



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

TOXICIDAD DEL ARSÉNICO Y MERCURIO EN *Litopenaeus vannamei*: EFECTO AGUDO Y SUBLETAL EN CAMARONES EXPUESTOS A DIFERENTES SALINIDADES.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Javier Ramírez Rochín

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2021.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 9 del Mes de febrero del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Toxicidad del arsénico y mercurio en *Litopenaeus vannamei*: efecto agudo y subletal en camarones expuestos a diferentes salinidades”

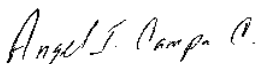
Presentada por el alumno:

Javier Ramírez Rochín

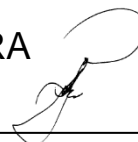
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **ACUICULTURA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director de Tesis




Dr. Federico Páez Osuna
Co-Director de Tesis




Dra. María Antonia Guzmán Murillo
Co-Tutora de Tesis



Dra. Irasema Elizabeth Luis Villaseñor
Co-Tutora de Tesis



Martín Gabriel Frías Espericueta
Co-Tutor de Tesis



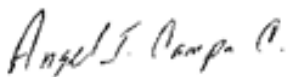
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 17 de febrero de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Javier Ramírez Rochín del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate Professional Plagiarism Prevention
- Filtros utilizados:
Excluir citas y Bibliografía
- Porcentajes de similitud:
10%, el cual se muestra en la captura de pantalla

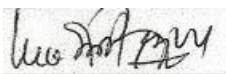
Firmas del comité



Dr. Ángel I. Campa Córdova
(Co-Director de tesis)



Dr. Federico Páez Osuna
(Co-Director de tesis)



Dra. María Antonia Guzmán Murillo
(Co-Tutor de tesis)



Dr. Martín G. Frías-Espericueta
(Co-Tutor de tesis)

		Citas excluidas	10%
		Bibliografía excluida	SIMILAR
Resumen de Coincidencias			
1	Internet 310 palabras Copiado el 13-Ene-2019 cibnor.repositorioinstitucional.mx		1%
2	Crossref 304 palabras María Pacheco M, Ángel Campa C, Gabriel Aguirre G, Antonio Luna G, María Guzmán M, Felipe Ascencio. "Efecto d		1%
3	Crossref 300 palabras Javier Ramírez-Rochín, Ángel I. Campa-Córdova, Martín G. Frías-Espericueta, Marcela G. Fregoso-López et al. "Eff		1%
4	Internet 226 palabras Copiado el 13-Nov-2020 dSPACE.cibnor.mx:8080		<1%
5	Crossref 215 palabras Javier Ramírez-Rochín, Ángel I. Campa-Córdova, Martín G. Frías-Espericueta, Marcela G. Fregoso-López et al. "Ac		<1%
6	Internet 186 palabras Copiado el 04-Mar-2020 doczz.es		<1%
7	Internet 177 palabras Copiado el 18-Jul-2020 docplayer.es		<1%
8	Internet 169 palabras Copiado el 24-Ago-2016 documents.tips		<1%
9	Internet 137 palabras hdl.handle.net		<1%
10	Internet 137 palabras Copiado el 14-Dic-2020 aprenderly.com		<1%



Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dr. Federico Páez Osuna
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Co-Director de Tesis

Dra. Irasema Elizabeth Luis Villaseñor
Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa
Co-Tutora de Tesis

Dra. María Antonia Guzmán Murillo
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dr. Martín Gabriel Frías Espericueta
Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. Federico Páez Osuna
Dra. Irasema Elizabeth Luis Villaseñor
Dra. María Antonia Guzmán Murillo
Dr. Martín Gabriel Frías Espericueta

Jurado de Examen

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. Federico Páez Osuna
Dra. María Antonia Guzmán Murillo
Dr. Martín Gabriel Frías Espericueta
Dr. Edilmar Cortés Jacinto

Suplente

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra

Resumen

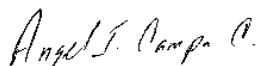
En el presente estudio se evaluó la toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración (concentración acumulada del contaminante en un organismo acuático cuando la única ruta de exposición es a través del agua) del arsénico (As) y mercurio (Hg) en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) aclimatados a diferentes salinidades; asimismo, se determinó el efecto combinado de la baja salinidad y niveles subletales de dichos tóxicos sobre la concentración de oxihemocianina, conteo total de hemocitos (CTH), susceptibilidad de los organismos ante un reto con *Vibrio parahaemolyticus*, bioacumulación (concentración acumulada del contaminante cuando la ruta de exposición es a través del agua y la dieta) de los tóxicos en músculo de camarón y su potencial riesgo a la salud humana. Las concentraciones letales medias (CL₅₀) para As fueron 30.8, 20.2, 16.8 y 13.9 mg/L a 5 g/L de salinidad; 30.4, 19.1, 16.8 y 14.8 mg/L a 10 g/L de salinidad; 31.5, 19.0, 15.0 y 11.9 mg/L a 25 g/L de salinidad para las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente. No se observó un efecto significativo de la salinidad sobre la bioconcentración de As en los camarones después de 96 h de exposición en todos los tratamientos probados, lo cual explica que la salinidad no afecta significativamente a la toxicidad aguda del metaloide. Las CL₅₀ de Hg fueron 1.7, 1.2, 1.0 y 0.5 mg/L a 5 g/L; 2.2, 1.7, 1.3 y 0.8 a 10 g/L; 7.0, 5.7, 1.7 y 1.5 a 25 g/L de salinidad para las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente. La bioconcentración de Hg en los camarones fue estadísticamente más elevada en 5 g/L que en 25 g/L de salinidad en todos los tratamientos examinados, coincidiendo con el hecho de que la toxicidad aguda del metal fue mayor en la salinidad más baja en relación a la más alta. La relación inversa determinada entre la toxicidad del Hg y la salinidad se debió al estrés osmótico y al incremento en las concentraciones de las fracciones de las especies químicas neutras del metal a salinidades más bajas. Para la determinación de los efectos subletales, concentraciones equivalentes al 0 (control), 1 y 10% de las CL₅₀-96 h de As y Hg calculadas para 25 g/L de salinidad, fueron probadas durante 96 h en 5 y 25 g/L de salinidad, debido a que tradicionalmente dichas concentraciones se han considerado como seguras para el cultivo de crustáceos. Los resultados para As demostraron que 119 (1% de la CL₅₀-96 h) y 1190 (10% de la CL₅₀-96 h) µg/L del metaloide no provocaron mortalidad sobre los grupos de camarones ensayados en 5 y 25 g/L de salinidad; asimismo, dichos niveles de As no afectaron el consumo aparente de alimento, niveles de oxihemocianina, CTH, y la susceptibilidad de los camarones expuestos a una infección con *V. parahaemolyticus*, lo cual sugirió que estos niveles de As son fisiológicamente seguros para el camarón. De acuerdo al análisis de riesgo para la salud humana, los camarones sometidos a 119 y 1190 µg/L de As 96 h, no acumularon niveles del metaloide en el músculo potencialmente riesgosos para la salud de la población promedio en México (coeficiente de peligrosidad (HQ) < 1); no obstante, con base en las raciones máximas diarias de consumo seguras estimadas para cada tratamiento con As (*i.e.*, 432 y 502 g para 119 µg/L de As; y 366 y 432 g para 1190 µg/L de As, en 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente), se concluyó que es probable que éstas sean excedidas por las personas que habitan la zona costera, donde el consumo de camarón es mayor que la media nacional; por lo tanto, dichos niveles de As no son apropiados para el cultivo de *L. vannamei*. En el caso del Hg, se demostró que 15 µg/L del metal (1% de la CL₅₀-96 h) no provocó efectos letales en 5 y 25 g/L de salinidad, mientras que lo contrario se observó en 150 µg/L de Hg (10% de la CL₅₀-96 h) en ambas salinidades. El consumo aparente de alimento, niveles de oxihemocianina, CTH y la susceptibilidad de los camarones expuestos ante una infección con *V. parahaemolyticus* no

fueron afectados significativamente por la exposición a 96 h a con 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg, aunque dichas variables disminuyeron significativamente en el tratamiento con 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg, siendo más agudo este efecto en la salinidad más baja; lo cual sugiere que solo la concentración de Hg más baja fue fisiológicamente segura para el camarón. El análisis de riesgo para la salud humana indicó que los camarones expuestos 96 h a 15 y 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg acumulan concentraciones riesgosas para la salud de los consumidores en México, sobre todo aquellos organismos expuestos a baja salinidad. Por lo tanto, se concluye que los niveles de Hg ensayados no son apropiados para el cultivo de *L. vannamei*.

Palabras clave: Camarón blanco; metales pesados; estrés osmótico; efectos subletales; reto bacteriano.

ORCID: 0000-0002-0520-717X

Vo. Bo



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director de Tesis



Dr. Federico Páez-Osuna
Co-Director de Tesis

Summary

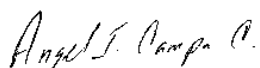
In this study the acute toxicity and bioconcentration (cumulative concentration of pollutant in an aquatic organism when the only exposure route is through the water) capacity of arsenic (As) and mercury (Hg) in *Litopenaeus vannamei* juveniles acclimated to different salinities were evaluated; likewise, the combined effect of low salinity and sublethal levels of these pollutants on oxyhemocyanin concentration, total hemocyte count (THC), shrimp susceptibility to a challenge with *Vibrio parahaemolyticus*, As and Hg bioaccumulation (cumulative concentration of pollutant in aquatic organisms when the exposure routes are through the water and food) in shrimp muscle and their potential risk to human health. The lethal median concentrations (LC₅₀) for As were 30.8, 20.2, 16.8 and 13.9 mg/L to 5 g/L of salinity; 30.4, 19.1, 16.8 and 14.8 mg/L to 10 g/L of salinity; 31.5, 19.0, 15.0 and 11.9 mg/L a 25 g/L of salinity for 24, 48, 72 y 96 h, respectively. Salinity did not have a significant effect on As bioconcentration in shrimp after 96 h of exposure in the tested treatments, which explains why salinity did not significantly affect the acute As toxicity. Hg LC₅₀ values were 1.7, 1.2, 1.0 and 0.5 mg/L to 5 g/L; 2.2, 1.7, 1.3 and 0.8 to 10 g/L; 7.0, 5.7, 1.7 and 1.5 to 25 g/L of salinity for 24, 48, 72 y 96 h, respectively. The Hg bioconcentration in shrimp was statistically higher in 5 g/L than in 25 g/L of salinity in the examined treatments, coinciding with the fact that the acute Hg toxicity was higher at lower salinity. The inverse relationship determined between Hg toxicity and salinity was due to osmotic stress and the neutral chemical Hg species fractions that increased at lower salinities. For the determination of the sublethal effects, equivalent concentrations to 0 (control), 1 and 10% of the LC₅₀-96 h of As and Hg calculated for 25 g/L of salinity, were tested during 96 h at 5 and 25 g/L of salinity, because traditionally these concentrations have been considered safety for the crustaceans cultures. The results showed that 119 (1% of the LC₅₀-96 h) and 1190 (10% of the LC₅₀-96 h) µg/L of As did not cause mortality on the shrimp groups tested at 5 and 25 g/L of salinity; likewise, these As levels did not affect the apparent feed consumption, oxyhemocyanin levels, THC, and the shrimp susceptibility after to be infected with *V. parahaemolyticus*, which suggested that such As levels are physiologically safe for shrimp. According to analysis of human health risk, the shrimp exposed to 119 and 1190 µg/L of As during 96 h did not bioaccumulate As levels in muscle potentially risky for health of the average population in Mexico (hazard coefficient (HQ) < 1). However, based on the maximum safety daily consumption rations estimated for each As treatment (*i.e.*, 432 and 502 g for 119 µg/L of As; and 366 and 432 g for 1190 µg/L of As, in 5 and 25 g/L of salinity), it was concluded that these are likely to be exceeded by people living in the coastal zone, where shrimp consumption is higher than the national average, therefore, these As levels are not appropriate for the *L. vannamei* culture. In the case of Hg, it was shown that 15 µg/L (1% of the LC₅₀-96 h) did not cause lethal effects at 5 and 25 g/L of salinity, while the opposite was observed in 150 µg/L (10% of the LC₅₀-96 h) in both salinities. Apparent feed consumption, oxyhemocyanin levels, THC and the shrimp susceptibility after to be infected with *V. parahaemolyticus* were not significantly affected by exposure to 15 µg/L of Hg during 96 h, although these variable decreased significantly in treatment with 150 µg/L of Hg, this effect being more acute in the lowest salinity. This suggests that only the lowest Hg concentration tested was physiologically safe for shrimp. The analysis of human health risk indicated that shrimp exposed for 96 h to 15 and 150 µg/L of Hg bioaccumulated Hg concentrations in muscle that were risky for the health of consumers in

Mexico, especially those shrimp exposed in low salinity. Therefore, it is concluded that the Hg levels tested are not appropriate for *L. vannamei* culture.

Key words: White shrimp; heavy metals; osmotic stress; sublethal effects; bacterial challenge.

ORCID: 0000-0002-0520-717X

Vo. Bo



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director de Tesis



Dr. Federico Páez-Osuna
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

A Dios, por guiar satisfactoriamente cada paso en mi vida.

A mis padres, Asención y Javier, por apoyar incondicionalmente el deseo de continuar con mi carrera académica.

A mi abuela Lucila, a quien debo en gran medida ser la persona que soy.

Agradecimientos

Al CIBNOR por aceptarme como estudiante, y brindarme la oportunidad de continuar con mi carrera académica; así mismo al CONACyT, quien a través de la beca número (CVU/Becario): 491156/279350 facilitó mi manutención durante este periodo como estudiante de Doctorado.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-Unidad Académica Mazatlán de la UNAM por permitir el uso de sus instalaciones para el desarrollo de trabajo experimental y analítico.

A la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa, por contribuir de forma significativa en el desarrollo del trabajo experimental.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, institución que a través del Departamento de Acuicultura compartió la cepa bacteriana utilizada en el presente estudio (contribución realizada por el Dr. Píndaro Álvarez Ruíz y el Dr. Antonio Luna González).

Al Dr. Federico Páez Osuna, por otorgarme la confianza de seguir trabajando en su laboratorio ahora como estudiante de Doctorado, dirigir el presente estudio y sobre todo por las enseñanzas académicas. Muchas gracias doc.

Al Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, por su voto de confianza y dirigir el presente estudio, así como por su indispensable apoyo académico.

A los miembros del comité tutorial, Dra. María Antonia Guzmán, Dra. Irasema E. Luis Villaseñor y Dr. Martín G. Frías Espericueta, por sus valiosas aportaciones, las cuales enriquecieron en gran medida el presente trabajo de tesis.

Un especial agradecimiento al Químico Humberto Bojórquez Leyva, técnico del Laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera del ICMYL-UNAM Unidad Académica Mazatlán, por su indispensable colaboración en la realización de los análisis químicos, así como por sus consejos tanto académicos como personales.

A Jesús Martín Ramírez Orozco, responsable del Laboratorio de Inmunología Marina del CIBNOR, por su valiosa colaboración durante los análisis bioquímicos.

Al bibliotecario Daniel Oviedo Juárez, por su amplia colaboración durante las búsquedas bibliográficas, y poner siempre al alcance de un servidor los recursos de la Biblioteca del ICMYL-Unidad Académica Mazatlán.

Al Dr. Francisco Flores Higuera por su valiosa colaboración durante el trabajo experimental, y sobre todo por sus propositivos consejos académicos.

A Milton y Melissa, por su importante ayuda durante el trabajo experimental y procesamiento de muestras.

A mis compañeros de Laboratorio, Marcela G., Suammy G., Magdalena E., Cristina, Ahtziri, Juan, Armando y Alfredo, por su incondicional disposición a colaborar en lo que fuera necesario para sacar adelante esta tesis, por su compañía y amistad.

A mis compañeros y amigos cibnorense, Tomás, Robert, Zoe, Gloria y Jorge, por compartir sus experiencias académicas pero sobre todo por hacer realmente agradable todo el tiempo que viví en el bello puerto paceño.

Al Matemático Germán Ramírez Reséndiz, por su valiosa asesoría en estadística, así como al Lic. Carlos Suárez por su asesoría técnica en computación.

A todo el personal de Posgrado del CIBNOR, particularmente a la Dra. Gracia Gómez, Adriana Franzoni, Lic. Osvelia Ibarra, Tania Núñez y Ing. Horacio Sandoval, por las amables atenciones que recibí en todo momento.

A todo el personal de Biblioteca del CIBNOR-La Paz, especialmente para la Lic. Ana María Talamantes Cota y la Lic. María Esther Ojeda Castro, por el excelente servicio que siempre me brindaron durante mis búsquedas bibliográficas.

A los proyectos DGAPA-PAPIIT-UNAM IN200619 titulado "Metales y metaloides en ríos y presas de cuencas mineras de Sinaloa: identificando contaminación y riesgos para la salud", Proyecto institucional ICML-UNAM titulado "Biogeoquímica de los nutrientes y oligoelementos en sistemas acuáticos: acumulación, distribución, transferencia, efectos y ciclaje", y proyecto SEP-CONACyT (243532) por el apoyo financiero otorgado al presente estudio.

