^- ambiental, el nivel más bajo de oxihemocianina (0.970 ± 0.238 mmol/L) fue observado a las 24 h, pero aumentó al final del experimento con un nivel de 1.049 ± 0.084 mmol/L (Figura 5).

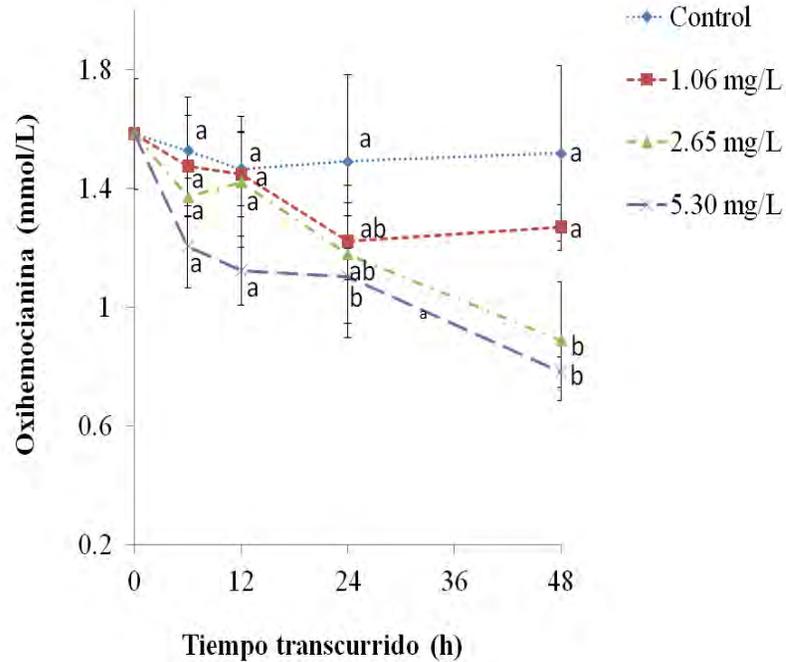


Figura 4. Niveles de oxihemocianina (mmol/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO_2^- (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

A las 6 h de exposición, los niveles de oxihemocianina en los organismos del tratamiento control (0 mg/L de N-NO_3^-) fueron estadísticamente mayor ($p < 0.05$) a los tratamientos de 225.02 y 400.05 mg/L de N-NO_3^- ambiental, pero no con la concentración de 90.0 mg/L de N-NO_3^- . A las 12, 24 y 48 h, los niveles de oxihemocianina en la concentración de 0 mg/L de N-NO_3^- mostró diferencias significativas con el tratamiento de 400.05 mg/L de N-NO_3^- ambiental, pero no con los otros dos tratamientos de exposición (Figura 5).

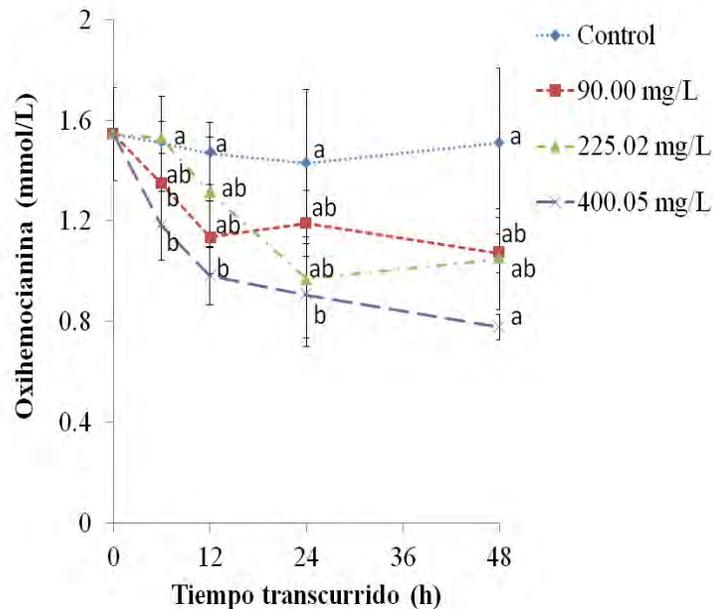


Figura 5. Niveles de oxihemocianina (mmol/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO_3^- (mg/L) durante de 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

7.7.2. Niveles de glucosa en la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* expuestos por separado a amonio, nitritos y nitratos

Los niveles de glucosa en la hemolinfa de organismos expuestos a amonio mostraron un aumento en las primeras 24 h de exposición al amonio ambiental y después de las 24 h se observó una disminución, excepto en el tratamiento control (0 mg/L de NAT ambiental), el cual mantuvo niveles entre 0.360 y 0.347 mg/mL. En la concentración de 14.50 mg/L de NAT ambiental, los niveles de glucosa a las 6, 12, 24 y 48 h de exposición fueron de 0.448 ± 0.028 , 0.464 ± 0.017 , 0.554 ± 0.016 y 0.373 ± 0.016 mg/mL, respectivamente; mientras que en el tratamiento de menor concentración de NAT ambiental (2.90 mg/L), los niveles de glucosa tuvieron un comportamiento de 0.362 ± 0.026 , 0.373 ± 0.033 , 0.442 ± 0.024 y 0.410 ± 0.024 mg/mL a las 6, 12, 24 y 48 h de exposición, en ese orden. A las 6, 12 y 48 h de exposición, no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los niveles de glucosa en los tratamientos de NAT ambiental; sin embargo, a las 24 h se presentaron

diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento control (0 mg/L de NAT) y el de mayor concentración de NAT ambiental (14.50 mg/L de NAT); no obstante, este último no fue diferente con los otros dos tratamientos de NAT ambiental (2.90 y 7.25 mg/L) (Figura 6).

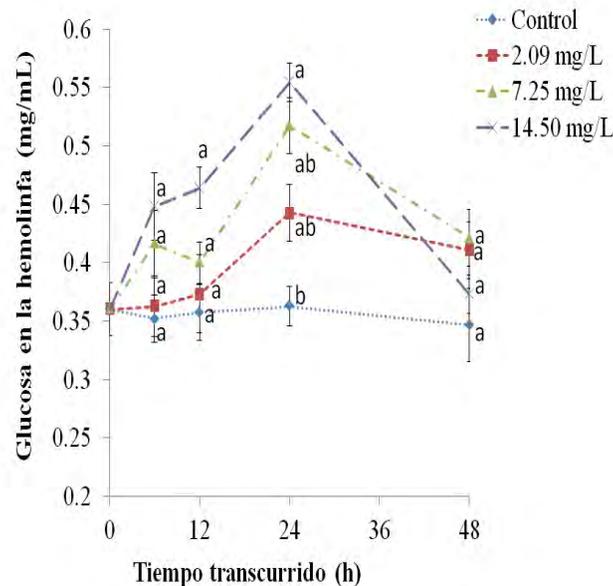


Figura 6. Niveles de glucosa (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

En la Figura 7 se muestra el comportamiento de los niveles de glucosa en la hemolinfa de camarones expuestos a diferentes concentraciones de N-NO_2^- ambiental. Los niveles de glucosa en el tratamiento control, a las 6, 12, 24 y 48 h fueron de 0.346 ± 0.024 , 0.314 ± 0.024 , 0.346 ± 0.024 y 0.336 ± 0.033 mg/mL, respectivamente; mientras que para el tratamiento de la concentración más alta de N-NO_2^- ambiental fue de 0.362 ± 0.026 , 0.386 ± 0.020 , 0.386 ± 0.020 , 0.405 ± 0.016 y 0.442 ± 0.031 mg/L a las 6, 12, 24 y 48 h, respectivamente. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los niveles de glucosa en los 4 tratamientos de N-NO_2^- ambiental a las 6 y 48 h; sin embargo, a las 12 y 24 h, sí se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento de 5.30 mg/L de N-NO_2^- ambiental, pero no con los otros dos tratamientos de nitrito ambiental (1.06 y 2.65 mg/L de N-NO_2^-).

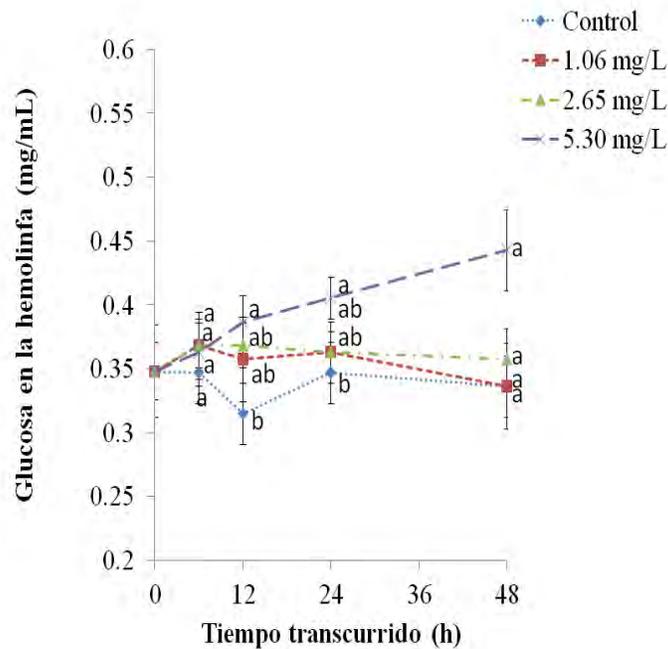


Figura 7. Niveles de glucosa (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO_2^- (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

En cuanto a la exposición de nitratos, los niveles de glucosa en la hemolinfa mostraron una tendencia menor a aumentar en las primeras horas. En el tratamiento control y los de 90.00 y 225.02 mg/L de N-NO_3^- ambiental mantuvieron niveles de glucosa similares; sin embargo, en el tratamiento de 400.05 mg/L de N-NO_3^- ambiental, los niveles de glucosa a las 6, 12, 24 y 48 h fueron de 0.336 ± 0.033 , 0.368 ± 0.017 , 0.400 ± 0.033 y 0.362 ± 0.016 , respectivamente. En ninguno de los tiempos de exposición se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los niveles de glucosa expuestos a las 4 concentraciones de N-NO_3^- ambiental (Figura 8).

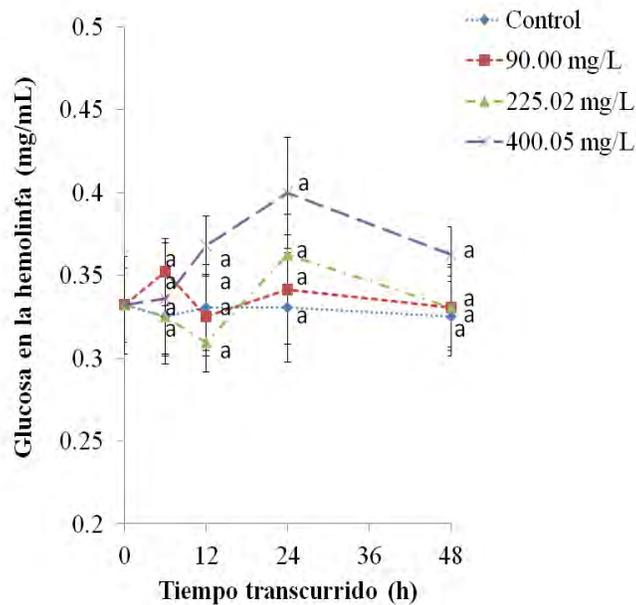


Figura 8. Niveles de glucosa (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO₃⁻ (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

7.7.3. Niveles de lactato en la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* expuestos por separado a amonio, nitritos y nitratos

El comportamiento de los niveles de lactato en la hemolinfa de organismos expuestos a concentraciones subletales de amonio fue similar a los niveles de glucosa, en las primeras horas de exposición se observó un aumento en los niveles de lactato y a partir de las 24 h se presentó una disminución en los niveles. El tratamiento control (0 mg/L de NAT) se mantuvo estable durante las 48 h de exposición con niveles entre 0.095 y 0.108 mg/mL de lactato; mientras que los niveles de lactato en el tratamiento de 14.50 mg/L de NAT ambiental a las 6, 12, 24 y 48 h fue de 0.142 ± 0.026 , 0.235 ± 0.029 , 0.315 ± 0.013 y 0.249 ± 0.047 mg/mL, respectivamente. A las 6 h no se mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los niveles de lactato en ninguno de los tratamientos con NAT ambiental; sin embargo, a las 12 h, todos los tratamientos fueron diferentes entre sí ($p < 0.05$), siendo el tratamiento con mayor concentración de NAT (14.50 mg/L) el que registró el nivel más elevado de lactato en la hemolinfa (0.235 ± 0.029 mg/mL) (Figura 9).

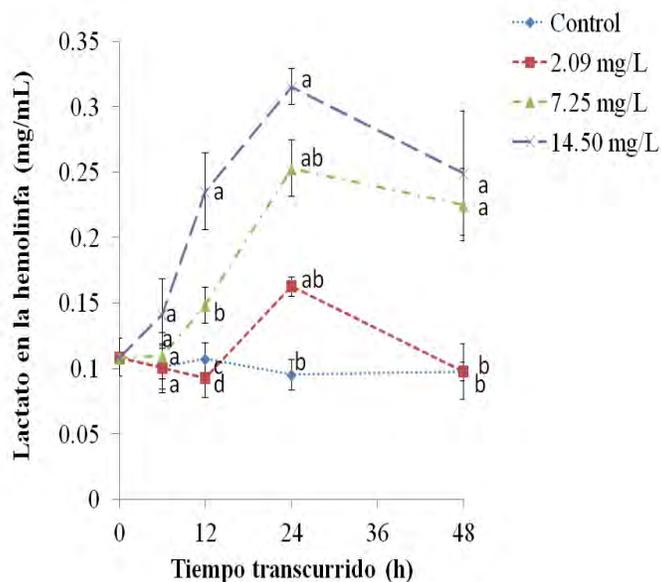


Figura 9. Niveles de lactato (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

En la Figura 10 se muestra el comportamiento de los niveles de lactato en la hemolinfa de organismos que fueron expuestos a diferentes concentraciones de nitrito ambiental (0, 1.06, 2.65, 5.30 mg/L de N-NO_2^-). Los tratamientos control, 1.06 y 2.65 mg/L de N-NO_2^- ambiental tuvieron un comportamiento similar en cuanto a los niveles de lactato en la hemolinfa; sin embargo, en el tratamiento de 5.30 mg/L de N-NO_2^- , los niveles de lactato a las 6, 12, 24 y 48 h fueron de 0.115 ± 0.037 , 0.130 ± 0.026 , 0.255 ± 0.022 y 0.236 ± 0.027 mg/mL, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los niveles de lactato y las concentraciones de nitrito ambiental a las 6 y 12 h de exposición. A las 24 h, el tratamiento control (0 mg/L de N-NO_2^-) mostró diferencias significativas menores ($p < 0.05$) con el tratamiento de mayor concentración de nitritos ambiental (5.30 mg/L de N-NO_2^-), pero no con los otros dos tratamientos de nitrito ambiental. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de lactato en la hemolinfa del tratamiento de 5.30 mg/L de N-NO_2^- ambiental con los otros 3 tratamientos (0, 1.06 y 2.65 mg/L de N-NO_2^- ambiental) a las 48 h de exposición.

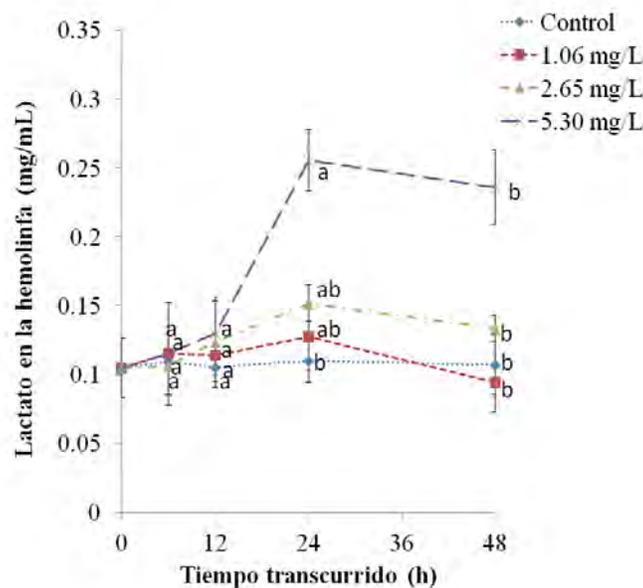


Figura 10. Niveles de lactato (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO_2^- (mg/L) durante 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

Los niveles de lactato en la hemolinfa de camarones expuestos a diferentes concentraciones de nitratos oscilaron entre 0.096 a 0.138 mg/mL. Los tratamientos de 0, 90.00 y 225.02 mg/L de N-NO_3^- mantuvieron sus niveles de lactato similares durante las 48 h de exposición; sin embargo, los niveles de lactato en el tratamiento de 400.05 mg/L a las 6, 12, 24 y 48 h fueron de 0.101 ± 0.014 , 0.106 ± 0.019 , 0.138 ± 0.030 y 0.153 ± 0.035 mg/mL, respectivamente. No fueron evidenciadas diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los niveles de lactato de la hemolinfa con los tratamientos de nitrato ambiental a las 6, 12 y 24 h de exposición; no obstante, sí se observaron diferencias ($p < 0.05$) a las 48 h entre el tratamiento de mayor concentración de nitrato ambiental (400.05 mg/L de N-NO_3^-) con los otros 3 tratamientos (0, 90, 225.02 mg/L de N-NO_3^- ambiental) (Figura 11).

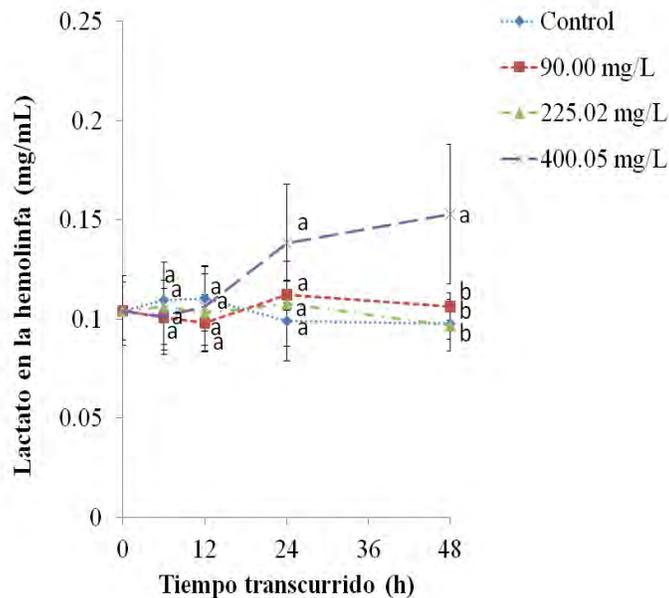


Figura 11. Niveles de lactato (mg/mL) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO_3^- (mg/L) durante un periodo de 48 h. Letras diferentes para el mismo tiempo de exposición (h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones.

7.7.4. Concentraciones de iones en la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* expuestos por separado a amonio, nitritos y nitratos

En la prueba subletal de amonio, las concentraciones de magnesio (Mg) en los tratamientos de 0 y 14.50 mg/L de NAT ambiental oscilaron entre 29.892 y 31.410 y entre 27.980 y 29.919 mmol/L de Mg, respectivamente; para el ion calcio (Ca) fueron de 14.152 a 15.618 y 13.160 a 14.896 mmol/L de Ca para las concentraciones de 0 y 14.50 mg/L de NAT ambiental, respectivamente. En cuanto a los niveles de potasio (K) y sodio (Na), fluctuaron entre 6.78 a 7.50 y 6.68 a 7.45, y 341.32 a 349.75 y 297.92 a 346.35 mmol/L para la concentración de 0 y 14.50 mmol/L de N-NAT ambiental, respectivamente (Figura 12). Los niveles de iones Mg, Ca, K y Na en la hemolinfa de organismos expuestos al tratamiento control (0 mg/L de N-NO_2^-) fueron 28.03 a 29.04, 14.15 a 15.62, 7.45 a 7.80 y 288.35 a 309.25 mmol/L, respectivamente; y para los expuestos a la concentración de 5.30 mmol/L de N-NO_2^- ambiental fueron de 27.55 a 28.19, 13.82 a 15.21, 6.32 a 7.66 y 262.47 a 298.70 mmol/L, en ese orden (Figura 13). En la Figura 14 se muestra el comportamiento de los niveles de iones en la hemolinfa expuestos a diferentes concentraciones de nitratos;

la oscilación de Mg, Ca, K y Na durante las 48 h de exposición fue de 21.20 a 23.60, 0.53 a 1.50, 7.58 a 8.10 y 272.47 a 305.10 mmol/L de N-NO_3^- , respectivamente.

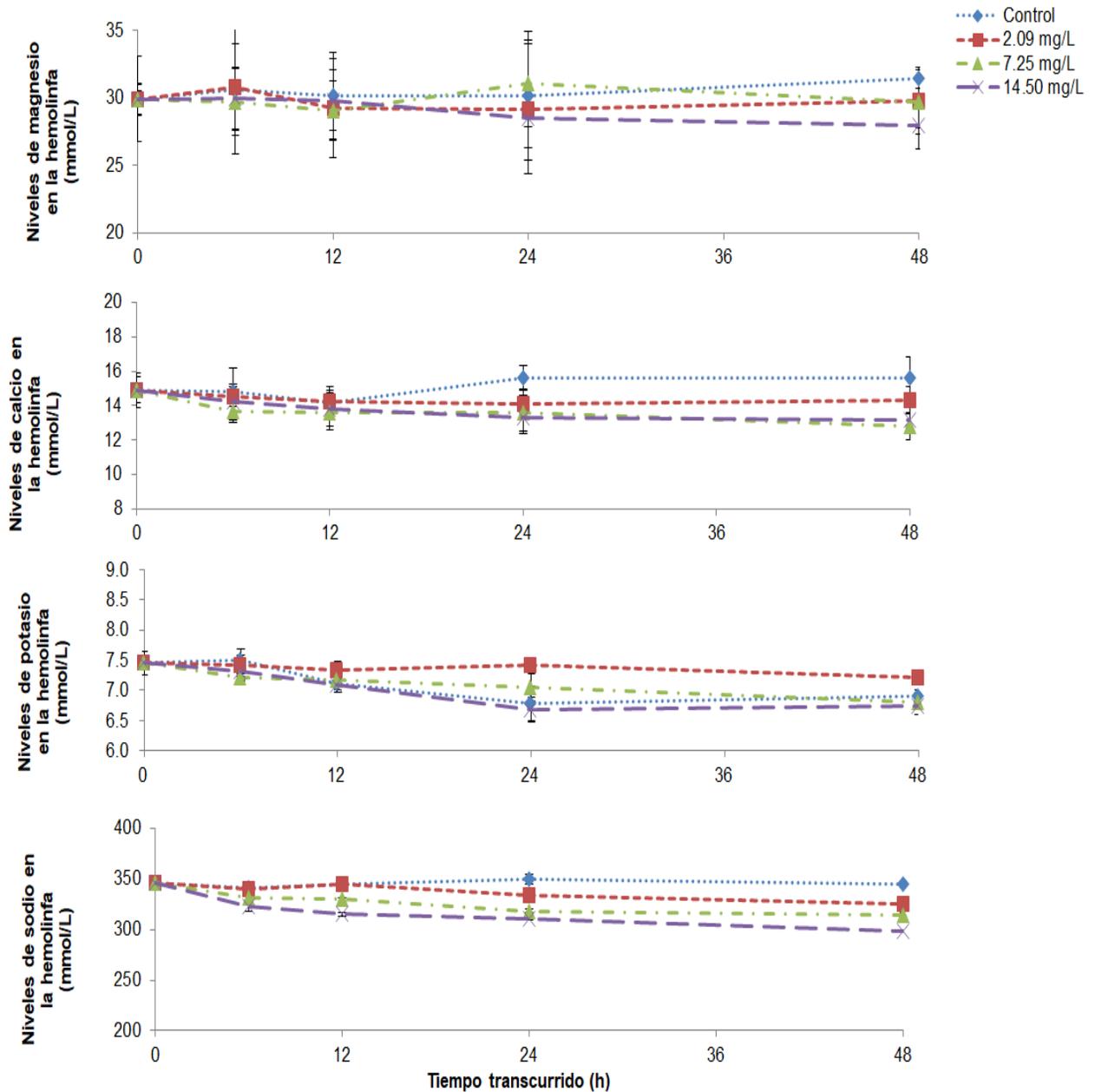


Figura 12. Concentraciones de magnesio, calcio, potasio y sodio (mmol/L) en la hemolinfa de camarones *L. vannamei* expuestos por 48 h a concentraciones subletales de NAT.

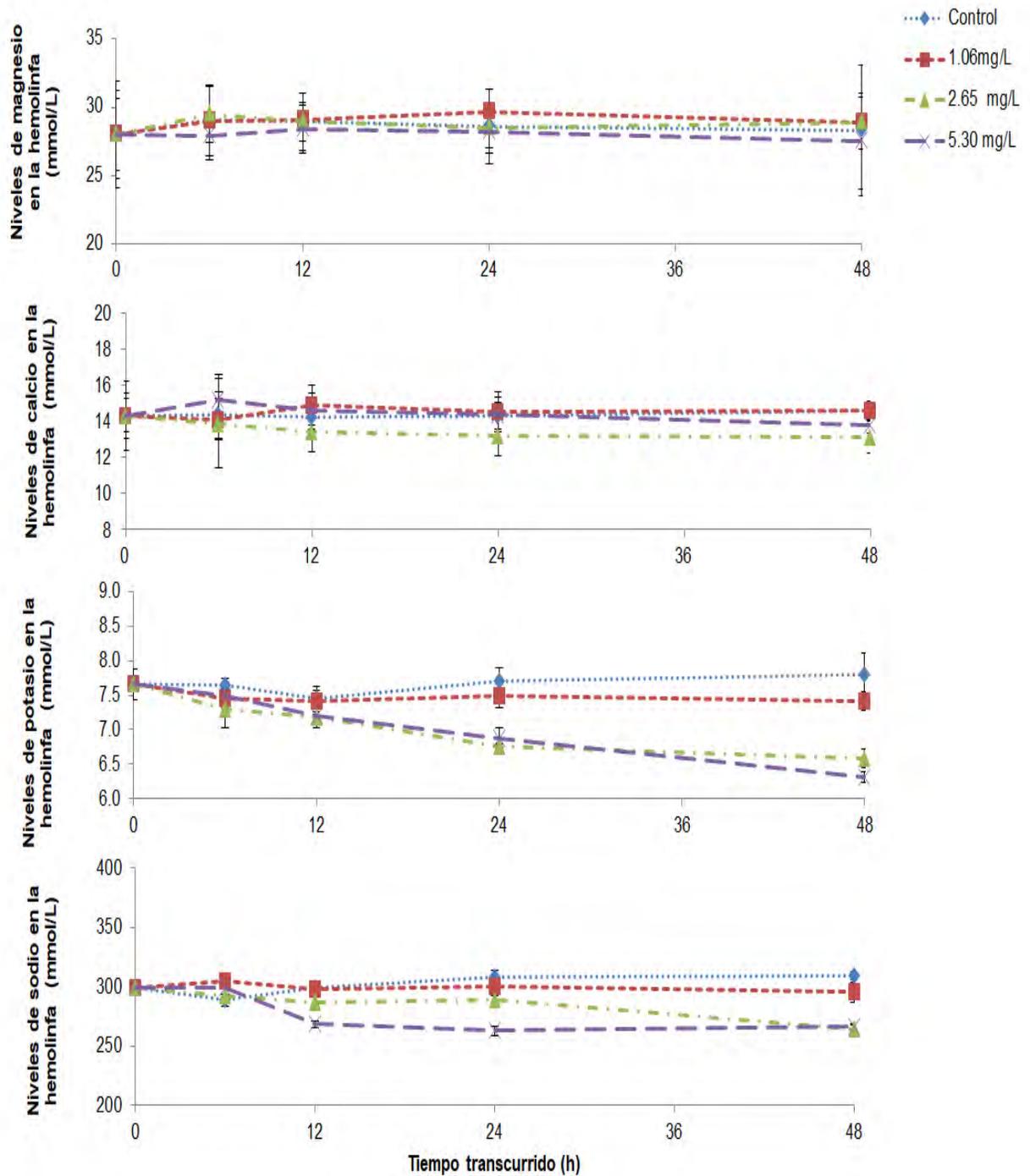


Figura 13. Concentraciones de magnesio, calcio, potasio y sodio (mmol/L) en la hemolinfa de camarones *L. vannamei* expuestos por 48 h a concentraciones subletales de $N-NO_2^-$.