Contenido

Resumen	i
Summary	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	viii
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Generalidades de la biología de <i>L. vannamei</i> y datos de producción por pesca y acuicultura	6
2.2. Metaloides y metales pesados como contaminantes acuáticos.....	8
2.3. Estudios que abordan el efecto de la salinidad sobre la toxicidad aguda de metaloides y metales pesados en crustáceos.....	10
2.4. Estudios que abordan los efectos de metaloides-metales pesados y la salinidad sobre la oxihemocianina, conteo total de hemocitos y susceptibilidad de crustáceos ante retos con patógenos bajo concentraciones subletales	12
2.5. Estudios relacionados a la capacidad de bioconcentración/bioacumulación del As y Hg en crustáceos bajo diferentes salinidades	17
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo general	24
5.2. Objetivos particulares.....	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1. Transporte y aclimatación	25
6.2. Calidad del agua.....	26
6.3. Pruebas de toxicidad aguda y bioconcentración de arsénico y mercurio en juveniles de <i>L. vannamei</i>	27
6.3.1. Cálculo de las concentraciones letales medias y factores de bioconcentración de arsénico y mercurio en <i>L. vannamei</i>	28
6.3.2. Análisis estadísticos de las pruebas de toxicidad aguda de arsénico y mercurio en juveniles de <i>L. vannamei</i>	29
6.4. Pruebas subletales.....	29
6.4.1. Determinación de las dosis letales medias de <i>V. parahaemolyticus</i> en juveniles de <i>L. vannamei</i>	29
6.4.2. Pruebas subletales de arsénico y mercurio en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferente salinidad	30
6.4.3. Pruebas reto con <i>V. parahaemolyticus</i> en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades	33
6.4.4. Cálculos de los coeficientes de peligrosidad de As y Hg.....	35
6.4.5. Análisis estadísticos relacionados a las pruebas de toxicidad subletal de arsénico y mercurio en <i>L. vannamei</i>	36

6.5.	Análisis químico-biológicos	36
6.5.1.	Determinación de arsénico y mercurio en tejidos de <i>L. vannamei</i>	36
6.5.2.	Conteo total de hemocitos y oxihemocianina en <i>L. vannamei</i>	38
7.	RESULTADOS	39
7.1.	Caracterización química del agua de mar y dulce empleada en los experimentos de toxicidad aguda y subletal	39
7.2.	Pruebas de toxicidad aguda.....	40
7.2.1.	Toxicidad aguda y bioconcentración de arsénico en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades.....	40
7.2.2.	Toxicidad aguda y bioconcentración de mercurio en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades.....	48
7.3.	Pruebas de toxicidad subletal de arsénico	57
7.3.1.	Dosis letal media de <i>V. parahaemolyticus</i> de <i>L. vannamei</i> (juveniles) aclimatados para la prueba subletal con arsénico.....	57
7.3.2.	Toxicidad subletal del arsénico sobre la oxihemocianina, conteo total de hemocitos y bioacumulación en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades	58
7.3.3.	Toxicidad subletal del arsénico sobre la susceptibilidad de juveniles de <i>L. vannamei</i> ante un reto con <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes salinidades	62
7.3.4.	Cálculo de los coeficientes de peligrosidad (HQ) de arsénico en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a concentraciones subletales de arsénico en diferentes salinidades.....	63
7.4.	Pruebas de toxicidad subletal de mercurio.....	64
7.4.1.	Dosis letal media de <i>V. parahaemolyticus</i> de los juveniles de <i>L. vannamei</i> aclimatados para la prueba subletal con mercurio	64
7.4.2.	Toxicidad subletal del mercurio sobre la oxihemocianina, conteo total de hemocitos y bioacumulación en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades	65
7.4.3.	Toxicidad subletal del mercurio sobre la susceptibilidad de juveniles de <i>L. vannamei</i> ante un reto con <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes salinidades	70
7.4.4.	Cálculo de los coeficientes de peligrosidad (HQ) de mercurio en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a concentraciones subletales de mercurio en diferente salinidad	72
8.	DISCUSIÓN	74
8.1.	Toxicidad aguda	74
8.1.1.	Efecto de la baja salinidad sobre la toxicidad aguda y bioconcentración del arsénico en juveniles de <i>L. vannamei</i>	76
8.1.2.	Efecto de la baja salinidad sobre la toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración del mercurio en juveniles de <i>L. vannamei</i>	84
8.2.	Toxicidad subletal	94
8.2.1.	Efecto de la baja salinidad y niveles subletales de arsénico sobre la oxihemocianina, CTH, bioacumulación del metaloide en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> y su susceptibilidad ante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	96
8.2.2.	Evaluación de riesgo a la salud humana por consumo de músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes niveles de arsénico y salinidad	105

8.2.3. Efecto de la baja salinidad y niveles subletales de mercurio sobre la oxihemocianina, CTH, bioacumulación del metal en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> y su susceptibilidad ante una infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	108
8.2.4. Evaluación de riesgo a la salud humana por consumo de músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes niveles de mercurio y salinidad	115
9. CONCLUSIONES	118
9.1. Toxicidad aguda y bioconcentración de arsénico y mercurio en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades	118
9.2. Toxicidad subletal del arsénico y mercurio en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades.....	118
10. LITERATURA CITADA	121
11. ANEXOS	140
Artículos publicados	140

Lista de figuras

Figura 1. Descripción de <i>L. vannamei</i>	6
Figura 2. Producción acuícola mundial de <i>L. vannamei</i> considerando diferentes fuentes de agua para su cultivo en el año 2018 (FAO, 2020).	7
Figura 3. Representación gráfica de la hemocianina en su forma oxy de acuerdo a la estructura de rayos X en <i>Limulus polyphemus</i> . El modelo muestra el sitio de enlace del O ₂ con los dos átomos de cobre (CuA y CuB) (tomado de Decker y Terwilliger, 2000).	12
Figura 4. Imagen de hemocitos circulantes de <i>L. vannamei</i> bajo el microscopio de contraste de fases. (a) hemocito hialino, (b) hemocitos semi-granulares y (c) granulares (tomado de Vargas-Albores et al., 2005).	14
Figura 5. Diseño experimental de las pruebas de toxicidad aguda con As y Hg considerando las diferentes salinidades evaluadas (A). Imagen de un experimento de toxicidad aguda para una salinidad (B).	27
Figura 6. Diseño experimental de las pruebas de toxicidad subletal de As o Hg desarrolladas a 5 (A) y 25 g/L (B) de salinidad (T1 y T2 se refieren a los tratamientos donde se expusieron a los camarones a concentraciones equivalentes al 1 y 10%, respectivamente, de las CL ₅₀ -96 h determinadas para cada tóxico en 25 g/L de salinidad). Imagen de un experimento subletal realizado a las dos salinidades evaluadas (C).	32
Figura 7. Diseño experimental de las pruebas reto con <i>V. parahaemolyticus</i> realizadas a 5 (A) y 25 (B) g/L de salinidad. El tratamiento control (-) se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a la solución de agua de mar diluida (sin tóxico) y posteriormente inyectado con solución salina estéril (3% de NaCl); el tratamiento control (+) se refiere al grupo de camarones expuestos 96 h a la solución de agua de mar diluida (sin tóxico) y posteriormente infectado con la DL ₅₀ -48 h de <i>V. parahaemolyticus</i> determinada para cada tóxico; el tratamiento T1 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a una concentración equivalente al 1% de la CL ₅₀ -96 h determinada para cada tóxico en 25 g/L de salinidad, y posteriormente infectado con la DL ₅₀ -48 h de <i>V. parahaemolyticus</i> determinada para cada tóxico; el tratamiento T2 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a una concentración equivalente al 10% de la CL ₅₀ -96 h determinada para cada tóxico en 25 g/L de salinidad, y posteriormente infectado con la DL ₅₀ -48 h de <i>V. parahaemolyticus</i> determinada para cada tóxico. Todos los tratamientos se corrieron por triplicado sin administrar As o Hg al agua. Imagen de una prueba reto con <i>V. parahaemolyticus</i> desarrolladas con las dos salinidades evaluadas (C).	34
Figura 8. Concentraciones letales medias e intervalos de confianza (barras) de arsénico en juveniles de <i>L. vannamei</i> calculadas para los tres niveles de salinidad (g/L) en intervalos de 24 h durante 96 h (n = 3). No se encontraron diferencias significativas (P > 0.05) entre los valores de diferentes salinidades y mismo tiempo de exposición.	45
Figura 9. Bioconcentración de arsénico (mg/kg en peso seco) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes salinidades y concentraciones de arsénico disuelto en el agua después de	

- 96 h. Los datos se muestran como promedios \pm desviación estándar ($n = 3$). Distintas letras entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).....47
- Figura 10.** Factor de bioconcentración (FBC) de arsénico (mg/kg de peso seco) en juveniles de *L. vannamei* expuestos 96 h a diferentes salinidades y concentraciones de arsénico disuelto en el agua. Los datos son mostrados como promedios y desviaciones estándar ($n = 3$). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).....48
- Figura 11.** Concentraciones letales medias e intervalos de confianza (barras) de mercurio en juveniles (8.4 \pm 0.7 g) de *L. vannamei* calculadas para los tres niveles de salinidad (g/L) en intervalos de 24 h durante 96 h ($n = 3$). Letras distintas indican diferencias significativas entre valores de diferentes salinidades pero mismo tiempo de exposición ($P < 0.05$).53
- Figura 12.** Bioconcentración de mercurio (mg/kg en peso seco) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades y concentraciones de mercurio disuelto en el agua después de 96 h. Los datos se muestran como promedios \pm desviación estándar ($n = 3$). Distintas letras entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).....55
- Figura 13.** Factor de bioconcentración (FBC) de mercurio (mg/kg en peso seco) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 96 h a diferentes salinidades y concentraciones de mercurio disuelto en el agua. Los datos se muestran como promedios y desviaciones estándar ($n = 3$). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).....56
- Figura 14.** Mortalidad acumulada promedio \pm desviación estándar de juveniles de *L. vannamei* después de 48 h de haber sido infectados con *V. parahaemolyticus* bajo diferentes ambientes de salinidad. El tratamiento 0 (-) (control negativo) se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 0 $\mu\text{g/L}$ de As en agua y posteriormente inyectado con solución salina estéril (3% de NaCl); el tratamiento 0 (+) (control positivo) se refiere al grupo de camarones expuestos 96 h a 0 $\mu\text{g/L}$ de As en agua y posteriormente infectado con 3.3×10^5 UFC/g de camarón (DL_{50} -48 h); el tratamiento 119 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 119 $\mu\text{g/L}$ de As en agua y posteriormente infectado con 3.3×10^5 UFC/g de camarón; el tratamiento 1190 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 1190 $\mu\text{g/L}$ de As en agua y posteriormente infectado con 3.3×10^5 UFC/g de camarón. Todos los tratamientos se corrieron por triplicado ($n = 30$) sin administrar As al agua. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).....62
- Figura 15.** Mortalidad acumulada promedio \pm desviación estándar de juveniles de *L. vannamei* después de 48 h de haber sido infectados con *V. parahaemolyticus* bajo diferentes ambientes de salinidad. El tratamiento 0 (-) (control negativo) se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 0 $\mu\text{g/L}$ de Hg en agua y posteriormente inyectado con solución salina estéril (3% de NaCl); el tratamiento 0 (+) (control positivo) se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 0 $\mu\text{g/L}$ de Hg en agua y posteriormente infectado con 2.4×10^5 UFC/g de camarón (DL_{50} -48 h); el tratamiento 15 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg en agua y posteriormente infectado con 2.4×10^5 UFC/g de camarón; el tratamiento 150 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg en agua y posteriormente infectado con

2.4 x 10⁵ UFC/g de camarón. Todos los tratamientos se corrieron por triplicado (n = 3) sin administrar Hg al agua. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).....71

Figura 16. La gráfica que ilustra los escenarios de mortalidad teórica que se obtienen al exponer siete grupos de camarones (10 organismos por grupo) de una misma población al mismo número de concentraciones de un tóxico en un tiempo dado. El primer escenario corresponde a organismos expuestos a las tres concentraciones más altas (camarones muertos con relleno color negro); el segundo está representado por camarones de la tercera y cuarta concentración más baja (camarones muertos con relleno color gris); el tercer escenario está integrado por los organismos de la primera y segunda concentración más baja. Los camarones que sobreviven (sin relleno para los tres escenarios). La curva sigmoideal representa la dosis-respuesta (concentración-mortalidad) de cada grupo de individuos frente al logaritmo de la dosis (modificado de Páez-Osuna, 2011).75

Lista de tablas

Tabla 1. Caracterización química del agua de mar y agua dulce utilizada para las pruebas de toxicidad aguda.	39
Tabla 2. Concentraciones promedio \pm desviación estándar (mg/L) de las soluciones de prueba de arsénico utilizadas en los experimentos de toxicidad aguda y su variación (V) con respecto a las concentraciones nominales (n = 4).	40
Tabla 3. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) del experimento preliminar con As a 25 g/L de salinidad (n = 20).	41
Tabla 4. Mortalidad promedio (%) \pm desviación estándar de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de As en 5 g/L de salinidad (n = 30).	41
Tabla 5. Concentraciones letales medias promedio (CL ₅₀) y límites de confianza (95%) \pm desviación estándar de As (mg/L) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).	42
Tabla 6. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de As en 10 g/L de salinidad (n = 30).	43
Tabla 7. Concentraciones letales medias promedio (CL ₅₀) y límites de confianza (95%) de As \pm desviación estándar (mg/L) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a 10 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).	43
Tabla 8. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de As (mg/L) en 25 g/L de salinidad (n = 30).	44
Tabla 9. Concentraciones letales medias promedio (CL ₅₀) y límites de confianza (95%) \pm desviación estándar de As (mg/L) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a 25 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).	44
Tabla 10. Número de camarones <i>L. vannamei</i> sobrevivientes por réplica (R1, R2, y R3) correspondientes a cada nivel de arsénico disuelto en el agua (mg/L) ensayado en las pruebas de toxicidad aguda con diferentes salinidades.	46
Tabla 11. Concentraciones promedio \pm desviación estándar (mg/L) de las soluciones de prueba de mercurio utilizadas en los experimentos de toxicidad aguda y su variación (V) con respecto a las concentraciones nominales (n = 4).	49
Tabla 12. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) del experimento preliminar con Hg (mg/L) a 25 g/L de salinidad (n = 20).	49
Tabla 13. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de Hg en 5 g/L de salinidad (n = 30).	50
Tabla 14. Concentraciones letales medias promedio (CL ₅₀) y límites de confianza (95%) \pm desviación estándar de Hg (mg/L) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).	51
Tabla 15. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de Hg en 10 g/L de salinidad (n = 30).	51

Tabla 16. Concentraciones letales medias promedio (CL ₅₀) y límites de confianza (95%) ± desviación estándar de Hg (mg/L) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a 10 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).	52
Tabla 17. Mortalidad promedio ± desviación estándar (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de Hg en 25 g/L de salinidad (n = 30).	52
Tabla 18. Concentraciones letales medias promedio (CL ₅₀) y límites de confianza (95%) ± desviación estándar de Hg (mg/L) en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a 25 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).	53
Tabla 19. Número de camarones (<i>L. vannamei</i>) sobrevivientes por réplica (R1, R2, y R3) correspondientes a cada nivel de mercurio disuelto en el agua (mg/L) ensayado en las pruebas de toxicidad aguda con diferentes salinidades.	54
Tabla 20. Concentraciones promedio de arsénico ± desviación estándar (µg/L) determinadas en las soluciones de prueba ensayadas de las 0 a 48 h (A) y de las 48 a 96 h (B) en el experimento de toxicidad subletal a diferentes salinidades (n = 6).	58
Tabla 21. Mortalidad acumulada promedio ± desviación estándar (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> registrada a diferentes tiempos de exposición, niveles de arsénico disuelto en agua y salinidades (n = 135). No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (P > 0.05).	59
Tabla 22. Concentración de oxihemocianina promedio ± desviación estándar (mmol/L) determinada en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes tiempos de exposición, niveles de arsénico disuelto en agua y salinidades (n = 6). No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (P > 0.05).	60
Tabla 23. Conteo total de hemocitos promedio ± desviación estándar (10 ⁶ células/mL) de juveniles de <i>L. vannamei</i> registrado a diferentes tiempos de exposición, niveles de arsénico disuelto en agua y salinidades (n = 6). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).	60
Tabla 24. Bioacumulación de arsénico promedio ± desviación estándar (µg/g en peso seco) en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> determinada a diferentes tiempos de exposición, niveles de arsénico disuelto en agua y salinidades (n = 3). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).	61
Tabla 25. Coeficientes de peligrosidad (HQ) de As calculados considerando las concentraciones promedio de As _i estimadas en el músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de As disuelto en el agua y salinidad.	64
Tabla 26. Concentraciones promedio de mercurio ± desviación estándar (µg/L) determinadas en las soluciones de prueba ensayadas de las 0 a 48 h (A) y de las 48 a 96 h (B) en el experimento de toxicidad subletal a diferentes salinidades (n = 6).	65
Tabla 27. Mortalidad acumulada promedio ± desviación estándar (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> registrada a diferentes tiempos de exposición, niveles de mercurio disuelto en agua y	

salinidades (n = 135). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).....	66
Tabla 28. Concentración de oxihemocianina promedio \pm desviación estándar (mmol/L) determinada en juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes tiempos de exposición, niveles de mercurio disuelto en agua y salinidades (n = 6). Distintas letras entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).	67
Tabla 29. Conteo total de hemocitos promedio \pm desviación estándar (10^6 células/mL) de juveniles de <i>L. vannamei</i> registrado a diferentes tiempos de exposición, niveles de mercurio disuelto en agua y salinidades (n = 6). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).....	68
Tabla 30. Bioacumulación de Hg promedio \pm desviación estándar ($\mu\text{g/g}$ en peso seco) en músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> determinada a diferentes tiempos de exposición, niveles de Hg disuelto en agua y salinidades (n = 3). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).	69
Tabla 31. Coeficientes de peligrosidad (HQ) de Hg calculados considerando las concentraciones promedio de MeHg estimadas para músculo de juveniles de <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes concentraciones de Hg disuelto en el agua y salinidad.	72
Tabla 32. CL ₅₀ de arsénico (mg/L) para diferentes especies de crustáceos a distintos tiempos de exposición y salinidad. *Datos no disponibles, **juveniles de 40-50 mm de longitud y 60-70 mm de ancho del caparazón.	77
Tabla 33. CL ₅₀ de mercurio (mg/L) para diferentes especies de crustáceos a diferentes tiempos de exposición y salinidad.....	86
Tabla 34. Distribución (%) de las especies químicas de mercurio inorgánico presentes en las soluciones de prueba en relación a los niveles extremos de mercurio total ensayados en los experimentos de toxicidad aguda a diferentes salinidades. La especiación fue calculada utilizando el programa Visual MINTEQ versión 3.1, mismo que fue alimentado con la composición química teórica del agua de mar diluida a las distintas salinidades calculadas de acuerdo a Millero (2006).....	91

1. INTRODUCCIÓN

El camarón *Litopenaeus vannamei* es una especie con una gran importancia ecológica y económica para los países de la costa del océano Pacífico desde México hasta Perú, donde se distribuye de forma natural (Dugassa y Gaetan, 2018). Por ejemplo, *L. vannamei* representó el 25% de la producción total de camarón capturado en estuarios y bahías de México, y el 99% de la producción total de camarón cosechado por acuicultura (CONAPESCA, 2020).

La habilidad para adaptarse a un amplio intervalo de salinidades, que va desde 0.5 a 45.0 g/L (Bray *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 2010), a pesar de que su punto isosmótico es 25 g/L de salinidad (Castille y Lawrence, 1981), su alta tolerancia a los compuestos nitrogenados (Frías-Espericueta *et al.*, 1999; Valencia-Castañeda *et al.*, 2019) y a enfermedades causadas por virus y bacterias en relación con otros penaeidos (Godínez-Siordia *et al.*, 2011), así como su elevada demanda en el mercado, le han permitido a *L. vannamei* ser la especie de camarón más cultivada en el mundo, alcanzando una producción global de 4.9 millones de t en el año 2018, representando el 82% de la producción acuícola mundial de camarón (FAO, 2020).

Sin embargo, el cultivo de *L. vannamei* actualmente enfrenta serios problemas con enfermedades de origen viral y bacteriana, como es el caso de la enfermedad causada por el virus de la mancha blanca (WSSV), virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), virus del Taura (TSV) y vibriosis; siendo esta última producida por bacterias del género *Vibrio* como *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida* *V. parahaemolyticus* (Morales y Cuellar-Anjel, 2014; Qin *et al.*, 2018), destacando *V. parahaemolyticus* por ser el principal agente etiológico del síndrome de la muerte temprana (AHPND), enfermedad responsable de causar las mayores pérdidas económicas en la industria camaronícola mundial desde el año 2009 (Campa-Córdova *et al.*, 2017).

Las bacterias *Vibrio* son parte importante de la microflora comúnmente presente en agua y sedimento de ambientes marinos y salobres (Rivas-Montaña *et al.*, 2018), así como en el tracto intestinal de los camarones (Luis-Villaseñor *et al.*, 2013), no obstante, su virulencia incrementa cuando el sistema inmune de los organismos disminuye su eficiencia debido a la presencia de condiciones ambientales estresantes (Alday-Sanz, 2010).

Dentro de los diferentes factores de estrés que pueden desencadenar inmunocompetencia en camarones se encuentran: cambios bruscos de temperatura (Cheng *et al.*, 2005), salinidad (Li *et al.*, 2010), niveles de pH inapropiados (Wang *et al.*, 2012), bajos niveles de oxígeno disuelto (Le Moullac y Haffner, 2000), elevados niveles de compuestos nitrogenados (Liu y Chen, 2004; Liao *et al.*, 2012) y de contaminantes ambientales como los metaloides y metales pesados (Liao *et al.*, 2006).

Por lo anterior, el estudio de los efectos tóxicos ocasionados por metaloides y metales pesados sobre organismos acuáticos de interés comercial, como *L. vannamei*, es un tema de importancia para la industria acuícola (Frías-Espericueta *et al.*, 2011), puesto que las concentraciones ambientales de estos contaminantes ha incrementado de manera relevante en la última década, producto de la intensificación de las actividades antropogénicas (Páez-Osuna *et al.*, 2017). Actualmente, el arsénico (As) y mercurio (Hg) son considerados como el metaloide y metal, respectivamente, más tóxicos para la biota acuática (Eisler y Hennekey, 1977; Cordeiro *et al.*, 2016), y por lo tanto, contaminantes prioritarios, sobre todo por los altos niveles ambientales que se han registrado en ecosistemas acuáticos (Luoma y Rainbow, 2008; Osuna-Martínez *et al.*, 2021).

En la costa noroeste de México donde *L. vannamei* se distribuye de forma natural, y además se desarrolla la mayor actividad acuícola del país, se han registrado concentraciones de As de 8 a 111 mg/kg en sedimentos (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013), y de 35 a 1869 µg/L en agua (Prol-Ledesma *et al.*, 2004; Girón-Pérez *et al.*, 2013); mientras que en esta misma región de México, se han determinado niveles de Hg disuelto en el agua de 16 a 33 µg/L (García-Hernández *et al.*, 2013; Ramírez-Rochín, 2014).

Dichas concentraciones ambientales de As y Hg, sobrepasan el Criterio de Concentración Continua (CCC) para la vida marina, establecido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2020), que es de 36 y 0.9 µg/L para As y Hg disuelto en agua, respectivamente; por lo tanto, se puede inferir que existen ecosistemas en México potencialmente riesgosos para el desarrollo de las poblaciones de camarón silvestre y de cultivo, lo cual podría estar afectando la inocuidad del producto capturado y cosechado, debido a la alta capacidad de bioacumulación que se ha observado presentan el As y Hg en los crustáceos (Canli y Furness, 1993; Cordeiro *et al.*, 2016).

La salinidad ha demostrado ser otro factor importante a considerar en lo que se refiere a la toxicidad de metales y metaloides, porque de manera general se conoce que a medida que los crustáceos se exponen a más baja salinidad, los efectos tóxicos ocasionados por estos contaminantes incrementa (Verslycke *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008). Esto es relevante en el caso de *L. vannamei*, porque durante las etapas tempranas de su ciclo de vida (larvas, postlarvas y juveniles), esta especie habita en sistemas estuarinos (*i.e.*, con salinidades desde 1 hasta 45 g/L) (Mair *et al.*, 1982); asimismo, estos ecosistemas son usados como fuente de agua para el desarrollo de cultivos de camarón (Dugassa y Gaetan, 2018), usando frecuentemente aguas subterráneas con baja salinidad (*i.e.*, 2-5 g/L) (Esparza-Leal *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2010) impactadas con moderadas o altas concentraciones de Hg y As (Páez-Osuna *et al.*, 2017; Osuna-Martínez *et al.*, 2021).

Sin embargo, a pesar de la preocupación que han causado como contaminantes acuáticos el As y Hg, su toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración (*i.e.*, concentración acumulada del contaminante en los organismos considerando el agua como la única ruta de exposición) sobre camarones *L. vannamei* aclimatados a salinidades bajas (*e.g.*, 5-10 g/L) contrastantes con su punto isosmótico no había sido estudiada. Por esta razón, el presente estudio se enfocó en investigar la toxicidad aguda del As y Hg en camarones juveniles expuestos a 5, 10 y 25 g/L de salinidad, mediante la determinación de las concentraciones letales medias (CL₅₀-24, 48, 72 y 96 h) y sus respectivos límites de confianza para cada tóxico y nivel de salinidad.

La CL₅₀ indica la concentración de un tóxico que causa el 50% de mortalidad en la población expuesta a un tiempo determinado (dependiendo del nivel de significancia); mientras que los límites de confianza indican el intervalo en el que podría oscilar la CL₅₀ con una probabilidad determinada (*i.e.*, dependiendo del nivel de confianza). La CL₅₀ es el parámetro de estimación de la toxicidad aguda de una sustancia más utilizado en la literatura cuando se estudian organismos acuáticos (Newman y Unger, 2003), y permite realizar comparaciones de toxicidad entre tóxicos, así como investigar el impacto de diferentes factores de estrés sobre la toxicidad aguda de un tóxico en la especie de interés (Páez-Osuna, 2011). Conocer la CL₅₀ de un tóxico también es útil para estimar su concentración de seguridad en relación a una determinada especie (*i.e.*, concentración que no afectará ningún proceso fisiológico en los organismos

durante un periodo de exposición crónica) (Buikema *et al.*, 1982; Sprague, 1971), la cual puede ser considerada como criterio de calidad del agua en caso de especies de interés acuícola.

Las concentraciones de seguridad para organismos acuáticos se han calculado frecuentemente multiplicando la CL_{50-96} h del tóxico por los factores de aplicación 0.100 (Sprague, 1971; Chin y Chen, 1987; Chen y Lin, 2001; Cobo *et al.*, 2014), 0.050 (Boyd, 1998), 0.010 (Mariño-Balsa *et al.*, 2000; Paila *et al.*, 2010; Boudet *et al.*, 2013; Roos-Muñoz *et al.*, 2018), 0.005 (Frías-Espericueta *et al.*, 2008). Lo que indica que no hay un acuerdo general en este sentido, evidenciando que dicho factor tiene que ser evaluado para cada caso en particular. No obstante, en el presente estudio fueron considerados los factores de aplicación 0.100 y 0.010, por ser los más utilizados en la literatura cuando se trata de elementos pesados y crustáceos. Sin embargo, es sabido que la toxicidad de las sustancia varía de acuerdo a las condiciones ambientales y especie afectada; por lo tanto, es necesario que las concentraciones teóricamente seguras, sean probadas en la especie de interés durante periodos crónicos (*i.e.*, entre 28 y 30 días en caso de penaeidos (Páez-Osuna, 2011)). Aunque también se ha propuesto, que como primer paso para validar la seguridad de dichas concentraciones, estas pueden ser experimentadas durante un periodo de exposición corto (96 h en caso de penaeidos) (Kaoud *et al.*, 2011), donde se evalúen los posibles efectos de los contaminantes sobre variables fisiológicas identificadas como biomarcadores de toxicidad para la especie objetivo (Newman y Unger, 2003).

Los niveles de oxihemocianina (principal proteína transportadora de oxígeno) y conteo total de hemocitos (CTH, células sanguíneas encargadas del sistema inmunológico) son considerados como adecuados biomarcadores de toxicidad de elementos pesados en crustáceos, debido a su elevada sensibilidad para sufrir alteraciones a consecuencia de contaminantes ambientales (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014; 2015; Wu *et al.*, 2017), así como a sus importantes funciones fisiológicas. Determinar el efecto de metaloides-metales sobre la susceptibilidad de crustáceos ante patógenos oportunistas, ha sido otra estrategia recurrente para evaluar efectos de contaminantes, particularmente cuando se busca proponer concentraciones de seguridad para especies de interés acuícola (Yeh *et al.*, 2004; Subramannian y Phillip, 2012; Abad-Rosales *et al.*, 2019).

Conocer la relación entre la concentración ambiental del metaloide-metal y su capacidad de bioacumulación (*i.e.*, concentración acumulada del contaminante en los organismos acuáticos

considerando diferentes rutas de exposición como lo son el agua, la dieta y contacto con sedimento (Mackay y Fraser, 2000)) en el músculo de organismos destinados para la alimentación humana, debería ser otro factor a considerar cuando se proponen concentraciones de seguridad; no obstante, esto no ha sido correlacionado previamente en la literatura disponible. Esta información es de gran relevancia porque permite realizar una evaluación de riesgo a la salud humana; y por tanto, estimar el potencial riesgo que representarían estas concentraciones teóricamente seguras para los consumidores de la especie expuesta.

El cálculo de los índices de peligrosidad (HQ, Hazard Quotient, por sus siglas en inglés) mediante la metodología descrita por Newman y Unger (2003), es uno de los procedimientos más utilizados en la literatura para realizar evaluaciones de riesgo a la salud humana por exposición a metaloides-metales contenidos en los alimentos, el cual está regulado por las leyes federales de Estados Unidos, específicamente por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés).

De acuerdo a lo anterior, además de investigar el efecto de la salinidad sobre la toxicidad aguda del As y Hg en juveniles de *L. vannamei*, en el presente estudio se evaluaron los efectos tóxicos ocasionados por concentraciones equivalentes al 1 (*i.e.*, factor de aplicación 0.01) y 10% (*i.e.*, factor de aplicación 0.10) de la CL_{50-96} h determinada para cada tóxico en 25 g/L de salinidad, sobre el consumo aparente de alimento, los niveles de oxihemocianina, CTH, bioacumulación de los contaminantes en el músculo de camarones juveniles y su potencial riesgo para la salud humana, durante una exposición de 96 h en 5 y 25 g/L de salinidad. Asimismo, se evaluó el efecto de las concentraciones de estos elementos sobre la susceptibilidad de camarones retados con *V. parahaemolyticus*, con el objetivo de determinar si dichas concentraciones de As y Hg resultan ser seguras en términos fisiológicos para el camarón y de inocuidad alimentaria para la población en México.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la biología de *L. vannamei* y datos de producción por pesca y acuicultura

El camarón blanco *L. vannamei* pertenece al filo de los Artrópodos, que se caracteriza por tener apéndices unidos y un exoesqueleto o cutícula que periódicamente se desprende (Dall *et al.*, 1990). El cuerpo de *L. vannamei*, al igual que el de todos los penaeidos, puede ser dividido en dos regiones; una compuesta por un cefalotórax anterior, formado por la fusión de cinco segmentos cabecales y ocho segmentos torácicos, y una segunda formada por un abdomen compuesto de seis distintos segmentos (Figura 1). La superficie externa de estas regiones y de sus apéndices es cubierto por un exoesqueleto, el cual requiere de mudas periódicas para su crecimiento, una serie de procesos denominado ciclo de muda (Dugassa y Gaetan, 2018).

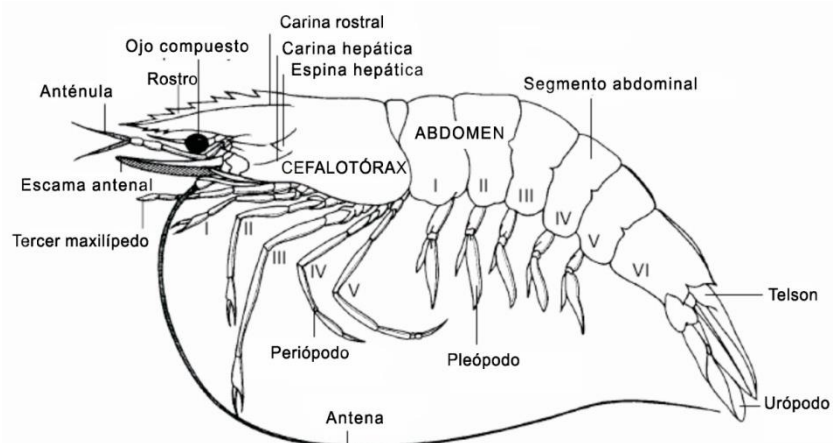


Figura 1. Descripción de *L. vannamei*.

L. vannamei es nativo de la costa del Pacífico este, y se distribuye desde Sonora en el Golfo de California hasta Perú. Esta especie prefiere habitar en áreas con fondos lodosos donde la temperatura del agua es usualmente mayor que 25°C durante todo el año, siendo durante la etapa adulta cuando estos organismos habitan en mar abierto a profundidades hasta de 72 m donde se reproducen; mientras que durante sus primeras etapas de vida (*i.e.*, larvas, postlarvas y juveniles), este camarón se desarrolla en sistemas estuarinos (*i.e.*, esteros y lagunas costeras) en profundidades de 1 a 4 m (FAO, 2006).

Aunque *L. vannamei* es nativo del Pacífico Americano, donde se alcanzó una producción aproximada por pesquería de 14 mil t en el año 2018, siendo México el principal país productor con 13 mil t; este camarón se encuentra como especie exótica en diferentes países de Asia (e.g., China, India, Tailandia, Vietnam) y África (e.g., Egipto y África del Sur), donde es cultivado en estanques artificiales. La producción global por acuicultura de *L. vannamei* fue de 4.9 millones de t (con un valor de 30,221 millones de dólares) en el año 2018, siendo China el principal país productor con 1.7 millones de t en el mismo año (FAO, 2020).

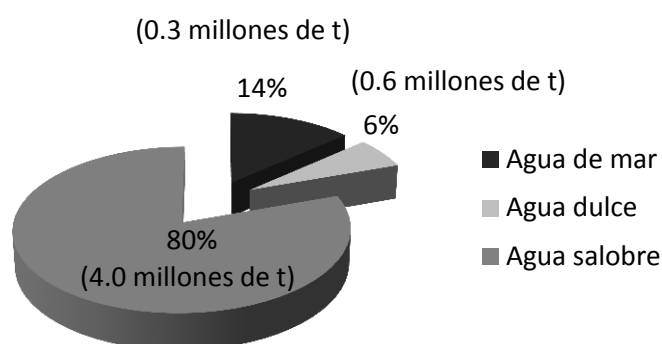


Figura 2. Producción acuícola mundial de *L. vannamei* considerando diferentes fuentes de agua para su cultivo en el año 2018 (FAO, 2020).

De acuerdo a los datos estadísticos de la FAO (2020), el cultivo de camarón ha sido desarrollado empleando diferentes fuentes de agua (Figura 2), las cuales fueron clasificadas como agua de mar (agua tomada directamente del mar), dulce (aguas con baja salinidad principalmente subterránea) y salobre (agua tomada desde sistemas estuarinos); destacando como principal fuente de agua la salobre, seguida del agua de mar y dulce.

El incremento de la contaminación por metaloides y metales en los cuerpos de agua costeros, particularmente en aguas salobres y dulces (i.e., subterráneas, principalmente), ha sido una importante problemática relacionada al cultivo de camarón (Prapaiwong y Boyd, 2014), lo cual ha aumentado el interés en el estudio de los efectos tóxicos ocasionados por dichos contaminantes sobre las especies de cultivo (Frías-Espéricueta *et al.*, 2011).

2.2. Metaloides y metales pesados como contaminantes acuáticos

Los metales son elementos que tienen una apariencia brillante en su estado sólido, poseen propiedades como maleabilidad, dureza, y son buenos conductores de electricidad y calor; además, usualmente actúan en reacciones químicas como iones positivos (cationes). De los 90 elementos que ocurren naturalmente en la corteza terrestre, 67 son clasificados como metales. Tradicionalmente, los metales han sido clasificados en categorías tales como ligeros, pesados, semi-metales o metaloides, tóxicos y oligoelementos, dependiendo de los diversos criterios químicos y físicos relacionados a su densidad, peso, número atómico y grado de toxicidad (Luoma y Rainbow, 2008).

En este sentido, los metaloides son elementos que poseen propiedades intermedias entre metales y no metales; por ejemplo, se consideran semiconductores de electricidad y calor, poseen una apariencia opaca en comparación con los metales. Dentro de esta categoría se encuentran el boro (B), silicio (Si), germanio (Ge), arsénico (As), antimonio (Sb), telurio (Te) y polonio (Po) (Manahan, 2010).

Los metaloides-metales pesados son aquellos que poseen una densidad mayor que 5 g/cm^3 , y tienden a ser los de mayor preocupación ambiental, destacando el As, Hg, Ag (plata), B (boro), Ba (bario), Be (berilio), Cd (cadmio), Co (cobalto), Cr (cromo), Cu (cobre), Mn (manganeso), Mo (molibdeno), Ni (níquel), Pb (plomo), Sb (antimonio), Se (selenio), Sn (estaño), Ti (titanio), V (vanadio) y Zn (zinc) por su alta concentración ambiental y toxicidad (Páez-Osuna, 2011). Particularmente para la biota acuática, el Hg (Eisler y Hennekey, 1977) y As (Cordeiro *et al.*, 2016) han sobresalido como el metal y metaloide más tóxicos, respectivamente.

El As es un elemento naturalmente abundante en la biosfera (ocupando la posición 47 en abundancia de 90 elementos que se ha estimado componen la corteza terrestre) (Mandal y Suzuki, 2002); sin embargo, las concentraciones ambientales de este metaloide han aumentado significativamente debido al incremento de actividades antropogénicas como la minería, agricultura, cría de aves de corral, quema de combustibles fósiles; entre otras, colocando a este metaloide en el primer lugar de la lista de sustancia peligrosas prioritarias publicada por la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de los Estados Unidos (ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, por sus siglas en inglés) (ATSDR, 2020).

Este metaloide puede existir en cinco estados de oxidación (3-, 1-, 0, 3+ y 5+); sus principales formas inorgánicas trivalentes incluyen el trióxido de arsénico, tricloruro de arsénico y arsenito de sodio, mientras que en las pentavalentes se encuentran el pentaóxido de arsénico, ácido arsénico, arseniato de plomo y arseniato de calcio (Philp, 2013). Entre las principales formas orgánicas del arsénico se encuentran el metilarseniato, ácido dimetilarsínico, óxido de trimetilarsina y el tetrametilarsonium, aunque el monitoreo ambiental de las formas inorgánicas es considerado de mayor relevancia, por ser éstas más tóxicas que las orgánicas (Kumari *et al.*, 2017).

El Hg es un elemento no esencial (*i.e.*, elemento que no es requerido para el desarrollo de alguna función biológica) altamente teratogénico (*i.e.*, sustancia capaz de producir defectos congénitos durante la gestación del feto) y carcinogénico (*i.e.*, sustancia que promueve el desarrollo de cáncer) ampliamente distribuido en el ambiente (Mason *et al.*, 1994), por lo cual se encuentra en el lugar número 3 de la lista de sustancias peligrosas prioritarias (ATSDR, 2020). Las principales fuentes naturales de Hg son el intemperismo de minerales con este metal (*e.g.*, cinabrio (HgS)), desgasificación de la corteza terrestre, emisiones volcánicas e incendios forestales (Philp, 2013).

Sin embargo, al igual que con el As, las principales fuentes de contaminación por Hg están relacionadas a las actividades antropogénicas, las cuales se estima que desde finales del siglo 19 han provocado un incremento de 300-500 y 200% en las concentraciones de Hg en la atmósfera y superficies de los océanos, respectivamente (Outridge *et al.*, 2018).