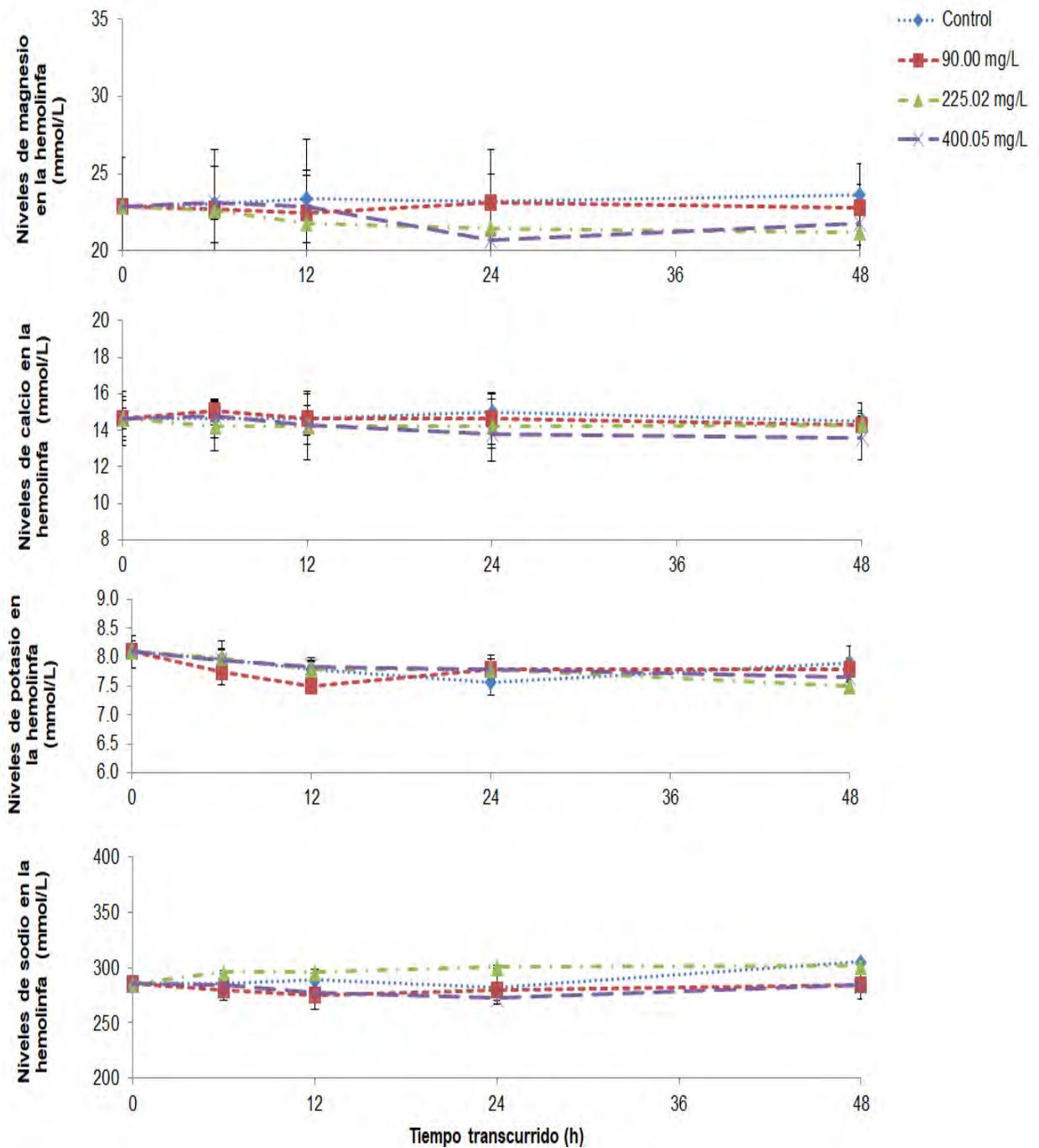


Figura 14. Concentraciones de magnesio, calcio, potasio y sodio (mmol/L) en la hemolinfa de camarones *L. vannamei* expuestos por 48 h a concentraciones subletales de N-NO_3^- .

7.8. Toxicidad subcrónica en el mediano plazo (28 días)

7.8.1. Tasa de supervivencia de juveniles de *L. vannamei* expuestos a amonio y nitritos solos y en combinación

Las concentraciones del tóxico utilizado en las pruebas subcrónicas a la salinidad de 3 y 25 g/L variaron dependiendo del valor de la CL_{50} a las 96 h de NAT y $N-NO_2^-$ para juveniles de *L. vannamei* a una salinidad de 3 g/L; se utilizaron el 0, 5 y 10 % del valor de la CL_{50} , siendo su equivalente en concentraciones en mg/L de 0, 1.15 y 2.90 de NAT y 0, 0.53 y 1.06 de $N-NO_2^-$.

En la prueba de toxicidad subcrónica de amonio, la tasa de supervivencia en el tratamiento control registró el 100 % de supervivencia durante las 4 semanas de prueba en las salinidades de 3, y en todas las concentraciones de NAT a la salinidad de 25 g/L. En la concentración de 1.15 y 2.90 mg/L de NAT a la salinidad de 3 g/L, los % de supervivencia en la semana 2, 3 y 4 fueron de 100 ± 0 , 96.7 ± 2.9 y 91.7 ± 2.9 % y 96.7 ± 2.9 , 93.3 ± 2.9 y 88.3 ± 2.9 %, respectivamente (Figura 15).

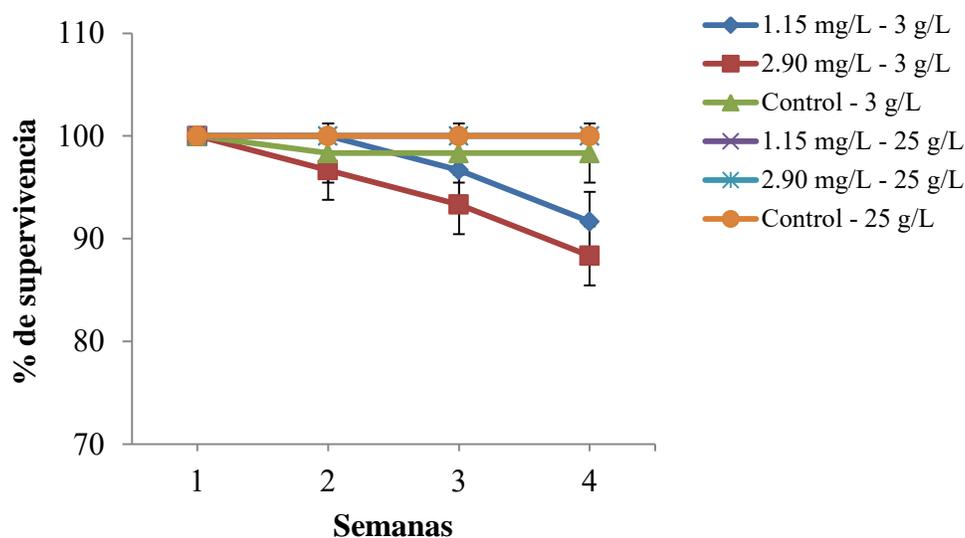


Figura 15. Porcentaje de supervivencia (%) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de NAT (mg/L) durante 28 días.

El % de supervivencia de los organismos expuestos a todas las concentraciones de nitritos en la salinidad de 25 g/L, registró el 100 % durante los 28 días de prueba; similarmente ocurrió para el control (0 mg/L de $N-NO_2^-$ ambiental) a la salinidad de 3 g/L.

En la concentración de 0.53 mg/L de N-NO_2^- a la salinidad de 3 g/L, el porcentaje de supervivencia al final de la cuarta semana fue de 96.7 ± 2.9 ; y en los % de supervivencia a la 2, 3 y 4 semana en la concentración de 1.06 mg/L de N-NO_2^- fue de 98.3 ± 2.9 , 90.0 ± 5.0 y 83.3 ± 2.9 %, respectivamente (Figura 16).

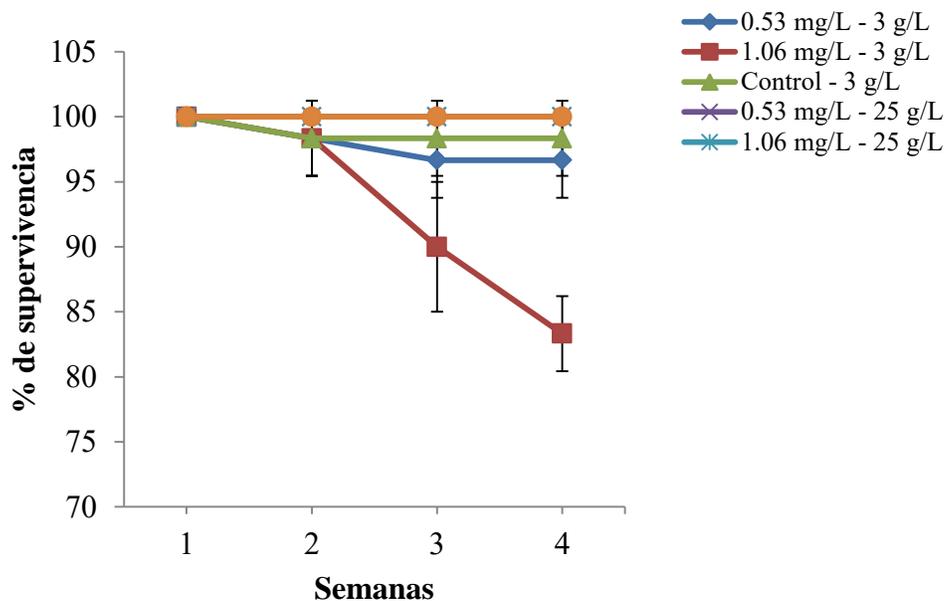


Figura 16. Porcentaje de supervivencia (%) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de N-NO_2^- (mg/L) durante 28 días.

Los porcentajes de supervivencia de los organismos expuestos a la mezcla de NAT y N-NO_2^- a la salinidad de 25 g/L fue del 100 % durante el desarrollo de toda la prueba, similarmente ocurrió para el control a la salinidad de 3 g/L. Durante la 2, 3 y 4 semana de exposición a la mezcla en la salinidad de 3 g/L, las supervivencias en la concentraciones del 5 % del valor de la CL_{50} a las 96 h fueron de 96.7 ± 2.9 , 93.3 ± 2.9 y 83.3 ± 2.9 %, respectivamente; y para la concentración del 10 % fueron de 96.7 ± 2.9 , 91.7 ± 2.9 y 45.0 ± 2.9 %, respectivamente (Figura 17).

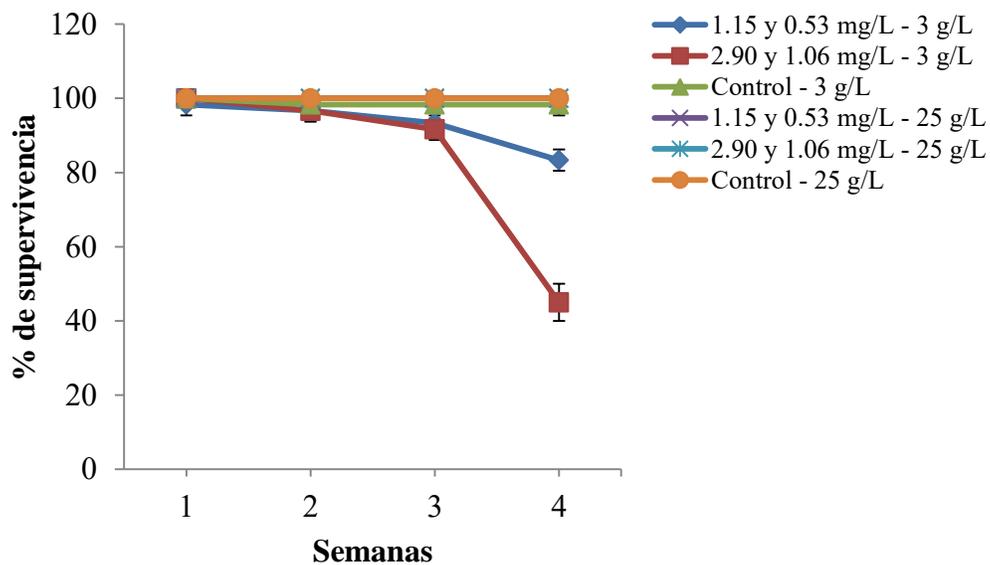


Figura 17. Porcentaje de supervivencia (%) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones combinadas de NAT y N-NO_2^- (mg/L) durante un periodo de 28 días.

7.8.2. Tasa de crecimiento

El peso promedio inicial de los juveniles de *L. vannamei* en las pruebas subcrónicas de amonio y nitritos solos y en combinación a una salinidad de 3 g/L fue de 3.53 ± 0.65 g. En la Tabla 37 se encuentran los pesos promedios de cada uno de los tratamientos de concentración de los tóxicos durante las 4 semanas de exposición a los tóxicos en la salinidad de 3 g/L. El peso promedio mayor fue registrado en el tratamiento control durante las 4 semanas de exposición y el menor en el tratamiento de la combinación de amonio y nitritos del 10 % del valor de la CL_{50} individual; sin embargo, solo en la tercera semana se mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos dos tratamientos, pero no hubo diferencias significativas de estos dos tratamientos con el resto (Tabla 37).

La Tabla 38 muestra las tasas de crecimiento (g/sem) de cada uno de los tratamientos con las diferentes concentraciones solas y en combinación de NAT y N-NO_2^- y los tratamientos control (0 %). La mayor tasa de crecimiento en la salinidad de 3 g/L fue para el control con un valor de 0.61 ± 0.02 g/sem, después le siguen los tratamientos del 5 % de NAT y N-NO_2^- de con 0.54 ± 0.06 y 0.50 ± 0.05 g/sem, respectivamente. El valor menor de tasa de crecimiento fue registrado en el tratamiento del 10 % de NAT/ N-NO_2^- con

0.36±0.14 mg/sem; sin embargo, en ninguno de los tratamientos se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 37. Peso promedio y desviación estándar (g) de juveniles de *L. vannamei* expuestos durante 4 semanas a concentraciones subcrónicas por separado y en combinación de NAT y N-NO_2^- a una salinidad de 3 g/L. Letras diferentes en la misma semana de exposición indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

Tratamiento	Semana				
	0	1	2	3	4
5 % NAT	3.53±0.65a	4.11±0.10a	4.93±0.07a	5.28±0.20ab	5.69±0.25a
10 % NAT	3.53±0.65a	3.88±0.49a	4.44±0.33a	5.03±0.32ab	5.37±0.84a
5 % NAT/ N-NO_2^-	3.53±0.65a	4.03±0.15a	4.39±0.28a	4.97±0.35ab	5.48±0.10a
10 % NAT/ N-NO_2^-	3.53±0.65a	3.98±0.07a	4.33±0.67a	4.6±0.38b	4.98±0.58a
5 % N-NO_2^-	3.53±0.65a	3.97±0.18a	4.68±0.44a	5.02±0.17ab	5.53±0.19a
10 % N-NO_2^-	3.53±0.65a	3.84±0.48a	4.42±0.44a	4.91±0.13ab	5.16±0.37a
Control	3.53±0.65a	4.12±0.11a	5.11±0.10a	5.47±0.20a	5.98±0.10a

Tabla 38. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de *L. vannamei* durante la exposición subletal de NAT y N-NO_2^- solos y en combinación a una salinidad de 3 g/L. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

Tratamiento	GR (g/sem)
5 % NAT	0.54±0.06a
10 % NAT	0.46±0.21a
5 % NAT/ N-NO_2^-	0.49±0.03a
10 % NAT/ N-NO_2^-	0.36±0.14a
5 % N-NO_2^-	0.50±0.05a
10 % N-NO_2^-	0.41±0.09a
Control	0.61±0.02a

Las concentraciones para las pruebas subcrónica de amonio y nitritos solos y combinados a una salinidad de 25 g/L fueron las mismas que en la prueba a una salinidad de 3 g/L. El peso inicial de los organismos fue de 3.74±0.69 g; en la Tabla 39 se muestran los pesos promedios por semana de cada uno de los tratamientos y el control; estadísticamente no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos en ninguna semana de exposición.

Tabla 39. Peso promedio y desviación estándar (g) de juveniles de *L. vannamei* expuestos durante 28 días a concentraciones subcrónica por separado y en combinación de NAT y N-NO₂⁻ a una salinidad de 25 g/L. Letras diferentes en la misma semana de exposición indican diferencias significativas (p <0.05) entre los tratamientos.

Tratamiento	Semana				
	0	1	2	3	4
5 % NAT	3.74±0.69a	4.49±0.24a	5.34±0.13a	6.21±0.35a	7.18±0.27a
10 % NAT	3.74±0.69a	4.48±0.17a	5.47±0.25a	6.39±0.23a	7.27±0.06a
5 % NAT/N-NO ₂ ⁻	3.74±0.69a	4.53±0.43a	5.37±0.40a	6.40±0.56a	7.14±0.18a
10 % NAT/N-NO ₂ ⁻	3.74±0.69a	4.42±0.55a	5.48±0.53a	6.41±0.45a	7.21 ±0.11a
5 % N-NO ₂ ⁻	3.74±0.69a	4.43±0.89a	5.44±0.37a	6.37±0.03a	7.16±0.19a
10 % N-NO ₂ ⁻	3.74±0.69a	4.49±0.24a	5.27±0.32a	6.44±0.19a	7.33±0.18a
Control	3.74±0.69a	4.54±0.05a	5.48±0.05a	6.38±0.12a	7.46±0.15a

En cuanto a la tasa de crecimiento, los valores de mayor a menor fueron registrados en el control (0 %), 10 % de N-NO₂⁻, 10 % de NAT, 10 % de NAT/N-NO₂⁻, 5 % de N-NO₂⁻ y 5 % de NAT/N-NO₂⁻ con valores de 1.69±0.04, 1.66±0.04, 1.65±0.01, 1.63±0.03, 1.62±0.05, 1.62±0.07 y 1.61±0.04 mg/sem, respectivamente (Tabla 40).

Tabla 40. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de *L. vannamei* durante la exposición subcrónica de NAT y N-NO₂⁻ solos y en combinación a una salinidad de 25 g/L. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas (p <0.05) entre los tratamientos.

Tratamiento	GR (g/sem)
5 % NAT	1.62±0.07a
10 % NAT	1.65±0.01a
5 % NAT/N-NO ₂ ⁻	1.61±0.04a
10 % NAT/N-NO ₂ ⁻	1.63±0.03a
5 % N-NO ₂ ⁻	1.62±0.05a
10 % N-NO ₂ ⁻	1.66±0.04a
Control	1.69±0.04a

Para conocer si existen efectos sobre la tasa de crecimiento de las concentraciones subcrónicas en dos diferentes escenarios de salinidades, se procedió a realizar una comparación estadística entre los diferentes tratamientos con el mismo tóxico y las salinidades de 3 y 25 g/L (Figura 18, 19 y 20). En la prueba de exposición de NAT no se

encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la tasa de crecimiento de las diferentes concentraciones de NAT para una misma salinidad (3 y 25 g/L); sin embargo, sí hay diferencias significativas ($p < 0.05$) en la tasa de crecimiento de una misma concentración del tóxico (%) pero en diferentes salinidades (3 y 25 g/L) (Figura 18). En la exposición de N-NO₂, la GR de la salinidad a 3 g/L mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la concentración de 1.06 mg/L con el control (0 mg/L), pero no con 0.53 mg/L de N-NO₂⁻; sin embargo, en la salinidad de 25 g/L, las GR no fueron diferentes entre las distintas concentraciones del tóxico. Si hay diferencias significativas ($p < 0.05$) en la tasa de crecimiento de una misma concentración del tóxico (%) pero en diferentes salinidades (3 y 25 g/L) (Figura 19). En la prueba combinada (NAT/N-NO₂⁻) a la salinidad de 3 g/L fueron observadas diferencias significativas ($p < 0.05$) de las GR entre los tratamientos de los tóxicos, en las cuales la GR del control fue mayor a la mezcla del 10 %, pero no con la mezcla del 5 %. En la salinidad de 25 g/L no se evidenciaron diferencias significativas de la GR de los % de las mezclas. Diferencias significativas fueron encontradas al comparar el mismo % de mezcla entre distintas salinidades ($p < 0.05$) (Figura 20).

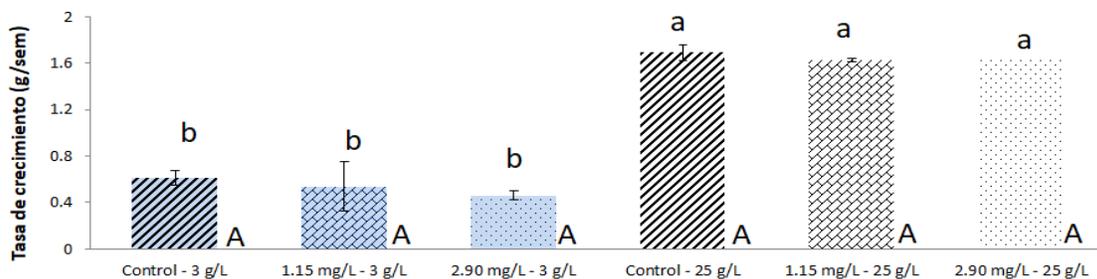


Figura 18. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de *L. vannamei* durante la exposición subcrónica de NAT en salinidades de 3 y 25 g/L. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma salinidad. Letras minúsculas diferentes entre mismas concentraciones del tóxico significan diferencias significativas entre las dos diferentes salinidades.

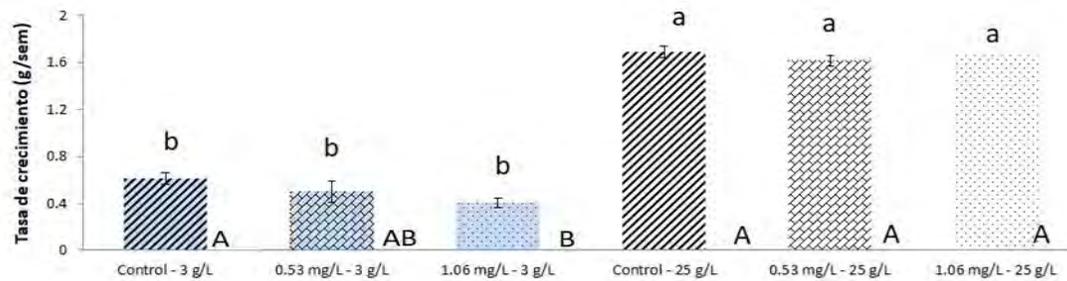


Figura 19. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de *L. vannamei* durante la exposición subcrónica de N-NO_2^- en salinidades de 3 y 25 g/L. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma salinidad. Letras minúsculas diferentes entre mismas concentraciones del tóxico significan diferencias significativas entre las dos diferentes salinidades.

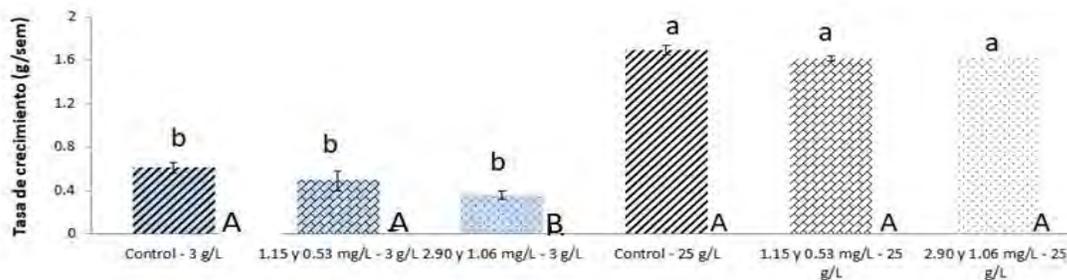


Figura 20. Tasa de crecimiento (GR) y desviación estándar (g/semana) de juveniles de *L. vannamei* durante la exposición subcrónica NAT y N-NO_2^- combinados en salinidades de 3 y 25 g/L. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma salinidad. Letras minúsculas diferentes entre mismas concentraciones del tóxico significan diferencias significativas entre las dos diferentes salinidades.

7.9. Consumo de alimento

En las pruebas de toxicidad aguda de amonio, nitritos y nitratos solos y combinados tanto en postlarvas como en juveniles de *L. vannamei*, se observó que los organismos disminuyeron el consumo de alimento conforme pasaron las horas de exposición a los tóxicos. Sin embargo, dado que se utilizó en cada una de las pruebas un intervalo de 9 concentraciones, en las Tablas 41 y 42 se resumen las observaciones del consumo de alimento en porcentaje total por el tiempo de exposición de 96 h en las dosis inferiores a las CL_{50} y las UT_{50} calculadas para los tóxicos solos y combinados, respectivamente.

Tabla 41. Consumo de alimento (%) de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a concentraciones inferiores a la CL₅₀-96 h y UT₅₀-96 h de NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ (mg/L) solos y combinados, respectivamente, a 1 y 3 g/L de salinidad.

Tóxicos	Salinidad (g/L)	CL ₅₀	Concentraciones (mg/L)	% de consumo de alimento**
NAT	1	10.8	10	87.5±0
			5	100±0
	3	16.3	10	94.2±5.5
N-NO ₂ ⁻	1	3.3	2.5	37.5± 0
	3	4.9	2.5	87.5± 0
N-NO ₃ ⁻	1	112.8	100	66.2± 5.5
			50	77.9± 5.8
	3	430.0	400	73.3 ±4.7
			200	83.3± 7.2
NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻	1	0.44*	0.25*	87.1±1.4
NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻	3	0.68*	0.5*	89.2 ±1.4
			0.25*	99.2 ±2.9
NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻	25	1.12*	1*	100±0
			0.75*	100±0
			0.5*	100±0
			0.25*	100±0
NAT/N-NO ₂ ⁻	3	0.66*	0.5*	90.8 ±2.9
			0.25*	100±0
NAT/N-NO ₃ ⁻	3	0.64*	0.5*	97.5 ±0
			0.25*	100±0
N-NO ₂ /N-NO ₃ ⁻	3	0.78*	0.75*	42.1± 2.8
			0.5*	80.4 ±2.8
			0.25*	89.6± 3.8

*Corresponde a las UT; ** % de consumo de alimento con respecto al control

En el caso de las postlarvas, el menor consumo de alimento ocurrió en los organismos expuestos a concentraciones individuales de N-NO₂⁻ en la salinidad de 1 g/L, registrando un consumo de alimento de 37.5±0 % durante las 96 h en la concentración de 2.5 mg/L con respecto al control (0 mg/L). En el caso de las pruebas de toxicidad aguda de N-NO₃⁻ en postlarvas, el consumo de alimento en las salinidades de 1 y 3 g/L durante las 96 h de exposición en las concentraciones de 100 y 50 mg/L de N-NO₃⁻ y 400 y 200 mg/L de N-NO₃⁻, fueron de 66.2±5.5 % y 77.9±5.8 % y 73.3 % y 83.3 %, respectivamente. Para las mezclas de los compuestos nitrogenados en postlarvas, la UT de 0.75 de la mezcla de N-NO₂/N-NO₃⁻ a la salinidad de 3 g/L registró un % de consumo de alimento de 42.1±2.8 durante las 96 h de exposición, siendo este porcentaje el más bajo de todas las pruebas de

toxicidad de mezclas en postlarvas. En el caso de la mezcla de $\text{NAT}/\text{N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ en la salinidad de 25 g/L, no se identificó un efecto en el consumo de alimento, los organismos expuestos a las diferentes UT inferiores a la UT_{50} estuvieron alimentándose durante las 96 h de exposición a la mezcla de los tres tóxicos (Tabla 41).

En las pruebas de toxicidad aguda con juveniles de *L. vannamei*, los porcentajes de consumo de alimento en los expuestos a amonio fueron de $75.0 \pm 3.7\%$ y $87.5 \pm 2.8\%$ en las concentraciones de 20 y 10 mg/L de NAT, respectivamente. El % más bajo de consumo de alimento ocurrió en los organismos expuestos a 10 mg/L de N-NO_2^- con el $33.8 \pm 5\%$ durante las 96 h. Para la mezcla de $\text{NAT}/\text{N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ a la salinidad de 3 g/L, el consumo de alimento para las UT de 1, 0.75 y 0.5 fueron de $17.5 \pm 0\%$, $38.8 \pm 5\%$ y $75.4 \pm 1.4\%$, respectivamente. No fue observada una reducción en el % de consumo de alimento en los organismos expuestos a la mezcla de los tres compuestos nitrogenados a la salinidad de 25 g/L (Tabla 42).

Tabla 42. Consumo de alimento (%) de juveniles de *L. vannamei* expuestos a concentraciones inferiores a la $\text{CL}_{50-96\text{ h}}$ y $\text{UT}_{50-96\text{ h}}$ de NAT, N-NO_2^- y N-NO_3^- (mg/L) solos y combinados a 1 y 3 g/L de salinidad.

Tóxicos	Salinidad (g/L)	CL_{50}	Concentraciones (mg/L)	% de consumo de alimento**
NAT	3	29.0	20	75.0 ± 3.7
			10	87.5 ± 2.8
N-NO_2^-	3	10.60	10	33.8 ± 0
			7.5	70.8 ± 2.8
			5	82.9 ± 1.4
N-NO_3^-	3	900.09	800	57.5 ± 1.7
			400	88.3 ± 1.4
$\text{NAT}/\text{N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$	3	0.99*	1*	17.5 ± 0
			0.75*	38.8 ± 5
			0.5*	75.4 ± 1.4
$\text{NAT}/\text{N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$	25	1.31*	1*	100 ± 0
			0.75*	100 ± 0
			0.5*	100 ± 0

*Corresponde a las UT

**Corresponde al % de consumo de alimento con respecto al control

7.10. Niveles de seguridad

Sprague (1971), define el nivel de seguridad como la concentración de un contaminante que a largo plazo no tiene un efecto adverso en un organismo o una población (respiración, crecimiento, reproducción, consumo de alimento); este valor puede ser obtenido a partir del valor de la CL_{50-96} h multiplicándolo por un factor de aplicación de 0.1. No se dispone de información detallada para elegir un factor más específico, por ejemplo de 0.06, 0.07, 0.04, etc.; sin embargo, los resultados observados si permiten elegir el factor de 0.05 y no el factor de 0.10. En el presente estudio, los niveles de seguridad fueron estimados con el factor de 0.05, este factor fue considerado a partir del análisis de resultados obtenidos de las pruebas subletales (48 h) y subcrónica (28 días), así también fueron tomados en cuenta los porcentajes y comportamientos de mortalidad en la pruebas letales agudas (96 h) (Figura 21). El comportamiento de los componentes sanguíneos (oxihemocianina glucosa y lactato), así como los datos de tasas de crecimiento y supervivencia fueron importantes para determinar el factor de 0.05.

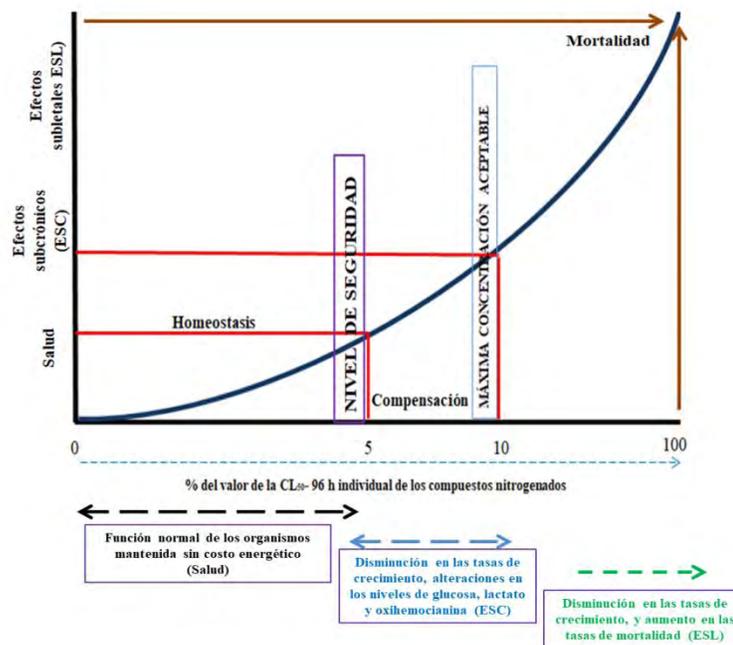


Figura 21. Propuesta estratégica para determinar el factor de aplicación para establecer los niveles de seguridad de compuestos nitrogenados para el camarón *L. vannamei* basado en los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de toxicidad (adaptado de Abel (1989) y después por Abel y Axiak (1991)).