La especie química del Hg que representa el mayor riesgo ecológico y para la salud humana es el metilmercurio (MeHg) o Hg orgánico (Mason *et al.*, 1994). Esto es porque el MeHg, que es resultado de la transformación del Hg inorgánico por algunos microorganismos en los sistemas acuáticos, se comporta como una neurotóxina lipofílica permeable a las membranas celulares de los organismos, característica que le permite bioacumularse con mayor facilidad en comparación con el Hg inorgánico (Hoang *et al.*, 2017).

Los ecosistemas costeros son particularmente sensibles a ser impactados por contaminantes como el As y Hg, puesto que independientemente de las fuentes (naturales o antropogénicas), los flujos de los elementos movilizados son transportados principalmente vía atmosférica y

escorrentía hasta depositarse en estos ecosistemas (Páez-Osuna, 2011). Los sedimentos y aguas intersticiales tienden a acumular mayores concentraciones de As y Hg que la columna de agua, debido a que estos elementos tienen una alta afinidad para enlazarse con la materia orgánica, así como con óxidos de hierro y manganeso que son más abundantes en el fondo de los cuerpos de agua (Luoma y Rainbow, 2008).

Por lo anterior, la biota bentónica, como lo es el camarón *L. vannamei*, está usualmente en mayor riesgo de sufrir efectos adversos en su fisiología a causa de estos elementos, asimismo, estos organismos están expuestos a bioacumular altos niveles de As y Hg en sus tejidos, pudiendo representar un potencial riesgo para la salud humana.

2.3. Estudios que abordan el efecto de la salinidad sobre la toxicidad aguda de metaloides y metales pesados en crustáceos

Numerosos estudios han demostrado que la salinidad es un factor que influencia de manera importante la toxicidad aguda de los metaloides-metales en crustáceos. Por ejemplo, Sullivan (1977) observaron que la toxicidad aguda del Cd en cangrejos *Paragrapsus gaimardii* expuestos a 9 g/L de salinidad fue significativamente más alta que la observada en cangrejos expuestos a 18 y 35 g/L de salinidad, fenómeno que fue observado a 5 y 19°C de temperatura.

Chen y Lin (2001) determinaron las CL₅₀ para las 24, 48, 72 y 96 h de Cu en *Penaeus monodon* expuesto a 15 y 25 g/L de salinidad, observando CL₅₀ significativamente menores en 15 g/L en relación a 25 g/L de salinidad, lo cual indicó que estos camarones fueron más sensibles a este metal en la menor salinidad.

Li *et al.* (2008) investigaron la toxicidad aguda del B en camarones *L. vannamei* expuestos a 3 y 20 g/L de salinidad. Los autores observaron a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición que los organismos aclimatados a la menor salinidad fueron más sensibles a las elevadas concentraciones del metaloide.

Barbieri y Doi (2011) examinaron la toxicidad aguda del Zn en el camarón *Farfantepenaeus paulensis* bajo 5, 20 y 36 g/L de salinidad. Los autores encontraron que la toxicidad del metal fue estadísticamente comparable a 20 y 26 g/L de salinidad; sin embargo, en 5 g/L de salinidad la toxicidad del metal fue significativamente mayor a las 96 h de exposición.

Leonard *et al.* (2011) determinaron la CL_{50-96} h de Ni en *L. vannamei* juveniles aclimatados a 5 y 25 g/L de salinidad. Los valores de las CL_{50} calculadas para 5 g/L de salinidad fueron hasta 300% menos elevados que aquellos estimados para 25 g/L de salinidad, lo cual indica que la toxicidad aguda del metal es significativamente más alta en el medio diluido.

En lo que se refiere al As, su toxicidad aguda solo ha sido investigada en dos especies de crustáceos. El primer estudio se enfocó en determinar la CL_{50-96} h del metaloide en cangrejos *Scylla serrata* aclimatados a 34 g/L de salinidad; es decir, no se evaluó el efecto de la salinidad sobre la toxicidad del metaloide (Krishnaja *et al.*, 1987). En el segundo estudio se investigó la toxicidad aguda del As en camarones *L. vannamei* expuestos a 17, 25 y 33 g/L de salinidad. Los resultados demostraron que la toxicidad del metaloide no fue afectada significativamente por la salinidad cuando compararon las CL_{50-96} h calculadas para el medio isosmótico (25 g/L) en relación al medio hiper-osmótico (33 g/L) e hipo-osmótico (17 g/L) a 25 °C de temperatura (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013).

En el caso del Hg, la toxicidad aguda ha sido investigada en diversas especies de crustáceos tales como *Crangon crangon*, *Homarus gamarus* (Connor, 1972), *Penaeus setiferus* (Green *et al.*, 1976), *Metapenaeus dobsoni* (Sivadasan *et al.*, 1986), *Pagurus longicarpus* (Eisler y Hennekey, 1977), *Palaemon serratus*, *Maja squinado* (Mariño-Balsa *et al.*, 2000), *L. vannamei* (Frías-Espéricueta *et al.*, 2001; Roos-Muñoz *et al.*, 2019), *Farfantepenaeus brasiliensis* (Barbieri *et al.*, 2005) y *Macrobrachium rosenbergii* (Kaoud *et al.*, 2011) en salinidades marinas o salobres; sin embargo, el efecto de la salinidad sobre la toxicidad aguda del Hg solo se ha investigado en *Eriocheir sinensis*, *Carcinus maenas* (Bianchini y Gilles, 1996), *Penaeus monodon*, *P. indicus* (Das y Sahu, 2002) y *Neomysis integer* (Verslycke *et al.*, 2003).

Como conclusión general, la mayoría de los autores citados asoció la relación inversa entre la salinidad y la toxicidad aguda de dichos metaloides y metales pesados, al incremento en la captación del tóxico presentada en el cuerpo de estos crustáceos originado por el estrés osmótico, sugiriendo que cuando se trata de crustáceos eurihalinos, es necesario conocer la toxicidad de los metaloides y metales bajo diferentes salinidades para poder tener un mejor entendimiento de la toxicología del respectivo tóxico.

Particularmente en *L. vannamei*, como fue mencionado anteriormente, el efecto de la salinidad sobre la toxicidad aguda del As ha sido evaluado en salinidades marinas (33 g/L) y salobres (17 y 25 g/L) (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013); no obstante, el efecto de la baja salinidad no ha sido investigado. En lo que se refiere al Hg, su toxicidad aguda solo ha sido evaluada en salinidades marinas (*i.e.*, 34 g/L, Frías-Espericueta *et al.*, 2001; Roos-Muñoz *et al.*, 2019). Por lo tanto, resulta pertinente investigar el efecto de la baja salinidad sobre la toxicidad aguda del As y Hg en *L. vannamei*.

2.4. Estudios que abordan los efectos de metaloides-metales pesados y la salinidad sobre la oxihemocianina, conteo total de hemocitos y susceptibilidad de crustáceos ante retos con patógenos bajo concentraciones subletales

La hemocianina es la principal proteína presente en la hemolinfa (representando entre 80-95% de la concentración total de proteína), cuya función más importante es la de transportar y distribuir el oxígeno molecular desde las branquias al resto de los tejidos en crustáceos (Dall *et al.*, 1990). Esta proteína es sintetizada por las células F que se encuentran en el hepatopáncreas, las cuales existen como hexámeros unidos a dos átomos de Cu, mismos que pueden alcanzar un peso molecular de 460×10^6 daltons (Figura 3). La hemocianina es incolora cuando no se encuentra ligada al oxígeno, no obstante, cuando se da la unión, el resultado es una proteína de color azul (Alday-Sanz, 2010).

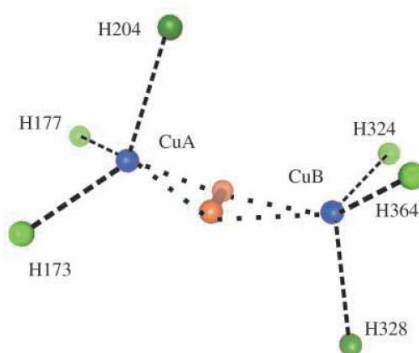


Figura 3. Representación gráfica de la hemocianina en su forma oxo de acuerdo a la estructura de rayos X en *Limulus polyphemus*. El modelo muestra el sitio de enlace del O₂ con los dos átomos de cobre (CuA y CuB) (tomado de Decker y Terwilliger, 2000).

Se sabe que la molécula de la hemocianina puede adoptar dos configuraciones diferentes con distinta afinidad por el oxígeno. Una de ellas es su forma disgregada conocida como desoxi-

hemocianina, mientras que la forma agregada con alta afinidad por el oxígeno es la oxihemocianina. En medios con saturación baja de oxígeno, las dos conformaciones de hemocianina están presentes, aunque en medios con saturación media y elevada, la conformación de alta afinidad es la predominante (Van Holde y Miller, 1982; Dall *et al.* 1990). Es por esto que la oxihemocianina es considerada como la principal encargada del transporte de oxígeno (*e.g.*, representa entre el 82 y 88% de la proteína total en la hemolinfa de *L. vannamei* adultos en estado de intermuda) (Cheng *et al.*, 2000), y también es conocida como la forma funcional de la hemocianina (Chen *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 2002).

Dentro de los estudios que han investigado el efecto de metaloides y metales pesados sobre los niveles de oxihemocianina en crustáceos, se encuentra el realizado por Bautista-Covarrubias *et al.* (2014). Estos autores expusieron a los camarones juveniles de *L. vannamei* a diferentes concentraciones de Cd en 34 g/L de salinidad durante 96 h de exposición; periodo en el que se observó un decremento significativo en las concentraciones de oxihemocianina en los organismos expuestos a 25 y 1245 µg/L de Cd. Los autores relacionaron dicho efecto al aumento en la demanda energética ocasionado por el metal, lo que promovió que las proteínas circulantes fueran aprovechadas como fuente de energía.

Posteriormente, estos mismo autores (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2015) examinaron el efecto del Cu sobre los niveles de oxihemocianina en juveniles de *L. vannamei* aclimatados a 34 g/L de salinidad. Los resultados demostraron que las concentraciones de Cu más altas (3.73 y 18.65 µg/L) provocaron un decremento significativo en la concentración de oxihemocianina a las 5 h de exposición, fenómeno que fue incrementando durante el tiempo, mismo que fue atribuido al incremento en la demanda energética promovida por la exposición al metal.

Por su parte, Qian *et al.* (2020) observaron que la concentración de oxihemocianina en *L. vannamei* aumentó después de 30 días de exposición a 200 y 500 µg/L de Cu en 30 g/L de salinidad; aunque un efecto contrario fue determinado en 1000 µg/L de Cu. Los autores concluyeron que en condiciones de exposición crónica (*i.e.*, ≥ 30 días), esta especie es capaz de adaptarse al incremento en la demanda de energía ocasionado por 200 y 500 µg/L de Cu, aumentando los niveles de oxihemocianina; sin embargo, bajo un ambiente con 1000 µg/L de Cu, *L. vannamei* no fue capaz de adaptarse al incremento en la demanda energética.

En cuanto al efecto de la salinidad sobre la oxihemocianina, Li *et al.* (2008) observaron que esta proteína aumenta su concentración en la hemolinfa cuando *L. vannamei* es expuesto a salinidades extremadamente bajas (3 g/L), mientras que en ambientes salobres (17 y 32 g/L de salinidad), los niveles de oxihemocianina se mantienen relativamente constantes. Estos autores sugieren que el incremento en la oxihemocianina, y a su vez de oxígeno en la hemolinfa, es un mecanismo compensatorio que le permite al camarón mantener su homeostasis en baja salinidad.

Los hemocitos son las células que se distribuyen a través de la hemolinfa de los crustáceos, las cuales son producidas en el tejido hematopoyético y cumplen funciones de tipo inmunológico. Se han identificado tres tipos de hemocitos, mismos que se clasifican como hialinos, semi-granulares y granulares de acuerdo a sus características físicas (Figura 4).

Los hemocitos hialinos son los más pequeños, con un diámetro de 8-12 μm y pueden presentar muy pocos o ningún gránulo. Estas células son más lábiles y se lisan con mayor facilidad que el resto de los hemocitos para facilitar la coagulación de la hemolinfa (Alday-Sanz, 2010); además se ha demostrado que estos hemocitos pueden realizar el proceso de fagocitosis (Johansson *et al.*, 2000). De acuerdo a Vargas-Albores *et al.* (2005), los hemocitos hialinos suelen representar del 25 al 27% de la concentración total de hemocitos circulantes.

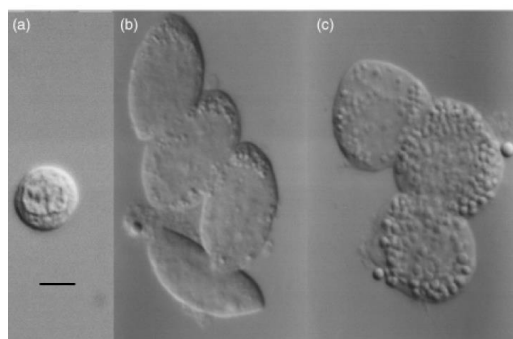


Figura 4. Imagen de hemocitos circulantes de *L. vannamei* bajo el microscopio de contraste de fases. (a) hemocito hialino, (b) hemocitos semi-granulares y (c) granulares (tomado de Vargas-Albores *et al.*, 2005).

Los hemocitos semi-granulares tienen un diámetro de 10-15 μm y suelen ser más grandes que los hialinos; además, presentan pequeños gránulos (*i.e.*, diámetro de 0.4-0.6 μm), por lo que es

fácil que sean confundidos con los hemocitos granulares (Alday-Sanz, 2010). Las funciones de estas células están relacionadas a los procesos de fagocitosis, encapsulación, activación del sistema profenoloxidasa y liberación de péptidos antimicrobianos (Destoumieux *et al.*, 2000). Se ha observado que los hemocitos semi-granulares son los más abundantes en la hemolinfa de penaeidos, representando entre el 51 y 53% de los hemocitos circulantes (Vargas-Albores *et al.*, 2005).

Los hemocitos granulares tienen un diámetro de 10 a 20 μm , y son los hemocitos más grandes; asimismo, presentan una gran cantidad de gránulos (*i.e.*, diámetro de 0.8-1.1 μm), por lo que su principal función es la activación del sistema profenoloxidasa y reconocimiento de células invasoras (Alday-Sanz, 2010). Estas células suelen ser las menos abundantes en la hemolinfa, representando entre el 14 y 22% de la concentración total de hemocitos circulantes (Vargas-Albores *et al.*, 2005).

Los efectos de los metales pesados sobre la concentración total de hemocitos (CTH) en la hemolinfa han sido ampliamente estudiados en diversas especies de crustáceos. Por ejemplo, Yeh *et al.* (2004) expusieron a juveniles de *L. vannamei* a 0, 1, 5, 10 y 20 mg/L de Cu en 35 g/L de salinidad durante 48 h. Los resultados mostraron un decremento significativo en el CTH en los tratamientos con 5, 10 y 20 mg/L a las 24 y 48 h de exposición, ocasionados por el incremento en el estrés oxidativo debido a las elevadas concentraciones de Cu ambiental; asimismo, la actividad fenoloxidasa y fagocítica fue significativamente afectada. Los autores concluyeron que una exposición de 48 h a 5 mg/L de Cu fueron suficientes para incrementar la susceptibilidad de *L. vannamei* ante un reto con *V. alginolyticus*, debido a la reducción en la respuesta de las variables inmunológicas evaluadas.

En un experimento similar, Bautista-Covarrubias *et al.* (2015) demostraron un efecto negativo del Cu sobre el CTH en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 0.003 y 18.650 mg/L en 34 g/L de salinidad, lo cual fue atribuido a una migración de hemocitos hacia el tejido braquial dañado, promoviendo inflamación y melanización como mecanismo de reparación del tejido.

Por su parte, Xian *et al.* (2010) demostraron que el Cu también puede afectar la CTH en *P. monodon*, puesto que después de una exposición de 48 h a 0.5, 1.5 y 3.5 mg/L de Cu en 10 g/L

de salinidad, se observó un decremento significativo en el CTH, lo cual fue relacionado al incremento en el estrés oxidativo y apoptosis celular causada por el metal.

En el caso del Cd, se ha observado que una exposición de 96 h a 8.8, 249.0 y 1245.0 $\mu\text{g/L}$ en 34 g/L de salinidad, puede provocar una reducción significativa en el CTH de *L. vannamei* (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014), sugiriendo un aumento en el porcentaje de células apoptóticas, un decremento en la capacidad inmunológica, así como un aumento en la susceptibilidad de los camarones a los patógenos oportunistas. Posteriormente, Peng *et al.* (2015), demostraron claramente que el Cd aumenta la expresión de genes relacionados a la ruta apoptótica en hemocitos de *L. vannamei*, después de una exposición de 24 h a 955 $\mu\text{g/L}$ de Cd.

El efecto causado por ambientes contaminados con diferentes metales mezclados sobre el CTH en *L. vannamei* fue examinado por Abad-Rosales *et al.* (2019). En este estudio se sometieron camarones a un ambiente con 33 g/L de salinidad y 670, 186, 650, 10, 12 y 221 $\mu\text{g/L}$ de Pb, Cu, Mn, Zn, Cd y Fe, respectivamente, durante 21 días, y posteriormente los organismos se retaron con WSSV. Los resultados indicaron que el efecto combinado de los metales y la infección con WSSV, provocó un efecto sinérgico sobre la disminución en el CTH, mayores daños histopatológicos así como incremento en la susceptibilidad de los organismos ante dicha enfermedad viral.

En lo que se refiere al As, no se ha encontrado estudio alguno enfocado a evidenciar sus efectos sobre el CTH en crustáceos; en cambio, relacionados al Hg se conocen cuatro estudios (Truscott y White, 1990; Jose *et al.*, 2011; Kaou *et al.*, 2011; Roos-Muñoz *et al.*, 2019). Por ejemplo, Truscott y White (1990) encontraron que 5 y 50 $\mu\text{g/L}$ de Hg en 33 g/L de salinidad no afectaron significativamente el CTH en *C. maenas* a los 30 días de exposición, concluyendo que sitios altamente contaminados ubicados en el estrecho de Menai (Reino Unido), donde se presentan concentraciones de Hg comparables, no comprometen la respuesta inmunológica de estos cangrejos.

Jose *et al.* (2011) desarrollaron una línea de hemocitos de *P. monodon* y expuesta *in vitro* a diferentes concentraciones de Hg. Después de 12 h de incubación, se observó que el porcentaje de inhibición celular en el tratamiento con 1.6 mg/L disminuyó significativamente; asimismo, se determinó daño al ADN por medio de un ensayo cometa.

Kaoud *et al.* (2011) expusieron durante 96 h al camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* a distintas concentraciones de Hg. Los resultados indicaron que los tratamientos con 100, 300 y 500 µg/L incrementaron significativamente la mortalidad, asimismo, disminuyeron el CTH y su actividad fagocítica.

Roos-Muñoz *et al.* (2019) sometieron a juveniles de *L. vannamei* a 2.3, 3.2 y 18.0 µg/L de Hg en 34 g/L de salinidad, observando un decremento en el CTH a las 24 h en los tres tratamientos; además, se observó daño al ADN en hemocitos a las 168 h de exposición. Estos resultados fueron asociados a la inducción de apoptosis celular y daño al tejido hematopoyético.

En cuanto al efecto de la salinidad sobre el CTH en crustáceos eurihalinos, Wang y Chen (2006) demostraron que la concentración de hemocitos, y otras variables inmunológicas (*i.e.*, actividad fenoloxidasa, superóxido dismutasa, fagocítica y producción de especies reactivas de oxígeno), fueron afectadas significativamente en juveniles de *P. monodon* sometidos a cambios bruscos de salinidad desde 25 a 5 y 15 g/L, volviendo más susceptibles a los camarones ante un reto con *Photobacterium damsela*. Asimismo, en un experimento similar, Li *et al.* (2010) obtuvieron resultados comparables en juveniles de *L. vannamei* pero retados con *V. alginolyticus*.

Con base en lo anterior, se puede afirmar que los estudios enfocados a los efectos ocasionados por el As y Hg en baja salinidad sobre la oxihemocianina, CTH y susceptibilidad de *L. vannamei* ante bacterias patógenas son escasos, lo cual soporta la pertinencia del presente estudio.

2.5. Estudios relacionados a la capacidad de bioconcentración/bioacumulación del As y Hg en crustáceos bajo diferentes salinidades

Existen estudios donde se ha determinado la capacidad del As y Hg para bioacumularse y/o bioconcentrarse tanto en condiciones controladas (exposiciones en laboratorio donde los organismos se mantienen en concentraciones conocidas del metaloide o combinadas con otras sustancias), así como en el medio ambiente, lo que se conoce como biomonitoreo ambiental o estudios de campo (Newman y Unger, 2003; Metian *et al.*, 2010).

Dentro de los estudios desarrollados en condiciones experimentales con As se encuentra el realizado por Fowler y Ünlü (1978), quienes observaron que juveniles de *Lysmata seticaudata* expuestos 6 días a 0.95 µCi/L de As-74 (*i.e.*, As radioactivo) bioacumularon mayor concentración

del elemento a 16 g/L en relación a 38 g/L de salinidad. Resultados que fueron relacionados al incremento en la captación de agua contaminada debido al estrés hipo-osmótico.

Hunter *et al.* (1998) expusieron al cangrejo *Crangon crangon* durante 16 días a una misma concentración de As disuelto en agua de mar (100 µg/L) pero en diferentes especies químicas, las cuales fueron arsenato, óxido de trimetilarsina y arsenobetaína, encontrando que la bioconcentración de As en el músculo, branquias, intestino, exoesqueleto y resto del cangrejo fue diferente para cada especie química de As, aunque el intestino destacó por presentar los mayores niveles del metaloide en los tres tratamientos.

Lobato *et al.* (2013) sometieron a camarones juveniles (*L. vannamei*) aclimatados a 30 g/L de salinidad en 1 mg/L de As total durante 2 días, así como en una combinación de 1 mg/L de As + 1 mg/L de Cd. Al final de la exposición se observó que la bioconcentración de As en el hepatopáncreas resultó ser hasta 6.5 veces mayor que en el músculo en el tratamiento con As; mientras que en los camarones expuestos a la combinación de los dos tóxicos, la acumulación de As en el hepatopáncreas fue 4.3 veces superior que en el músculo de los organismos.

Cresswell *et al.* (2014) realizaron un estudio en el que se determinó la bioacumulación de As en el cefalotórax de *Macrobrachium australiense*, *M. rosenbergii* y *M. latidactylus* después de ser expuestos siete días a jales mineros con una composición de 330 µg/g de As, 8 µg/g de Cd, 100 µg/g de Cu, 540 µg/g de Pb y 1300 µg/g de Zn en peso seco. Los organismos se expusieron de una forma directa (libre contacto con el sustrato contaminado) e indirecta (sin contacto directo con el sustrato) al desecho minero, registrándose una bioacumulación de As hasta 2.5 veces superior en los cangrejos que tuvieron contacto directo con el material. Asimismo, se demostró que *M. australiense* fue la especie que acumuló el mayor nivel del metaloide.

Cordeiro *et al.* (2016) evaluaron la capacidad de bioconcentración del As en *L. vannamei* adultos, exponiendo a los camarones de forma individual al metaloide (10 µg/L) y combinada con nTiO₂ (dióxido de nano-titanio) (10 µg/L As + 10 µg/L nTiO₂) en 30 g/L de salinidad. Después de 48 h de exposición, se determinó que la acumulación de As no fue afectada significativamente por la presencia del nTiO₂ tanto en branquias como en hepatopáncreas; asimismo, se observó que el hepatopáncreas bioconcentró los mayores niveles de As en ambos tratamientos.

En relación al Hg, Andersen y Baatrup (1988) investigaron la capacidad de bioacumulación del metal en músculo, branquias y hepatopáncreas de *Crangon crangon* aclimatados a 20 g/L de salinidad y expuestos durante 14 días a 17 µg/L de Hg. Los resultados mostraron que el hepatopáncreas acumuló la mayor concentración de Hg, seguido de las branquias y músculo.

Canli y Furnes (1993) expusieron a langostas juveniles de *Nephrops norvegicus* durante 30 días a 10 µg/L MeHg y 10 µg/L Hg (inorgánico) en agua de mar. Al final del experimento fueron determinados los niveles de Hg acumulados en el cefalotórax, hepatopáncreas, branquias y músculo de las langostas, encontrando que las branquias presentaron la mayor concentración de Hg en ambos tratamientos, concluyendo que aun cuando los niveles ambientales de ambos tóxicos fueron iguales, la capacidad del MeHg para bioconcentrarse en los tejidos analizados fue superior a la del Hg inorgánico, excepto en las branquias.

Bianchini y Gilles (1996) expusieron a *Eriocheir sinensis* (fuerte hiper-osmorregulador), *C. maenas* (débil hiper-osmorregulador) y *Cancer pagurus* (osmoconformador) en ambientes de agua de mar y agua de mar diluida con 1 mg/L de Hg durante 48 h. Se observó que la bioconcentración del Hg en exoesqueleto, branquias y músculo de *E. sinensis* y *C. maenas* fue mayor en los medios diluidos, mientras que tal fenómeno no se observó en *C. pagurus*, indicando que el mecanismo de adaptación a los medios diluidos que posee cada especie influye sobre la capacidad de acumulación del Hg cuando varía la salinidad.

Kaoud *et al.* (2011) investigaron la capacidad de bioacumulación del Hg en cangrejos *Macrobrachium rosenbergii* expuestos 96 h a 0, 10, 50, 100, 200, y 500 µg/L. Se determinó una acumulación significativa a partir del tratamiento con 100 µg/L de Hg en el músculo, branquias y hepatopáncreas, siendo éste último órgano el que más acumuló el metal seguido de las branquias y músculo.

Zhang *et al.* (2017) observaron al exponer a juveniles de *Exopalaemon carinicauda* en 80, 99, 142 y 212 µg/L de Hg y aclimatados en 33 g/L de salinidad, que el metal se acumuló significativamente en branquias, hepatopáncreas y músculo de todos los tratamientos en relación al control (0 µg/L de Hg); sin embargo, en los cuatro tratamientos los patrones de bioconcentración fueron hepatopáncreas > branquias > músculo, lo cual resulta esencial porque el músculo es el tejido del camarón principalmente consumido por los humanos.

Dentro de los estudios realizados con camarones penaeidos recolectados desde el medio ambiente se encuentra el desarrollado por Ruelas-Inzunza *et al.* (2004), quienes investigaron la concentración y distribución de Hg en hepatopáncreas, músculo y exoesqueleto de especies de importancia comercial (*i.e.*, *Farfantepenaeus brevisrostris*, *Farfantepenaeus californiensis*, *L. stylirostris*, *L. vannamei* y *Xiphopenaeus kroyeri*) recolectados en el sistema lagunar Altata-Ensenada del Pabellón (ubicado en el estado de Sinaloa, al sur-este del Golfo de California), caracterizado por estar fuertemente impactado por desechos agrícolas y urbanos. Las concentraciones de Hg para cada tejido fueron similares entre las especies; sin embargo se observó que el hepatopáncreas acumuló los mayores niveles de Hg, seguido del músculo y exoesqueleto en cada especie.

Delgado-Álvarez *et al.* (2015) determinó los niveles de Hg en músculo de *L. vannamei* recolectados en granjas de cultivo ubicadas en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit. Los resultados mostraron que los camarones de Nayarit presentaron mayores concentraciones del metal; no obstante, estas concentraciones no representaron riesgo para la salud humana en México.

Frías-Espéricueta *et al.* (2016) recolectaron camarones *F. californiensis* y *L. stylirostris* con diferentes tallas en el litoral de Baja California, Baja California Sur y Sinaloa, en los cuales se observó que las concentraciones de Hg en el músculo, hepatopáncreas y exoesqueleto incrementaron cuando aumentó la talla de los organismos para ambas especies, aunque se concluyó que dichos niveles de Hg no representaban riesgo para la salud humana.

Wu *et al.* (2017) analizaron el contenido de As en adultos de *Scylla serrata* y *L. vannamei* recolectados de estanques de cultivo ubicados en el suroeste de China. Se descubrió que ambas especies de crustáceos presentaron niveles de As por arriba de la norma nacional de seguridad alimentaria para organismos acuáticos de China, siendo excedida hasta ocho veces para el caso de *L. vannamei*, demostrando que el As puede representar un potencial riesgo para la salud humana.

De acuerdo a lo anterior, el efecto de la salinidad sobre la capacidad de bioconcentración y/o bioacumulación del As y Hg en *L. vannamei* no ha sido investigado; asimismo, ningún estudio ha sido reportado donde se determine en condiciones controladas, la relación entre la

concentración de As y Hg disuelto en el agua con la capacidad de acumulación en los camarones y su potencial riesgo para la salud humana en México bajo distintos escenarios de salinidad.

3. JUSTIFICACIÓN

El arsénico y mercurio son considerados como contaminantes de alta prioridad para la biota, debido a su alta toxicidad y capacidad de bioconcentración/bioacumulación. Los ecosistemas costeros tienden a acumular concentraciones elevadas de dichos elementos, porque los cuerpos de agua son los principales receptores finales de los metaloides-metales movilizados desde las fuentes naturales y antropogénicas. El camarón *L. vannamei* es una especie de gran importancia ecológica y económica que habita en las zonas estuarinas de México, donde la salinidad varía ampliamente. Además, esta especie es cultivada a nivel nacional y mundial. Se ha demostrado que cuando los metaloides-metales se acumulan en los crustáceos, pueden afectar su estado de salud, causando un aumento en la susceptibilidad de los organismos ante patógenos oportunistas. Otro factor que ha demostrado ser de gran relevancia, en lo que se refiere a la toxicidad de algunos metaloides-metales es la salinidad, ya que de manera general se sabe que a medida que los crustáceos se encuentran en aguas con más baja salinidad, la capacidad de acumulación de los metaloides-metales incrementa, lo cual es relevante para la salud humana, puesto que el consumo de organismos acuáticos es una de las principales rutas exposición a estos contaminantes. Sin embargo, los estudios enfocados en la investigación de los efectos tóxicos del As y Hg en *L. vannamei* bajo diferentes salinidades son escasos. Por tal motivo, en el presente estudio se evalúa el efecto de la baja salinidad sobre la toxicidad aguda del As y Hg en *L. vannamei*; así como los efectos subletales causados por concentraciones teóricamente seguras sobre variables bioindicadoras de estrés, susceptibilidad de los camarones ante un patógeno, y la relación entre la concentración ambiental del tóxico y su potencial riesgo para la salud humana considerando los niveles de los elementos bioacumulados en el músculo de los organismos. Esta información permite conocer las concentraciones umbrales de toxicidad de estos elementos, lo cual ayudaría a alertar a los acuicultores sobre ambientes riesgosos para el desarrollo de esta actividad.

4. HIPÓTESIS

La toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración del As y Hg en juveniles de *L. vannamei* aumenta en salinidades más bajas; asimismo, el efecto combinado de la baja salinidad y niveles subletales de dichos tóxicos equivalentes al 1 y 10% de sus respectivas CL_{50-96} h determinadas para un ambiente isosmótico, provoca alteraciones en los niveles de oxihemocianina, CTH, mayor susceptibilidad de los camarones ante una infección con *V. parahaemolyticus*, así como un incremento en la bioacumulación de los tóxicos en el músculo de los organismos representando un potencial riesgo para la salud humana.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración del arsénico y mercurio en juveniles de *L. vannamei* aclimatados a diferentes salinidades, asimismo, determinar el efecto combinado de la baja salinidad y niveles subletales de los tóxicos sobre la concentración de oxihemocianina, CTH, susceptibilidad de los organismos ante un reto con *V. parahaemolyticus*, bioacumulación de los tóxicos en músculo de camarón y su potencial riesgo para la salud humana.

5.2. Objetivos particulares

1. Calcular la CL_{50} -24, 48, 72 y 96 h de As y Hg (individualmente) en juveniles de *L. vannamei* aclimatados a 5, 10 y 25 g/L de salinidad, así como determinar la capacidad de bioconcentración de los tóxicos en los organismos sobrevivientes a las pruebas de toxicidad aguda.
2. Exponer a juveniles de *L. vannamei* aclimatados a 5 y 25 g/L de salinidad a niveles de As y Hg (individualmente) equivalentes al 1 y 10% de la respectiva CL_{50} -96 h determinada para 25 g/L de salinidad, y evaluar su efecto sobre los niveles de oxihemocianina, CTH, bioacumulación de los tóxicos en músculo de camarón, así como la susceptibilidad de los organismos ante un reto con *V. parahaemolyticus*.
3. Determinar los coeficientes de peligrosidad (HQ) de As y Hg considerando la concentración de los tóxicos en músculo de los camarones expuestos a los diferentes niveles subletales bajo un escenario de consumo específico.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron tres pruebas de toxicidad aguda con juveniles de *L. vannamei* (6-9 g) empleando trióxido de arsénico (As_2O_3) como tóxico, cada una a diferentes salinidades (5, 10 y 25 g/L); de igual forma, tres experimentos utilizando cloruro de Hg ($HgCl_2$). Los organismos que sobrevivieron a las pruebas de toxicidad aguda (96 h de exposición) fueron analizados para determinar la bioconcentración de As o Hg en los organismos completos.

Por otra parte, se llevaron a cabo pruebas subletales (con 96 h de duración) de As y Hg empleando dos niveles de salinidad (5 y 25 g/L) para cada tóxico, utilizando organismos de talla similar a las pruebas de toxicidad aguda (6-10 g). Asimismo, se desarrolló una prueba de toxicidad aguda con *Vibrio parahaemolyticus* usando camarones seleccionados de los mismos grupos de organismos aclimatados a 25 g/L de salinidad para las respectivas pruebas subletales de As o Hg, con el objetivo de calcular la DL_{50-48} h a 25 g/L de salinidad, y posteriormente correr retos bacterianos con los organismos sobrevivientes a las pruebas subletales como se describe más adelante.

Los experimentos se llevaron a cabo en el módulo experimental YK, el cual se encuentra relativamente cerca de las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM Unidad-Mazatlán (1.5 km aproximadamente). Además, es importante mencionar que el protocolo de transporte y aclimatación, al igual que el proceso de filtración y obtención de agua de mar y agua dulce descritos a continuación fue utilizado para el desarrollo de las pruebas de toxicidad aguda y subletales con As y Hg.

6.1. Transporte y aclimatación

Camarones de 6 a 9 g se obtuvieron de una granja camaronícola localizada en la región (ejido Isla de la Piedra, Mazatlán Sinaloa). Los organismos se transportaron en recipientes de polietileno de alta densidad con capacidad de 500 L al módulo experimental YK, y durante el transporte se suministró oxígeno grado medicinal.

Una vez arribados al módulo experimental, los camarones se colocaron en recipientes similares a los de transporte, donde permanecieron 24 h sin ningún cambio de salinidad; es decir, se mantuvo la salinidad de los estanques de cultivo (27 g/L). Posteriormente, los organismos

fueron aclimatados siguiendo el protocolo propuesto por Li *et al.* (2008) (*i.e.*, cambios de salinidad de 2 g/L/día con una velocidad de aclimatación de 0.5 g/L/h) hasta alcanzar las salinidades requeridas según el tipo de prueba de toxicidad; es decir, 5, 10 y 25 g/L de salinidad para las pruebas de toxicidad aguda con As y Hg; y 5 y 25 g/L de salinidad para las pruebas subletales de As y Hg. Durante dicho proceso, los animales fueron alimentados *ad libitum* con alimento balanceado (35% de proteína).

Previo al inicio de cada experimento (incluidos toxicidad aguda y subletal), los organismos se mantuvieron sin cambio de salinidad durante 48 h. En el caso de los organismos aclimatados para las pruebas de toxicidad aguda con As y Hg, estos fueron mantenidos en inanición 24 h antes de empezar los bioensayos, mientras que los camarones aclimatados para los experimentos de toxicidad subletal fueron alimentados durante todo el proceso.

6.2. Calidad del agua

Para los bioensayos se utilizó agua de mar de la bahía de Mazatlán, la cual fue obtenida y filtrada (filtro de carbón activado y arena sílicea, seguido de 3 filtros de cartucho (10, 5 y 1 μm) acoplados a un sistema de filtración UV) del área experimental de la FACIMAR-UAS y transportada al módulo experimental YK; donde fue diluida con agua dulce filtrada (a través de un sistema de filtración WaterTec® de lecho profundo con arena, grava, carbón activado y zeolita) hasta alcanzar las salinidades deseadas.

El agua de mar y el agua dulce fueron caracterizadas fisicoquímicamente para descartar una posible interferencia en los resultados por la presencia de altas concentraciones de los principales compuestos nitrogenados, y sobre todo para conocer los niveles base de As y Hg de dichas aguas. Las variables fisicoquímicas fueron determinadas empleando instrumentos de laboratorio así como técnicas analíticas; por ejemplo la salinidad fue determinada por medio de un refractómetro de campo; alcalinidad total por titulación potenciométrica (Culberson *et al.*, 1969); pH con un potenciómetro de campo; amonio, nitrito y nitrato mediante colorimetría (Strickland y Parsons, 1972); mientras que los niveles de As y Hg disueltos fueron determinados mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA). La temperatura y el oxígeno disuelto son parámetros que fueron monitoreados constantemente durante los experimentos, los cuales se determinaron por medio de un oxímetro de campo.

6.3. Pruebas de toxicidad aguda y bioconcentración de arsénico y mercurio en juveniles de *L. vannamei*

Pruebas de toxicidad estática con renovación (*i.e.*, recambios del 100% de las soluciones de prueba cada 24 h) (Buikema *et al.*, 1982; Chandurvelan *et al.*, 2017) se realizaron para calcular las CL_{50} a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición de As y Hg (*i.e.*, individualmente) a 5, 10 y 25 g/L de salinidad.

Los bioensayos se desarrollaron colocando grupos de 10 organismos de talla similar (8.2 ± 0.6 y 8.4 ± 0.7 g para As y Hg, respectivamente) en estado de intermuda (de Oliveira-Cesar *et al.*, 2006), previamente aclimatados (a las 3 diferentes salinidades a ensayar, según fue el caso) dentro de recipientes de plástico con 10 L de solución por recipiente. Para las pruebas con As, los grupos de camarones fueron expuestos a 0 (control), 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0 y 50.0 mg/L (concentraciones de prueba) para los 3 niveles de salinidad por triplicado; mientras que en los bioensayos con Hg, las concentraciones de prueba fueron 0 (control), 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 y 8.00 mg/L para las 3 salinidades por triplicado (Figura 5).