En la Tabla 31 se muestran los niveles de seguridad de amonio, nitritos y nitratos solos y en combinación para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en salinidades de 1 y 3 g/L.

Tabla 43. Niveles de seguridad e intervalos de confianza propuestos para el cultivo de camarón blanco *L. vannamei* en aguas de baja salinidad del presente estudio.

Edad	Tóxico	Salinidad (g/L)	Nivel de seguridad (mg/L)
PL20	NAT	1	0.54 (0.495-0.590)
PL20	NAT	3	0.82 (0.76-0.87)
PL20	N-NH ₃	1	0.050 (0.045-0.055)
PL20	N-NH ₃	3	0.055 (0.070-0.075)
PL20	N-NO ₂ ⁻	1	0.170 (0.145-0.185)
PL20	N-NO ₂ ⁻	3	0.190 (0.215-0.275)
PL20	N-NO ₃ ⁻	1	5.64 (4.92-6.45)
PL20	N-NO ₃ ⁻	3	21.50 (19.53-23.67)
PL20	NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻	1	0.022 (0.020-0.025)* ^a
PL20	NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻	3	0.034 (0.031-0.038)* ^b
PL20	NAT/N-NO ₂ ⁻	3	0.033 (0.030-0.037)* ^c
PL20	NAT/N-NO ₃ ⁻	3	0.032 (0.029-0.036)* ^d
PL20	N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻	3	0.039 (0.035-0.040)* ^e
Juveniles (3.3 g)	NAT	3	1.45 (1.28-1.64)
Juveniles (3.3 g)	N-NH ₃	3	0.13 (0.11-0.14)
Juveniles (3.3 g)	N-NO ₂ ⁻	3	0.53 (0.57-0.48)
Juveniles (3.3 g)	N-NO ₃ ⁻	3	45.00 (40.90-49.72)
Juveniles (3.3 g)	NAT/N-NO ₂ ⁻ /N-NO ₃ ⁻	3	0.050 (0.045-0.055)* ^f

* Corresponde a las UT; ^a 0.79, 0.02 y 0.83 mg/L de NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻, respectivamente; ^b 0.18, 0.05 y 4.87 mg/L de NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻, respectivamente; ^c 0.27 y 0.08 mg/L de NAT y N-NO₂⁻, respectivamente; ^d 0.26, 6.9 mg/L de NAT y N-NO₃⁻, respectivamente; ^e 0.09 y 8.4 mg/L de N-NO₂ y N-NO₃⁻, respectivamente; ^f 0.48, 0.08 y 14.58 mg/L de NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻.

8.0. DISCUSIÓN

8.1. Toxicidad aguda de amonio

En ambientes acuáticos, el NAT existe en dos formas químicas como NH_4^+ y NH_3 , siendo esta última más tóxica debido a que puede difundirse más fácilmente a través de las bicapas lipídicas hacia la hemolinfa (Weihrauch *et al.*, 2004). Las proporciones del NH_4^+ a NH_3 depende de la salinidad, la temperatura, y, en mayor medida, del pH, y cada una de estas variables influye en la toxicidad del amonio de diferentes maneras (Lin y Chen, 2001). Aunque pocos estudios han investigado la influencia de pH en la toxicidad del amonio en los crustáceos, los resultados han mostrado que un pH más alto aumenta la toxicidad del amonio, probablemente esto se deba a que aumenta la proporción de la forma NH_3 es más concentrada (Armstrong *et al.*, 1978). Sin embargo, a pesar de que la salinidad y la temperatura tienen un efecto mucho menor en la relación $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, también influyen en la toxicidad del amonio.

La toxicidad del amonio para los crustáceos ha sido estudiada por varios autores (Chin y Chen, 1987; Chen *et al.*, 1989; Ostrensky y Wasielesky, 1995; Alcaraz *et al.*, 1999b; Frías-Espericueta *et al.*, 2000). En la Tabla 44 y 45 se encuentran valores de CL_{50} de NAT (mg/L) en diferentes especies de postlarvas y juveniles de camarones peneidos, respectivamente. Es importante mencionar que la toxicidad aguda del amonio y los nitritos se ha estudiado en varias especies de postlarvas de camarones peneidos en aguas marinas y salobres; sin embargo, no existe información disponible en aguas de baja salinidad (Tabla 44). Una discusión más amplia sobre la toxicidad aguda de amonio, nitritos y nitratos en postlarvas de *L. vannamei* puede encontrarse en el trabajo de Valencia-Castañeda *et al.* 2018 (Anexo 3).

Tabla 44. Valores de CL₅₀ de NAT (mg/L) en diferentes especies de postlarvas de camarones peneidos

Especies	Talla	Salinidad (g/L)	CL ₅₀				Referencias
			24 h	48 h	72 h	96 h	
<i>P. monodon</i>	PL6	34	52.1	27.7	17.0	11.5	Chin y Chen (1987)
<i>P. japonicus</i>	PL2	33	31.7	---	---	---	Chen <i>et al.</i> (1989)
<i>P. japonicus</i>	PL12	33	53.4	---	---	---	Chen <i>et al.</i> (1989)
<i>Metapenaeus ensis</i>	PL1	33	30.3	16.7	---	---	Chen <i>et al.</i> (1991)
<i>M. ensis</i>	PL10	33	24.4	---	---	---	Chen <i>et al.</i> (1991)
<i>P. japonicus</i>	PL1	36	32.5	22.8	17.4	15.5	Lin <i>et al.</i> (1993)
<i>Penaeus paulensis</i>	PL1	28	24.2	8.6	5.6	5.5	Ostrensky y Wasielesky (1995)
<i>P. setiferus</i>	PL25	25	11.5	9.4	8.7	---	Alcaraz <i>et al.</i> (1999b)
<i>L. vannamei</i>	PL12	35	17.9	12.5	12.2	12.2	Frías-Espericueta <i>et al.</i> (2000)
<i>Penaeus semisulcatus</i>	27.5 mg	15	14.8	11.2	7.9	7.1	Kir y Kumlu (2006)
<i>P. semisulcatus</i>	27.5 mg	20	27.1	12.3	8.5	7.11	Kir y Kumlu (2006)
<i>P. semisulcatus</i>	27.5 mg	35	58.9	23.3	20.5	18.7	Kir y Kumlu (2006)
<i>P. semisulcatus</i>	27.5 mg	40	66.7	32.5	23.2	19.1	Kir y Kumlu (2006)
<i>L. vannamei</i>	PL1	34	13.2	---	---	---	Cobo <i>et al.</i> (2014)
<i>L. vannamei</i>	PL25	10	---	39.7	---	---	Schuler <i>et al.</i> (2010)
<i>L. vannamei</i>	PL20	1	38.9	14.0	11.8	10.8	Este estudio
<i>L. vannamei</i>	PL20	3	48.4	22.5	18.1	16.3	Este estudio

--- No disponible

En la Tabla 45 se muestran valores de CL₅₀ de NAT (mg/L) a diferentes horas de exposición para diferentes especies de juveniles de camarones peneidos, las cuales fueron expuestas a diferentes ambientes de salinidad. Se aprecia claramente que en cuanto a trabajos de toxicidad de amonio en aguas de baja salinidad con juveniles de *L. vannamei* no existe información. Se ha observado que existe una relación inversa entre la salinidad y la toxicidad de amonio en *P. penicillatus* (Chen y Lin 1991), *P. chinensis* (Chen y Lin, 1992b), *L. vannamei* (Lin y Chen, 2001; Li *et al.*, 2007), *Penaeus semisulcatus* (Kir y Kumlu, 2006) y *L. schmitti* (Barbieri, 2010).

Tabla 45. Valores de CL₅₀ de NAT (mg/L) en diferentes especies de juveniles de camarones peneidos

Especie	Talla (g)	Salinidad (g/L)	CL ₅₀				Referencia
			24 h	48 h	72 h	96 h	
<i>Penaeus chinensis</i>	0.36	33	79.9	51.1	37.0	35.1	Chen <i>et al.</i> (1990a)
<i>Metapenaeus macleayi</i>	2.0	34.5	---	---	---	26.3	Allan <i>et al.</i> (1990)
<i>P. monodon</i>	2.2	34.5	---	---	---	37.4	Allan <i>et al.</i> (1990)
<i>P. monodon</i>	4.87	20	97.7	88.0	53.4	42.6	Chen <i>et al.</i> (1990b)
<i>M. ensis</i>	0.10	25				35.4	Nan y Chen (1991)
<i>P. penicillatus</i>	0.4-0.7	34	59.5	38.7	29.7	---	Chen y Lin (1991)
<i>P. chinensis</i>	0.76	10	44.0	34.8	---	28.2	Chen y Lin (1992b)
<i>P. chinensis</i>	0.76	20	52.2	42.7	---	38.9	Chen y Lin (1992b)
<i>P. chinensis</i>	0.76	30	66.7	54.0	---	39.9	Chen y Lin (1992b)
<i>P. paulensis</i>	5.4	28	51.8	---	---	38.7	Ostrensky y Wasielesky (1995)
<i>P. paulensis</i>	31.43	28	64.6	---	---	42.5	Ostrensky y Wasielesky (1995)
<i>L. vannamei</i>	3.8	35	---	111.2	84.5	70.2	Frías-Espéricueta <i>et al.</i> (1999)
<i>L. vannamei</i>	0.99	35	120.1	92.5	69.2	64.2	Frías-Espéricueta <i>et al.</i> (1999)
<i>L. vannamei</i>	22 mm	15	59.7	40.6	32.1	24.4	Lin y Chen (2001)
<i>L. vannamei</i>	22 mm	25	66.4	48.8	43.2	35.4	Lin y Chen (2001)
<i>L. vannamei</i>	22 mm	35	68.8	53.8	44.9	39.5	Lin y Chen (2001)
<i>P. semisulcatus</i>	1.6	39	92.2	76.6	64.1	55.8	Kir <i>et al.</i> (2004)
<i>L. schmitti</i>	1.50	5	40.7	32.6	24.6	19.1	Barbieri (2010)
<i>L. schmitti</i>	1.50	20	53.5	38.6	27.8	25.5	Barbieri (2010)
<i>L. schmitti</i>	1.50	35	54.3	47.9	41.7	38.9	Barbieri (2010)
<i>L. vannamei</i>	3.3	3	116.3	44.6	39.6	29.0	Este estudio

--- No disponible

Para el caso específico de *L. vannamei*, Lin y Chen (2001) expusieron a esta especie a diferentes concentraciones de amonio en salinidades de 15, 25 y 35 g/L, los valores de la CL₅₀ mostraron una mayor toxicidad del amonio cuando disminuye la salinidad del ambiente. El valor de la CL_{50-96 h} estimado en este trabajo para juveniles de *L. vannamei* fue menor (29.0 mg/L de NAT) al estimado por Frías-Espéricueta *et al.* (1999) con juveniles de una talla similar y una salinidad de 35 g/L (70.2 mg/L de NAT), indicando estos valores que la toxicidad del amonio en juveniles de *L. vannamei* aumenta en una

magnitud cercana al 40% en aguas de baja salinidad (3 g/L) (Tabla 45). Romano y Zeng (2010) encontraron una relación entre los niveles más altos de amonio en la hemolinfa de *Penaeus pelagicus* en salinidades más bajas en comparación con los de mayor salinidad, probablemente debido a la utilización de diferentes mecanismos de resistencia.

La toxicidad de amonio en juveniles de *L. schmitti* aumentó con el tiempo de exposición, además, la tolerancia disminuyó bruscamente en un 19.8, 39.5 y 53.0 % después de 48, 72 y 96 h comparado con la CL₅₀ a las 24 h a 5 g/L de salinidad (Barbieri, 2010). Lin y Chen (2003) reportaron que la tolerancia de juveniles de *L. vannamei* a amonio disminuyó marcadamente en 12.8, 23.28 y 28.42 % después de 48 y 96 h en comparación con la CL₅₀-24 h a 35 g/L de salinidad; después de 48 y 96 h se observó que la tolerancia disminuyó en un 56.7 y 74.0 % en comparación a la CL₅₀-24 h a 15 g/L de salinidad; la tolerancia al amonio disminuyó en un 52.9 y 64.7 % después de 48 y 96 h en comparación con a la CL₅₀-24 h a 35 g/L de salinidad. Comparando el aumento de la toxicidad del amonio a lo largo del tiempo entre estos dos estudios (Barbieri, 2010; Lin y Chen, 2003) fue más abrupto en *L. schmitti* en comparación con *L. vannamei*.

La toxicidad del amonio también puede depender de la etapa de desarrollo de los crustáceos, y aunque a veces hay una gran tolerancia entre estadios larvales, generalmente las postlarvas o juveniles tienen mayor tolerancia al amonio y muestran una correlación positiva con el tamaño (Ostrensky y Wasielesky, 1995; Romano y Zeng, 2007a). La CL₅₀ de 72 h en las larvas zoea I del cangrejo chino, *Eriocheir sinensis*, fue de 5.7 mg/L de NAT y aumentó sustancialmente a 45.3 mg/L en la etapa de juvenil (Zhao *et al.*, 1997). Un aumento de más del doble de la tolerancia al amonio en juveniles de primera etapa de *P. pelagicus* en comparación a cuando alcanzaron la séptima etapa de cangrejo juvenil (Romano y Zeng, 2007a). Neil *et al.* (2005) no encontró ninguna relación entre la toxicidad de amonio y las etapas larvales del cangrejo *Scylla serrata*, aunque la etapa de cangrejo tenía dos veces mayor tolerancia (Romano y Zeng, 2007b). A excepción, en juveniles de *M. ensis* se observó una tolerancia menor al amonio que en las etapas larvales menos desarrolladas (Chen y Nan, 1991; Nan y Chen, 1991). En el presente estudio, el valor de CL₅₀-96 h en juveniles de *L. vannamei* (3.3 g) expuestos a una salinidad de 3 g/L indican una mayor tolerancia al amonio que las postlarvas (PL20) a la misma salinidad. Además,

una mayor resistencia a la tolerancia del amonio en las postlarvas en un ambiente de 3 g/L de salinidad en comparación con aquellas a una salinidad de 1 g/L.

Otro de los factores que puede influir en la tolerancia a los tóxicos es que los organismos de una misma especie pero de distintas poblaciones pueden presentar concentraciones individuales efectivas desiguales, esto debido a que antes de someterse a las pruebas de toxicidad estuvieron bajo condiciones ambientales diferentes o provienen de lotes de progenitores distintos (Newman y Unger, 2003). En este estudio, todos los organismos utilizados para las distintas pruebas de toxicidad procedieron de diferentes lotes de organismos; sin embargo, esto no se vio influenciado en los efectos letales ya que antes de someter a los organismos a las diferentes pruebas se realizó una evaluación de la calidad de los mismos (Arcos *et al.*, 2005), además se contó con un certificado de salud sanitaria.

8.2. Toxicidad aguda de nitritos

La toxicidad aguda de nitritos en los crustáceos es sustancialmente menos estudiada en comparación con la de amonio. Sin embargo, la información disponible parece indicar que el pH, la salinidad y las etapas de desarrollo son los principales factores que influyen en la toxicidad. El nitrito existe en dos formas, nitrito (NO_2^-) y ácido nitroso (HNO_2), las cuales coexisten en un equilibrio controlado principalmente por el pH, prácticamente todo el nitrito presente en el cultivo de organismos acuáticos está en forma ionizada. La ionización del nitrito mediada por el pH es lo contrario a la del amonio (Lin y Chen, 2001). El HNO_2 puede difundirse fácilmente a través de las membranas branquiales de los animales acuáticos, por lo que esta forma es más tóxica. La proporción de estas formas de nitrito está muy influenciada por el pH; sin embargo, no existen pruebas de toxicidad aguda de nitrito a diferentes niveles de pH en crustáceos decápodos (Romano y Zeng, 2013). No obstante, las correlaciones entre la toxicidad de los nitritos y el pH se han demostrado en peces (Huey *et al.*, 1982), es probable que exista una tendencia similar en los crustáceos ya que Chen y Cheng (2000) encontraron que tanto la afluencia de nitrito y los niveles de nitrito en la hemolinfa aumentaron en *P. monodon*, a un pH decreciente.

A pesar de que existen relativamente pocos estudios sobre los efectos de la salinidad o los niveles de Cl^- sobre la toxicidad de los nitritos, los resultados muestran tendencias consistentes de la importancia de la salinidad sobre la toxicidad de los nitritos. Por ejemplo,

en agua dulce (<0.5 mg/L de Cl^-), el valor de la $\text{CL}_{50-96 \text{ h}}$ fue de 6.1 mg/L para *Procambarus simulans*, y cuando la concentración de Cl^- se incrementó a 300 mg/L, no se observaron mortalidades, por lo tanto, los valores de CL_{50} no pudieron ser calculados (Beitinger y Huey, 1981). Del mismo modo, salinidades más altas (niveles más altos de Cl^-) redujeron significativamente la toxicidad de los nitritos en *P. penicillatus* (Chen y Lin, 1991) y *L. vannamei* (Lin y Chen, 2003). En contraste con los hallazgos anteriores, se demostró que la salinidad no tiene un efecto sobre los valores de la CL_{50} de N-NO_2^- en las larvas de *S. serrata* (Seneriches-Abiera *et al.*, 2007). Sin embargo, estas larvas poseen capacidades osmorreguladoras subdesarrolladas, como se observa en otros cangrejos (Charmantier *et al.*, 1998; Anger y Charmantier, 2000), reduciendo la absorción de $\text{N-NO}_2^-/\text{Cl}^-$ que puede explicar este mecanismo de acción. Solo se han realizado dos experimentos sobre la toxicidad de los nitritos en diferentes etapas de desarrollo y con resultados contrastantes (Chen y Chin, 1988a; Seneriches-Abiera *et al.*, 2007).

Chen y Chin (1988a) encontraron que el desarrollo larval de nauplios a postlarvas, la tolerancia a los nitritos de *P. monodon* aumentó más de 12 veces (un valor $\text{CL}_{50-96 \text{ h}}$ de 5.00 mg/L a 61.87 mg/L de N-NO_2^-). Por el contrario, cada etapa de larvas zoea de *S. serrata* tenían marcadas diferencias en la tolerancia a los nitritos y no se mostró un vínculo claro con las etapas de desarrollo; se observó que cambios de salinidad de 35 a 25 g/L no influyeron significativamente sobre el efecto letal de los organismos (Seneriches-Abiera *et al.*, 2007). Por otro lado, comparando las $\text{CL}_{50-48 \text{ h}}$ de N-NO_2^- estimadas en zoea para *Penaeus indicus* (Jayasankar y Muthu, 1983) y *P. monodon* (Chen y Chin, 1988a) se observa que *P. monodon* es casi dos veces más sensible que *P. indicus*; mientras que las $\text{CL}_{50-96 \text{ h}}$ muestra que en el estadio de PL1 de *P. monodon* es dos veces más sensible a los nitritos que *M. ensis* (Tabla 46).

Tabla 46. Valores de CL₅₀ de N-NO₂⁻ (mg/L) en diferentes especies de larvas y postlarvas de camarones peneidos

Especies	Estadio	Salinidad (g/L)	CL ₅₀				Referencias
			24 h	48 h	72 h	96 h	
<i>P. indicus</i>	Zoea	35	---	15.4	---	---	Jayasankar y Muthu (1983b)
<i>P. monodon</i>	Nauplio	34	5.0	---	---	---	Chen y Chin (1988a)
<i>P. monodon</i>	Zoea	34	13.2	---	---	---	Chen y Chin (1988a)
<i>P. monodon</i>	Mysis	34	20.7	8.3	---	---	Chen y Chin (1988a)
<i>P. monodon</i>	PL1	34	61.9	33.2	20.5	13.5	Chen y Chin (1988a)
<i>P. monodon</i>	PL6	34	61.9	33.2	20.5	13.5	Chen y Chin (1988a)
<i>P. japonicus</i>	PL2	34	83.4	53.8	21.8	13.0	Chen y Tu (1990)
<i>M. ensis</i>	PL1	33	70.1	27.1	---	---	Chen y Nan (1991)
<i>P. paulensis</i>	PL1		277.8	41.6	14.5	10.7	Ostrensky y Poersch (1992)
<i>P. japonicus</i>	PL12	36	87.8	55.0	25.0	20.6	Lin <i>et al.</i> (1993)
<i>P. setiferus</i>	PL25	25	268.1	248.8	167.3	---	Alcaraz <i>et al.</i> (1999b)
<i>L. vannamei</i>	PL25	10	---	153.7	---	---	Schuler <i>et al.</i> (2010)
<i>L. vannamei</i>	PL23	4.3	---	12.1	8.1	7.6	Ramirez-Rochín (2014)
<i>L. vannamei</i>	PL23	3	---	16.3	7.7	5.2	Ramirez-Rochín (2014)
<i>L. vannamei</i>	PL23	1.7	18.9	7.0	4.3	3.4	Ramirez-Rochín (2014)
<i>L. vannamei</i>	PL23	1.1	8.8	6.0	3.6	2.6	Ramirez-Rochín (2014)
<i>L. vannamei</i>	PL23	0.8	7.9	5.8	4.0	3.0	Ramirez-Rochín (2014)
<i>L. vannamei</i>	PL20	1	29.3	5.1	4.0	3.3	Este estudio
<i>L. vannamei</i>	PL20	3	37.9	8.0	5.7	4.9	Este estudio

--- No disponible

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, es escasa la información sobre la toxicidad aguda de los nitritos en larvas y postlarvas de *L. vannamei* en ambientes de baja salinidad. Schuler *et al.* (2010) estimaron que la CL₅₀ a las 48 h para postlarvas PL25 en una salinidad de 10 g/L fue de 153.7 mg/L de N-NO₂⁻; este valor es de una magnitud del 96.7 y 94.8 % mayor al estimado en este estudio para postlarvas PL20 a salinidades de 1 y 3 g/L, respectivamente (Tabla 46). Aunque Schuler *et al.* (2010) utilizaron postlarvas de edades diferentes a las de este trabajo, es claro que la salinidad (10 g/L) influye en la tolerancia a la toxicidad de los nitritos. Por otro lado, Ramírez-Rochín (2014) realizó una

evaluación de la toxicidad aguda de los nitritos en postlarvas PL23 en salinidades de 4.3, 3, 1.7, 1.1 y 0.8 g/L estimando una CL_{50} a las 96 h de 7.6, 5.2, 3.4, 2.6 y 3 mg/L de $N-NO_2^-$, respectivamente. De acuerdo a los valores de CL_{50} de $N-NO_2^-$ en las salinidades de 3 y 1.1 g/L estimados por Ramírez-Rochín (2014), estos son similares a los registrados en esta investigación para las salinidades de 1 y 3 g/L en postlarvas PL20 (Tabla 46).

En la Tabla 47 se muestran valores de CL_{50} de $N-NO_2^-$ para diferentes especies de juveniles de camarones peneidos a diferentes tiempos de exposición y ambientes de salinidad. En comparación con estudios de toxicidad de amonio, se puede apreciar que existe un mayor número de trabajos de toxicidad aguda de nitritos en ambientes de baja salinidad con juveniles de *L. vannamei* (Gross *et al.*, 2004; Sowers *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Ramírez-Rochín *et al.*, 2017). En cuanto a la tolerancia de nitritos entre las especies, se puede observar que *L. vannamei* y *P. monodon* a salinidades (20 y 25 g/L) y tallas similares (4.87 y 3.90 g) presentan una tolerancia similar. Lin y Chen (2003) expusieron a juveniles de *L. vannamei* (3.90 g) a nitritos en salinidades de 15, 25 y 35 g/L, mostrando una mayor toxicidad conforme disminuye la salinidad; es decir, la toxicidad disminuyó en un 44.5 % al comparar los valores obtenidos a una salinidad de 35 g/L con respecto a 25 g/L de salinidad, siendo más tóxicos los nitritos en la segunda salinidad; de igual manera, pero a salinidades de 25 g/L con respecto a 15 g/L la tolerancia disminuyó en un 57 %.

Ramírez-Rochín *et al.* (2017) mostraron que la tolerancia de nitritos en juveniles de la misma especie y talla similar (4.4 g) a salinidades de 2.0, 1.0 y 0.6 g/L fue 43.5 % más baja a 1.0 que a 2.0 g/L de salinidad, mientras que a 0.6 g/L la tolerancia fue de 18.6 % menos que a 1.0 g/L de salinidad. El valor de la $CL_{50-96 h}$ de $N-NO_2^-$ estimado en este trabajo para juveniles de 3.3 g (10.3 mg/L de $N-NO_2^-$) es similar al estimado por Ramírez-Rochín *et al.* (2017) a una salinidad de 2 g/L (12.4 mg/L de $N-NO_2^-$); sin embargo, a pesar de que es una salinidad menor que la de este estudio (3 g/L), posiblemente la mayor tolerancia se puede deber a que la talla de los organismos empleados fue diferente; aquí 3.3 g y Ramírez-Rochín *et al.* (2017), 4.4 g.

Tabla 47. Valores de CL₅₀ de N-NO₂⁻ (mg/L) en diferentes especies de juveniles de camarones peneidos

Especie	Talla (g)	Salinidad (g/L)	CL ₅₀				Referencia
			24 h	48 h	72 h	96 h	
<i>P. chinensis</i>	0.36	33	33.9	---	---	37.7	Chen <i>et al.</i> (1990c)
<i>P. monodon</i>	4.87	20	218.0	193	---	171.0	Chen <i>et al.</i> (1990a)
<i>P. penicillatus</i>	0.40	35	92.8	79.4	---	40.9	Chen y Lin (1991)
<i>P. penicillatus</i>	0.40	25	83.3	52.9	---	38.5	Chen y Lin (1991)
<i>L. vannamei</i>	3.90	15	187.9	142.2	92.5	76.5	Lin y Chen (2003)
<i>L. vannamei</i>	3.90	25	274.1	244	224.8	178.0	Lin y Chen (2003)
<i>L. vannamei</i>	3.90	35	521.2	423	375	321.0	Lin y Chen (2003)
<i>L. vannamei</i>	0.21	2	30.4	16.4	10.4	8.9	Gross <i>et al.</i> (2004)
<i>L. vannamei</i>	0.08	2	21.4	13.9	11.2	9.6	Gross <i>et al.</i> (2004)
<i>L. vannamei</i>	0.70	2	---	---	---	8.4	Sowers <i>et al.</i> (2004)
<i>L. vannamei</i>	0.62	3	31.3	24.3	20.3	15.2	Wang <i>et al.</i> (2006)
<i>L. vannamei</i>	4.40	2	19.4	15.4	13.4	12.4	Ramirez-Rochín <i>et al.</i> (2017)
<i>L. vannamei</i>	4.40	1	14.4	9.6	8.3	7.0	Ramirez-Rochín <i>et al.</i> (2017)
<i>L. vannamei</i>	4.40	0.6	8.1	7.9	6.8	5.7	Ramirez-Rochín <i>et al.</i> (2017)
<i>L. vannamei</i>	3.3	3	55.5	15.4	12.4	10.6	Este estudio

--- No disponible

En el caso de los valores de CL₅₀ a las 96 h estimados por Gross *et al.* (2004) y Sowers *et al.* (2004) para juveniles de *L. vannamei* a una salinidad de 2 g/L, también ambos son similares, pero un poco menor que los calculados en este estudio; la mayor tolerancia de los organismos de este trabajo se puede deber a que fueron de talla más grande (Tabla 47). En este estudio, los juveniles de *L. vannamei* expuestos a nitritos y una salinidad de 3 g/L mostraron ser más tolerantes al tóxico en comparación a las postlarvas (PL20) bajo las mismas condiciones de salinidad, debido a que los valores de las CL₅₀ para juveniles fueron mayores a los estimados en postlarvas (Tabla 8 y Tabla 29).

8.3. Toxicidad aguda de nitratos

En cuanto a la toxicidad de los nitratos, esta es mucho menor en comparación con el amonio y los nitritos; por lo tanto, no es sorprendente que este sea el menos estudiado entre las tres especies nitrogenadas. Información sobre la toxicidad aguda de los nitratos está limitada a solo unas pocas especies de decápodos que incluyen cangrejos de río, *Cherax*

quadricarinatus (Meade y Watts, 1995) y *P. pelagicus* y *S. serrata* (Romano y Zeng, 2007c; 2007d).

Es importante mencionar que hay evidencia que sugiere que los nitratos pueden ser incluso menos tóxico como se ha mencionado en trabajos de toxicidad aguda en crustáceos, y que probablemente sea aplicable a todos los animales estuarinos/marinos. Esto está relacionado a problemas inherentes con la detección de valores de CL_{50} de $N-NO_3^-$ que alteran la composición iónica de las soluciones de prueba, la cual conducen a un estrés osmorregulador no relacionado con la exposición a los nitratos y, en consecuencia, se puede registrar un sesgo de mortalidad (Romano y Zeng, 2007d).

El problema comienza a partir de que se tiene que preparar una solución madre con algún reactivo comercial, la cual se diluye para establecer un intervalo de las concentraciones de prueba deseadas. En el caso de los nitratos, cuando se agrega $NaNO_3$ al agua destilada para crear la solución madre, va a contener además de los correspondientes al agua de prueba iones de NO_3^- y Na^+ . Debido a la menor toxicidad de los nitratos, son normalmente necesarios altos volúmenes de solución estándar. Entonces, estas diluciones grandes de solución madre, con iones de Na^+ y NO_3^- , inevitablemente tiene un impacto significativo en la composición iónica de la solución de prueba final, como aumentar las proporciones de Na^+/K^+ . Tales relaciones de iones interrumpidas, que se combinan con salinidades más bajas, es bien conocido que induce estrés osmótico y posteriormente la muerte en los animales acuáticos, independientemente de sus capacidades de osmorregulación (Romano y Zeng, 2007d; Romano y Zeng, 2012). Un método simple para mitigar estos cambios de relación iónica es a través de la adición de K^+ a la solución madre de $N-NO_3^-$, en las mismas concentraciones como los que se encuentran naturalmente en la salinidad de la solución de prueba. En pruebas de toxicidad de nitratos se utilizó la estrategia de adición de iones K^+ a la solución madre la cual ocasionó una disminución significativa en el sesgo de mortalidad en *P. pelagicus*, *S. serrata* (Romano y Zeng, 2007c; 2007d) y *P. monodon* (Romano y Zeng, 2009a). Si bien esto puede reducir el estrés osmorregulador, se advierte que las comparaciones de toxicidad de nitratos en la misma especie pero en diferentes salinidades puede no ser del todo exacto (Romano y Zeng, 2009a). Sin embargo, dado que la toxicidad de los compuestos nitrogenados a menudo está

relacionado con la acumulación en la hemolinfa, experimentos sobre los niveles de nitratos en la hemolinfa de crustáceos, cuando se han sometido a diferentes combinaciones de nitritos y salinidades, pueden proporcionar una visión de las tendencias de su toxicidad.

En este trabajo, en las pruebas de toxicidad de nitratos no fueron adicionados iones de K^+ , y no deja de ser preocupante que un desequilibrio en las relaciones iónicas originó un sesgo en las mortalidades de los organismos por un estrés osmorregulatorio; sin embargo, se considera que los datos estimados de toxicidad aguda de nitratos en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad (1 y 3 g/L) son la pauta para futuras investigaciones sobre toxicidad de los nitratos en las cuales se contemple la adición de iones K^+ para mantener una relación iónica similar a un agua de mar a la misma salinidad.

La toxicidad de los nitratos para los invertebrados acuáticos aumenta al aumentar las concentraciones de nitratos y los tiempos de exposición (Camargo y Ward, 1992, 1995; Scott y Crunkilton, 2000; Tsai y Chen, 2002). Por el contrario, la toxicidad del nitrato disminuye con el aumento del tamaño corporal y la salinidad del agua (Camargo y Ward, 1992, 1995; Tsai y Chen, 2002). En este trabajo, las estimaciones de valores de CL_{50} de $N-NO_3^-$ indican que las postlarvas PL20 son menos tolerantes a la toxicidad aguda que los juveniles (3 g) en la salinidad de 3 g/L (Tabla 11 y 31). Además, en las pruebas de toxicidad aguda con postlarvas, se puede observar una mayor tolerancia de nitratos en la salinidad de 3 g/L que en la de 1 g/L (Tabla 11).

Camargo *et al.* (2005) mencionan que los invertebrados de agua dulce parecen ser más sensibles a la toxicidad de los nitratos que los invertebrados marinos como una consecuencia probable del efecto de la salinidad del medio sobre la tolerancia de los invertebrados acuáticos a los iones de nitratos. Sin embargo, se ha observado que en las primeras etapas de vida de algunos invertebrados marinos (*P. monodon*), estos pueden ser muy sensibles a la toxicidad del nitrato (Muir *et al.*, 1991). Para el caso de crustáceos de agua dulce, Meade y Watts (1995), examinaron los efectos tóxicos de $NaNO_3$ en la supervivencia y la tasa metabólica de juveniles de la langosta australiana *C. quadricarinatus*; después de 5 días, no se observó mortalidad en los organismos expuesto a una concentración de 1000 mg/L de $N-NO_3^-$. Además, no hubo diferencias significativas en el consumo de oxígeno entre el control (0 mg/L de $N-NO_3^-$) y los organismos expuestos a la

mayor concentración experimental (1000 mg/L de N-NO₃⁻). Wickins (1976) al examinar la toxicidad aguda de NaNO₃ en una combinación de especies de camarones peneidos (*Penaeus aztecus*, *P. japonicus*, *Penaeus occidentalis*, *Penaeus orientalis*, *L. schmitti* y *P. setiferus*), calculó un valor de CL₅₀-48 h de 3400 mg/L de N-NO₃⁻ en un agua de mar de 28 g/L de salinidad. En cuanto a estudios de toxicidad aguda en camarones peneidos solo se tiene un estudio con juveniles de la especie *P. monodon* (Tabla 48). No es posible con nuestros resultados obtenidos de toxicidad aguda de nitratos en juveniles hacer un comparativo en cuanto a la tolerancia de la especie *L. vannamei* y *P. monodon* debido a que las tallas de los organismos son muy diferentes; además, *P. monodon* fue expuesto en aguas salobres y marinas (>15 g/L de salinidad), mientras que *L. vannamei* fue expuesto a una salinidad de 3 g/L. La información generada en esta investigación da el inicio de nuevas investigaciones de toxicidad de nitratos en aguas de baja salinidad con la especie *L. vannamei*, y también en aguas marinas y salobres para así hacer comparativos sobre la tolerancia entre especies.

Tabla 48. Valores de CL₅₀ (mg/L) de N-NO₃⁻ para la especie *P. monodon* y *L. vannamei* a diferentes salinidades.

Especie	Talla (g)	Salinidad (g/L)	CL ₅₀				Referencia
			24 h	48 h	72 h	96 h	
<i>P. monodon</i>	0.78	15				1411	Romano y Zeng (2009a)
<i>P. monodon</i>	1.78	25				2020	Romano y Zeng (2009a)
<i>P. monodon</i>	0.78	35				2213	Romano y Zeng (2009a)
<i>P. monodon</i>	0.30	15		2876		1449	Tsai y Chen (2002)
<i>P. monodon</i>	0.30	25		3894		1575	Tsai y Chen (2002)
<i>P. monodon</i>	0.30	35		4970		2316	Tsai y Chen (2002)
<i>L. vannamei</i>	3.30	3	4874	2254	1091	900	Este estudio

8.4. Toxicidad aguda de mezclas

La supervivencia y salud de los organismos acuáticos es controlada por su entorno y por lo tanto, por los cambios inducidos por las actividades del hombre. La entrada de las aguas residuales y otros desechos en un cuerpo de agua, aunque han sido tratados, se puede esperar que tengan un impacto en el ecosistema acuático. La mayoría de las muertes

masivas de organismos acuáticos tiene que ver con el agotamiento rápido de oxígeno o de relativamente grandes vertimientos de productos químicos (Rubin y Elmaraghy, 1997). Un claro ejemplo de contaminantes que pueden llegar a los ecosistemas acuáticos costeros o de aguas interiores de manera natural o por actividades antropogénicas, son los compuestos nitrogenados, los cuales pueden tener un efecto sobre los organismos que habitan esos sitios.

Similarmente, en el agua de cultivo, los organismos viven en condiciones permanentemente cambiantes, por lo general, a factores físicos y químicos, entre los que se suman concentraciones de diferentes contaminantes, como los antibióticos (e.g., N-sulfaclopiridazina, tetraciclina, norfloxacin, enrofloxacin, oxitetraciclina), desinfectantes (cloro, yodo, cal), alguicidas (CuSO_4), pesticidas (hexaclorobenceno) y otros aditivos (Lyle-Fritch *et al.*, 2006). En algunos casos, la utilización de los productos químicos es absolutamente necesaria para evitar pérdidas masivas de producción, pero es importante considerar los daños biológicos asociados a los organismos y que pueden comprometer la salud del camarón. En el caso de los compuestos nitrogenados, estos llegan a los sistemas de cultivo por medio de la fertilización, la alimentación o por la fuente original de agua, y conforme avanza el periodo de cultivo los niveles se incrementan ocasionando bajas tasas de crecimiento o mortalidades. Es importante identificar y establecer la toxicidad de la mezcla de contaminantes presente en el ambiente de cultivo, ya que en términos de CL_{50} (concentración letal media) individual, no necesariamente coincide el efecto tóxico y se pueden presentar diferentes patrones de interacción (Iannacone *et al.*, 2011). En solución, las sustancias de diferentes toxicidades pueden interactuar biológica y químicamente de varias maneras para aumentar o disminuir el efecto tóxico: pudiendo presentarse el efecto aditivo, sinergismo, potenciación y/o antagonismo (Rubin y Elmaraghy, 1997).

En cuanto a estudios sobre la toxicidad de mezclas de compuestos nitrogenados en crustáceos, esta se encuentra reducida a unas pocas especies (*P. monodon* y *P. setiferus*) y en salinidades de aguas de mar (>25 g/L), y para *L. vannamei* en ambientes de baja salinidad (10 g/L). Chen y Chin (1988b), expusieron a postlarvas (PL6) de camarón *P. monodon* a una mezcla de amonio y nitritos. Cuando la relación de toxicidad de la mezcla

de amonio y nitritos fue de 1:1, los valores de CL_{50} a las 48, 72 y 96 h fueron de 2.20, 1.43 y 0.84 UT equivalentes a 12.66 mg/L de NAT (0.60 mg/L de N-NH₃) más 14.91 mg/L de N-NO₂⁻; 8.23 mg/L de NAT (0.39 mg/L N-NH₃) más 9.69 mg/L N-NO₂⁻ y 4.83 mg/L de NAT (0.23 mg/L de N-NH₃) más 5.69 mg/L de N-NO₂⁻, respectivamente. Cuando la relación de toxicidad de la mezcla de amonio y nitritos fue 5:1, los valores de CL_{50} a las 48, 72 y 96 h fueron de 2.50, 1.56 y 0.85 UT que fueron equivalentes a 23.98 mg/L de NAT (1.13 mg/L N-NH₃) más 5.65 mg/L N-NO₂⁻; 14.96 mg/L de NAT (0.71 mg/L de N-NH₃) más 3.52 mg/L de N-NO₂⁻, y 8.15 mg/L de NAT (0.39 mg/L de N-NH₃) más 1.92 mg/L de N-NO₂⁻. Una mezcla de amonio y nitritos ejerció una mayor toxicidad que las altas concentraciones solas de amonio o nitritos. El efecto combinado del amonio y los nitritos en las postlarvas de *P. monodon* fue antagónico durante 48 y 72 h de exposición, pero sinérgico después de 96 h de exposición.

La acumulación de nitritos se ha estudiado en la hemolinfa de los crustáceos de agua dulce después de la exposición a ambientes con nitrito, en los cangrejos de agua dulce *Astacus astacus* (Jensen, 1990; Jeberg y Jensen, 1994; Jensen, 1996) y *Pacifastacus leniusculus* (Harris y Coley, 1991). Estas investigaciones han indicado que las concentraciones de nitrito de hemolinfa exceden los niveles de nitrito en el ambiente más de 10 veces. En los camarones *P. japonicus* y *P. monodon* (Chen y Chen, 1992a; 1992b; Cheng y Chen, 2001; Cheng y Chen, 2002a) se ha registrado la acumulación de nitrito en la hemolinfa en una magnitud mayor a la de los nitritos en el ambiente. En *P. monodon* fue observado que después de la exposición a elevados niveles de nitritos, un elevado en presencia de nitratos (7.32 mM) acumuló niveles de nitritos en la hemolinfa similares a los expuestos al camarón a nitrito elevado solamente (Cheng y Chen, 2002a). En contraste con los nitritos en la hemolinfa, la acumulación de nitratos en la hemolinfa solo fue un tercio del nitrato del ambiente. En el cangrejo *Astacus astacus*, después de 7 días de exposición a nitratos (1 mM), la acumulación de nitrato en la hemolinfa fue de aproximadamente 0.07 mmol/mL que es una décima cuarta parte del nitrato ambiental (Jensen, 1995). El hecho de que la absorción de nitratos era mucho más bajo que la captación de nitritos indica que la captación de nitratos a través de la captación del mecanismo branquial Cl⁻ y la entrada pasiva es baja en comparación con la absorción de nitritos para *P. monodon* y *A. astacus*.

Un aumento en los niveles de nitratos en la hemolinfa en respuesta al aumentar el nitrito ambiental, sugiere que al incorporar el nitrito en la hemolinfa se oxida a nitrato. Además, Cheng y Chen (2002a) observaron en *P. monodon* que después de la exposición a elevados niveles de nitritos y nitratos, aumentó la tasa de excreción de amonio, y el hecho de que el camarón después de la exposición a nitritos disminuya el amonio en la hemolinfa sugiere tres posibilidades: (1) una disminución de la amioogénesis, (2) una mayor excreción de amonio; o (3) una conversión de amonio a urea. En *P. japonicus* fue observado una acumulación de urea en la hemolinfa directamente con el nitrito en el ambiente, mientras que el amonio en la hemolinfa estaba inversamente relacionado al nitrito del ambiente (Cheng y Chen, 2001).

Postlarvas de *P. setiferus* fueron expuestas a niveles agudos solos y en combinación de amonio y nitritos; los valores de la CL_{50} a las 72 h fue de 8.69 mg/L de NAT (1.12 mg/L $N-NH_3$) y 167.33 mg/L de $N-NO_2^-$, este último fue mucho menos tóxico que el amonio. El efecto conjunto del amonio y el nitrito en las postlarvas fue sinérgico a las 48 h de exposición y antagónico después de 72 h (Alcaraz *et al.*, 1999b).

Schuler *et al.* (2010) determinaron los efectos individuales y combinados de amonio y nitritos en postlarvas de *L. vannamei* (PL de 25 a 45 días de edad) a una salinidad de 10 g/L. Las pruebas de NAT se realizaron a 18 y 10 g/L de salinidad, y la prueba de $N-NO_2^-$ a 10 g/L. Las pruebas combinadas de NAT y $N-NO_2^-$ también se realizaron a una salinidad de 10 g/L. Los valores de la CL_{50-48} h para NAT a 18 g/L de salinidad, NAT a 10 g/L de salinidad y $N-NO_2^-$ a 10 g/L fueron 42.9, 39.7 (2.3 y 2.1 mg/L de $N-NH_3$), y 153.7 mg/L, respectivamente. Cuando el $N-NO_2^-$ se ajustó al nivel más bajo de concentración de efectos observados (LOEC, por sus siglas en inglés) y las concentraciones de NAT fueron variadas, se observaron efectos sinérgicos, con una estimación de la CL_{50-48} h de 28.2 mg/L de NAT (1.49 mg/L de $N-NH_3$). Sin embargo, cuando se ajustó el nivel de amonio al LOEC y el nitrito fue variado, se observaron efectos antagónicos con un cálculo de la CL_{50-48} h de 163.3 mg/L de $N-NO_2^-$.

En el presente estudio se presentaron efectos antagónicos, sinérgicos y aditivos en las diferentes pruebas de mezclas 1:1 y 1:1:1 en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*. Para el caso de la mezcla de NAT/ $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ en postlarvas (PL20) expuestas a las salinidades

de 1 y 3 g/L el efecto a las 24 h fue aditivo y antagónico, respectivamente; mientras que a las 48, 72 y 96 h el efecto fue sinérgico. En postlarvas de la misma talla, pero a una salinidad de 25 g/L, efecto de la mezcla de los 3 compuestos nitrogenados fue antagónico a las 24 h y aditivo a las 48, 72 y 96 h de exposición. Para las mezclas de NAT/N-NO₂⁻ (1:1) en postlarvas a las salinidades de 3 g/L, los efectos a las 24 h fue antagónico, pero sinérgico a las 48, 72 y 96 h de exposición; en la mezcla de N-NO₂⁻/N-NO₃⁻, el efecto a las 24 h fue aditivo, mientras que a las 48, 72 y 96 h fue sinérgico. En la mezcla de NAT/N-NO₃⁻ (1:1), el efecto a las 24 y 48 h fue aditivo y a las 72 y 96 h fue sinérgico. En el caso de los juveniles, la mezcla 1:1:1 (NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻) en la salinidad de 3 g/L, presentó un efecto antagónico a las 24 h, sinérgico a las 48 y 72 h, y aditivo a las 96 h de exposición. Esta misma mezcla 1:1:1, pero en una salinidad de 25 g/L, los efectos que se presentaron en todos los tiempos de exposición fue antagónico.

Los efectos observados en las pruebas de toxicidad de mezclas en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* fueron similares a los registrados por otros autores para diferentes tiempos de exposición (Chen y Chin, 1998; Alcaraz *et al.*, 1999b; Schuler *et al.*, 2010). La toxicidad de mezclas de compuestos nitrogenados en camarones es limitada a unas cuentas especies, tallas y ambientes de salinidad; por lo tanto, dada la acumulación de estos tóxicos conforme avanza el periodo de cultivo y su toxicidad, es importante seguir realizando investigación sobre el efecto conjunto en *L. vannamei*, así como en otras especies, edades y salinidades, además de estudiar el efecto de diversos parámetros ambientales que pueden modificar la toxicidad de cada uno de los compuestos del nitrógeno.

Se puede generalizar que en la combinación NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻, o bien NAT/N-NO₂⁻ ó N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ después de las 48 h las postlarvas (PL20) expuestas a salinidades bajas (1 y 3 g/L) se presenta sinergismo; escenario que probablemente se presenta con frecuencia en los estanques de cultivo como en los ecosistemas lagunares, cuando efectivamente están presentes las tres formas nitrogenadas disueltas en las aguas. Sin embargo, es interesante que cuando se presentan condiciones de salinidad salobre de 25 g/L el efecto es antagónico, aunque es importante mencionar que las UT utilizadas en esta prueba fueron similares a las UT utilizadas a salinidad de 3 g/L; entonces, para conocer si efectivamente en aguas marinas o salobres se da un efecto antagónico, es necesario hacer

más investigaciones sobre la interacción de los compuestos del nitrógeno en aguas marinas y salobres y que las UT correspondan a una CL_{50} individual bajo esos escenarios de salinidad. En juveniles después de las 96 h de exposición se nota en cambio un efecto aditivo en bajas salinidades y un efecto antagónico en agua salobre. Esta conducta en postlarvas (sinergismo) y en juveniles (aditivo) en aguas de baja salinidad cambió al pasar a agua salobre a un efecto antagónico, tiene implicaciones diversas. Una de las implicaciones, es que probablemente la especie se ha adaptado de manera tal que cuando entra a desovar a las partes internas de los estuarios y luego sale rumbo a las aguas estuarinas salobres dispone de un mecanismo tal que de manera antagónica.

8.5. Toxicidad subletal de amonio, nitritos y nitratos: oxihemocianina, glucosa y lactato

Los mecanismos de intercambio de gases y el equilibrio ácido/base están interrelacionados con la enzima anhidrasa carbónica (CA), y son responsables de ambos procesos. En los crustáceos, el CO_2 se transporta dentro de la hemolinfa a través de HCO_3^- , donde la CA ubicada en la parte basolateral lo cataliza de nuevo a $CO_2 + H_2O$ para ser pasivamente excretado al ambiente. El pigmento respiratorio, hemocianina, representa el 80-95 % de la concentración total de proteína en la hemolinfa de los crustáceos decápodos (Jeuniaux, 1971). El oxígeno se transporta a través de la hemolinfa vía cobre (Cu) que contiene la proteína respiratoria hemocianina y, una vez que se une a una molécula de O_2 , se convierte en oxihemocianina (Jensen, 1995; Cheng y Chen, 1999). Los niveles de hemocianina, las proporciones de oxihemocianina/desoxihemocianina y/o el consumo de oxígeno se miden comúnmente como indicadores del intercambio de gases en los crustáceos (Romano y Zeng, 2013).

Se tiene documentado en numerosos crustáceos que la exposición a elevados niveles de NAT ocasionan una disminución de la oxihemocianina. Juveniles de *P. japonicus* (15.6 g) fueron expuestos a NAT en una salinidad de 30 g/L, se observó que el NAT en la hemolinfa se incrementó con el aumento de NAT ambiental; los niveles de hemocianina y proteína en la hemolinfa del camarón disminuyeron, mientras que los niveles de aminoácidos libres aumentaron con un aumento del NAT ambiental en el rango de 0.003-1.439 mmol/L de NAT. La exposición del camarón de NAT ambiental a 1.439 mmol/L

causó la acumulación de amonio en la hemolinfa y provocó el catabolismo de la hemocianina y proteína en aminoácidos libres (Chen *et al.*, 1994). Por su parte, Chen y Cheng (1993), expusieron a *P. monodon* (21.9 g) a amonio en 30 g/L de salinidad; registraron un aumento en la excreción de N-urea y N-NO₂⁻, mientras que la excreción de NAT disminuyó con un aumento de NAT ambiental; así como una reducción significativa de la hemocianina y proteína en la hemolinfa. En este estudio, los niveles de oxihemocianina mostraron una disminución significativa de 1.598±0.186 a 0.894±0.05 mmol/L (Figura 3) en los juveniles expuestos a una concentración del 50 % de la CL₅₀ a las 96 h de NAT (14.5 mg/L de NAT). El aumento en el consumo de oxígeno en organismos expuestos a amonio ha sido documentada en *L. vannamei* (Racotta y Hernández-Herrera, 2000), *P. japonicus* (Chen y Lai, 1992), *P. chinensis* (Chen y Lin, 1992a) y *Macrobrachium nipponense* (Wang *et al.*, 2003).

Son escasos los estudios que se tienen sobre cómo se da la captación del nitrito del ambiente a los organismos. Cabe mencionar que se ha estudiado más el mecanismo de absorción de nitritos en peces y se propone que se presenta un mecanismo similar en crustáceos. Es conocido que niveles elevados de N-NO₂⁻ perturban gravemente la capacidad de transportar el oxígeno en los peces cuando este nutriente ingresa a las células sanguíneas y oxida la hemoglobina (FeII) a metahemoglobina (FeIII), volviéndose incapaz de unirse al oxígeno (Williams *et al.*, 1993). Sin embargo, hay informes contradictorios sobre si un proceso similar ocurre en los crustáceos (Romano y Zeng, 2013). Cheng y Chen (2002b) indicaron que, para *M. japonicus*, el NO₂⁻ en la hemolinfa oxida la hemocianina a metahemocianina; esto fue apoyado por la detección significativamente menor de oxihemocianina y proteínas en la hemolinfa en *M. rosenbergii* (Chen y Lee, 1997) y en juveniles de *P. japonicus* (Cheng y Chen, 1998), así como reducciones de la oxihemocianina y proteína junto con un aumento de la desoxihemocianina en la hemolinfa de *P. monodon* (Cheng y Chen, 1999). Sin embargo, hay evidencia que sugiere que el intercambio de gases no afecta a otros crustáceos cuando son expuestos a niveles elevados de NO₂⁻ (Jensen, 1990; Tahon *et al.*, 1988; Jensen, 1990). En el presente estudio, la exposición de *L. vannamei* a 2.65 y 5.30 mg/L de N-NO₂ causó una reducción significativa

($p < 0.05$) de oxihemocianina en la hemolinfa con respecto a la concentración de 1.60 mg/L de N-NO₂ y el control (0 mg/L) después de las 48 h de prueba (Figura 4).

La principal acción tóxica de los nitratos en animales acuáticos es similar a la acción de los nitritos, una conversión de pigmentos portadores de oxígeno (hemoglobina, hemocianina) a formas que son incapaces de llevar oxígeno (por ejemplo, metahemoglobina, metahemocianina) (Conrad, 1990; Jensen, 1996; Cheng y Chen, 2002b). Sin embargo, debido a la baja permeabilidad branquial al nitrato en animales acuáticos, la absorción es menor y contribuye a su baja toxicidad (Meade y Watts, 1995; Jensen, 1996; Cheng y Chen, 2002b). Los niveles de oxihemocianina encontrados en los camarones expuestos a diferentes concentraciones de N-NO₃⁻ mostraron una tendencia a disminuir conforme pasaron las horas de exposición, sin embargo, estos niveles no fueron significativamente diferentes con el tratamiento control (0 mg/L de N-NO₃⁻) (Figura 5). Cheng y Chen (2002b) encontraron que una concentración de N-NO₃⁻ de 105 mg/L causó la reducción de oxihemocianina y proteína en la hemolinfa del camarón *M. japonicus*. Cheng *et al.* (2002) estudiaron la acumulación de nitrato en los tejidos de *P. monodon*, y encontraron que el nitrato acumulado en el músculo, hepatopáncreas, intestino anterior, corazón, branquias, hemolinfa, intestino medio y tallo ocular fue de un factor de 0.16, 0.20, 0.26, 0.45, 0.60, 0.61, 0.83 y 1.32, respectivamente, sobre la concentración de nitrato en el ambiente.

Como ya se mencionó anteriormente, en las especies de peneidos, la toxicidad del amonio ha demostrado que afecta la supervivencia (Chen y Lei, 1990), el crecimiento y la muda (Chen y Kou, 1992), acumulación y excreción de amonio (Chen y Lin, 1992a; Chen y Cheng, 1993) y otros aspectos fisiológicos (Chen y Lin, 1992a; Chen *et al.*, 1993, 1994). Así como las disminuciones en los niveles de oxihemocianina de camarones por la exposición de amonio y/o nitritos (Chen y Cheng, 1993, 1994). Una alteración de los niveles de oxihemocianina junto con el aumento de la demanda metabólica resulta en una situación conflictiva, y donde las rutas metabólicas anaeróbicas podrían activarse como una vía alternativa en tal situación; sin embargo, esto no ha sido bien evaluado. En general se supone que los aminoácidos libres que resultan de la proteólisis son empleados como osmolitos, en cuyo caso el catabolismo sea reducido. Esto implicaría un aumento en el uso

de otros combustibles metabólicos, como carbohidratos y lípidos. Juveniles de *L. vannamei* fueron expuestos a diferentes concentraciones de NAT en 39 g/L de salinidad durante 24 h y se observó un consumo de oxígeno y los niveles de lactato y glucógeno en el hepatopáncreas aumentaron significativamente, con respecto a la concentración más alta de NAT. Los niveles de oxihemocianina, acilglicerol y colesterol en la hemolinfa y el lactato en el músculo disminuyeron significativamente en los organismos expuestos a las concentraciones más altas de NAT. Los cambios observados en la hemolinfa y los combustibles metabólicos tisulares sugieren un uso reducido de carbohidratos a través del metabolismo anaeróbico y un aumento en el uso de lípidos para satisfacer la demanda metabólica (Racotta y Hernández-Herrera, 2000).

Por otro lado, Hong *et al.* (2007), expusieron a juveniles de *E. sinensis* a diferentes concentraciones de amonio por dos días en los cuales se evaluaron parámetros metabólicos (incluida la concentración de hemolinfa amoniaca, niveles de glucosa, lactato, urea, triacilglicerol, glutamina y glutamato) e indicadores de inmunidad (el total de hemocitos y de la actividad superóxido dismutasa). Los resultados mostraron una relación lineal distinta entre el amonio ambiental y el amonio en la hemolinfa y un aumento notable en el contenido de amonio en la hemolinfa después de la exposición al amonio. En comparación con el grupo control, se observó una menor concentración de triglicéridos y un nivel más alto de glucosa, urea y lactato en la hemolinfa cuando se incrementó el amonio ambiental. Esto sugiere un uso reducido de carbohidratos a través del metabolismo anaeróbico y un aumento en el uso de lípidos para satisfacer la demanda metabólica. Durante el mismo período, el conteo total de hemocitos disminuyó mientras que el amonio ambiental aumentó. La acumulación de amonio en la hemolinfa resultó en un aumento en la demanda de energía. El mecanismo para la desintoxicación del amoniaco puede ser transformado en urea y glutamina.

En el presente estudio, los niveles de glucosa en la hemolinfa presentaron una tendencia a aumentar en las primeras horas de exposición (0-24 h); en la exposición de NAT, a las 24 h se dio el mayor incremento de glucosa (0.225 ± 0.016 mg/mL) en la concentración de 14.50 mg/L de NAT ambiental (Figura 6). En la prueba de nitritos, a las 48 h se presentó el nivel más alto de glucosa con 0.442 ± 0.031 mg/mL en la concentración

de 5.30 mg/L de N-NO₂⁻ ambiental (Figura 7); en la prueba de nitratos, no se presentó un nivel significativamente mayor de glucosa en la hemolinfa en ninguna de las concentraciones de N-NO₃⁻ a las cuales fueron expuestos los organismos (Figura 8). Para los niveles de lactato, en la prueba de amonio, a las 24 h de exposición en las concentraciones de 14.50 y 7.25 mg/L de NAT ambiental se observó un mayor incremento de lactato en la hemolinfa con 0.315±0.137 y 0.253±0.021 mg/mL, respectivamente (Figura 9). En la exposición de nitritos, el más alto nivel de lactato en la hemolinfa (0.256±0.022) fue a las 24 h en los camarones expuestos a 5.30 mg/L de N-NO₂⁻ ambiental (Figura 10). El comportamiento de los niveles de glucosa y lactato a exposición de amonio y nitritos en camarones coincide con los trabajos de otros autores (Hong *et al.* 2007; Racotta y Hernández-Herrera, 2000), los cuales sugieren que estos cambios son una forma de respuesta de los organismos a la exposición a los tóxicos.

8.6. Toxicidad subcrónica de amonio y nitritos solos y en combinación

Conforme avanza el periodo de cultivo se pueden presentar niveles elevados de los compuestos nitrogenados, principalmente el amonio, pero estos rara vez pueden llegar a exceder los valores de CL₅₀. Sin embargo, pruebas de toxicidad subcrónica de compuestos del nitrógeno para evaluar efectos sobre el crecimiento, supervivencia y otros parámetros, son escasos. Esto puede deberse a que con la estimación de la CL₅₀ se pueden calcular las concentraciones seguras para el cultivo. Sin embargo, hay evidencia que indica que tales niveles de seguridad pueden ser consideradas como una sobreestimación (Huang *et al.*, 2006). Como se mencionó en la sección anterior de discusión (8.5. Toxicidad subletal), hay varios estudios que indican que concentraciones relativamente bajas de amonio, nitritos y nitratos pueden ocasionar cambios significativos en el intercambio de gases, equilibrio ácido/base, en el sistema inmunológico, la osmorregulación y cambios histopatológicos. Por lo tanto, es importante realizar investigaciones sobre la exposición subcrónica que puede generar información para evaluaciones de riesgo ambiental y la acuicultura (Dahl *et al.*, 2006).