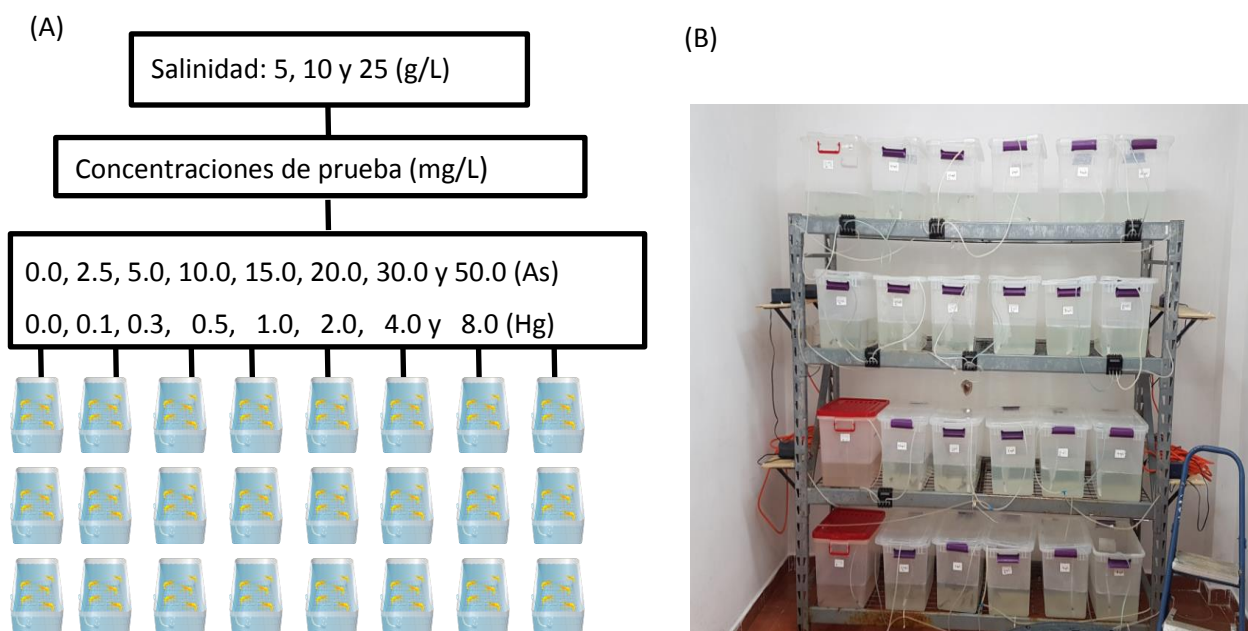


Figura 5. Diseño experimental de las pruebas de toxicidad aguda con As y Hg considerando las diferentes salinidades evaluadas (A). Imagen de un experimento de toxicidad aguda para una salinidad (B).

Para alcanzar las concentraciones de As ensayadas primeramente se preparó una solución madre de 10,000 mg/L, para lo cual se requirió disolver 13.17 g de As_2O_3 y 6 g de NaOH en un matraz aforado a 1 L con agua Milli-Q. De forma similar, para los experimentos con Hg se preparó una solución madre de 500 mg/L, disolviendo 676.81 mg de $HgCl_2$ en 1 L de agua Milli-Q. Posteriormente, se tomaron desde las soluciones madre (de cada tóxico) los volúmenes necesarios para cada concentración de prueba (tratamiento), e inmediatamente se recolectó una muestra de agua de cada unidad experimental (20 mL) para determinar por EAA la variación de las concentraciones analíticas con respecto a las nominales, las cuales no deben ser mayores al 10% (Chandurvelan *et al.*, 2017). Los camarones no fueron alimentados durante los experimentos (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013).

Durante las pruebas de toxicidad aguda se mantuvieron condiciones ambientales estables por medio de un cuarto con temperatura controlada y aireación constante; asimismo, el periodo luz-oscuridad fue 12-12 h. Cada 12 h se registraron los organismos muertos y se determinaron los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto). Los organismos que sobrevivieron a cada unidad experimental (*i.e.*, después de 96 h de exposición) fueron enjuagados con agua Milli-Q, y posteriormente colocados en un recipiente de polietileno (un pool de camarones de cuerpo completo por réplica (n=3)), en el cual las muestras fueron congeladas a $-20^{\circ}C$ para su posterior análisis de contenido de As o Hg (bioconcentración) mediante EAA.

Es importante mencionar que las concentraciones de prueba o tratamientos ensayados fueron seleccionadas con base en experimentos preliminares donde se probaron por duplicado durante 72 h a 25 g/L de salinidad las siguientes concentraciones: 0 (control), 5, 15, 30 y 50 mg/L As; y 0 (control), 0.5, 2.0, 4.0 y 8.0 mg/L Hg, las cuales fueron sustentadas desde los estudios de Valentino-Álvarez *et al.* (2013) y Frías-Espéricueta *et al.* (2001), respectivamente.

6.3.1. Cálculo de las concentraciones letales medias y factores de bioconcentración de arsénico y mercurio en *L. vannamei*

Las concentraciones letales medias (CL_{50}) de As y Hg con sus respectivos límites de confianza a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición para cada nivel de salinidad, se determinaron usando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 7.04, el cual fue alimentado con los respectivos

resultados de mortalidad acumulada para cada periodo de exposición. Los factores de bioconcentración (FsBC) de cada tóxico fueron estimados como la diferencia entre la concentración del tóxico (As o Hg) determinada en los camarones expuestos a los tratamientos con niveles elevados del tóxico y la concentración del tóxico determinada en los camarones expuestos al tratamiento control dividido por la concentración nominal del respectivo elemento en el agua (Leonard *et al.*, 2011).

6.3.2. Análisis estadísticos de las pruebas de toxicidad aguda de arsénico y mercurio en juveniles de *L. vannamei*

Los valores de las CL₅₀ de As y Hg se compararon por medio de una prueba z siguiendo el método propuesto por APHA-AWWA-WPCF (1992). Por otra parte, los valores de bioconcentración de As y Hg así como los factores de bioconcentración de cada elemento no presentaron una distribución normal (prueba Kolmogorov-Smirnov), y tampoco presentaron varianzas homogéneas (prueba de Bartlett); por lo tanto, dichos valores fueron transformados a la raíz cuadrada del arcoseno, y posteriormente comparados usando pruebas ANAVA de dos vías, seguido de pruebas de comparaciones múltiples de Tukey por medio del paquete estadístico STATISTICA versión 10.0 (2010). Todos los análisis estadísticos se desarrollaron con un nivel de significancia del 5%.

6.4. Pruebas subletales

6.4.1. Determinación de las dosis letales medias de *V. parahaemolyticus* en juveniles de *L. vannamei*

Previo a las pruebas subletales con As y Hg, se desarrollaron pruebas de toxicidad aguda con una cepa de *V. parahaemolyticus* (identificada como altamente patógena para juveniles de *L. vannamei*, misma que fue proporcionada por el Centro de Investigación y Desarrollo Innovador para la Regionalización) empleando camarones seleccionados del mismo grupo de organismos que fueron aclimatados a 25 g/L de salinidad para cada prueba subletal; es decir, una prueba de toxicidad aguda para los organismos utilizados en la prueba subletal de As, y posteriormente otra independiente para Hg, esto debido a que dichos experimentos se desarrollaron con grupos de organismos recolectados de diferentes estanques de cultivo de la misma granja con

distintos pesos promedio, por lo que se esperaba que la susceptibilidad de cada grupo de organismos fuera distinta.

El objetivo de las pruebas de toxicidad aguda con *V. parahaemolyticus* fue el de estimar la DL_{50-48} h de cada grupo de organismos, para posteriormente, retar a los camarones sobrevivientes de las pruebas subletales de As y Hg administrando su respectiva DL_{50-48} h calculada a 25 g/L de salinidad. Estas pruebas de toxicidad aguda se llevaron a cabo en recipientes de plástico de 26 L de capacidad pero con 15 L de agua, en los que se colocaron 10 camarones juveniles por acuario. Las dosis de prueba utilizadas para ambos bioensayos, corridas por triplicado fueron: 0 (control), 0.6×10^5 , 1.2×10^5 , 1.8×10^5 , 3.0×10^5 y 6.0×10^5 UFC/g de camarón; considerando 9.1 y 6.9 g como pesos promedio de los organismos probados para As y Hg, respectivamente.

Para alcanzar las dosis requeridas primeramente fue preparado un inóculo de *V. parahaemolyticus* con una concentración de 1×10^9 UFC/mL, y a partir de esto, se prepararon las diluciones necesarias para alcanzar cada dosis de prueba en 40 μ L de inóculo (volumen inyectado a cada organismo), utilizando una jeringa para insulina de 1 mL; en el caso de los tratamientos control, fueron inyectados 40 μ L de agua salina estéril (NaCl al 3%). Para preparar el inóculo con la concentración de 1×10^9 UFC/mL, se cosechó biomasa bacteriana cultivada durante 24 h a 30°C en medio agar TSB (agar enriquecido con caldo de soya tripticaseína), y se resuspendió el pellet en agua salina estéril (NaCl al 3%) hasta alcanzar una absorbancia de 1 a una longitud de onda de 600 nm. La densidad bacteriana del inóculo concentrado (1×10^9 UFC/mL) fue corroborada por cuenta viable en medio agar TCBS.

Durante las 48 h que duró el experimento se realizaron observaciones cada 6 h, en las que se retiraron y registraron los organismos muertos. Los datos de mortalidad acumulada a las 48 h fueron usados para determinar las respectivas DL_{50-48} h por medio del paquete estadístico GraphPad Prism versión 7.04.

6.4.2. Pruebas subletales de arsénico y mercurio en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferente salinidad

Las pruebas subletales se realizaron a 5 y 25 g/L de salinidad para cada tóxico, empleando camarones con un peso promedio de 9.3 ± 1.1 y 7.2 ± 0.6 g para As y Hg, respectivamente. En el caso del As, las concentraciones de prueba ensayadas fueron 0 (control), 119 y 1190 μ g/L,

mientras que para el Hg los niveles evaluados fueron 0, 15 y 150 $\mu\text{g/L}$. Los experimentos se desarrollaron por triplicado y tuvieron una duración de 96 h. Las concentraciones de prueba resultaron de multiplicar la CL_{50-96} h determinada a 25 g/L de salinidad (estimadas desde las pruebas de toxicidad aguda) para cada tóxico por 2 factores de aplicación (*i.e.*, 0.01 y 0.10) (Mariño-Balsa *et al.*, 2000, Bautista-Covarrubias *et al.*, 2015). Para alcanzar las concentraciones de As y Hg deseadas, se utilizó As_2O_3 y HgCl_2 grado reactivo siguiendo el protocolo descrito para las pruebas de toxicidad aguda.

Los bioensayos se llevaron a cabo en recipientes de plástico con capacidad de 100 L pero con 75 L de solución de prueba y un área de 0.3 m^2 previamente lavados con ácido clorhídrico (2 M). En cada uno de los recipientes se colocaron 45 camarones juveniles en estado de intermuda (Oliveira-Cesar *et al.*, 2006), esto con el objetivo de obtener la densidad de siembra utilizada en la granja de cultivo (150 organismos/ m^2) en la que se recolectaron los organismos de prueba.

Los experimentos se desarrollaron dentro de un cuarto con temperatura controlada y un periodo luz-oscuridad de 12-12 h. Los camarones fueron alimentados dos veces al día durante los 4 días de exposición, suministrando el 4% de la biomasa total de camarón para cada unidad experimental por día; es decir, 2% por ración (Van Wyk, 1999). Se recambió el 60% de la solución de prueba para cada unidad experimental a las 48 h, y se tomaron muestras de agua al inicio y al final de cada recambio para determinar las concentraciones reales (instrumentales) de As o Hg a las que fueron expuestos los organismos (Figura 6).

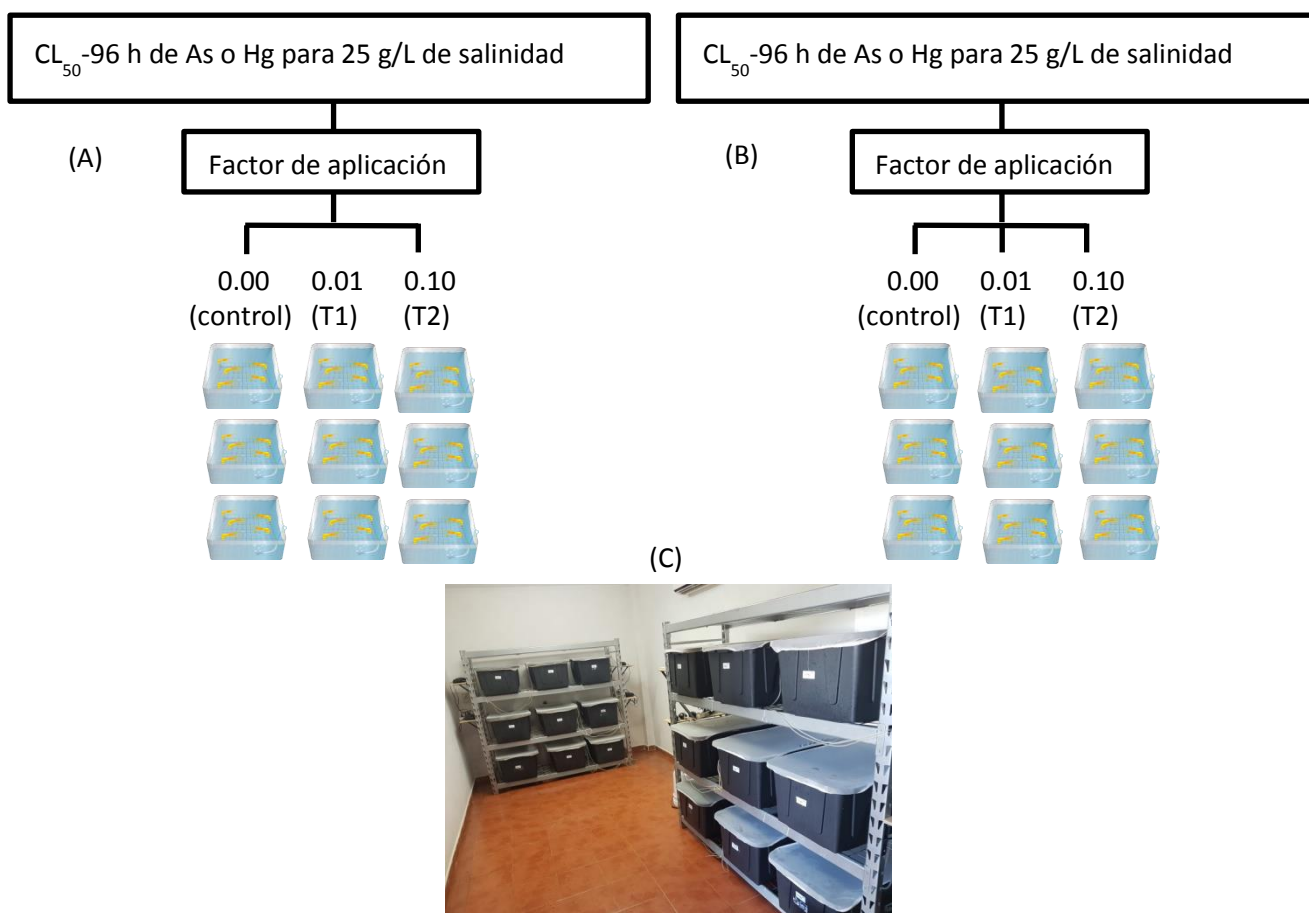


Figura 6. Diseño experimental de las pruebas de toxicidad subletal de As o Hg desarrolladas a 5 (A) y 25 g/L (B) de salinidad (T1 y T2 se refieren a los tratamientos donde se expusieron a los camarones a concentraciones equivalentes al 1 y 10%, respectivamente, de las CL_{50} -96 h determinadas para cada tóxico en 25 g/L de salinidad). Imagen de un experimento subletal realizado a las dos salinidades evaluadas (C).

Se realizaron observaciones cada 12 h, que consistieron en retirar y registrar los organismos muertos, así como determinar los parámetros fisicoquímicos *in situ* (temperatura, oxígeno disuelto y pH) y observar el consumo aparente de alimento. A las 24, 48 y 96 h de haber iniciado los experimentos fue extraída hemolinfa (100 μ L/organismo aproximadamente) de dos camarones por unidad experimental para la determinación de oxihemocianina ($n = 6$), para lo cual se utilizó una jeringa de 3 mL con aguja desmontable. En los mismos tiempos de exposición fue extraída hemolinfa (50 μ L/organismo aproximadamente) de dos camarones por unidad experimental para realizar el conteo total de hemocitos (CTH) ($n = 6$); en este caso, se emplearon jeringas de 1 mL con aguja desmontable la cual contenía 450 μ L de solución fijador (anticoagulante más formaldehído al 10%). Las extracciones de hemolinfa se desarrollaron

insertando las agujas en el seno hemolinfático ventral de cada camarón (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014).

El músculo de los camarones muestreados para la determinación de oxihemocianina y CTH fue recolectado en recipientes de polietileno (pool de 4 músculos por unidad experimental ($n = 3$)) y congelados a -20°C para posteriormente analizar su contenido de As o Hg (Bioacumulación) (Bergés-Tiznado *et al.* 2013; Delgado-Álvarez *et al.*, 2015).

6.4.3. Pruebas reto con *V. parahaemolyticus* en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades

Consecutivamente a la exposición subletal de As y Hg (*i.e.*, después de 96 h de exposición a cada tratamiento), se procedió a la realización de su respectiva prueba reto. Estos experimentos consistieron en seleccionar 10 camarones al azar sobrevivientes de cada unidad experimental ensayada durante los experimentos subletales de As y Hg (con ambas salinidades), y colocarlos en recipientes de plástico (iguales a los utilizados para las pruebas de toxicidad aguda) con 15 L de agua (con su respectiva salinidad) sin tóxico. Los organismos permanecieron durante 2 h en agua de mar diluida (sin tóxico), y posteriormente fueron retados con la bacteria inyectando a cada individuo 40 μL de inóculo con la DL_{50} -48 h de *V. parahaemolyticus* respectiva para cada tóxico, para después ser colocados en un nuevo acuario con agua sin tóxico a la salinidad correspondiente.

Desde los tratamientos control ensayados en cada prueba subletal fueron seleccionados dos grupos de 10 organismos al azar de cada unidad experimental. El primer grupo fue utilizado como control negativo (organismos que no fueron expuestos al tóxico y que fueron inyectados con 40 μL de agua salina estéril) y el segundo grupo como control positivo (organismos que no fueron expuestos al tóxico pero que fueron inyectados con la DL_{50} -48 h de *V. parahaemolyticus*) (Figura 7).

Las pruebas reto tuvieron una duración de 48 h, tiempo en el que se registraron los organismos muertos cada 6 h, aunque la mortalidad acumulada fue reportada a las 48 h. Cabe señalar que el protocolo empleado para la preparación de los inóculos fue el mismo que se utilizó para la

prueba de toxicidad aguda de *V. parahaemolyticus*, el cual fue descrito anteriormente (ver apartado 6.4.1).