Chen y Kou (1992), revelaron que la concentración máxima aceptable de NAT medido con el porcentaje de ganancia de peso para *P. japonicus* es <5 mg/L; mientras que Chen y Lin (1992a) informaron que la concentración máxima aceptable para *P. penicillatus*

es de 6 mg/L. Para *M. rosenbergii*, expuestos a NAT tan bajos como 0.5 mg/L redujeron significativamente su crecimiento y una reducción en la tasa de consumo de alimento después de 60 días (Naqvi *et al.*, 2007). En *P. monodon* la concentración máxima aceptable fue de 0.21 mg/L de NAT después de 30 días de exposición (Allan *et al.*, 1990). El valor de la CL₅₀ a las 96 h de *P. penicillatus* a una salinidad de 34 fue 38.72 mg/L de NAT con el cual indican un nivel de seguridad de 3.87 mg/L (Chen y Lin, 1991); Sin embargo, con 3 mg/L de NAT fue suficiente para reducir el crecimiento de esta misma especie dentro de 14 días (Chen y Lin, 1992a). En el caso de *M. rosenbergii*, la concentración de 0.5 mg/L de NAT fue suficiente para reducir la tasa de crecimiento (Naqvi *et al.*, 2007), lo que implica un valor de CL₅₀ a las 96 h de ≥ 5 mg/L de NAT. Estos experimentos muestran la importancia de realizar pruebas crónicas/subletales, especialmente cuando se pretende buscar causas posibles implicadas con la reducción del crecimiento u otros parámetros.

El nitrito también puede afectar significativamente la tasa de crecimiento en los crustáceos (Koo *et al.*, 2005). En el cangrejo *Orithiya sinica*, tanto el NAT como el NO₂⁻ aceleraron el proceso de muda (Koo *et al.*, 2005); similarmente ocurre en juveniles de *P. monodon* a una concentración de 4 mg/L de N-NO₂⁻ donde se aumentó la frecuencia de muda, aunque el aumento de tamaño en cada muda se redujo causando un menor crecimiento después de 20 días (Chen y Chen, 1992b). Concentraciones de N-NO₂⁻ también afectaron el proceso de muda de juveniles de *P. pelagicus*, pero en lugar de aumentar la frecuencia de muda, los niveles de 3 a 16 mg/L aumentaron significativamente el "síndrome de muerte por muda" (Romano y Zeng, 2009b). El camarón *P. pelagicus* tuvo una alta sensibilidad al nitrito (3 mg/L de N-NO₂) el cual tuvo un menor crecimiento después de 20 días de exposición (Romano y Zeng, 2009b).

Efectos sobre los nitratos en el crecimiento en crustáceos son más limitados que con amonio y nitritos; para el caso específico de *L. vannamei* solo se cuenta con un trabajo (Kuhn *et al.*, 2010). Mallesen *et al.* (2004) indicaron que los niveles de 180 mg/L de N-NO₃⁻ no representan un estrés significativo para las larvas de *M. rosenbergii*. Para *L. vannamei*, se llevaron a cabo dos experimentos separados en concentraciones de 220, 435 y 910 mg/L de N-NO₃⁻, y salinidades de 2, 9 y 18 g/L con las misma concentración de 440 mg/L de N-NO₃⁻ (Khun *et al.*, 2010). En el primer experimento se demostró que 440 y 910

mg/L de N-NO_3^- redujo significativamente el crecimiento y la supervivencia de *L. vannamei*, respectivamente, a partir de las dos semanas, mientras que en las salinidades más bajas en 440 mg/L de N-NO_3^- , este tuvo un mayor impacto en la supervivencia y el crecimiento del camarón que en salinidades mayores. Tales resultados se relacionaron con el proceso de la osmorregulación, es decir, un aumento de estrés por las demandas energéticas de *L. vannamei* (Khun *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, las tasas de crecimiento y supervivencia de juveniles de *L. vannamei* a 3 g/L de salinidad, se vieron reducidas en los porcentajes mayores de amonio y nitritos a los cuales fueron expuestos; además de que fue más notable en los camarones mantenidos en 10 % de la combinación de los dos tóxicos. Es importante señalar que los camarones que fueron expuestos a concentraciones del 5 y 10 % de amonio y nitritos solos y en combinación a la salinidad de 25 g/L no mostraron una reducción significativa en la tasa de crecimiento con respecto al tratamiento control (0 % de los tóxicos). En cuanto a la tasa de supervivencia, los organismos más afectados fueron aquellos que estuvieron expuestos al 10 % de la CL_{50} de NAT y N-NO_2^- en la salinidad de 3 g/L.

8.7. Niveles de seguridad

Como ya se mencionó en la sección de resultados, el factor de aplicación más usado es el 0.1 propuesto por Sprague (1971). Diferentes autores lo han implementado para determinar los niveles de seguridad de metales y compuestos del nitrógeno para el cultivo del camarón *L. vannamei* (Frías-Espericueta *et al.*, 1999, 2001; Gross *et al.*, 2004; Ramírez-Rochín *et al.*, 2016). Sin embargo, Boyd y Tucker (1998) y Gross *et al.* (2004) han sugerido para uso general en la acuicultura se debe usar el factor de aplicación de 0.05. Otros autores han implementado los factores de 0.025, 0.01, 0.005 (Ahsanullah *et al.*, 1981; Mariño-Balsa *et al.*, 2000; Páez-Osuna y Frías-Espericueta, 2011, respectivamente). Huang *et al.* (2006) usaron el factor de 0.1 para calcular el nivel de seguridad de N-NO_2^- para *L. vannamei* los cuales fueron de 4 y 8.9 mg/L para las salinidades de 17 y 31 g/L, respectivamente; sin embargo, demostraron que tales concentraciones de N-NO_2^- disminuyen la respuesta inmune.

Existen varios criterios para determinar el cálculo de los niveles de seguridad, los cuales se relacionan con el factor de aplicación y el cual se multiplica por el valor de la

CL₅₀ a las 96 h. Sin embargo, es importante señalar la importancia de realizar investigaciones sobre la toxicidad subletal y crónica con concentraciones dependientes de diferentes factores de aplicación, las cuales pueden generar información sobre el comportamiento de los organismos expuestos a diferentes concentraciones del tóxico, y así proponer un nivel de seguridad que no tenga consecuencias en las diferentes actividades fisiológicas de los organismos. En el presente trabajo se aplicó el factor de 0.05 el cual fue seleccionado a partir de los resultados obtenidos de la serie de pruebas de toxicidad letal aguda, subletales y crónicas realizadas en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*. En la prueba letal aguda se consideraron los % de mortalidad y el consumo de alimento; en la pruebas subletales, el comportamiento de los niveles de oxihemocianina, glucosa y lactato; y en la prueba crónica, las tasas de crecimiento y supervivencia.

En la Tabla 49 se encuentran una revisión sobre niveles de seguridad de NAT y N-NO₂⁻ para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* a diferentes salinidades. Frías-Espericueta *et al.* (2000), estimó un nivel de seguridad de 1.22 mg/L de NAT para postlarvas PL9 en agua de mar (33 g/L); este valor es 55.7 y 32.8 % mayor al estimado en este trabajo para postlarvas PL20 a salinidades de 1 y 3 g/L; igualmente, el nivel de seguridad para juveniles de 3.8 g en agua de mar es 79.5 % mayor al calculado para juveniles de 3.3 g en una salinidad de 3 g/L (Tabla 43). Con postlarvas PL23 de *L. vannamei* a una salinidad de 1 y 2 g/L, Ramírez-Rochín *et al.* (2016) propusieron el nivel de seguridad de 0.35 y 0.62 mg/L de N-NO₂⁻ utilizando el factor de 0.05. Con el mismo factor de aplicación, los niveles de seguridad de N-NO₂⁻ estimados en este estudio para PL20 a las salinidades de 1 y 3 g/L fueron de 0.170 y 0.190 mg/L (Tabla 43) valores menores a los propuestos por Ramírez-Rochín *et al.* (2016). Ramírez-Rochín (2014), propuso un nivel de seguridad de 1.24 mg/L para juveniles de *L. vannamei* de 4.4 g a una salinidad de 2 g/L; este valor es 58.9 % mayor al propuesto en el presente trabajo para juveniles de 3.3 g a una salinidad de 3 g/L (0.53 mg/L de N-NO₂⁻) (Tabla 43).

En la Tabla 50 se muestran niveles de NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ presentes en los cultivos de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad. Es importante mencionar que los niveles de seguridad no solo pueden ser implementados en los sistemas de cultivo; estas concentraciones sirven para ser aplicados a ambientes naturales costeros que por las

actividades naturales y antropogénicas reciben aportes de aguas enriquecidas de nutrientes y/o otros contaminantes que pueden ocasionar problemas en los organismos que habitan esos ecosistemas. Piñón-Gimate *et al.* (2009) reportaron para las lagunas costeras de Sinaloa niveles promedio máximos y mínimos de NAT y N-NO_3^- de 0.107 ± 0.047 y 0.061 ± 0.107 mg/L, respectivamente.

El ciclo de vida del camarón *L. vannamei* se lleva en dos tipos de ecosistemas: marinos y estuarino (Morales, 1990); este último presenta cambios físico-químicos, principalmente la salinidad en ciertas épocas del año. *L. vannamei*, es una especie que puede tolerar un amplio rango de salinidades (0.5-45 g/L) (Bray *et al.*, 1994); esa tolerancia le permite hacer frente a los cambios bruscos de salinidad que pueden presentar los ecosistemas en los cuales habitan; sin embargo, como ya se mencionó, los ecosistemas acuáticos pueden recibir aportes de amonio, nitritos y/o nitratos que pueden estar en concentraciones moderadamente altas y ocasionar problemas en la población de camarones; por ello, es importante que los niveles de seguridad para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en baja salinidad (1 y 3 g/L) establecidos en el presente trabajo puedan servir como base para implementarse en cuerpos de aguas naturales.

Tabla 49. Niveles de seguridad de NAT y N-NO₂⁻ para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* a diferentes salinidades

Edad/Talla	Tóxico	Salinidad g/L	Nivel de seguridad (mg/L)	Referencia
PL9	NAT	33	1.22	Frías-Espéricueta <i>et al.</i> (2000)
0.99 g	NAT	33	6.52	Frías-Espéricueta <i>et al.</i> (1999)
3.8 g	NAT	33	7.09	Frías-Espéricueta <i>et al.</i> (1999)
22 cm	NAT	15	2.44	Lin <i>et al.</i> (2001)
22 cm	NAT	25	3.55	Lin <i>et al.</i> (2001)
22 cm	NAT	35	3.95	Lin <i>et al.</i> (2001)
56 cm	N-NO ₂ ⁻	15	6.1	Lin y Chen (2003)
56 cm	N-NO ₂ ⁻	25	15.2	Lin y Chen (2003)
56 cm	N-NO ₂ ⁻	35	25.7	Lin y Chen (2003)
0.21g	N-NO ₂ ⁻	2	0.45	Gross <i>et al.</i> (2004)
PL23	N-NO ₂ ⁻	0.6	0.28	Ramírez-Rochín <i>et al.</i> (2016)
PL23	N-NO ₂ ⁻	1	0.35	Ramírez-Rochín <i>et al.</i> (2016)
PL23	N-NO ₂ ⁻	2	0.62	Ramírez-Rochín <i>et al.</i> (2016)
4.4g	N-NO ₂ ⁻	2	1.24	Ramírez-Rochín (2014)
4.4g	N-NO ₂ ⁻	1	0.70	Ramírez-Rochín (2014)
4.4 g	N-NO ₂ ⁻	0.6	0.50	Ramírez-Rochín (2014)
PL20	NAT	1	0.54	Este estudio
PL20	NAT	3	0.82	Este estudio
PL20	N-NH ₃	1	0.05	Este estudio
PL20	N-NH ₃	3	0.06	Este estudio
PL20	N-NO ₂ ⁻	1	0.17	Este estudio
PL20	N-NO ₂ ⁻	3	0.19	Este estudio
PL20	N-NO ₃ ⁻	1	5.64	Este estudio
PL20	N-NO ₃ ⁻	3	21.50	Este estudio
PL20	NAT/N-NO ₂ ⁻ /NNO ₃ ⁻	1	0.02*	Este estudio
PL20	NAT/N-NO ₂ ⁻ /NNO ₃ ⁻	3	0.03*	Este estudio
PL20	NAT/N-NO ₂ ⁻	3	0.033*	Este estudio
PL20	NAT/N-NO ₃	3	0.032*	Este estudio
PL20	N-NO ₂ /N-NO ₃ ⁻	3	0.039*	Este estudio
Juveniles (3.3 g)	NAT	3	1.45	Este estudio
Juveniles (3.3 g)	N-NH ₃	3	0.13	Este estudio
Juveniles (3.3 g)	N-NO ₂ ⁻	3	0.53	Este estudio
Juveniles (3.3 g)	N-NO ₃	3	45.00	Este estudio
Juveniles (3.3 g)	NAT/N-NO ₂ ⁻ /NNO ₃ ⁻	3	0.05*	Este estudio

* Corresponde a la UT

Tabla 50. Niveles de NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ (mg/L) presentes en cultivos de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad.

Salinidad (g/L)	Duración (días)	NAT	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	Referencia
0.65	140	0.20	0.58	419.4	Mariscal-Lagarda <i>et al.</i> (2012)
2.9	105	0.19	0.03	0.0	Prapaigong y Boyd (2012)
1.0	84	0.002	0.07	1.225	Esparza-Leal <i>et al.</i> (2010)
1.7	28	0.05	3.38	---	Valencia-Castañeda <i>et al.</i> (2017)
2.2	105	15.0	<0.02	15.0	Samocha <i>et al.</i> (2004)
1.9	70	2.31	0.18	6.8	Fregoso-López <i>et al.</i> (2017)

--- No disponible

9.0. CONCLUSIONES

1. La comparación de 4 tratamientos para evaluar la toxicidad aguda de nitritos en postlarvas *L. vannamei*, indica que: (i) los valores de CL_{50} de $N-NO_2^-$ que se estimaron con las concentraciones determinadas analíticamente a las 0 h y cada 24 h son diferentes entre los tratamientos T1 (no alimentación + estático) y T4 (alimentación + estático), lo que indica que la alimentación influye en la estimación de la CL_{50} ; (ii) cuando las concentraciones iniciales y finales de $N-NO_2^-$ se utilizan para estimar la CL_{50} , obteniendo el promedio de la CL_{50} , presumiblemente más representativo, se generan valores diferentes de CL_{50} a las 96 h de $N-NO_2^-$ a partir de los cuatro diferentes tratamientos examinados ($T2 > T3 > T1, T4$); (iii) considerando la magnitud y variación de los valores de CL_{50} y la mortalidad de los controles, se recomienda el método estático con renovación y alimentación (T2), sin embargo, si se trata de evaluar parámetros bioquímicos que pueden alterarse con la alimentación, se recomienda el tratamiento que implica no alimentar con el método estático (T1).
2. Las CL_{50} a las 96 h de NAT, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ para postlarvas de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad de 1 y 3 g/L fueron de 10.8 y 16.3, 3.3 y 4.9, y 112.8 y 340.0 mg/L, respectivamente.
3. Las CL_{50} a las 96 h de NAT, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$ para juveniles de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad de 3 g/L fueron de 29.0, 10.6 y 900.1 mg/L, en ese orden.
4. Las UT_{50} a las 96 h de NAT/ $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ (RT=1:1:1) para postlarvas *L. vannamei* en las salinidades de 1, 3 y 25 g/L fueron 0.44, 0.68 y 1.12 unidades, respectivamente.
5. Los respectivos valores de UT_{50} a las 96 h de NAT/ $N-NO_2^-$, NAT/ $N-NO_3^-$ y $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ (RT=1:1) para postlarvas de *L. vannamei* en las salinidades de 3 g/L fueron 1.12, 0.64 y 0.78 unidades.
6. Las UT_{50} a las 96 h de NAT/ $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ (RT=1:1:1) para juveniles de *L. vannamei* en las salinidades de 3 y 25 g/L fueron 0.99 y 1.31 UT, en ese orden.
7. El efecto de la interacción de las mezclas NAT/ $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ en las salinidades de 1 y 3 g/L y en las mezclas de NAT/ $N-NO_2^-$ y $N-NO_2^-$ / $N-NO_3^-$ a salinidades de 3

g/L en postlarvas de *L. vannamei* fue sinérgico a las 48, 72 y 96 h de exposición. Sin embargo, en la mezcla de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ a la salinidad de 25 g/L en postlarvas, el efecto a las 24 h fue antagónico, mientras que a las 48, 72 y 96 h el efecto fue aditivo; este mismo efecto aditivo se mostró en la mezcla de de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ y NAT/N-NO₃⁻ a las 24 h de exposición en postlarvas. El efecto en la mezcla de N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ a salinidades de 3 g/L en postlarvas de *L. vannamei* fue antagónico a las 24 h, aditivo a las 48 h y sinérgico a las 72 y 96 h. En la interacción de NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ a 3 y 25 g/L de salinidad en juveniles de *L. vannamei* el efecto fue antagónico.

8. El proceso de ecdisis no evidenció una tendencia que mostrará efectos letales ocasionada por la exposición de los tóxicos en ninguna de las pruebas individuales y en combinación en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*. En cuanto al consumo de alimento, en todas las pruebas de toxicidad aguda se observó una disminución conforme pasaban las horas de exposición; sin embargo, fue más notable en las pruebas de N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ a la salinidad de 1 g/L en postlarvas, y en las pruebas de NO₂, N-NO₃⁻ y NAT/N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ en juveniles.
9. Las tasas de crecimiento de *L. vannamei* expuesto a concentraciones de 0, 5 y 10 % de NAT a una salinidad de 3 g/L fueron de 0.61±0.02, 0.54±0.06 y 0.46±0.21 g/sem, respectivamente; mientras que a una salinidad de 25 g/L fueron de 1.69±0.04, 1.62±0.07 y 1.65±0.01 g/sem, en ese orden. En el 0, 5 y 10 % de N-NO₂⁻ a una salinidad de 3 g/L fueron de 0.61±0.02, 0.50±0.05, 0.41±0.09 g/sem, respectivamente; mientras que a una salinidad de 25 g/L fueron 1.62±0.05, 1.66±0.04 y 1.69±0.04, en orden. Y a 0, 5 y 10 % de NAT/N-NO₂⁻ a una salinidad de 3 g/L fueron de 0.61±0.02, 0.49±0.03 y 0.36±0.14 g/sem, correspondientemente; mientras que a la salinidad de 25 g/L fueron 1.69±0.04, 1.61±0.04 y 1.63±0.03 g/sem, respectivamente.
10. Los niveles de oxihemocianina, glucosa y lactato en la hemolinfa de juveniles *L. vannamei* expuestos a NAT, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ mostraron alteraciones en sus niveles conforme pasaron los tiempos de exposición y fue más evidente en el 50 % del valor de la CL₅₀ a las 96 h de cada tóxico. Los cambios en los niveles de

oxihemocianina fueron más evidentes en la prueba de N-NO_2^- ; sin embargo, los niveles de glucosa y lactato mostraron mayores alteraciones en la prueba de NAT.

11. Los respectivos niveles de seguridad de NAT, N-NH_3 , N-NO_2^- , N-NO_3^- y la mezcla de $\text{NAT/N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ a la salinidad de 1 y 3 g/L para postlarvas (PL20) de *L. vannamei* son 0.54 y 0.82 mg/L, 0.050 y 0.055 mg/L, 0.170 y 0.190 mg/L, 5.64 y 21.50 mg/L, 0.022 y 0.34 UT; mientras que los niveles de seguridad para las mezclas de NAT/N-NO_2^- , NAT/N-NO_3^- y $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ a la salinidad de 3 g/L son 0.033, 0.032 y 0.039 UT, en el orden.
12. Los niveles de seguridad de NAT, N-NH_3 , N-NO_2^- , N-NO_3^- y la mezcla de $\text{NAT/N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$ a la salinidad de 3 g/L para juveniles (3.3 g) de *L. vannamei* son 1.45 mg/L, 0.13 mg/L, 0.53 mg/L, 45 mg/L y 0.050 UT, en orden.
13. Los niveles de seguridad de NAT, N-NO_2^- y N-NO_3^- para el cultivo de postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en aguas de baja salinidad de 1 y 3 g/L, son menores que los establecidos para cultivos en aguas marinas o salobres; y la toxicidad de los tres compuestos del nitrógeno es más aguda conforme disminuye la salinidad de 3 a 1 g/L.
14. Esta investigación generó información sobre la toxicidad individual y en combinación de amonio, nitritos y nitratos para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en ambientes de aguas de baja salinidad (< 3 g/L); cada uno de los resultados obtenidos de las diferentes pruebas de toxicidad fueron trascendentales para proponer los niveles de seguridad para esta especie y que serán útiles para la camaronicultura en ambientes de baja salinidad, así también para aquellos ecosistemas acuáticos con aportes de agua dulce y marina que en diferentes épocas del año su salinidad puede ser < 3 g/L y que son vulnerables a recibir descargas con niveles moderados o altos de compuestos nitrogenados donde *L. vannamei* puede estar presente por el desarrollo de su ciclo de vida.

10. LITERATURA CITADA

- Abel, P.D. (1989). *Water Pollution Biology*. Chichester: Ellis Horwood, London.
- Abel, P.D., Axiak, V. (1991). *Ecotoxicology and the marine environment*. Ellis Horwood, London 264 p.
- Ahsanullah, M., Arnott, G.H. (1978). Acute toxicity of copper, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. I. Effects of individual metals. *Marine Biology* 64: 299-304.
- Alcaraz, G., Espinoza, V., Venegas, C., Chiappa-Carrara, X. (1999a). Acute effect of ammonia and nitrite on respiration of *Penaeus setiferus* postlarvae under different oxygen levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 30:98-106.
- Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., Espinoza, V., Vanegas, C. (1999b). Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 30:90-97.
- Allan, G. L., Maguire, G.B., Hopkins, S.J. (1990). Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. *Aquaculture* 91: 265-280.
- Anger, K., Charmantier, G. (2000). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in a mangrove crab, *Sesarma curacaoense* (Decapoda: Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 251:265-274.
- APHA-AWWA-WPCF. (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, America Water Works Association and Water Pollution Control Federation 18th ed. Washington, DC.
- Araneda, M., Pérez, E., Gasca, E. (2008). White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: conditions state based on length and weight. *Aquaculture* 283:13-18.
- Arcos F.G., Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I. (2005). Larval quality in relation to consecutive spawning in white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* 36:890-897.
- Arellano, E. (1993). Guías técnicas en el cultivo de larvas de camarón. En: Calderón J & S Sonnenholzner (eds). *En memoria de Edgar Arellano*. Once años dedicados a la

- investigación y desarrollo de la acuicultura en el Ecuador 1:1- 231. CENAIM, Guayaquil, Ecuador.
- Armienta, M.A., Zamora, V., Juárez, S.F. (1987). Manual para el Análisis Químico de Aguas Naturales, en el Campo y en el Laboratorio: México D.F., Instituto de Geofísica, Universidad Nacional autónoma de México, Comunicaciones técnicas, Serie Docencia y Divulgación No. 4, 83.
- Armstrong, D.A., Chippendale, D., Knight, A.W., Colt, J.E. (1978). Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. Biology Bulletin 154:15-31.
- Armstrong, D.A., Stephenson, M.J., Knight, A.W. (1976). Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 9:39-46.
- Balbi, F., Rosas, J., Velásquez, A., Cabrera, T., Maneiro, C. (2005). Aclimatación a baja salinidad de camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) provenientes de criaderos comerciales. Revista de Biología Marina y Oceanografía 40:109-115.
- Barbieri, E. (2010). Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. Aquaculture 306:329–333.
- Bardach E.J., McLarner, O.W., Ryther, H.J. (1986). Acuicultura. Crianza y Cultivo de Organismos Marinos y de Agua Dulce. 1a ed. A.G.T. Editor S.A. México D.F. 780.
- Bautista-Covarrubias, J.C., Velarde-Montes, G.J., Voltolina, D., Garcia-De la Parra, L.M., Soto-Jimenez, M.F., Frías-Espericueta, M.G. (2014). Humoral and hemocytic responses of *Litopenaeus vannamei* to Cd exposure. The Scientific World Journal 2014:1-6.
- Beitinger, T. L., Huey, D.W. (1981). Acute toxicity of nitrite to crayfish *Procambarus simulans* in varied environmental conditions. Environmental Pollution Series 26A:305-311.
- Bower, C.E., Bidwell, J.P. (1978). Ionization of ammonia in seawater: Effects of temperature, pH and salinity. Journal of Fisheries Research Board of Canada 35:1012-1016.
- Boyd, C.E. (1990). Water quality in ponds for aquaculture. Alabama, Agriculture Experimental Station. Auburn University, Auburn USA.

- Boyd, C.E. (1995). Bottom soils, sediments and pond aquaculture, Champan and Hall, Nueva York.
- Boyd, C.E. (2002). Standardize terminology for low salinity shrimp culture. *Global Aquaculture Advocate* 7:58-59.
- Boyd, C.E. (2009). Trace metals toxic at high concentrations. *Global Aquaculture Advocate* 12:24-26.
- Boyd, C.E., Thunjai, T. (2003). Concentrations of major ions in waters of inland shrimp farms in China, Ecuador, Thailand, and the United States. *Journal of the World Aquaculture Society* 34:524-532.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S. (1998). Pond aquaculture water quality management. Kluwer, Norwell, MA.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-253.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., Leung-Trujillo, J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture* 122:133-146.
- Brown, L.R. (2009). PlanB 4.0. Mobilizing to save civilization. Earth Policy Institute. Norton Books. New York. 368 p. También disponible en: http://www.earthpolicy.org/images/uploads/book_files/pb4book.pdf
- Buikema, A.L., Niederlehner, B.R., Cairns, J.Jr. (1982). Biological Monitoring. Toxicity testing. *Water Research* 16:239-262.
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58:1255-1267.
- Camargo, J.A., Ward, J.V. (1992). Short-term toxicity of sodium nitrate (NaNO₃) to no target freshwater invertebrates. *Chemosphere* 24:23-28.
- Camargo, J.A., Ward, J.V. (1995). Nitrate (NO₃-N) toxicity to aquatic life: a proposal of safe concentrations for two species of Nearctic freshwater invertebrates. *Chemosphere* 31:3211-3216.

- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Anger, K. (1998). Ontogeny of osmoregulation in the grapsid crab, *Armases miersii* (Crustacea: Decapoda). *Marine Ecology Progress Series* 164:285-292.
- Chen, J.C., Chen, J.M. (1997). Arginase specific activity and nitrogenous excretion of *Penaeus japonicus* exposed to elevated ambient ammonia. *Marine Ecology Progress Series* 153:197-202.
- Chen, J.C., Chen, S.F. (1992a). Accumulation of nitrite in hemolymph of *Penaeus japonicus*. *Marine Ecology Progress Series* 83:305-308.
- Chen, J.C., Chen, S.F. (1992b). Accumulation of nitrite in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 103:477-481.
- Chen, J.C., Chen, S.F. (1992c). Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 101:453-458.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y. (1993). Hemolymph PCO₂, hemocyanin, protein levels and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquatic Toxicology* 27: 281-292.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y. (1995). Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Aquatic Toxicology* 33:215-226.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y., Chen, C.T. (1994). Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 109:339-347.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y. (2000). Recovery of *Penaeus monodon* from functional anemia after exposure to sublethal concentration of nitrite at different pH levels. *Aquatic Toxicology* 50:73-83.
- Chen, J.C., Chin, T.S. (1988a). Acute toxicity of nitrite to tiger prawn, *Penaeus monodon*, larvae. *Aquaculture* 69:253-262.
- Chen, J.C., Chin, T.S. (1988b). Joint action of ammonia and nitrite on tiger prawn *Penaeus monodon* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 19:143-148.

- Chen, J.C., Kou, Y.Z. (1991). Accumulation of ammonia in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Diseases of Aquatic Organisms* 11:187-191.
- Chen, J.C., Kou, X.Z. (1993). Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 109:177-185.
- Chen, J.C., Lai, S.H. (1992). Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 102:129-133.
- Chen, J.C., Lee, Y. (1997). Effects of nitrite on mortality, ion regulation and acid-base balance of *Macrobrachium rosenbergii* at different chloride concentrations. *Aquatic Toxicology* 39:291-305.
- Chen, J.C. Lin, C.Y. (1992a). Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 102:287-291.
- Chen, J.C., Lin, C.Y. (1992b). Lethal effects of ammonia on *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 156:139-149.
- Chen, J.C., Lin, C.Y. (1991). Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus pencillatus* juveniles at two salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 100:477-482.
- Chen, J.C., Lin, M.N. (1991). Lethal and sub-lethal effects of ammonia to *Penaeus penicillatus* juveniles. *Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica* 30:73-80.
- Chen, J.C., Liu, P.C., Lei, S.C. (1990a). Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture* 89:127-137.
- Chen, J.C., Liu, P.C., Lin, Y.T., Lee, C.K. (1989). High-intensive culture study of tiger prawn *Penaeus monodon* in Taiwan, pp. 377-382. In: *Aquaculture—A Biotechnology in Progress* (De Pauw, N., E. Jaspers, H. Ackerfors, and N. Wilkins, Eds.). Bredene, Belgium: European Aquaculture Society.
- Chen, J.C., Liu, P.C., Nan, F.H. (1990). Lethal effect of nitrite to juvenile *Metapenaeus ensis*. *Journal Fish Society Taiwan* 17:109-115.

- Chen, J.C., Liu, P.C., Nan, F.H. (1991). Acute toxicity of ammonia to larval *Metapenaeus ensis*. *Asian Fisheries Society* 4:41-51.
- Chen, J.C., Nan, F.H. (1991). Lethal effect of nitrite on *Metapenaeus ensis* larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 22:51-56.
- Chen, J.C., Nan, F.H. (1992). Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*. *Aquatic Toxicology* 23:1-10.
- Chen, J.C., Nan, F.H., Cheng, S.Y., Sheen, S.S. (1993). Effects of ambient ammonia on ammonia-N and protein concentrations in hemolymph and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis*. *Marine Ecology Progress Series* 98:203-208.
- Chen, J.C., Ting, Y.Y., Lin, J.N., Lin, M.N. (1990). Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. *Marine Biology* 107:427-431.
- Chen, J.C., Tu, C.C. (1990). Acute toxicity of nitrite to larval *Penaeus japonicus*. *Journal of The Fisheries Society of Taiwan* 17:227-287.
- Chen, J.C., Tu, C.C., Yang, W.S. (1989). Acute toxicity of ammonia to larval *Penaeus japonicus*. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan* 16:261-270.
- Cheng, K.M., Hu, C.Q., Liu, Y.N., Zheng, S.X., Qi, X.J. (2005). Effects of dietary calcium, phosphorus and calcium/phosphorus ratio on the growth and tissue mineralization of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity water. *Aquaculture* 251:472-783.
- Cheng, S.Y., Chen, J.C. (1998). Effects of nitrite exposure on the hemolymph electrolyte, respiratory protein and free amino acid levels and water content of *Penaeus japonicus*. *Aquatic Toxicology* 44:129-139.
- Cheng, S.Y., Chen, J.C. (1999). Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology* 45:35-46.
- Cheng, S.Y., Chen, J.C. (2001). The time-course change of nitrogenous excretion in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure. *Aquatic Toxicology* 51:443-454.
- Cheng, S.Y., Chen, J.C. (2002a). Joint action of elevated ambient nitrite and nitrate on hemolymph nitrogenous compounds and nitrogen excretion of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 131:303-314.

- Cheng, S.Y., Chen, J.C. (2002b). Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicology* 61:181-193.
- Cheng, S.Y., Tsai, S.J., Chen, J.C. (2002). Accumulation of nitrate in the tissues of *Penaeus monodon* following elevated ambient nitrate exposure after different time periods. *Aquatic Toxicology* 56:133-146.
- Cheng, S.Y., Shieh, L.W., Chen, J.C. (2013). Changes in hemolymph oxyhemocyanin, acid-base balance, and electrolytes in *Marsupenaeus japonicus* under combined ammonia and nitrite stress. *Aquatic Toxicology* 130-131:132-138.
- Chin, T.S., Chen, J.C. (1987). Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 66:247-253.
- Castille, F.L., Lawrence, A.L. (1981). The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 68:75-80.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Trussell, R.R. (1998). Standards methods for the examination of water and wastewater, 17th edition. DHAAWWA. WPCCK. Washington D.C.
- Cobo M.L., Sonnenholzner, S., Wille, M., Sorgeloos, P. (2014). Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquacult. Res.*, 45:470-475.
- Collins, A., Russell, B., Walls, A., Hoang, T. (2005). Inland prawn farming: Studies into the potential for inland marine prawn farming in Queensland. Queensland, Australia: Queensland Government. Department of Primary Industries and Fisheries, 79 pp.
- Conrad, J.J., 1990. Nitrate Pollution and Politics. Aldershot, Avebury.
- Dahl, U., Gorokhova, E., Breitholtz, M. (2006). Application of growth-related sublethal endpoints in ecotoxicological assessments using harpacticoid copepod. *Aquaculture Toxicology* 77:433-438.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg P.C., Sharples, D.J. (1990). Osmotic and Ionic Regulation. En: Blaxter J.H.S y Southward A.J. (Eds.), Vol. 27, Academic Press N.Y. 203-211.
- Davis, D.A., Boyd, C.E., Rouse, D.B. (2005). Effects of potassium, magnesium and age on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* post-larvae reared in inland low

- salinity well waters in West Alabama. *Journal of the World Aquaculture Society* 36:416-419.
- Davis, D.A., Samocha, T.M., Boyd C.E. (2004). Acclimation pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, to inland, low-salinity waters. Southern regional Aquaculture Center Publication 2601.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257:346-358.
- Esparza-Leal, H.M., Ponce-Palafox, J.T., Valenzuela-Quiñónez, W., Arredondo-Figueroa, J.L., García-Ulloa, M. (2010). Effects of density on growth and survival of juvenile pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, reared in low-salinity well water. *Journal of the World Aquaculture Society* 41:648-654.
- Esparza-Leal, H.M., Ponce-Palafox, J.T., Valenzuela-Quiñónez, W., Cabanillas-Beltrán, H., Arredondo-Figueroa, J.L. (2009). The effect of low salinity water with different ionic composition on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in intensive culture". *Journal Applied Aquaculture* 21:215-227.
- FAO (Fisheries and Agriculture Organization). (2017). The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and department. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2017.
- FAO (Fisheries and Agriculture Organization). (2013). Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). Report No. 1053. FAO, Rome
- Fernando, C.H., Halwart, M. (2000). Possibilities for the integration of fish farming into irrigation systems. *Fisheries Management and Ecology* 7:45-54.
- Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. Cambridge University Press, 3th ed. Cambridge, 333.
- Flaherty, M., Vandergeest, P. (1998). Low-salinity shrimp aquaculture in Thailand: goodbye coastine, Hello Khon Kaen. *Environmental Management* 22:817-830.
- Flaherty, M., Szuzter, B., Miller, P. (2000). Low salinity inland shrimp farming in Thailand. *Ambio* 29:174-179.

- Fregoso-López, M.G., Morales-Covarrubias, M.S., Franco-Nava, M.A., Ramírez-Rochín, J., Fierro-Sañudo, J.F., Ponce-Palafox, J.T., Páez-Osuna, F. (2017). Histological alterations in gills of shrimp *Litopenaeus vannamei* in low-salinity waters under different stocking densities: Potential relationship with nitrogen compounds. *Aquaculture Research* 48:5854-5863.
- Frías-Espericueta, M.G. (2002). Estudio de la toxicidad aguda por Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn solos y combinados en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, 105 p.
- Frías-Espericueta, M.G., Abad-Rosales, S., Nevárez-Velázquez, A.C., Osuna-López, I., Páez-Osuna, F., Lozano-Olvera, R., Voltolina, D. (2008). Histological effects of a combination of heavy metals of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology* 89:152-157.
- Frías-Espericueta, M.G., Harfush-Melendez, M., Osuna-López, J.I., Páez-Osuna, F. (1999). Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62:646-652.
- Frías-Espericueta, M.G., Harfush-Melendez, M., Páez-Osuna, F. (2000). Effects of Ammonia on Mortality and Feeding of Postlarvae Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65:98-103.
- Frías-Espericueta, M.G., Voltolina, D., Osuna-Lopez, J.I. (2001). Acute Toxicity of Cadmium, Mercury, and Lead to whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Postlarvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67:580-586.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. (1983). *Methods of Seawater Analysis*, 2nd ed., Verlag Chemie GmbH, Deerfield Beach, Florida.
- Gross A., Abutbul S., Zilberg, D. (2004). Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *L. vannamei*, culture in low-salinity brackish water. *Journal of the World Aquaculture Society* 35:315-321.
- Harris, R.R., Coley, S. (1991). The effects of nitrite on chloride regulation in the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana (Crustacea: Decapoda). *Journal of Comparative Physiology B* 161:199-206.

- Hong, M., Chen, L., Sun, X., Gu, S., Zhang, L., Chen, Y. (2007). Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 145:363-369.
- Hong, M., Chen, L., Qin, J.G., Sun, X., Li, E., Gu, S., Yu, N. (2009). Acute tolerance and metabolic responses of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles to ambient nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 149:419-426.
- Huang, X.H., Li C.L., Zheng, L., Liu, C.W., Zhou, J. (2006). The toxicity of NO₂-N on *Litopenaeus vannamei* and effects of NO₂-N on factors relating to the anti-disease ability. *Acta Hydrobiologica Sinica* 30:466-471.
- Huey, D.M., Wooten, M.C., Freeman, L.A., Beitinger, T.L. (1982). Effect of pH and chloride on nitrite induced lethality in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 28:3-6.
- Iannacone, J., Alvariño, L., Mamani, N. (2011). Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furadán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 6:23-29.
- Industria Acuícola. (2008). 4:36-38.
- Ingram, B.A., Gooley, G.J., Mckinnon, L.J. (2000). Aquaculture-agriculture systems integration: an Australian prospective. *Fisheries Management and Ecology* 7:33-43.
- Israngkura, A., Sae-Hae, S. (2002). A review of the economic impacts of aquatic animal disease. 253-286. En: Primary aquatic animal health care in rural, small-scale, aquaculture development. (Arthur, J.R., Phillips, M.J., Subasinghe, R.P., Reantaso, M.B., MacRae, I.H., Eds.) FAO Fish. Tech. Pap. No. 406. 382.
- Jayasankar, P., Muthu, M.S. (1983). Toxicity of nitrite to the larvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian Journal of Fisheries* 30:231-240.
- Jeberg, M.V., Jensen, F.B. (1994). Extracellular and intracellular ionic changes in crayfish *Astacus astacus* exposed to nitrite at two acclimation temperatures. *Aquatic Toxicology* 29:65-72.

- Jensen, F.B. (1990). Sublethal physiological changes in freshwater crayfish, *Astacus astacus*, exposed to nitrite: haemolymph and muscle tissue electrolyte status and haemolymph acid-base balance and gas transport. *Aquatic Toxicology* 18:51-60.
- Jensen, F.B. (1995). Uptake and effects of nitrite and nitrate in animals, pp. 289–303. In: *Nitrogen Metabolism and Excretion* (Walsh, P. J., and P. Wright, Eds). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Jensen, F.B. (1996). Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Aquatic Toxicology* 34:95-104.
- Jeuniaux, C. (1971). Hemolymph-Arthropoda. In *Chemical Zoology*. Vol. VI. Arthropoda, Part B (Edited by Florkin M. and Scheer B. J.), pp. 63-118. Academic Press, New York.
- Kir, M., Kumlu, M. (2006). Acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* postlarvae in relation to salinity. *Journal of the World Aquaculture Society* 37:231-235.
- Kir, M., Kumlu, M., Eroldogan, O.T. (2004). Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* juveniles. *Aquaculture* 241:479-489.
- Koo, J.G., Kim, S.G., Jee, J.H., Kim, J.M., Bai, S.C., Kang, J.C. (2005). Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and moulting in juvenile tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus). *Aquaculture Research* 36:79-85.
- Kuhn, D.D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Angier, M.W., Marsh, L., Flick Jr, G.J. (2010). Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture* 309:109-114.
- Leaño, E.M., Mohan, C.V. (2012). Early mortality syndrome (EMS)/ acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS): an emerging threat to the Asian shrimp industry.
- Lee, D., Wickins, J.F. (1997). *Cultivo de Crustáceos*. Acribia, S. A. Zaragoza-España. 449.
- Lee, W.C., Chen, J.C. (2003). Hemolymph ammonia, urea and uric acid levels and nitrogenous excretion of *Marsupenaeus japonicus* at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 288:39-49.

- Lemmonnier, H., Herbland, A., Sallery, L. Soulard, B. (2006). “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow out ponds in New Caledonia: Zootechnical and environmental factors. *Aquaculture* 261:1039-1047.
- Li, E.C., Chen, L.Q., Chen, C., Zeng, X.M., Chen, N., Yu, Q.M., Lai, J.G. (2007). Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture* 265:385-390.
- Lightner, D.V., Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164:201-220.
- Lin, H., Thuet, P., Trilles, J.P., Mounet-Guillaume, R., Charmantier, G. (1993). Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Marine Biology* 117:591-598.
- Lin, Y.C., Chen, J.C. (2001). Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 259:109-119.
- Lin, Y.C., Chen, J.C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 224:193-201.
- Liu, C.H., Chen, J.C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 16:321-334.
- Lloyd, R. (1961). The toxicity of mixture of zinc and copper sulphates to rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Annals of Applied Biology* 49:535-538.
- Lyle-Fritch, L.P., Romero-Beltrán, E., Páez-Osuna, F. (2006). A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). *Aquacultural Engineering* 35:135-146.
- Mallasen, M., Valenti, W.C., Ismael, D. (2004). Effects of nitrate concentration of larval development of the giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Applied Aquaculture* 14:55-69.

- Manthe, D.P., Malone, R.F., Kumar, S. (1984). Limiting factors associated with nitrification in closed blue crab shedding systems. *Aquacultural Engineering* 2:119-140.
- Mariño-Balsa, J.C., Poza, E., Vázquez, E., Beiras, R. (2000). Comparative toxicity of dissolved metals to early larval stages of *Palaemon serratus*, *Maja squinado*, and *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39:345-351.
- Mariscal-Lagarda, M., Páez-Osuna, F., Esquer-Méndez J.L., Guerrero-Monroy, I., Félix-Gastelum, R. (2012). Integrated culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) with low salinity groundwater: management and production. *Aquaculture* 366:76-84.
- McGraw, W., Davis, D., Teichert-Coddington, D., Rouse, D. (2002). Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity, endpoint, and rate of salinity reduction. *Journal of World Aquaculture Society* 33:78-84.
- McGraw, W., Scarpa, J. (2002). Determining ion concentrations for *Litopenaeus vannamei* culture in freshwater. *Global Aquaculture Advocate* 5:36.
- McIntosh, D., Fitzsimmons, K. (2003). Characterization of effluent from an inland, low salinity shrimp farm: what contribution could this water make if use for irrigation. *Aquaculture Engineering* 27:147-156.
- Meade, M.E., Watts, S.A. (1995). Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to juvenile Australia crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal Shellfish Research* 14:341-346.
- Mendoza, R. (1992). Etude de la vitellogénese et de sa stimulation chez les crevettes péneides par des facteurs hétérologues et homologues. Thèse de Doctorat; Université de Bretagne Occidentale.
- Millán-Almaraz, M.I. (2013). Evaluación del uso de las aguas superficiales y de acuíferos del Noroeste de México para el cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) a través de su caracterización química: iones mayoritarios, nutrientes y oligoelementos. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. 163 p.
- Millero, F. (2006). *Chemical Oceanography*. 3a. ed. Marine Science Series. Boca Raton, Florida, CRC Press, 496 pp.

- Morales, V. (1990). Levantamiento larvario de camarones peneidos. Cartilla Predepesca, 1 p.
- Moss, M.S., Arce, M.S., Argue, J.B., Otoshi., A.C., Calderón, O.R.F., Tacón, J.G.A. (2001). Greening of the blue revolution: efforts toward environmentally responsible shrimp culture, Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Baton Rouge, USA. 1-19.
- Muir, P.R., Sutton, D.C., Owens, I. (1991). Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoa. *Marine Biology* 108:67-71.
- NACA (Network of Aquaculture Centres in Asia Pacific). (2012). Diseases of crustaceans acute hepa topancreatic necrosis syndrome (AHPNS). This disease card was prepared based on the outcomes of the Asia Pacific Emergency Regional Consultation on Early Mortality Syndrome (EMS)/Acute Hepatopancreatic Necrosis Syn- drome (AHPNS) held in Bangkok, Thailand, on 9-10 August 2012.5m Publishing, Sheffield.
- Nan, F.H., Chen, J.C. (1991). Lethal effect of ammonia to juvenile *Metapenaeus ensis*. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan* 18:41-46.
- Naqvi, A., Adhikari, A.S., Pillai, B.R., Sarangi, N. (2007). Effect of ammonia-N on growth and feeding of juvenile *Macrobrachium rosenbergii* (De-Man). *Aquaculture Research* 38:847-851.
- Neil, L., Fotedar, L.R., Shelley, C.C. (2005). Effects of acute and chronic toxicity of unionized ammonia on mud crab, *Scylla serrata* (Forssk°al. 1755) larvae. *Aquaculture Research* 36:927-932.
- Newman M.C., Unger, M.A. (2003). *Fundamentals of Ecotoxicology*, Second Edition. Boca Raton Florida; Lewis Publishers, CRC Press, 458 pp.
- Nickerson, K.W., Van Holde, K.E. (1971). A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin. I. Circular dichroism and absorption spectra. *Comparative Biochemistry and Physiology* 39B:855-872.
- Nunes, A., Velasquez, C. (2001). Low-salinity, inland shrimp culture in Brazil and Ecuador: economic, disease issues move farms away from coasts. *The Global Aquaculture Advocate* 4:62-64.

- Ostrensky, A., Poersh, L.H. (1992). Toxicidade aguda do nitrito na larviculturado camararosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante. 1967. *Nerítica Curitiba* 7:101-107.
- Ostrensky, A., Wasielesky, W. (1995). Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Sao Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture* 132:339-347.
- Páez-Osuna, F. (2001a). The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects, and mitigating alternatives. *Environmental Management* 28:131-140.
- Páez-Osuna, F. (2001b). *Camaronicultura y Medio Ambiente*, Páez-Osuna F. UNAM y El Colegio de Sinaloa, México: 448.
- Páez-Osuna, F., Frías-Espericueta, M.F. (2011). Principios de Ecotoxicología. In: Metales en Camarón de Cultivo y Silvestre: importancia, efectos y transferencia trófica. UNAM, El Colegio de Sinaloa, Universidad Politécnica de Sinaloa, Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora, 31-54 p.
- Páez-Osuna, F., Gracia-Gasca, A., Flores-Verdugo, F., Lyle-Fritch, M.L., Alonso-Rodríguez, R., Roque, A., Ruiz-Fernández, A.C. (2003). Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin* 46:806-815.
- Páez-Osuna, F., Valencia-Castañeda, G. (2013). Calidad del agua en cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con baja salinidad. En *Camaronicultura en agua de baja salinidad: alternativa acuícola*. Editor: María Soledad Morales Covarrubias. CIAD, México.
- Palacios, E., Racotta, I.S. (2007). Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. *Aquaculture* 268:123-135.
- Pascual-Jiménez, C. (2013). Los inmunoaditivos para la camaronicultura, mitos y realidades. *Memorias del 1er Congreso Internacional de Acuicultura (2014)*. México, DF. 83-87.
- Pedersen, F., Petersen, G.I. (1996). Variability of species sensitivity to complex mixtures. *Water Science & Technology* 33:109-119.

- Pérez Farfante, I., Kensley, B. (1997). Penaeid and sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses. *Me'moires du Muse'um National D'Histoire Naturelle*, Paris, 233.
- Pierce, R.H., Weeks, J.M. (1993). Nitrate toxicity to five species of marine fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:105-107.
- Piferrer, F. (2005). Las dos caras de Jano de la acuicultura: necesidad de recursos marinos y riesgos ecológicos. X Congreso Nacional de Acuicultura, Gandía (Valencia), España, 17-21 de Octubre 2005 <http://www.observatorioacuicultura.org/downloads/publicaciones/documentos/calidad.pdf> (consultado en la red mundial, 25 de febrero 2008).
- Piñón-Gimate, A., Soto-Jiménez, M.F., Ochoa-Izaguirre, M.J., García-Pagéz, E., Páez-Osuna, F. (2009). Macroalgae blooms and $\delta^{15}\text{N}$ in subtropical coastal lagoons from the Southeastern Gulf of California: Discrimination among agricultural, shrimp farm and sewage effluents. *Marine Pollution Bulletin* 58: 1144-1151.
- Porubcan, R.S. (1996). Control de *Vibrio* y virus en la acuicultura de camarón: últimos desarrollos en el manejo de estanquería y ecología microbiana. *Memorias 3er Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 11 al 13 de noviembre de 1996, UANL, Monterrey, Nuevo León, México.
- Prapaiwong, N., Boyd, C.E. (2012). Water temperature in inland, low salinity shrimp ponds in Alabama. *Journal of Applied Aquaculture* 24:334-341.
- Racotta, I.S., Hernández-Herrera, R. (2000). Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte A* 125:437-443.
- Ramirez-Rochín, J. (2014). Estudio sobre el efecto del nitrito en postlarvas y juveniles de *Litopenaeus vannamei* expuestos a baja salinidad. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias en Recursos Acuáticos. UAS, 110 p.
- Ramírez-Rochín, J., Frías-Espéricueta, M.G., Fierro-Sañudo, J.F., Alarcón-Silva, S.G., Fregoso-López, M.G., Páez-Osuna, F. (2017). Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water. *Aquaculture Research*, 48:2337-2343.

- Re, A.D., Díaz, F., Sierra, E., 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* 30:443-453.
- Rojas, A.A., Haws, M.C., Cbanillas, J.A. (2005). Buenas practicas de manejo para el cultivo de camarón. The David and Lucile Packard Foundation. United States. Agency for International Development (Cooperative Agreement No. PCE-A-00-95-0030-05).
- Romano, N., Zeng, C. (2007a). Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated histological gill alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture* 266:246-254.
- Romano, N., Zeng, C. (2007b). Acute toxicity of ammonia and its effects on the haemolymph osmolality, ammonia-N, pH and ionic composition of early juvenile mud crabs, *Scylla serrata* (Forsk^oal). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 148:278-285.
- Romano, N., Zeng, C. (2007c). Acute toxicity of sodium nitrate, potassium nitrate and potassium chloride and their effects on the haemolymph composition and gill structure of early juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1955-1962.
- Romano, N., Zeng, C. (2007d). Effects of potassium on nitrate mediated changes to osmoregulation in marine crabs. *Aquatic Toxicology* 85:202-208.
- Romano, N., Zeng, C. (2009a). Evaluating the newly proposed protocol of incorporated potassium in nitrate toxicity experiments at different salinities: A case study with the tiger prawn, *Penaeus monodon*, juveniles. *Aquaculture* 289:304-309.
- Romano, N., Zeng, C. (2009b). Subchronic exposure to nitrite, potassium and their combination on survival, growth, total haemocyte count and gill structure of juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 72: 1287-1295.

- Romano, N., Zeng, C. (2010). Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 151:222-228.
- Romano, N., Zeng, C. (2012). Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture* 334-337:012-23.
- Romano, N., Zeng, C. (2013). Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapods crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanism. *Reviews in Fisheries Science* 21:1-21.
- Roy, L.A., Davis, D.A., Saoud, I.P., Boyd, C.A., Pine, H.J., Boyd, C.E. (2010). Shrimp culture in inland low salinity waters. *Aquaculture* 2:191-208.
- Roy, L.A., Davis, D.A., Saoud, I.P., Henry, R.P. (2007). Effects of varying levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth, and respiration of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture* 262:461-469.
- Roy, L.A., Davis, D.A., Whitis, G.N. (2009). Pond-to-pond variability in post-larval shrimp, *Litopenaeus vannamei*, survival and growth in inland low-salinity waters of west Alabama. *Aquaculture Research* 40:1823-1829.
- Rubin, A.J., Elmaraghy, G.A. (1977). Studies on the toxicity of ammonia, nitrate and their mixtures to guppy fry. *Water Research* 11:927-935.
- Samocha, T.M., Lawrence, A.L., Collins, C.A., Castille, F.L., Bray, W.A., Davies, C.J., Lee, P.G., Wood, G.F. (2004). Production of the pacific white shrimp, *L. vannamei*, in high density greenhouse enclosed raceways using low salinity groundwater. *Journal of Applied Aquaculture* 15:1-19.
- Saoud, I.P., Davis, D.A., Rouse, D.B. (2003). Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture* 217:373-383.
- Saoud, I.P., Roy, L.A., Davis, D.A. (2011). Chelated potassium and arginine supplementation in diets of pacific white shrimp reared in low-salinity waters of west Alabama. *North American Journal of Aquaculture* 69:265-270.

- Schryver, P., Defoirdt T., Sorgeloos, P. (2014). Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? PLoS Pathog 10(4): e1003919. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003919>.
- Schuler, D.J. (2008). Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp (*L. vannamei*) at low salinities. Thesis of Science Master. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. 78 pp.
- Schuler, D.J., Boardman, G.D., Kuhn, D.D., Flick, G.J. (2010). Acute toxicity of ammonia and nitrite to pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. Journal of the World Aquaculture Society 41:438-446.
- Scott, G., Crunkilton, R.L. (2000). Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*. Environmental Toxicology Chemistry 19:2918-2922.
- Seneriches-Abiera, M. L., Parado-Esteba, F., Gonzales, G.A. (2007). Acute toxicity of nitrite to mud crab *Scylla serrata* (Forssk°al) larvae. Aquaculture Research 38:1495-1499.
- Soderberg, R.W., Meade, J.W. (1991). The effects of ionic strength on un-ionized ammonia concentration. The Progressive Fish-Culturist 53:118-120.
- Solórzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. Limnology and Oceanography 14:799-801.
- Sprague, J.B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish III. Sublethal effects and "safe" concentrations. Water Research 5:245-266.
- Sowers, A.D., Young, S.P., Isely, J.J., Browdy, C.L., Tomasso Jr, J.R. (2004). Nitrite toxicity to *Litopenaeus vannamei* in water containing low concentrations of sea salt or mixed salts. Journal of the World Aquaculture Society 35:445-451.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bulletin 167 (2ª edición). Fisheries Research Board of Canada.
- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P. Decamp, O.E. (2002). Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition 8:121-139.

- Tahon, J.P., Van Hoof, D., Vinckier, C., Witters, R., Deley, M., Lontie, R. (1988). The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *Biochemical Journal* 249:891-896.
- The Fish Site. (2017). Fighting EMS shrimp disease in Mexico. Available at: www.thefishsite.com (acceso 15 Feb 2017).
- Tsai, S.J., Chen, J.C. (2002). Acute toxicity of nitrate on *Penaeus monodon* juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 213:163-170.
- Tseng, I.T., Chen, J.C. (2004). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology* 17:325-333.
- Valencia-Castañeda, G. (2013). Respuesta de *Litopenaeus vannamei* a diferentes aguas de baja salinidad del Noroeste de México: evaluación de la supervivencia y crecimiento en el corto y mediano plazo. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, 122 p.
- Valencia-Castañeda, G., Millán-Almaraz, M.I., Fierro-Sañudo, J.F., Fregoso-López, M.G., Páez-osuna, F. (2017). Monitoring of inland waters for culturing shrimp *Litopenaeus vannamei*: application of a method based on survival and chemical composition. *Environmental Monitoring and Assessment* 189 (8):395.
- Valencia-Castañeda, G., Vanegas-Pérez R.C., Frías-Espericueta M.G., Chávez-Sánchez M.C., Ramírez-Rochín, J., Páez-Osuna F. (2018). Comparison of four treatments to evaluate acute toxicity of nitrite in shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae: Influence of feeding and the renewal water. *Aquaculture* 491: 375-380.
- Valencia-Castañeda, G., Frías-Espericueta M.G., Vanegas-Pérez R.C., Pérez-Ramírez J.A., Chávez-Sánchez M.C., Páez-Osuna F. (2018). Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae in low-salinity water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. (en prensa).
- Van Wyk, P. (1999). Economics of shrimp culture in recirculating aquaculture systems, Florida Department of Agriculture and Consumer Services (eds.), USA: 179-208.
- Van Wyk, P., Davis-Hodkings, M., Laramore, C.R., Main, K.L., Mountain, J., Scarpa, J. (1999). Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. FDACS contract

- #4520 documents. Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Tallahassee, Florida, USA.
- Van Wyk, P., Scarpa, J. (1999). Water quality requirements and management in farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Harbour Branch Oceanic Institution. Department of Agriculture and Consumer Services, Florida. 20.
- Vanegas, C., Espina, S., Botello, A.V., Villanueva, S. (1997). Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in White shrimp, *Penaeus setiferus* juveniles. Bulletin Environmental Contamination Toxicology 58:87-92.
- Vanegas, C., Zúñiga-Lagunas, S., Gaxiola-Cortez, G., Robles-Mendoza, C., Betancourt-Lozano, M. (2008). Ensayos de toxicidad aguda con camarones peneidos. En: 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. México, D.F. 414 p.
- Wang, A.L., Wang, W.N., Wang, Y., Shang, L.X., Liu, Y., Sun, R.Y. (2003). Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption, ammonia-N excretion and Na⁺/K⁺ ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia. Aquaculture 220:833-841.
- Wang, J.K. (2003). Conceptual design of a microalgae-based recirculating oyster and shrimp system. Aquaculture Engineering 28:37-46.
- Wang, W.N., Wang, A.L., Zhang, Y.J. (2006). Effect of dietary higher level of selenium and nitrite concentration on the cellular defense response of *Penaeus vannamei*. Aquaculture 256:558-563.
- Wassenberg, T.J., Hill, B.J. (1984). Moulting behaviour of the tiger prawn *Penaeus esculentus* (Haswell). Australian Journal of Marine and Freshwater Research 35:561-571.
- Weihrauch, D., Morris, S., Towle, D.W. (2004). Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs-A review. Journal of Experimental Biology 207:4491-4504.
- Wickins, J.F. (1976). The tolerance of warm-water shrimps to recirculated water. Aquaculture 9:19-37.

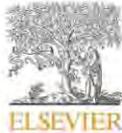
- Williams, E.M., Eddy, F.B. (1988). Anion transport, chloride cell number and nitrite induced methaemoglobinaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology* 13:29-42.
- Williams, E.M., Glass, M.L., Heisler, N. (1993). Effects of nitrite-induced methaemoglobinaemia on oxygen affinity of carp blood. *Environmental Biology of Fishes* 37:407-413.
- Wudtisin, I., Boyd, C.E. (2011). Possible potassium and magnesium limitations for shrimp survival and production in low-salinity, pond waters in Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society* 42:766-777.
- Xian, J.A., Wang, A.L., Chen, X.D., Gou, N.N., Miao, Y.T., Liao, S.A., Ye, C.X. (2011). Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. Short communication. *Aquaculture* 317:240-244.
- Yildiz, H.Y., Benli, A.C.K. (2004). Nitrite toxicity to crayfish, *Astacus leptodactylus*, the effects of sublethal nitrite exposure on hemolymph nitrite, total haemocytes counts and hemolymph glucose. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59:370-375.
- Zar, J. (1984). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. New Jersey. 717.
- Zhao, J.H., Lam, T.J., Guo, J.Y. (1997). Acute toxicity of ammonia to the early stage-larvae and juveniles of *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards, 1853 (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquaculture Research* 28:517-525.
- Zhang, P., Zhang, X., Li, J., Gao, T. (2009). Effect of salinity on survival, growth, oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 40:1419-1427.

11. ANEXOS

Anexo I. Diferentes pruebas de toxicidad de compuestos nitrogenados realizadas en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*.