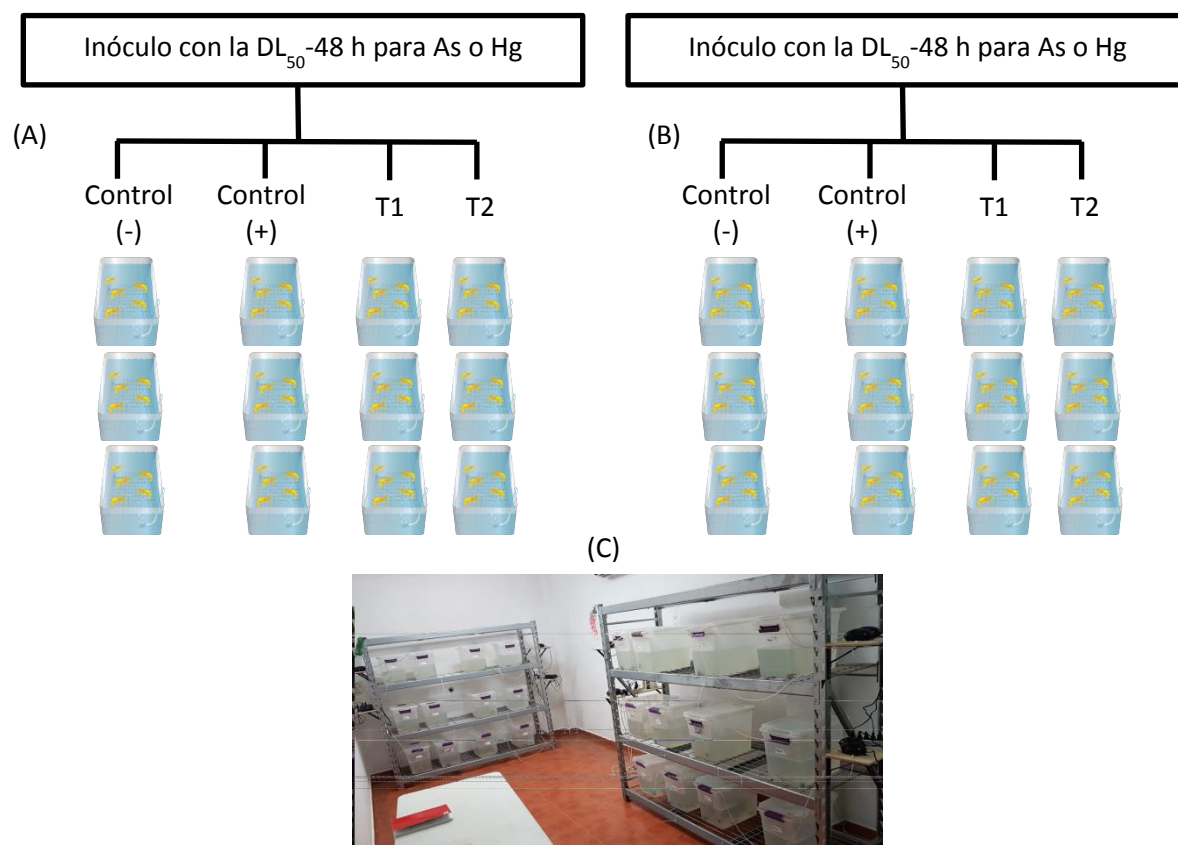


Figura 7. Diseño experimental de las pruebas reto con *V. parahaemolyticus* realizadas a 5 (A) y 25 (B) g/L de salinidad. El tratamiento control (-) se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a la solución de agua de mar diluida (sin tóxico) y posteriormente inyectado con solución salina estéril (3% de NaCl); el tratamiento control (+) se refiere al grupo de camarones expuestos 96 h a la solución de agua de mar diluida (sin tóxico) y posteriormente infectado con la DL_{50} -48 h de *V. parahaemolyticus* determinada para cada tóxico; el tratamiento T1 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a una concentración equivalente al 1% de la CL_{50} -96 h determinada para cada tóxico en 25 g/L de salinidad, y posteriormente infectado con la DL_{50} -48 h de *V. parahaemolyticus* determinada para cada tóxico; el tratamiento T2 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a una concentración equivalente al 10% de la CL_{50} -96 h determinada para cada tóxico en 25 g/L de salinidad, y posteriormente infectado con la DL_{50} -48 h de *V. parahaemolyticus* determinada para cada tóxico. Todos los tratamientos se corrieron por triplicado sin administrar As o Hg al agua. Imagen de una prueba reto con *V. parahaemolyticus* desarrolladas con las dos salinidades evaluadas (C).

6.4.4. Cálculos de los coeficientes de peligrosidad de As y Hg

Con el objetivo de evaluar el potencial riesgo a la salud humana, que representaría el consumo hipotético del músculo de juveniles de *L. vannamei* sometidos a los diferentes escenarios de toxicidad subletal de As o Hg probados, fueron calculados los coeficientes de peligrosidad (HQ, por sus siglas en inglés: Hazard Quotient) de As y Hg para cada caso. La metodología utilizada para la estimación de los valores de HQ fue descrita por Newman y Unger (2003), la cual está basada en las dosis de referencia para cada tóxico establecidas por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América (EPA, 2018).

Cabe señalar que las dosis de referencia representan el valor umbral de un tóxico en particular que conduce a ciertos daños en humanos, por ejemplo, necrosis celular; las cuales están expresadas en unidades de mg/kg de peso corporal por día, y se basa en una estimación de la exposición diaria de por vida que tiene la población humana en la que no se aprecia o presenta deterioro en el organismo (Newman y Unger, 2003). Las dosis de referencia de As y Hg están dadas considerando la fracción más tóxica de estos elementos, que son el As inorgánico (As_i) y el metil-Hg (MeHg).

Basado en lo anterior, enseguida se muestra la ecuación utilizada para los cálculos de los valores de HQ de As y Hg.

$$HQ = \frac{CTC \times (ID/PC)}{RfD} \quad (1)$$

Dónde:

CTC = Concentración total del contaminante (As_i o MeHg en mg/kg en peso húmedo)

ID = Tasa de ingestión diaria promedio de la población evaluada (3.7 g/persona/día; CONAPESCA, 2011)

PC = Peso corporal (personas de entre 10 a 100 kg)

RfD = Dosis de referencia del contaminante (0.0003 y 0.0001 mg/kg peso corporal/día para As_i y MeHg, respectivamente)

De acuerdo a dicha ecuación, para calcular los valores de HQ de As y Hg en los músculos de los camarones expuestos a los diferentes tratamientos de As y Hg probados, se requirió conocer la fracción de As_i y MeHg en peso húmedo de cada músculo evaluado; para lo cual, en el caso de As, se asumió que el 3.5% de la concentración de As total en cada músculo de camarón correspondió a la fracción inorgánica (As_i), esto de acuerdo a la Agencia de Seguridad Alimentaria Europea (2009) (EFSA, European Food Safety Authority, por sus siglas in inglés) y Olmedo *et al.* (2013); mientras que para el caso del Hg; se consideró que el 98.6% de la concentración total de Hg en los músculos de camarón correspondió a su fracción orgánica (MeHg) de acuerdo a Hoang *et al.* (2017).

6.4.5. Análisis estadísticos relacionados a las pruebas de toxicidad subletal de arsénico y mercurio en *L. vannamei*

Los resultados de mortalidad, oxihemocianina, CTH y bioacumulación de As y Hg en músculo obtenidos desde las pruebas subletales para cada tóxico fueron transformados a la raíz cuadrada del arcoseno, y posteriormente comparados por medio de un ANAVA-tres vías (considerando el tiempo de exposición, concentración del tóxico y salinidad como factores), seguido de pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los análisis estadísticos se desarrollaron con un nivel de significancia del 5%.

6.5. Análisis químico-biológicos

6.5.1. Determinación de arsénico y mercurio en tejidos de *L. vannamei*

Las muestras de tejido de camarón recolectadas desde las pruebas de toxicidad aguda (camarones de cuerpo entero) y subletal (músculo) siguieron el mismo protocolo para la determinación de cada elemento. En este contexto, las muestras congeladas (a $-20^{\circ}C$) fueron liofilizadas durante 72 h, y el material libre de humedad fue pesado (para calcular el porcentaje de humedad), molido y homogenizado un mortero semi-automatizado de porcelana.

El material molido y homogenizado fue sometido a un proceso de digestión ácida, donde se colocaron alrededor de 0.25 g de cada muestra en un vaso para digestión de teflón con capacidad de 60 mL (Savillex), y se les adicionaron 5 mL de ácido nítrico (HNO_3 , Ultrapuro >65%,

Trace Metal Analysis, Baker). Las muestras se colocaron en un baño de arena a 120 °C durante 3 h; y consecuentemente, los digeridos fueron aforados con agua Milli-Q a un volumen final de 15 mL, para posteriormente ser almacenados en frascos de polietileno. Cabe mencionar que todo el material utilizado para la determinación de As y Hg fue preparado de acuerdo a la técnica de limpieza de Moody y Lindstrom (1977).

Para la determinación de las concentraciones de As, las muestras se analizaron por EAA con sistema de corrección por efecto zeeman acoplado a horno de grafito (AAAnalyst 800, Perkin-Elmer). Para la cuantificación del elemento, se preparó un modificador de matriz para obtener una mayor temperatura de cenizas y mejorar la señal del analito, adicionando 30 µL del mismo en cada atomización. El modificador se elaboró a partir de 1 mL de solución de nitrato de paladio ($[Pd(HNO_3)_2]$; 10,000 mg Pd/L en HNO_3 al 15%, Merck) y 100 µL de nitrato de magnesio ($Mg(NO_3)_2$; 10,000 mg/L, Merck), en 8.9 mL de agua acidificada (HNO_3 al 0.2%). Todas las soluciones y diluciones de las muestras que se utilizaron para estos análisis se prepararon con agua acidificada.

Las determinaciones de Hg se llevaron a cabo por EAA y generación de vapor en frío (GVF, Varian modelo VGA-110). Las muestras se prepararon haciendo las diluciones correspondientes y agregando 1 mL de HNO_3 al 50% (v/v) y 0.1 mL de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 1% (p/v) a cada una de ellas. Posteriormente se dejaron reaccionar durante 4 horas.

Para la validación de los análisis de As y Hg se corrieron muestras blanco (5 mL de ácido nítrico) y los materiales de referencia certificados Dorm-4 (músculo de pescado con niveles de As y Hg de 6.87 ± 0.44 y 0.41 ± 0.04 µg/g en peso seco (p.s.), respectivamente; NRC-CNRC, 2012) y Dolt-5 (hígado de pescado con niveles de As y Hg de 34.60 ± 2.40 y 0.44 ± 0.18 µg/g en p.s., respectivamente; NRC-CNRC, 2014) (uno de cada uno por cada lote de muestras; es decir, cada 24 muestras), los cuales fueron tratados de la misma manera que las muestras de camarón. Los porcentajes de recuperación promedio de As fueron 93.5 ± 3.3 y $96.4 \pm 6.1\%$ para Dorm-4 y Dolt-5, respectivamente; mientras que para Hg los porcentajes de recuperación promedio fueron 106.4 ± 3.4 y $102.7 \pm 4.6\%$ para Dorm-4 y Dolt-5, respectivamente.

6.5.2. Conteo total de hemocitos y oxihemocianina en *L. vannamei*

La oxihemocianina presente en la hemolinfa se determinó tomando 30 μL de la muestra sin anticoagulante e inmediatamente colocada en cubetas de 3 mL, las cuales contenían 2970 μL de agua Milli-Q, y posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 335 nm (Chen *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 2002). La concentración de oxihemocianina se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar determinado por Nickerson y Van Holde (1971) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Oxihc} = \text{FD} (\text{absorbancia} * \epsilon^{-1}) \quad (2)$$

Dónde:

Oxihc: oxihemocianina (mmol/L)

FD= factor de dilución: $30 \mu\text{L} + 2970 \mu\text{L} = 3000/30=100$

ϵ = coeficiente de extinción molar = 17.26

El CTH se realizó microscópicamente colocando una alícuota de 50 μL de la hemolinfa mezclada con la solución fijadora en una cámara Neubauer a 40X, usando los cuadrantes de las esquinas y un adicional seleccionado aleatoriamente en cada caso (Costa *et al.*, 2009). El número de hemocitos se determinó en células por mililitro. Para ello, se dividió el número de células contadas entre el número de cuadrantes leídos por 10,000 por el factor de dilución con la solución fijadora (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización química del agua de mar y dulce empleada en los experimentos de toxicidad aguda y subletal

Las concentraciones de las diferentes variables químicas del agua de mar y agua dulce empleadas tanto en el proceso de aclimatación como en la preparación de las soluciones de agua de mar diluida a las tres salinidades usadas (5, 10 y 25 g/L) para el desarrollo de las pruebas de toxicidad aguda y subletales se presentan en la Tabla 1. Dichos valores se encuentran dentro del intervalo considerado como típico para agua de mar y aguas dulces superficiales (APHA-AWWA-WPCF, 1992; Millero, 2006; Boyd, 2009). Además, se observa que las concentraciones de As y Hg se encuentran por lo menos en un orden de magnitud inferior a la concentración más baja utilizada en las pruebas de toxicidad subletal para ambos elementos (15 y 119 $\mu\text{g/L}$ de Hg y As, respectivamente).

Tabla 1. Caracterización química del agua de mar y agua dulce utilizada para las pruebas de toxicidad aguda.

Variable	Agua de mar	Agua dulce
Salinidad (g/L)	34.3 \pm 0.5	0.2 \pm 0.0
TAN ($\mu\text{g/L}$)	385.0 \pm 91.9	155.0 \pm 35.4
N-NH ₃ ($\mu\text{g/L}$) ^a	8.1 \pm 1.9*	7.9 \pm 1.8*
N-NO ₂ ⁻ ($\mu\text{g/L}$)	9.5 \pm 0.0	8.9 \pm 0.3
N-NO ₃ ⁻ ($\mu\text{g/L}$)	229.0 \pm 5.7	0.6 \pm 0.0
Alcalinidad total (como CaCO ₃ mg/L)	214.0 \pm 7.1	157.0 \pm 11.3
pH	8.2 \pm 0.1	7.7 \pm 0.1
As ($\mu\text{g/L}$)	2.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
Hg ($\mu\text{g/L}$)	0.8 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1

^aDatos calculados a partir de la concentración de TAN (nitrógeno amoniacal total) y las constantes de equilibrio químico propuestas por Millero (2006).

7.2. Pruebas de toxicidad aguda

7.2.1. Toxicidad aguda y bioconcentración de arsénico en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades

Las pruebas de toxicidad aguda con As a 5, 10 y 25 g/L de salinidad se desarrollaron a una temperatura de 28.6 ± 0.7 °C, oxígeno disuelto de 6.2 ± 0.4 mg/L y pH de 7.9 ± 0.4 . Las concentraciones analíticas o instrumentales de As determinadas en las soluciones de prueba (tratamientos) empleadas en estos experimentos se muestran en la Tabla 2. Dichas variables fisicoquímicas sustentan los resultados de mortalidad y bioconcentración de As que se muestran a continuación, ya que demuestran que los organismos fueron expuestos a las condiciones experimentales requeridas.

Tabla 2. Concentraciones promedio \pm desviación estándar (mg/L) de las soluciones de prueba de arsénico utilizadas en los experimentos de toxicidad aguda y su variación (V) con respecto a las concentraciones nominales (n = 4).

CN	CA (5 g/L)	V (%)	CA (10 g/L)	V (%)	CA (25 g/L)	V (%)
0.0	$< 0.01^a$	0.00	$< 0.01^b$	0.00	$< 0.01^c$	0.00
2.5	2.53 ± 0.10	1.47 ± 1.44	2.60 ± 0.02	3.84 ± 0.66	2.48 ± 0.40	-0.80 ± 1.60
5.0	5.09 ± 0.05	1.83 ± 0.75	5.28 ± 0.14	4.92 ± 0.19	4.96 ± 0.15	-0.70 ± 3.10
10.0	10.18 ± 0.26	1.84 ± 1.86	10.44 ± 0.17	4.27 ± 0.59	9.63 ± 0.25	-3.70 ± 0.20
15.0	15.31 ± 0.33	2.12 ± 1.54	15.10 ± 0.11	0.87 ± 0.55	14.40 ± 0.50	-3.73 ± 0.33
20.0	21.37 ± 0.30	4.70 ± 0.15	20.61 ± 0.68	2.99 ± 2.04	19.25 ± 0.50	-3.75 ± 0.25
30.0	30.08 ± 0.37	0.3 ± 0.86	28.88 ± 0.19	-4.04 ± 0.38	29.00 ± 0.30	-3.33 ± 1.00
50.0	50.22 ± 2.70	0.44 ± 2.82	49.17 ± 0.38	-1.78 ± 0.44	48.55 ± 0.25	-2.90 ± 0.50

CN, concentración nominal; CA, concentración analítica; 1.1 ± 0.1 $\mu\text{g/L}^a$; 1.4 ± 0.2 $\mu\text{g/L}^b$; 2.0 ± 0.2 $\mu\text{g/L}^c$.

Los resultados de mortalidad del experimento preliminar de toxicidad aguda con As en juveniles de *L. vannamei* desarrollado a 25 g/L de salinidad durante 72 h se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) del experimento preliminar con As a 25 g/L de salinidad (n = 20).

Tiempo (h)	Concentraciones de prueba (mg/L)					
	(control)	0	5	15	30	50
24	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	60 \pm 14	85 \pm 7	
48	0 \pm 0	5 \pm 7	30 \pm 0	70 \pm 14	100 \pm 0	
72	0 \pm 0	10 \pm 13	30 \pm 0	75 \pm 7	100 \pm 0	

El porcentaje de mortalidad más alto alcanzado a las 24 h en la concentración más elevada de As probada fue de 85%, mientras que a las 48 h, la mortalidad registrada en dicha concentración de prueba fue del 100%. En el resto de los tratamientos no se observaron efectos letales del 100%; sin embargo, mortalidades de 10, 30 y 75% fueron observadas para los tratamientos con 5, 15 y 30 mg/L de As disuelto en agua, respectivamente. Con base en estos resultados fueron seleccionadas las concentraciones de prueba empleadas en los experimentos de toxicidad aguda de As con diferentes salinidades como se muestra a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Mortalidad promedio (%) \pm desviación estándar de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de As en 5 g/L de salinidad (n = 30).

Tiempo (h)	Control (0.0)	Concentraciones de prueba (mg/L)						
		2.5	5.0	10.0	15.0	20.0	30.0	50.0
24	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 5.8	0.0 \pm 0.0	10.0 \pm 10.0	16.7 \pm 20.1	20.0 \pm 10.0	40.0 \pm 11.5	90.0 \pm 11.5
48	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 5.7	6.7 \pm 5.7	20.0 \pm 10.0	26.7 \pm 5.7	40.0 \pm 10.0	80.0 \pm 10.0	100.0 \pm 0.0
72	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 5.7	10.0 \pm 5.7	26.7 \pm 15.3	33.3 \pm 15.3	60.0 \pm 17.3	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
96	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 5.7	20.0 \pm 10.0	30.0 \pm 15.3	40.0 \pm 23.3	73.3 \pm 15.3	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

Los resultados de mortalidad de la prueba de toxicidad aguda con As en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 5 g/L de salinidad, muestran que el 100% de los organismos expuestos a 30.0 y 50.0 mg/L de As murieron a las 72 y 48 h, respectivamente, de haber iniciado la prueba. En las concentraciones de 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 mg/L de As, los porcentajes de mortalidad registrados a las 96 h fueron 6.7, 20.0, 30.0, 40 y 73.3, respectivamente. En el caso particular de la respuesta observada de los organismos mantenidos en 2.5 y 5.0 mg/L de As, se apreció que el

efecto del tóxico fue más agudo en los camarones expuestos a la concentración menor a las 24 h; sin embargo, lo contrario se manifestó a partir de las 48 h, lo cual fue lo esperado.