Prueba	Edad/Talla	Salinidad (g/L)	Tóxico	Tiempo	Evaluación
Aguda individual	PL20	3	Nitrito	96 h	- CL ₅₀ - Métodos de estrategia de trabajo
Aguda individual	PL20 y juveniles	1 y 3	Amonio, nitrito y nitrato	96 h	- CL ₅₀ - Alimentación - Niveles de seguridad
Aguda mezcla	PL20	1, 3 y 25	Amonio, nitrito y nitrato (RT 1:1:1 y 1:1)	96 h	- CL ₅₀ - Alimentación - Niveles de seguridad
Aguda mezcla	Juveniles	3 y 25	Amonio, nitrito y nitrato (RT 1:1:1)	96 h	- CL ₅₀ - Alimentación - Niveles de seguridad
Subletal individual	Juveniles	3	Amonio, nitrito y nitrato	48 h	- Oxihemocianina - Glucosa - Lactato - Iones- - Niveles de seguridad
Subletal individual y mezcla	Juveniles	3 y 25	Amonio y nitrito	28 días	- Tasa de crecimiento - Supervivencia - Niveles de seguridad

Anexo II. Artículo “Comparison of four treatments to evaluate acute toxicity of nitrite in shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae: Influence of feeding and the renewal water”.



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Short communication

Comparison of four treatments to evaluate acute toxicity of nitrite in shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae: Influence of feeding and the renewal water



Gladys Valencia-Castañeda^a, Ruth C. Vanegas-Pérez^b, Martín G. Frías-Espéricueta^c,
María C. Chávez-Sánchez^d, Javier Ramírez-Rochín^e, Federico Páez-Osuna^{f,*}

^a Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, Mazatlán 82040, Sinaloa, Mexico

^b Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F. 04510, Mexico

^c Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n, Mazatlán 82000, Sinaloa, Mexico.

^d Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, Av. Sábalo Cerros s/n, Mazatlán 82100, Sinaloa, Mexico.

^e Programa de Posgrado en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo 195, Col. Palo de Santa Rita, La Paz 23090, Baja California, Sur, Mexico.

^f Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, Mazatlán 82040, Sinaloa, Mexico.

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute toxicity

Nitrite

Shrimp

Litopenaeus vannamei

Static

Renewal

ABSTRACT

Distinct methods are used to evaluate acute toxicity and generate different values of LC_{50} . However, the static with renewal (100% renewal every 24 h) and feeding method is the more utilized. This study was developed to determine the differences between the LC_{50} obtained and define which method is most adequate for testing acute toxicity of nitrite in shrimp. *Litopenaeus vannamei* postlarvae (PL18) were exposed to different concentrations of nitrite-N (nitrite as nitrogen) at 3 g/L of salinity, using two different strategies of renewal solution and feeding trials: treatment $T_{s/nf/1}$ (static (no water renewal) + not feed), $T_{sr/f/2}$ (static with renewal + feed), $T_{sr/nf/3}$ (static with renewal + not feed) and $T_{s/f/4}$ (static + feed). Different values of LC_{50} nitrite-N for 96 h values were generated for the four distinct treatments ($T_{sr/f/2} > T_{sr/nf/3} > T_{s/nf/1}$, $T_{s/f/4}$). However, significant differences ($p < 0.05$) were only between the treatments that involves feeding and not feeding in the static with renewal method ($T_{sr/f/2} > T_{sr/nf/3}$). Considering the magnitude and variation of the LC_{50} values, it is recommended the static with renewal method and feeding method which generates higher values of LC_{50} and lowest variation, results suggesting that this method is more adequate to evaluate in shrimps nitrite and other nitrogen compounds acute toxicity.

1. Introduction

Shrimps are an important resource for worldwide fisheries and aquaculture. The white shrimp *Litopenaeus vannamei*, is of great importance in the farming industry because it can tolerate a wide range of salinities (1–40 g/L) (Bray et al., 1994). Its tolerance to low salinity and the availability of post-larvae throughout the year make this shrimp very popular for its culture in low salinity waters. Compared to other penaeids, *L. vannamei* is the most cultivated species in the world, reaching world production of 3.3 million t in 2013, of which 0.6 million t was grown in fresh water, 0.2 million t in seawater and 1.9 million t in brackish water (FAO, 2015).

The acute toxicity of nitrite and ammonia in shrimp larvae has been evaluated in marine and brackish waters in different stages of *Penaeus*

monodon (Chen and Chin, 1988), *Penaeus japonicus* (Chen and Tu, 1990), and in *Metapenaeus ensis* (Chen and Nan, 1991; Chen et al., 1991), found that the toxicity is variable with age, stage and species of shrimp. However, shrimp tolerance to nitrogen compounds, especially ammonia and nitrite, decreases in low salinity waters (Sowers et al., 2004; Gross et al., 2004; Schuler et al., 2010; Ramírez-Rochín et al., 2017) which represents a major problem since as the culture period progresses, concentrations of these two nutrients can reach high levels and cause low rates in feed intake, growth reduction, increase oxygen consumption and ammonia-N excretion, alter concentrations of haemolymph protein and free amino acid levels, and even cause moderate or high mortality (Colt and Armstrong, 1981; Chen et al., 1989; Lin and Chen, 2003).

The acute toxicity tests provide useful information about the

* Corresponding author.

E-mail address: paos@oia.icyt.unam.mx (F. Páez-Osuna).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.037>

Received 16 December 2016; Received in revised form 17 December 2017; Accepted 21 December 2017

Available online 23 December 2017

0044-8486/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

relative lethality of one or more substances. These tests are designed to determine the highest concentration of a substance that is sufficient to affect a percentage of survival, e.g., 50%, of a limited number of test organisms (LC_{50}) considering that the duration of the toxicity tests in an acute exposition is generally 96 h or less (Newman and Ungar, 2003). The acute toxicity tests follow basically four types of trial designs: static (s), static with renewal (sr), continuous or intermittent flow, and in situ. Additionally, such toxicity tests are developed supplying feeding (f) or without it -not feed- (nf). Each test has its advantages and disadvantages, and the selected treatment depends on the purpose of the test. A static test may be sufficient for comparing two effluents or two process streams entering a wastewater treatment facility. If the interest lies in determining more precisely the toxicity of a volatile compound or the toxicity of a wastewater to riverine organisms, then a continuous flow test would be more appropriate. If the interest is to define lethal boundaries of an effluent entering a receiving system, an in situ test may be more appropriate (Bolkema et al., 1982).

In the case of tests with shrimp exposed to nitrogen compounds, usually two methods are considered: with or without feeding and renewal toxic solution every 24 h (static and static with renewal). In such context, there are implicit questions such if distinct treatments generate different or comparable LC_{50} values, what treatment shows less variability in the LC_{50} values, and, most importantly, what procedure generates more reliable and representative LC_{50} values. The aim of this study was to compare two strategies of toxic solution exchange (static (s) and static with renewal (sr)), and feeding (f) or not feeding (nf) trials in *L. vannamei* shrimp. This comparison was developed to evaluate the differences between the LC_{50} obtained for the typical periods of study (24, 48, 72 and 96 h of exposure) and to define which method is most appropriate for testing acute toxicity of nitrite in the white shrimp *L. vannamei*.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

L. vannamei postlarvae (PL12) were provided from a laboratory of shrimp larvae production (Fitmar S.A. de C.V. in Rosario, Sinaloa, Mexico) and transported in plastic bags containing seawater (30 g/L salinity) to experimental module (Yum Kaax module) in Mazatlán city. Postlarvae were acclimatized for 5 days at 3 g/L salinity (seawater and freshwater); the rate of acclimation and the procedure used were according to Van Wyk (1999). The survival rate of postlarvae was 95%. During the acclimatization process organisms were maintained in two polyethylene 500 L tanks at 28 °C with 12 h periods of day-night and fed every 4 h using commercial feed (protein 50%, lipids 6%, fiber 3%, S-Pak 2/5, INVE Aquaculture), with water renewal (50%) every 24 h until the start of the tests. Feeding was suspended in one group of organisms 24 h before testing.

2.2. Preparation of test solutions

Natural seawater (salinity, 34 g/L) was used in each of the test solutions which was filtered through a system of 10 and 5 µm cartridge filters, activated carbon filter and ultraviolet radiation, and then diluted to 3 g/L with municipal tap water (electrical conductivity, 290 µS/cm; dissolved solids, 173 mg/L) previously filtered through a WaterTec® (Tucson, Az) deep bed (gravel, zeolite, sand, clay and activated carbon) filtration system. Nitrite stock solutions were prepared by dissolving 12.321 g of $NaNO_2$ in 1 L of milli-Q water (2500 mg/L NO_2^- -N). The selected nitrite-N nominal concentrations were 0 (control), 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 and 35 mg/L, and were reached by addition of adequate volumes from stock solution to the test solution. The concentrations of nitrite-N in test solutions were analytically determined every 24 h using a standard method (Strickland and Parsons, 1972; APHA (American Public Health Association), 1989). The precision of the measurements

expressed as coefficient of variation were below 3.5%.

LC_{50} test short-term median lethal concentration (LC_{50}) toxicity tests were carried out according to the methods described by APHA (American Public Health Association) (1989). Shrimps were randomly sampled from the holding tanks and transferred to the test and control containers. Bioassay experiments were conducted in triplicate 0.5-L polyethylene containers having the test solutions. Each container contained 10 shrimps (PL12) and continuous aeration was provided through air stones connected to a blower. Toxicity tests were conducted in four experimental treatments with their respective concentrations, controls and triplicates; $T_{s/nf/0}$ and $T_{s/f/0}$ treatments were carried out with the static method, while $T_{sr/f/24}$ and $T_{sr/nf/24}$ included daily renewed (100%) nitrite solution (static with renewal method). During the experiment, shrimp of $T_{s/nf/0}$ and $T_{s/f/0}$ treatments were not fed, while $T_{sr/f/24}$ and $T_{sr/nf/24}$ were fed. During the acclimation and toxicity tests the organisms were maintained at a temperature of 26.1 ± 0.2 °C, 6.5 ± 0.3 mg/L of dissolved oxygen and a pH of 8.2 ± 0.2 ; values which are within the recommended range for *L. vannamei* (Bardadi et al., 1996). Survival was checked at 24 h intervals during 96 h. Death was assumed when shrimps were immobile and showed no response when touched with a glass rod. The dead shrimps were removed daily from the containers.

A problem in the calculation of LC_{50} is identifying the concentration to which the organisms are exposed. It is due to toxics as the nitrogen compounds that may be altered in their concentrations through the time of exposure. Shrimps principally excrete nitrogen compounds (mainly ammonia) which may be transformed to nitrite or other nitrogen compounds (Chen et al., 1994; Romano and Zeng, 2013). In this study, the LC_{50} was calculated using concentrations of nitrite-N in three procedures: (i) with those measured at the initial period (0 h) of the shrimp exposure, which was consistently similar or the same to the nominal concentration prepared from the stock solution; conventionally, this procedure is usually more used; (ii) with the levels of nitrite-N quantified after of each 24 h of exposure (24, 48, 72 and 96 h); and (iii) with the mean values between the LC_{50} obtained from the initial concentration (or nominal) of nitrite-N and the LC_{50} from those obtained from the measurements at each 24 h. It is assumed, that this last procedure corresponds more closely to the actual exposure levels, or at least is the most representative.

2.3. Statistical analysis

The LC_{50} values of nitrite-N and their 95% confidence limits were calculated by the Probit method (Finney, 1971). Repeated measures *t*-test (paired comparisons) was performed on each treatment to determine significant differences between the LC_{50} obtained from the concentrations of the initial period (0 h; nominal concentrations) versus those of the end of exposure (every 24 h until 96 h); comparison of the LC_{50} average between treatments was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey a posteriori test (Zar, 1996).

3. Results and discussion

The differences in the concentrations of nitrite-N for the four treatments between the actual levels measured at the beginning and the nominal concentrations stock were minimal fluctuating between 0.5 and 0.9% of the selected levels. During the development of the tests, the concentrations of nitrite-N measured each 24 h in the two static with renewal treatments, $T_{sr/f/24}$ (feeding) and $T_{sr/nf/24}$ (not feeding) were within 5% of the nominal concentrations, which are acceptable difference for acute toxicity tests (Bolkema et al., 1982). However, in $T_{s/f/0}$ and $T_{s/nf/0}$ static treatments, concentrations of nitrite-N were significantly modified during the trial period; the initial concentration in relation the final (96 h) concentration of nitrite-N in $T_{s/f/0}$ and $T_{s/nf/0}$ was reduced 56.3 and 40.3%, respectively. Clearly, this indicates that in the static tests the levels of nitrite-N are significantly decreased, being

more evident when the shrimps are feeding. This reduction could be related to a capture of nitrite by shrimp and its increase in hemolymph and other tissues, as has been showed by Chen and Chen (1992a, 1992b) in *P. monodon* and *P. japonicus*.

Another point that may be relevant during the development of the tests is ammonia, which is a compound highly toxic. It is evident that the shrimp that were not fed were likely exposed to lower levels of ammonia compared to the group of shrimp that were fed. Also, ammonia levels should be affected by renewal; renewal reduces the ammonia and static method accumulates the ammonia generated by the excretion of shrimp (Chen and Chen, 1997). Zhang et al. (2009) found in *L. vannamei* juveniles in low salinity water (5 g/L) an excretion rate of ammonia of 0.05 μmol ammonia-N/g/h. Considering that such excretion rate is similar for PL18 (30 mg), then, 10 PL would generate scarcely 5 μg ammonia-N per 24 h. This indicates the low magnitude of ammonia that could be excreted by PL. Additionally, Boyd (1990) indicates that aeration is one of the best methods to oxidize ammonia to nitrate and to volatilize the ammonia. In our tests, ammonia was not measured. Therefore, by the aeration continuous is assumed here that ammonia levels were negligible.

During the tests of the four treatments pH was monitored each 12 h, found that values were maintained between 8.1 and 8.3; values which are within the recommended range for *L. vannamei* (Bardach et al., 1986). The accumulation of nitrite in the hemolymph in function of pH has been studied by Chen and Cheng (2000) in *P. monodon*, who found that nitrite in pH of 6.8 is incorporated more easily in comparison to pH of 8.2 and 9.8. Such results are difficult of extrapolate to *L. vannamei*, but this reveals the need to develop future studies on the influence of pH on the toxicity of nitrite in low salinity waters.

The percentages of mortality in control groups were different in each one of the four treatments: 6.6, 0.0, 23.3 and 3.3% for $T_{st}/nt/1$, $T_{st}/nt/2$, $T_{st}/nt/3$ and $T_{st}/nt/4$, respectively. Considering that for validation of toxicity tests, it is necessary that mortality in the controls remain below 10% (Balkema et al., 1982), these statement should be rejected in the $T_{st}/nt/3$ trial. In the treatments $T_{st}/nt/1$ and $T_{st}/nt/3$ where the organisms are not feed during exposure to nitrite, cannibalism was observed at concentrations below 5 mg/L N-nitrite; in $T_{st}/nt/3$, the cannibalism was more evident, which explains the mortality of 23.3% registered. From these results, when treatment involves static with renewal and no feeding, it is clear that these types of tests on shrimp are not favorable, due to their feeding behavior.

Fig. 1 presents the LC_{50} nitrite-N at 24, 48, 72 and 96 h for *L. vannamei* postlarvae calculated with the concentrations determined at 0 and every 24 h for the four treatments. The LC_{50} of nitrite-N at 96 h calculated with the initial concentrations (0 h) for each one of the treatments was 5.28 \pm 0.13, 6.67 \pm 0.22, 4.93 \pm 0.41 and 4.32 \pm 0.14 mg/L, in $T_{st}/nt/1$, $T_{st}/nt/2$, $T_{st}/nt/3$ and $T_{st}/nt/4$, respectively. Table 1 includes the confidence intervals for each treatment and each period of exposure. The LC_{50} of nitrite-N at 96 h calculated with the concentrations determined every 24 h in the indicated treatments was 2.32 \pm 0.10, 6.57 \pm 0.28, 4.76 \pm 0.35 and 3.61 \pm 0.27 mg/L for $T_{st}/nt/1$, $T_{st}/nt/2$, $T_{st}/nt/3$ and $T_{st}/nt/4$, respectively (Table 1 includes LC_{50} values and confidence intervals). At 96 h of exposure, there was a significant ($p < 0.05$) difference between the LC_{50} of nitrite-N calculated with the levels of nitrite quantified initially (or nominal) and those measured each 24 h, evidenced in $T_{st}/nt/1$ (not feeding + static) and $T_{st}/nt/4$ (feeding + static). In contrast, there were no significant ($p > 0.05$) differences for the $T_{st}/nt/2$ (feeding + static with renewal) and $T_{st}/nt/3$ (not feeding + static with renewal). This indicates that feeding modifies the initial concentration of the toxic, and therefore may influence the LC_{50} 96 h values when tests are developed by the static method (Fig. 1).

The LC_{50} of nitrite-N calculated with the average of the LC_{50} obtained of the initial (nominal) level of nitrite-N and those of the level measured each 24 h, is assumed that represents more closely the exposure to nitrite, and therefore, such LC_{50} is more representative. Fig. 2

shows such values of LC_{50} to 24, 48, 72 and 96 h of nitrite exposure in *L. vannamei* postlarvae. For 48 h exposure, $T_{st}/nt/2$ showed significant differences with $T_{st}/nt/1$ and with $T_{st}/nt/3$ but not with $T_{st}/nt/4$; however, at 24 h of exposure no differences between the four treatments were observed.

96 h LC_{50} average values were 3.8 \pm 1.62, 6.62 \pm 0.23, 4.85 \pm 0.35 and 3.97 \pm 0.43 mg/L nitrite-N in $T_{st}/nt/1$, $T_{st}/nt/2$, $T_{st}/nt/3$ and $T_{st}/nt/4$ treatments, respectively; $T_{st}/nt/2$ (feeding + static with renewal) was only significantly different ($p < 0.05$) to $T_{st}/nt/3$ (static with renewal + no feeding) treatment; however, it is important to mention that although there are no significant differences between $T_{st}/nt/2$ and $T_{st}/nt/4$, and between $T_{st}/nt/3$ and $T_{st}/nt/4$. In the control of the $T_{st}/nt/3$ an important mortality occurs (23.3%) due cannibalism. It is relevant the magnitude of the variation of LC_{50} values obtained for each treatment, which consistently, $T_{st}/nt/3$ exhibited the lowest standard deviation for the four exposure periods examined (Fig. 2). In general, the LC_{50} of nitrite-N values obtained for the four time periods followed the decreasing order: $T_{st}/nt/2 > T_{st}/nt/3 > T_{st}/nt/1, T_{st}/nt/4$. The magnitude of these LC_{50} values and the significant differences observed indicate that nitrite concentrations in the test solutions are modified by feeding when it is static with renewal, in contrast to the static tests.

There is a large variability in the different strategies used for testing toxicity of different nitrogen compounds. However, this selected strategy depends on the objective of the research, the age of the organisms and the exposure period. Studies have been conducted to evaluate the accumulation of ammonia, nitrite and nitrate, the rates of excretion and the evaluation of different metabolites (glucose, lactate) in hemolymph of exposed penaeid shrimp species, where feeding is suspended before and during test development to prevent alterations in the hemolymph due the feeding influence (Chen and Knaa, 1991; Chen and Nan, 1992; Chen and Chen, 1997; Racotta and Hernández-Herrera, 2000; Cheng et al., 2013). These studies have been conducted by using the static method and for < 48 h of testing time. However, studies where the subchronic effect of nitrogen compounds in growth and histopathological damage in diverse shrimps (*Penaeus japonicus*, *Penaeus penicillatus*, *L. vannamei* and *Penaeus monodon*) have been evaluated, the toxicity method used was the static with renewal and feeding during the time of exposure to toxics (Chen and Lin, 1993; Chen and Chen, 1992; Kühn et al., 2010).

Research conducted to determine LC_{50} and security levels of ammonia and nitrite for different penaeid species had used static and static with renewal methods, and in some cases feeding was not suspended before and during the development of the tests (Alicaraz et al., 1999; Lin et al., 1993; Kiri and Kunalı, 2006); however, there are studies with the same objective but feeding not have been suspended (Chin and Chen, 1987; Lin and Chen, 2003; Gross et al., 2004). From a bibliographic research in the Elsevier's Scopus database a total of 51 studies were found; 11.7% using the static with renewal and not feed (defined here $T_{st}/nt/2$), 42.2% static and not feed ($T_{st}/nt/1$), 34.6% static with renewal and feed ($T_{st}/nt/3$), and 7.8% static and feed ($T_{st}/nt/4$). The highest percentage is for those studies using the static method and non-feeding ($T_{st}/nt/1$) trials, tests aimed mainly to determine the subchronic effects of nitrogen compounds and different blood components, oxygen consumption and excretion rate are evaluated; in some cases this method is also used to determine LC_{50} . The $T_{st}/nt/2$ (static with renewal + feeding) method is directed mainly to determine the LC_{50} . It is to note that a significant number of studies are conducted where organisms are fed and a percentage of the test solution is not replaced ($T_{st}/nt/3$), and a lesser number of studies are conducted with the static method and feeding, the latter method has been usually used to evaluate the acute effect and exposure time, when it does not exceed 96 h.

The conclusions of this study, where four treatments to evaluate acute toxicity tests of *L. vannamei* shrimp nitrite were compared, are: (i) it was found that the LC_{50} values of nitrite-N estimated with the concentrations determined analytically at 0 h and every 24 h were different; significant differences ($p < 0.05$) were observed only between

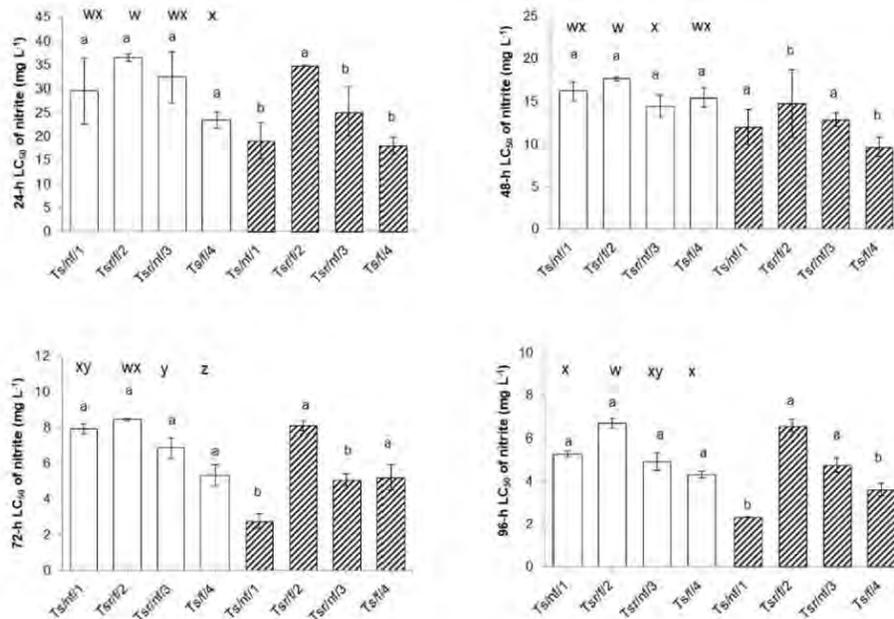


Fig. 1. Mean values of LC₅₀ (± standard deviation) of nitrite-N (mg/L) at 24, 48, 72 and 96 h of exposure for *L. vannamei* postlarvae estimated with the initial nitrite concentrations (0 h, unfilled bars) and determined every 24 h (filled bars) in the different test solutions. Treatments: T₁ (static + not feed), T₂ (static with renewal + feed), T₃ (static with renewal + not feed) and T₄ (static + feed). Different letters (a and b) within each treatment indicate significant differences ($p < 0.05$) between the LC₅₀. Different letters (w, x, y and z) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the LC₅₀ of each treatment calculated with the initial concentration (nominal).

the treatments using the static method T_{s/nf/1} (not feeding + static) and T_{s/f/4} (feeding + static), which indicates that feeding influence the estimation of 96 h LC₅₀; (ii) when the initial and final concentrations of the nitrite-N are used to estimate the LC₅₀, obtaining the mean LC₅₀, presumably representative of overall test, it is clear that different values of LC₅₀ nitrite-N for 96 h values are generated from the four different treatments examined (T_{sr/f/2} > T_{sr/nf/3} > T_{s/nf/1}, T_{s/f/4}). However, the differences were significant ($p < 0.05$) only between the treatments that involve feeding or not feeding in the static with renewal method: T_{sr/f/2} and T_{sr/nf/3} (Fig. 2); (iii) according to the results obtained in this study, considering the magnitude and variation of the LC₅₀ values and the mortality of the controls, our recommendation to evaluate acute toxicity is the static with renewal method with feeding. However, if it is to evaluate biochemical parameters, which can be altered by feeding, we recommended the treatment that involves not

feeding with the static method (T_{s/nf/1}).

Acknowledgments

The authors thank H. Bojórquez Leyva and M.G. Fregoso Lopez of the Geochemistry and Marine Pollution Laboratory, ICMYL-UNAM, Mazatlan, Sinaloa, for the assistance in the chemical analysis. Special gratitude is to Fitmar Company Mexico who provided the organisms for this study. This study was supported by: Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM; GVC obtained a fellowship programa from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Program UNAM-DGAPA-PAPIIT IN201916 titled “Evaluación de efectos letales y subletales de amonio, nitrito y nitratos en camarón *Litopenaeus vannamei* en aguas de baja salinidad”; and Red PRODEP “Contaminación acuática: niveles y efectos” (año 3).

Table 1

LC₅₀ values (mg/L) and confidence intervals (in parenthesis) (95%) of nitrite-N for *L. vannamei* calculated with the concentration of nitrite-N measured at the initial period (0 h) and those measured after of each 24 h of exposure (24, 48, 72 and 96 h).

Treatment	Time (h)			
	24	48	72	96
T _{s/nf/1}	29.53 (44.38–27.27) 19.21 (27.07–15.57)*	16.20 (21.58–13.17) 12.02 (16.95–8.32)*	7.91 (8.70–6.37) 2.78 (3.53–2.63)*	5.28 (9.98–4.62) 2.32 (2.76–2.09)*
T _{sr/f/2}	36.48 (52.31–25.55) 34.82 (52.46–22.48)*	17.63 (21.36–11.20) 14.81 (17.45–9.50)*	8.44 (9.70–6.73) 8.11 (8.71–6.25)*	6.67 (7.10–5.82) 6.57 (7.24–5.65)*
T _{sr/nf/3}	32.42 (50.08–21.23) 25.18 (44.13–22.82)*	14.50 (23.99–8.95) 12.91 (23.00–8.50)*	6.90 (7.62–5.60) 5.09 (5.92–4.30)*	4.93 (6.29–4.03) 4.76 (5.31–4.00)*
T _{s/f/4}	23.46 (35.32–16.07) 18.05 (27.56–11.89)*	15.51 (18.57–10.15) 9.70 (13.24–6.42)*	5.36 (7.24–4.69) 5.23 (6.33–3.42)*	4.32 (5.69–3.84) 36.61 (3.94–3.28)*

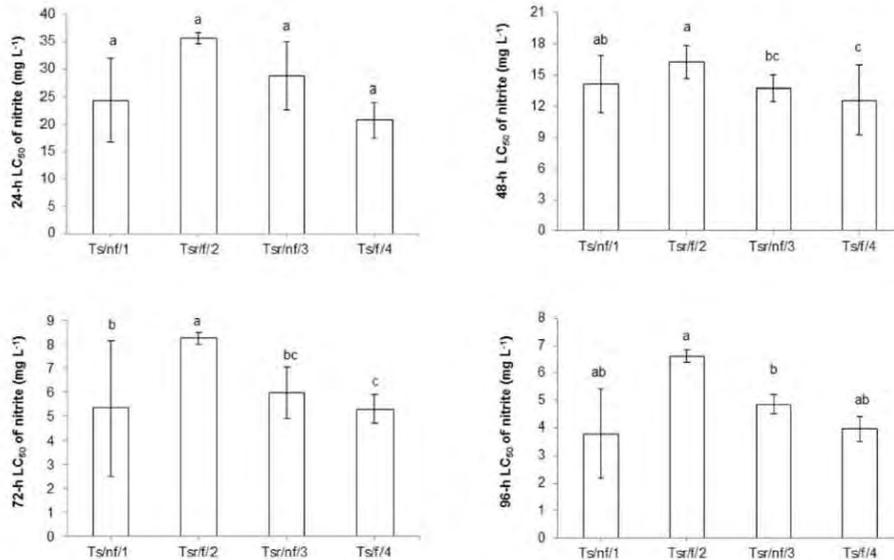


Fig. 2. LC₅₀ average (\pm standard deviation) of nitrite-N (mg/L) at 24, 48, 72 and 96 h of exposure for *L. vannamei* postlarvae calculated with the initial nitrite concentrations (0 h) and LC₅₀ values of every 24 h. Treatments: T₁ (static + not feed), T₂ (static with renewal + feed), T₃ (static with renewal + not feed) and T₄ (static + feed). Different letters between treatments indicate significant differences ($p < 0.05$) between the LC₅₀ values.

References

- Alcaraz, G., Chiappa, X., Espinosa, V., Vanegas, C., 1999. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *J. World Aquacult. Soc.* 30, 90–97.
- APHA (American Public Health Association), 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed. 7 APHA, Washington D.C., USA.
- Bardach, E.J., McLarner, O.W., Ryther, H.L., 1986. *Aquacultura, crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce*. 1a ed. A.G.T. Editor S.A. México D.F. 780.
- Boyd, C.E., 1990. Water quality in ponds for aquaculture. In: Alabama, Agriculture Experimental Station, Auburn University, Auburn USA.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., Leung-Trujillo, J.R., 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture* 122, 133–146.
- Bulkema, A.L., Niederlehner, B.R., Cairns Jr., J., 1982. Biological monitoring, toxicity testing. *Water Res.* 16, 239–262.
- Chen, J.C., Chen, S.F., 1992. Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 453–458.
- Chen, J.C., Chen, S.F., 1992a. Accumulation of nitrite in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C, 477–481.
- Chen, J.C., Chen, S.F., 1992b. Accumulation of nitrite in hemolymph of *Penaeus japonicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 83, 305–308.
- Chen, J.C., Chen, J.M., 1997. Arginase specific activity and nitrogenous excretion of *Penaeus japonicus* exposed to elevated ambient ammonia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 153, 197–202.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y., 2000. Recovery of *Penaeus monodon* from functional anaemia after exposure to sublethal concentration of nitrite at different pH levels. *Aquat. Toxicol.* 50, 73–83.
- Chen, J.C., Chin, T.S., 1988. Acute toxicity of nitrite to tiger prawn, *Penaeus monodon*, larvae. *Aquaculture* 69, 253–262.
- Chen, J.C., Kou, Y.Z., 1991. Accumulation of ammonia in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Dis. Aquat. Org.* 11, 187–191.
- Chen, J.C., Lin, J.N., 1992. Effect of ammonia on growth of *Penaeus penicillatus* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 443–447.
- Chen, J.C., Nan, F.H., 1991. Lethal effect of nitrite on *Metapenaeus ensis* larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 22, 51–56.
- Chen, J.C., Nan, F.H., 1992. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*. *Aquat. Toxicol.* 23, 1–10.
- Chen, J.C., Tu, C.C., 1990. Acute toxicity of nitrite to larval *Penaeus japonicus*. *J. Fish. Soc. Taiwan* 17, 277–287.
- Chen, J.C., Liu, P.C., Lin, Y.T., 1989. Culture of *Penaeus monodon* in an intensified system in Taiwan. *Aquaculture* 77, 319–328.
- Chen, J.C., Liu, P.C., Nan, F.H., 1991. Acute toxicity of ammonia to larval *Metapenaeus ensis*. *Asian Fish. Sci.* 4, 41–51.
- Chen, J.C., Chen, C.T., Cheng, S.Y., 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110, 85–94.
- Cheng, S.Y., Shieh, L.W., Chen, J.C., 2013. Changes in hemolymph oxyhemocyanin, acid-base balance, and electrolytes in *Metapenaeus japonicus* under combined ammonia and nitrite stress. *Aquat. Toxicol.* 130–131, 132–138.
- Chin, T.S., Chen, J.C., 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 66, 247–253.
- Colt, J.E., Armstrong, D.A., 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and molluscs. In: Allen, L.J., Kinney, E.C. (Eds.), *Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture*. American Fisheries Society, Bethesda, pp. 34–47.
- FAO, 2015. *FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis release: 2.0.0*. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/>, Accessed date: May 2015.
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*, 3rd ed. 333 Cambridge University Press, Cambridge.
- Gross, A., Aburubul, S., Zilberg, D., 2004. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, culture in low-salinity brackish water. *J. World Aquacult. Soc.* 35, 315–321.
- Kir, M., Kumlulu, M., 2006. Acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* postlarvae in relation to salinity. *J. World Aquacult. Soc.* 37, 231–235.
- Kuhn, D.D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Angier, M.W., Marsh, L., Flick Jr., G.J., 2010. Chronic toxicity of nitrate to pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture* 309, 109–114.
- Lin, G.Y., Chen, J.C., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 224, 193–201.
- Lin, H., Thuer, P., Trilles, J.P., Mounet-Guillaume, R., Chamantier, G., 1993. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.* 117, 591–598.
- Newman, M.C., Unger, M.A., 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*, 2nd edn. CRC/Lewis Press, Boca Raton.
- Racotta, L.S., Hernández-Herrera, R., 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A, 437–443.
- Ramírez-Rochín, J., Frías-Espéricueta, M.G., Pierró-Sañudo, J.F., Alarcón-Silva, S.G., Fregoso-López, M.G., Pérez-Osuna, F., 2017. Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water. *Aquac. Res.* 48, 2337–2343.
- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapods crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanism. *Rev. Fish. Sci.* 21, 1–21.
- Schuler, D.J., Boardman, G.D., Kuhn, D.D., Flick, G.J., 2010. Acute toxicity of ammonia and nitrite to pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. *J. World Aquacult. Soc.* 41, 438–446.
- Sowers, A.D., Young, S.P., Isely, J.J., Browdy, C.L., Tomasso, J.R., 2004. Nitrite toxicity to *Litopenaeus vannamei* in water containing low concentrations of sea salt or mixed salts. *J. World Aquacult. Soc.* 35, 445–451.

G. Valencia-Castañeda et al.

Aquaculture 491 (2018) 275–280

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bulletin 167 (2a edición). Fisheries Research Board of Canada.

Ven Wyck, P.M., 1999. Economics of Shrimp Culture in Recirculating Aquaculture Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, USA, pp. 179–208.

Zar, J., 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey (662 pp).

Zhang, P., Zhang, X., Li, J., Gao, T., 2009. Effect of salinity on survival, growth, oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus setiferus*. Aquac. Res. 40, 1419–1427.

Anexo III. Artículo “Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae in low-salinity water”.



Acute Toxicity of Ammonia, Nitrite and Nitrate to Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae in Low-Salinity Water

Gladys Valencia-Castañeda¹ · Martín G. Frías-Espéricueta² · Ruth C. Vanegas-Pérez³ · Jesús A. Pérez-Ramírez² · María C. Chávez-Sánchez⁴ · Federico Páez-Osuna^{5,6} 

Received: 27 February 2018 / Accepted: 8 May 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Shrimp farming in low salinities waters is an alternative to increasing production, and counteracting disease problems in brackish and marine waters. However, in low-salinity waters, toxicity of nitrogen compounds increases, and there is no available data of its acute toxicity in shrimp postlarvae. This study determined the acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate in *Litopenaeus vannamei* postlarvae in 1 and 3 g/L salinity, as well as the safety levels. The LC₅₀ confirms that nitrite is more toxic than ammonia and nitrate in low salinity waters, and that its toxicity increases with a decrease in salinity. The safe levels estimated for salinities of 1 and 3 g/L were 0.54 and 0.81 mg/L for total ammonia-N, 0.17 and 0.25 mg/L for NO₂-N, and 5.6 and 21.5 mg/L for NO₃-N, respectively.

Keywords Acute toxicity · *Litopenaeus vannamei* · Ammonia · Nitrite · Nitrate · Safe level

The white shrimp *Litopenaeus vannamei* is distributed in the tropical waters of the Pacific from Mexico to Peru (Pérez-Farfante and Kensley 1997). This species is found in waters with a wide range of salinities (1–40 g/L) due to osmoregulation mechanisms (Castille and Lawrence 1981). Its ability to adapt to different salinities makes it the most cultivated species worldwide. In recent years, growth of shrimp farming

has accelerated in the tropical and subtropical coastal areas of the world; however, it has been significantly affected by the impact of viral diseases, which directly affect production (Mess et al. 2001) and remain the most common source of economic losses of farms in different parts of the world (Israngkura and Sae-Hae 2002). As a measure to counteract the disease problem it is hypothesized that disease control is easier to implement in inland than in coastal environments (Boyd 2002). In recent years this activity has been developed and experimented in several regions of China and Mexico (Roy et al. 2010).

However, shrimp tolerance to nitrogenous compounds, especially ammonia and nitrite, decreases in low salinity waters (Schuler et al. 2010; Ramírez-Rochín et al. 2017) and represents an important problem. During the culture period, in situ concentrations can reach high levels and cause low rates of food intake, reduce growth, increase consumption of oxygen and nitrogen excretion, alter hemolymph protein concentrations and free amino acid levels, and even cause moderate or high mortality (Romano and Zeng 2013). The high levels of nitrogenous compounds are related mainly to feeding, fertilization and the conditions of water and sediments, which is linked to management (Hargreaves 1998). In *L. vannamei* juveniles, the acute toxicity of nitrogen compounds in marine and brackish waters is well known; in contrast, such information is limited for postlarvae (Romano

✉ Federico Páez-Osuna
paezos@ola.icmyl.unam.mx

¹ Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, ICML-UNAM, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, 82040 Mazatlán, Sinaloa, Mexico

² Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n, 82000 Mazatlán, Sinaloa, Mexico

³ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

⁴ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Av. Sábalo Carrón s/n, 82112 Mazatlán, Sinaloa, Mexico

⁵ Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, 82040 Mazatlán, Sinaloa, Mexico

⁶ Miembro de El Colegio de Sinaloa, Centro, 80000 Culiacán, Sinaloa, Mexico

Published online: 12 May 2018

 Springer

and Zeng 2013). Moreover, for the case of postlarvae in low salinity waters, there are currently no available data (Scopus 2017). Therefore, the objective of this study was to determine the acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate in *L. vannamei* postlarvae in 1 and 3 g/L salinity; as well as to propose safety levels for the culture of this species under low-salinity conditions. Safe level is defined in this work as the value that theoretically should not exert any adverse effect to the physiological processes of an organism exposed to a toxic substance (Buikema et al. 1982).

Materials and Methods

Approximately 2500 healthy *L. vannamei* postlarvae (PL15) were provided from a shrimp larvae production laboratory located in Sinaloa, Mexico and were transported in a salinity of 30 g/L to experimental module in Mazatlán city. Postlarvae were acclimatized for 5 days (PL15–PL20) at 1 and 3 g/L salinity; the rate of acclimation and the procedure used were according to McGraw et al. (2002). The survival rate of postlarvae during the acclimatization was 97% for both salinities, which are comparable to those obtained by McGraw et al. (2002). Salinity was estimated from the electrical conductivity (EC) measurements ($\mu\text{S}/\text{cm}$ at $25^\circ\text{C} \times 0.00063$) (Boyd 2002) with EC-meter (Oakton TDS 5). During acclimatization process organisms were maintained in 500 L tanks at 28°C with 12 h periods of day-night and fed every 4 h using feed (protein 50%; lipids 6%; S-Pak 2/5, INVE Aquaculture), with water renewal (50%) every 24 h until the start of the tests.

Filtered seawater (5 μm cartridge, activated carbon and ultraviolet radiation; salinity, 34 g/L) was used in each of the test solutions and then diluted to 1 and 3 g/L with tap water (EC, 290 $\mu\text{S}/\text{cm}$) previously filtered through a WaterTec® (Tucson, Az) deep bed (gravel, zeolite, sand, clay and activated carbon) filtration system. The experimental concentrations of ammonia, nitrite and nitrate were chosen from preliminary tests to determine their toxicity interval. Ammonia stock solutions were prepared by dissolving 4.776 g of NH_4Cl in 0.5 L of milli-Q water (2500 mg/L $\text{NH}_4\text{-N}$). The selected ammonia-N nominal concentrations for the salinities of 1 and 3 g/L were 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40, and 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 mg/L ammonia-N, respectively. Nitrite stock solutions were prepared by dissolving 12.321 g of NaNO_2 in 1 L of milli-Q water (2500 mg/L $\text{NO}_2\text{-N}$). The selected nitrite-N nominal concentrations for the salinities of 1 and 3 g/L were 0 (control), 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 and 35; and 0 (control), 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25, 35 and 45 mg/L $\text{NO}_2\text{-N}$, respectively. Nitrate stock solutions were prepared by dissolving 151.786 g of NaNO_3 in 1 L of milli-Q water (25,000 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$). The selected nitrate-N nominal concentrations for

the salinities of 1 and 3 g/L were 0, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 700 and 800; and 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 and 1600 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$, respectively. The nominal concentrations of ammonia, nitrite and nitrate were reached by addition of adequate volumes from stock solution to the test solution. Concentrations of nitrogen compounds in test solutions were confirmed analytically every 24 h using standard methods (APHA 1989).

Toxicity trials were conducted with the static renewal method for toxicity testing (Buikema et al. 1982). For each experimental salinity (1 and 3 g/L) and nitrogen compound (ammonia, nitrite and nitrate), toxicity tests were conducted by triplicate. Groups of 10 postlarvae (PL20) were taken randomly from the holding tanks and transferred to each test and control containers with 0.5 L of the test solutions (30 shrimps for each of the nine concentrations of a selected toxic). Therefore a total of 810 PL20 were used in each experimental salinity and a total of 1620 PL20 were used in our study. During the toxicity tests continuous aeration was provided through air stones connected to a blower and the postlarvae were maintained at a temperature of $26.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 6.5 ± 0.3 mg/L of dissolved oxygen and a pH of 8.2 ± 0.2 . Organisms were fed every 12 h using commercial feed (S-Pak 2/5, INVE Aquaculture). Mortality was checked at 24 h intervals during 96 h. Death was assumed when shrimps were immobile and showed no response when touched with a glass rod. The dead shrimps were removed daily from the containers and each test solution was renewed every 24 h. Based on the mortality, the LC_{50} values of total ammonia-N, $\text{NO}_2\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ and their 95% confidence limits were calculated by the Probit method (Finney 1971; Ramírez-Rochín et al. 2017). A comparison test was performed between the values of LC_{50} (Z test) to establish significant differences between LC_{50} ($p < 0.05$). Safe levels were estimated multiplying the 96-h LC_{50} value by 0.05 as an application factor (Boyd and Tucker 1998). For LC_{50} values of ammonia, concentrations were expressed as mg/L of total ammonia-N and $\text{NH}_3\text{-N}$ (un-ionized ammonia) was calculated according to the equilibrium constant in low salinity waters considering the effect of the ionic strength on un-ionized ammonia concentration (Soderberg and Meade 1991), for salinities of 1 and 3 g/L, a temperature of 26°C and pH of 8.2.

Results and Discussion

The concentrations of ammonia, nitrite and nitrate determined every 24 h were within 10% of the nominal concentration, which is an acceptable difference for toxicity testing (Buikema et al. 1982). Mortality percentages in the control groups of all toxicity tests were 0% for 96 h of exposure. LC_{50} values for total ammonia (and $\text{NH}_3\text{-N}$) and nitrate and

their 95% confidence intervals (CI) for *L. vannamei* postlarvae at 1 and 3 g/L of salinity are showed in Tables 1 and 2, respectively. LC₅₀ values of total ammonia and nitrates at the same time of exposure but at different salinities showed significant differences at 24, 48, 72 and 96 h ($p < 0.05$). LC₅₀ values of nitrite at the same time of exposure but at different salinities showed significant differences ($p < 0.05$) only at 24 and 48 h. In general, our results suggest that the acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate in *L. vannamei* PL20 is increased while decreasing salinity from 3 to 1 g/L. At the same time our results suggest that under low salinity conditions, nitrite exerts a higher acute toxicity than ammonia.

The acute toxicity of total ammonia and nitrite has been studied in several species of postlarvae of penaeid shrimp in marine and brackish waters (Table 3). However, there is little available information for low salinity waters. In the case of nitrate, the information is yet more limited, because in marine and brackish waters LC₅₀ levels are non-existent.

Traditionally, the safe level has been estimated using a factor of 0.1, (Buikema et al. 1982). This 0.1 factor has

been applied by several authors (e.g., Frias-Espicueta et al. 2000; Cobo et al. 2014). However, Huang et al. (2006) calculated the nitrite-N safe values for *L. vannamei* and used the application factor of 0.1, but showing that such levels of nitrite decreased significantly the immune response. Boyd and Tucker (1998) have suggested for general use in aquaculture an application factor of 0.05. As the tolerance of shrimp to nitrogen compounds, especially ammonia and nitrite, decreases in waters with low salinity, we decide to estimate safety levels with an application factor of 0.05 (Ramírez-Rochín et al. 2017). From our LC₅₀ values the safe levels of total ammonia, nitrite and nitrate for rearing postlarvae of *L. vannamei* PL20 exposed to salinities of 1 and 3 g/L were: 0.54 and 0.81 mg/L ammonia total-N (0.05 and 0.06 mg/L NH₃-N; 9.3 and 7.6% of total ammonia); 0.17 and 0.25 mg/L NO₂-N; and 5.6 and 21.5 mg/L NO₃-N, respectively. Evidently, these safe levels are lower than those of marine and brackish waters: 1.15 mg/L ammonia-N and 0.10 mg/L NH₃-N (Chin and Chen 1987); 0.03 mg/L NH₃-N (Ostrensky and Wasielesky 1995); 1.22 mg/L ammonia-N

Table 1 The 24, 48, 72 and 96 h-LC₅₀ values (mg/L) of total ammonia-N and NH₃-N for *L. vannamei* postlarvae at 1 and 3 g/L of salinity

Salinity (g/L)	LC ₅₀ total ammonia-N		LC ₅₀ NH ₃ -N	
	1	3	1	3
Time (h)				
24	38.9 (30.2–50.1) ^b	48.4 (42.6–63.4) ^b	3.6 (2.8–4.7) ^b	3.7 (3.2–4.8) ^b
48	14.0 (13.0–15.2) ^c	22.5 (20.5–24.7) ^c	1.3 (1.2–1.4) ^b	1.7 (1.6–1.9) ^c
72	11.8 (10.7–13.0) ^c	18.1 (16.8–19.4) ^c	1.1 (1.0–1.2) ^b	1.4 (1.3–1.5) ^c
96	10.8 (9.9–11.8) ^b	16.3 (15.2–17.4) ^c	1.0 (0.9–1.1) ^b	1.2 (1.1–1.3) ^c

95% CI are shown within parentheses

Different letters at the same exposure time indicates significant differences ($p < 0.05$)

Table 2 The 24, 48, 72 and 96 h-LC₅₀ values (mg/L) of NO₂-N and NO₃-N for *L. vannamei* postlarvae at 1 and 3 g/L of salinity

Salinity (g/L)	LC ₅₀ NO ₂ -N	
	1	3
Time (h)		
24	29.3 (21.3–40.7) ^b	37.9 (26.5–54.3) ^a
48	5.1 (4.5–5.8) ^c	8.0 (7.0–9.2) ^a
72	4.0 (3.5–4.5) ^c	5.7 (5.1–6.3) ^a
96	3.3 (2.9–3.7) ^c	4.9 (4.3–5.5) ^a
Salinity (g/L)	LC ₅₀ NO ₃ -N	
	1	3
Time (h)		
24	774.8 (541.9–1107.8) ^b	1680.2 (5270.3–2165.8) ^a
48	221.4 (179.7–272.7) ^c	568.5 (516.5–625.7) ^a
72	140.2 (122.6–160.2) ^c	510.1 (465.7–558.7) ^a
96	112.8 (98.5–129.1) ^c	430.0 (390.7–473.3) ^a

95% CI are shown within parentheses

Different letters at the same exposure time indicates significant differences ($p < 0.05$)

Table 3 LC₅₀ of total ammonia-N, NO₂-N, and NO₃-N (mg/L) in several postlarvae penaeid species

Species	Size	Salinity (g/L)	LC ₅₀				Reference
			24 h	48 h	72 h	96 h	
LC₅₀ of total ammonia-N							
<i>Penaeus monodon</i>	PL6	34	52.1	27.7	17.0	11.5	Chin and Chen (1987)
<i>L. vannamei</i>	PL1	34	13.2				Cobo et al. (2014)
<i>L. vannamei</i>	PL12	35	17.9	12.5	12.2	12.2	Frias-Espericueta et al. (2000)
<i>L. vannamei</i>	PL25	10		39.7			Schuler et al. (2010)
<i>L. vannamei</i>	PL20	1	38.9	14.0	11.8	10.8	This study
<i>L. vannamei</i>	PL20	3	48.4	22.5	18.1	16.3	This study
<i>Penaeus japonicus</i>	PL1	36	32.5	22.8	17.4	15.5	Lin et al. (1993)
<i>P. japonicus</i>	PL2	33	31.7				Chen et al. (1989)
<i>P. japonicus</i>	PL12	33	53.4				Chen et al. (1989)
<i>Metapenaeus ensis</i>	PL1	33	30.3	16.7			Chen et al. (1991)
<i>M. ensis</i>	PL10	33	24.4				Chen et al. (1991)
<i>Penaeus setiferus</i>	PL25	25	11.5	9.4	8.7		Alcaraz et al. (1999)
<i>Penaeus paulseni</i>	PL1	28	24.2	8.6	5.6	5.5	Ostrensky and Wasiolesky (1995)
<i>Penaeus semisulcatus</i>	27.5 mg	15	14.8	11.2	7.9	7.1	Kir and Kumlu (2006)
<i>P. semisulcatus</i>	27.5 mg	25	31.9	17.0	12.5	8.9	Kir and Kumlu (2006)
<i>P. semisulcatus</i>	27.5 mg	40	66.7	32.5	23.2	19.1	Kir and Kumlu (2006)
LC₅₀ of NO₂-N							
<i>Metapenaeus ensis</i>	PL1	33	70.1	27.1			Chen and Nan (1991)
<i>P. japonicus</i>	PL12		87.8	55.0	25.0	20.6	Lin et al. (1993)
<i>P. japonicus</i>	PL2		83.4	53.8	21.8	13.0	Chen and Tu (1990)
<i>P. monodon</i>	PL6	34	61.9	33.2	20.5	13.5	Chen and Chin (1988)
<i>P. vaniensis</i>	PL1		277.8	41.6	14.5	10.7	Ostrensky and Poersch (1992)
<i>P. setiferus</i>	PL25	25	268.1	248.8	167.3		Alcaraz et al. (1999)
<i>L. vannamei</i>	PL25	10		153.7			Schuler et al. (2010)
<i>L. vannamei</i>	PL20	1	29.3	5.1	4.0	3.3	This study
<i>L. vannamei</i>	PL20	3	37.9	8.0	5.7	4.9	This study
LC₅₀ of NO₃-N							
<i>L. vannamei</i>	PL20	1	774.8	221.4	140.2	112.8	This study
<i>L. vannamei</i>	PL20	3	1680	568	510	430	This study

and 0.048 mg/l. NH₃-N (Frias-Espericueta et al. 2000); 0.7 mg/L ammonia-N and 0.034 mg/L NH₂-N (Kir and Kumlu 2006); 0.71 mg/L nitrite-N (Chen and Nan 1991).

The toxicity and condition of aquatic organisms during exposure to elevated levels of nitrogen compounds is related with their accumulation in hemolymph. Accumulation is influenced by factors such as branchial permeability, speciation of nitrogenous waste, mechanisms to reduce their passive diffusion, ability to excrete them through a gradient, internal detoxification processes and environmental factors (Romano and Zeng 2013). Among them, salinity, it is one of the variables that most influences the toxicity of ammonia and nitrite, showing an inverse relationship; that is, the toxicity increases as the salinity decreases (Kir and Kumlu 2006; Ramirez-Rochin et al. 2017).

The processes of detoxification, uptake, and elimination of the three nitrogen compounds have been widely discussed

in the reviews of Romano and Zeng (2012, 2013) and references therein. The organisms developed the active excretion of ammonia against a gradient to avoid the excessive accumulation of ammonia in the hemolymph, thus mitigating its toxicity. According to this process, which is closely related to osmoregulation, where NH₃ diffuses through the lipid bilayers of the most permeable gills and is protonated to NH₄⁺. NH₄⁺ is replaced by K⁺ during the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase located in the basolateral border, which transports it to the apical membrane of the gills. Finally, the NH₃ is excreted in the environment through the transport of Na⁺/NH₃⁻ located in the apical part. The detoxification mechanism has been reported in numerous crustacean species and is an important adaptation since hemolymph accumulation is predictable during their prolonged and/or elevated exposure (Lin and Chen 2001). The toxicity of nitrite increases when salinity decreases because

nitrite and Cl^- compete for the same transport site in the $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger on the apical side of branchial cells. This process indicates that nitrite enters through one of the mechanisms of Cl^- uptake by the mitochondrial cells of the gills—probably through the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger. This exchanger is driven by a gradient of abrupt concentration of HCO_3^- towards the exterior created by the catalytic activity of carbonic anhydrase. Similar to the elevated exposure of ammonia, there is evidence that shows the ability of crustaceans to detoxify nitrite; an increase in nitrite levels and the duration of exposure lead to higher concentrations of urea hemolymph in different shrimp species (Chen and Cheng 2000). The processes of uptake and elimination of nitrate in crustaceans is less complex since active transport does not seem to be involved, while gill permeability to nitrate is probably low, thus reducing passive diffusion. Consequently, it is believed that one of the main reasons that nitrate is less toxic is due to reduced hemolymph accumulation. It has been considered that the route involved in the uptake of nitrate in crustaceans is similar to that of nitrite.

Comparing the acute toxicity (LC_{50} -48 h) ammonia and nitrite in *L. vannamei* postlarvae (PL25) at a salinity of 10 g/L, their ratio LC_{50} total ammonia N: LC_{50} NO_2^- N is 3.87 (Schuler et al. 2010) (Table 3); while in our study at a salinity of 3 g/L, in PL20 such ratio is 0.33. The LC_{50} value of ammonia and nitrite in postlarvae of *L. vannamei* to salinities of 3 g/L is 1.8 and 19.2 times lower in comparison to the those LC_{50} to a salinity of 10 g/L. This confirms that nitrite is more toxic than ammonia in low salinity waters, and that the toxicity of both increases (i.e., reduce LC_{50}) with a decrease in salinity. However, it is suggested that sublethal chronic studies must be conducted to corroborate that under the estimated safe concentrations, physiological status of organisms is not compromised ensuring shrimp production.

Acknowledgements The authors thank H. Bojórquez-Leyva and G. Ramírez-Reséndiz for the assistance in the chemical and statistical analysis, respectively. Special gratitude is to Fitmar Company México who provided the organisms for this study. Study supported by the program UNAM-DGAPA-PAPIIT IN201916 Evaluación de efectos letales y subletales de amoníaco, nitrato y nitrito en camarón *Litopenaeus vannamei* en aguas de baja salinidad.

References

- Alcaraz G, Chiappa-Carrera X, Espinoza V, Vanegas C (1999) Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *J World Aquac Soc* 30:90–97
- APHA American Public Health Association (1989) Standard methods for the examination of water and wastewater, 17th edn. APHA, Washington
- Boyd CB (2002) Standardize terminology for low-salinity shrimp culture. *Glob Aquac Adv* 7:58–59
- Boyd CE, Tucker CS (1998) Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston
- Brikema AI, Niederlehner BR, Cairns Jr (1982) Biological monitoring, part IV toxicity testing. *Water Res* 16:239–262
- Casilla H, Lawrence AI (1981) The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp Biochem Physiol A* 68:75–80
- Chen JC, Cheng SY (2000) Recovery of *Penaeus monodon* from functional anemia after exposure to sublethal concentration of nitrite at different pH levels. *Aquat Toxicol* 50:73–83
- Chen JC, Chin TS (1988) Acute toxicity of nitrite to tiger prawn, *Penaeus monodon*, larvae. *Aquaculture* 69:253–262
- Chen JC, Nan FH (1991) Lethal effect of nitrite on *Metapenaeus ensis* larvae. *J World Aquac Soc* 22:51–56
- Chen JC, Tu CC (1990) Acute toxicity of nitrite to larval *Penaeus japonicus*. *J Fish Soc Taiwan* 17:227–287
- Chen JC, Tu CC, Yang WS (1989) Acute toxicity of ammonia to larval *Penaeus japonicus*. *J Fish Soc Taiwan* 16:261–270
- Chen JC, Lin PC, Nan FH (1991) Acute toxicity of ammonia to larval *Metapenaeus ensis*. *Asian Fish Soc* 4:41–51
- Chin TS, Chen JC (1987) Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 66:247–253
- Cobo MI, Sonnenholzner S, Wille M, Sorgeloos P (2014) Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquac Res* 45:470–475
- Finney DJ (1971) Probit Analysis, 3th edn. Cambridge University Press, Cambridge, p 333
- Fuás-Espárcueta MG, Harfush-Meléndez M, Pérez-Osuna F (2000) Effects of ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Bull Environ Contam Toxicol* 65:98–103
- Hargreaves JA (1998) Nitrogen biogeochemical of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166:181–212
- Huang XH, Li CL, Zheng L, Liu CW, Zhou J (2006) The toxicity of NO_2^- -N on *Litopenaeus vannamei* and effects of NO_2^- -N on factors relating to the anti-disease ability. *Acta Hydrobiol Sinica* 30:466–471
- Israngkura A, Sae-Iae S (2002) A review of the economic impacts of aquatic animal disease. In: Phillips JR, Subasinghe MJ, Reantaso RP, MacRae MB (eds) Primary Aquatic Animal Health Care in Rural, Small-scale, Aquaculture Development. Fisheries Department, Bangkok, pp 253–286
- Kir M, Kumlu M (2006) Acute toxicity of ammonia to *Penaeus vannamei* postlarvae in relation to salinity. *J World Aquac Soc* 37:231–235
- Lin YC, Chen JC (2001) Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *J Exp Mar Biol Ecol* 259:109–119
- Lin H, Thuot P, Tillet JP, Mounet-Guillaume R, Charmantier G (1993) Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Mar Biol* 117:591–598
- McGraw WJ, Davis DA, Teichert-Coddington D, Rouse DB (2002) Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: influence of age, salinity endpoint and rate of salinity reduction. *J World Aquac Soc* 33:78–84
- Moss MS, Arce MS, Argue JB, Otoshi AC, Calderón ORF, Tacón JGA (2001) Greening of the blue revolution: efforts toward environmentally responsible shrimp culture. In: Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Baton Rouge, pp. 1–19
- Ostrensky A, Poersch LH (1992) Toxicidade aguda do nitrito na larvicultura do camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Tarfante. 1957. *Neritica* 7:101–107
- Ostrensky A, Wasielesky W Jr (1995) Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Sao Paulo Ostrensky shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante. 1967. *Aquaculture* 132:339–347

- Pérez-Farfante I, Kensley B (1997) Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the Families and Genera. *Memoires du Museum National D'Histoire Naturelle*, Paris, p 233
- Ramírez-Rochín J, Vivas-Espinoza MG, Piñero-Sañudo JJ, Alarcón-Silva SG, Fregoso-López MG, Páez-Osuna F (2017) Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water. *Aquac Res* 48:2337–2343
- Romano N, Zeng C (2012) Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture* 334–337:12–23
- Romano N, Zeng C (2013) Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Rev Fish Sci* 21:1–21
- Roy LA, Davis DA, Saoud P, Boyd CA, Pine IU, Boyd CE (2010) Shrimp culture in inland low salinity waters. *Rev Aquac* 2:191–208
- Schuler DJ, Boardman GD, Kuhn DD, Thiel GI (2010) Acute toxicity of ammonia and nitrite to pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. *J World Aquac Soc* 41:438–446
- Scopus (2017) Scopus Database Elsevier B.V. <https://www.scopus.com/>. Accessed 30 Oct 2017
- Soderberg MW, Meade JW (1991) The effect of ionic strength on unionized ammonia concentration. *Progr Fish Cult* 53:118–120

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él”.

Louis Pasteur (1822-1895)