Las CL₅₀ 24-96 h con sus respectivos límites de confianza (95%) de As estimados para 5 g/L de salinidad se presentan en la Tabla 5, donde se muestra que las CL₅₀ oscilaron entre 13.9 y 30.8 mg/L; además que estos valores fueron disminuyendo progresivamente a medida que aumentó el tiempo de exposición, aunque estas diferencias resultaron ser significativas entre los valores calculados para las 24 y 48 h, y posteriormente entre los estimados para las 48 y 96 h. Lo anterior demuestra que el 50% de una población de camarones juveniles no podrían sobrevivir 24 h en un ambiente con 30.8 mg/L As, y que su tolerancia disminuiría a medida que aumenta el tiempo de exposición, observándose los mismos efectos letales en la población si fuera expuesta a 13.9 mg/L y 5 g/L de salinidad durante 96 h.

Tabla 5. Concentraciones letales medias promedio (CL₅₀) y límites de confianza (95%) \pm desviación estándar de As (mg/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 5 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	CL ₅₀	Límite inferior	Límite superior
24	30.8 \pm 2.7 ^c	25.1 \pm 4.9	40.1 \pm 3.3
48	20.2 \pm 2.5 ^b	16.6 \pm 4.8	24.7 \pm 0.6
72	16.8 \pm 1.8 ^{ab}	11.9 \pm 3.2	20.6 \pm 1.2
96	13.9 \pm 2.8 ^a	11.5 \pm 3.2	16.5 \pm 2.3

Durante la prueba realizada a 10 g/L de salinidad (Tabla 6), el porcentaje máximo de mortalidad se registró en la concentración más alta a las 48 h, mientras que al final del bioensayo las respuestas letales alcanzaron 13.3, 13.3, 30, 36.7, 60.0 y 96.7% en los camarones expuestos a 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 30 mg/L As, respectivamente.

Tabla 6. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de As en 10 g/L de salinidad (n = 30).

Tiempo (h)	Concentraciones de prueba (mg/L)							
	Control (0.0)	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0	30.0	50.0
24	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 5.7	6.7 \pm 5.7	16.7 \pm 11.5	16.7 \pm 11.5	36.7 \pm 5.7	96.7 \pm 5.7
48	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 11.5	6.7 \pm 11.5	20.0 \pm 15.3	30.0 \pm 15.3	36.7 \pm 18.9	93.3 \pm 5.7	100.0 \pm 0.0
72	0.0 \pm 0.0	10.0 \pm 15.3	13.3 \pm 15.3	20.0 \pm 15.3	30.0 \pm 15.3	46.7 \pm 11.5	96.7 \pm 5.7	100.0 \pm 0.0
96	0.0 \pm 0.0	13.3 \pm 5.3	13.3 \pm 15.3	30.0 \pm 15.3	36.7 \pm 15.3	60.0 \pm 10.0	96.7 \pm 5.7	100.0 \pm 0.0

De acuerdo a la Tabla 7, las CL₅₀ de las 24 a las 96 h por As en una población de camarones juveniles de *L. vannamei* mantenida en un ambiente con 10 g/L de salinidad variaron entre 14.8 y 30.4 mg/L. Se observa que la tolerancia de los organismos al tóxico disminuye significativamente en las primeras 48 h, y aunque dicha tolerancia continuó decreciendo en el resto de la prueba no fue significativo durante las últimas 48 h.

Tabla 7. Concentraciones letales medias promedio (CL₅₀) y límites de confianza (95%) de As \pm desviación estándar (mg/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 10 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	CL ₅₀	Límite inferior	Límite superior
24	30.4 \pm 2.7 ^c	26.1 \pm 3.7	36.1 \pm 1.8
48	19.1 \pm 1.6 ^b	17.0 \pm 1.7	21.2 \pm 3.4
72	16.8 \pm 2.4 ^{ab}	13.6 \pm 5.8	20.8 \pm 2.7
96	14.8 \pm 2.0 ^a	11.2 \pm 4.3	19.2 \pm 3.2

Esto sugiere que existe el 95% de probabilidad de que la mitad de una población de camarones juveniles de *L. vannamei* no sobreviva en ambientes con 10 g/L de salinidad donde se presenten 30.4 y 14.8 mg/L As durante 24 y 96 h, respectivamente.

En el experimento desarrollado a 25 g/L de salinidad (Tabla 8) se registró el 100% de mortalidad en los grupos de organismos expuestos a 30.0 y 50.0 mg/L As a las 48 h. Sin embargo, en las concentraciones correspondientes a 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 mg/L As se obtuvieron 6.7, 16.7, 33.3, 66.7 y 80.0% de mortalidad al final de la prueba, en el orden.

Tabla 8. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de As (mg/L) en 25 g/L de salinidad (n = 30).

Tiempo (h)	Concentraciones de prueba							
	Control (0.0)	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0	30.0	50.0
24	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 5.7	13.3 \pm 11.5	40.0 \pm 20.0	96.7 \pm 5.7
48	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 5.7	3.3 \pm 5.7	3.3 \pm 5.7	13.3 \pm 5.7	60.0 \pm 10.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
72	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 5.7	10.0 \pm 5.7	16.7 \pm 5.7	50.0 \pm 0.0	73.3 \pm 5.7	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
96	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 5.7	16.7 \pm 5.7	33.3 \pm 5.7	66.7 \pm 11.5	80.0 \pm 10.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

Las CL₅₀ y sus respectivos límites de confianza (95%) para 25 g/L de salinidad son mostrados en la Tabla 9. Los cuales oscilaron entre 11.9 y 31.5 mg/L As, encontrándose diferencias significativas en todos los casos. Con base en esto podemos señalar que el 50% de una población de juveniles de *L. vannamei* expuesta a un ambiente con 25 g/L de salinidad y 31.5 mg/L As durante 24 h sufriría efectos letales, y que la toxicidad aguda del tóxico aumentaría significativamente en intervalos de 24 h, siendo suficientes 11.9 mg/L As para ocasionar una respuesta similar en la población si se mantuviera 4 días bajo dicho ambiente.

Tabla 9. Concentraciones letales medias promedio (CL₅₀) y límites de confianza (95%) \pm desviación estándar de As (mg/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 25 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	CL ₅₀	Límite inferior	Límite superior
24	31.5 \pm 4.7 ^d	29.1 \pm 4.5	34.1 \pm 5.1
48	19.0 \pm 0.3 ^c	18.2 \pm 1.3	19.8 \pm 0.9
72	15.0 \pm 0.3 ^b	13.4 \pm 0.6	16.2 \pm 0.2
96	11.9 \pm 1.2 ^a	9.6 \pm 1.5	14.1 \pm 1.0

La Figura 8 muestra el comportamiento de las CL₅₀ calculadas para los tres niveles de salinidad a lo largo de 96 h. Aunque en los tres casos se observa una tendencia a la baja en las CL₅₀ a medida que aumenta el tiempo; es decir, la toxicidad aguda del tóxico incrementó conforme transcurrían las horas de exposición, no se encontró un efecto significativo (P > 0.05) cuando se compararon los valores entre los mismos tiempos de exposición y diferentes salinidades. Esto

demuestra que la salinidad (por lo menos en el intervalo probado en este estudio) no tuvo un efecto significativo sobre la tolerancia de los organismos al As; lo cual sugiere que una población de camarones sufriría efectos letales en un orden de magnitud comparable (sin diferencias significativas) si fuera expuesta en un periodo de corto plazo (no mayor a 96 h) en un intervalo de concentración de 11.9 a 31.5 mg/L As y ambientes con salinidades desde 5 a 25 g/L.

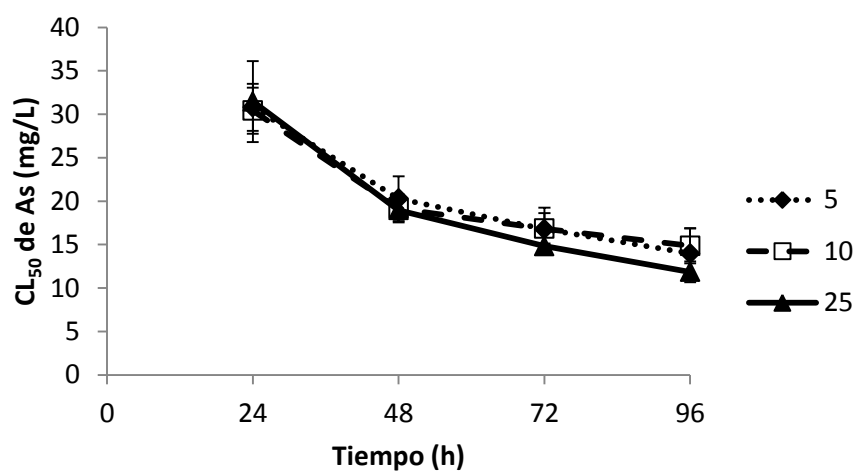


Figura 8. Concentraciones letales medias e intervalos de confianza (barras) de arsénico en juveniles de *L. vannamei* calculadas para los tres niveles de salinidad (g/L) en intervalos de 24 h durante 96 h ($n = 3$). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los valores de diferentes salinidades y mismo tiempo de exposición.

En lo que respecta al análisis de bioconcentración de As en el cuerpo completo de los juveniles de *L. vannamei*, la Tabla 10 muestra el número de organismos que sobrevivieron después de 96 h de exposición a los diferentes tratamientos de As ensayados por réplica en las pruebas de toxicidad aguda con diferentes salinidades, los cuales fueron usados para realizar dicho análisis.

Tabla 10. Número de camarones *L. vannamei* sobrevivientes por réplica (R1, R2, y R3) correspondientes a cada nivel de arsénico disuelto en el agua (mg/L) ensayado en las pruebas de toxicidad aguda con diferentes salinidades.

Nivel As	5 g/L			10 g/L			25 g/L		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0.0	10	10	10	10	10	10	10	10	10
2.5	9	10	9	9	7	10	9	9	10
5.0	7	9	8	9	7	10	8	9	8
10.0	6	9	6	9	6	6	6	7	7
15.0	4	5	9	7	8	4	4	4	2
20.0	3	4	1	3	5	4	1	3	2
30.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la Figura 9 se muestran los resultados del análisis de bioconcentración de As en los juveniles de *L. vannamei* que sobrevivieron a los diferentes tratamientos de As disuelto en el agua con diferentes salinidades. Este análisis demostró una relación positiva entre la bioconcentración de As en el camarón y la concentración de As en el agua después de 96 h de exposición para las tres salinidades, aunque estas fueron significativas ($P < 0.05$) entre los grupos control y el resto de los tratamientos en las tres salinidades, y entre los tratamientos de 2.5, 10.0 y 15.0 mg/L de As en 5 y 10 g/L de salinidad; así como para los tratamientos de 2.5, 5.0 y 10.0 mg/L de As en 25 g/L.

No fueron observadas diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los valores de bioconcentración de As determinados para cada concentración de As disuelto en el agua y diferentes niveles de salinidad; es decir, mismo tratamiento pero a diferentes salinidades. Asimismo, el análisis estadístico (ANAVA - 2 vías) demostró que no se presentó una interacción significativa de la salinidad y la concentración de As disuelto en el agua sobre la bioconcentración de As en los camarones.

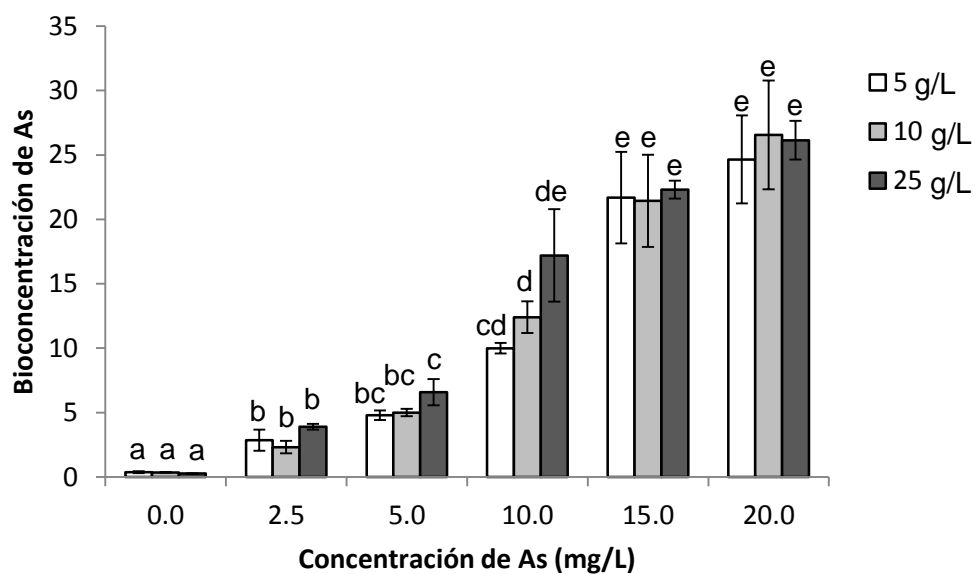


Figura 9. Bioconcentración de arsénico (mg/kg en peso seco) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades y concentraciones de arsénico disuelto en el agua después de 96 h. Los datos se muestran como promedios \pm desviación estándar ($n = 3$). Distintas letras entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

A continuación se muestran los factores de bioconcentración (FBC) calculados en los camarones expuestos a las diferentes concentraciones de As disuelto en el agua después de 96 h de exposición, los cuales variaron desde 0.8 ± 0.2 a 1.7 ± 0.4 , mismos que fueron determinados para los tratamientos de 2.5 mg/L As a 10 g/L de salinidad y para 10.0 mg/L As a 25 g/L de salinidad, respectivamente (Figura 10).

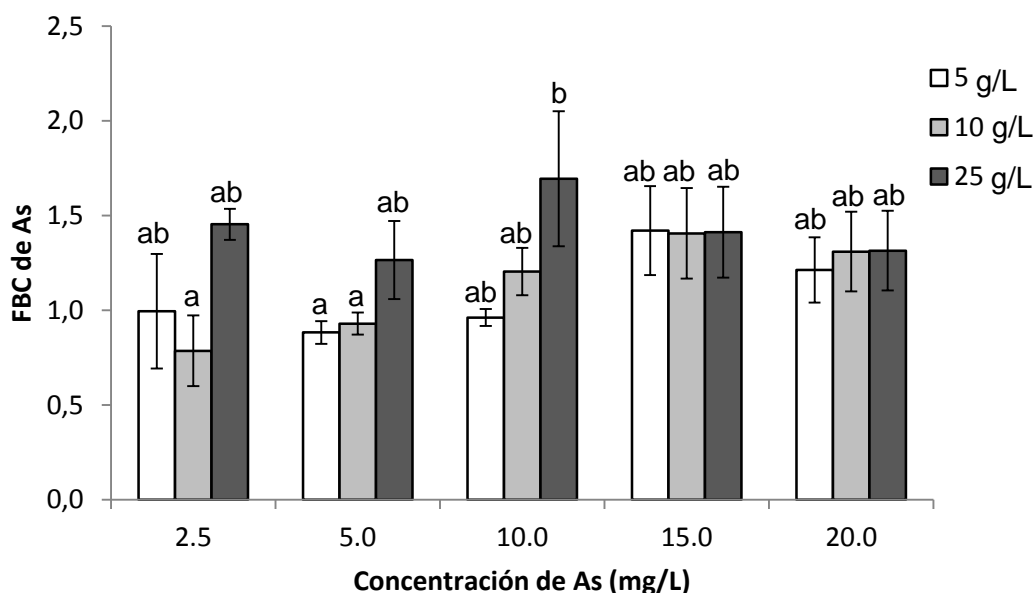


Figura 10. Factor de bioconcentración (FBC) de arsénico (mg/kg de peso seco) en juveniles de *L. vannamei* expuestos 96 h a diferentes salinidades y concentraciones de arsénico disuelto en el agua. Los datos son mostrados como promedios y desviaciones estándar (n = 3). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).

Se observaron diferencias significativas entre los valores de los FBCs correspondientes a 10.0 mg/L de As a 25 g/L de salinidad (1.7 ± 0.4) versus los valores dados para 2.5 (0.8 ± 0.2) y 5.0 (0.9 ± 0.1) mg/L de As a 10 g/L de salinidad, así como para 5.0 mg/L de As a 5 g/L de salinidad (0.9 ± 0.1). Estos últimos valores fueron 53, 47 y 47% más bajos que el calculado (1.7) para 10.0 mg/L de As a 25 g/L de salinidad; sin embargo, los FBCs de As no mostraron diferencias significativas entre los valores correspondientes a la misma salinidad y distintas concentraciones de As disuelto en el agua, y un resultado similar fue determinado cuando se compararon los FBCs calculados para la misma concentración de As disuelto en el agua en diferentes salinidades.

7.2.2. Toxicidad aguda y bioconcentración de mercurio en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades

Las pruebas de toxicidad aguda con Hg a 5, 10 y 25 g/L de salinidad se desarrollaron a una temperatura de 27.9 ± 0.6 °C, oxígeno disuelto de 5.9 ± 0.5 mg/L y pH de 7.8 ± 0.4 . Las concentraciones analíticas o instrumentales de Hg determinadas en las soluciones de prueba (tratamientos) empleadas en estos experimentos se presentan en la Tabla 11. Dichas variables

fisicoquímicas sustentan los resultados de mortalidad y bioconcentración de Hg que se muestran a continuación, ya que demuestran que los organismos fueron expuestos a las condiciones experimentales requeridas.

Tabla 11. Concentraciones promedio \pm desviación estándar (mg/L) de las soluciones de prueba de mercurio utilizadas en los experimentos de toxicidad aguda y su variación (V) con respecto a las concentraciones nominales (n = 4).

CN	CA (5 g/L)	V (%)	CA (10 g/L)	V (%)	CA (25 g/L)	V (%)
0.00	< 0.01 ^a	0.00	< 0.01 ^b	0.00	< 0.01 ^c	0.00
0.10	0.09 \pm 0.00	-8.00 \pm 1.00	0.10 \pm 0.00	-2.50 \pm 3.63	0.10 \pm 0.00	-3.68 \pm 3.32
0.25	0.23 \pm 0.01	-7.50 \pm 1.74	0.25 \pm 0.01	0.93 \pm 5.27	0.25 \pm 0.01	-1.35 \pm 2.66
0.50	0.46 \pm 0.05	-7.98 \pm 0.30	0.52 \pm 0.01	4.12 \pm 1.28	0.47 \pm 0.01	-5.75 \pm 2.25
1.00	1.03 \pm 0.05	1.52 \pm 0.90	1.08 \pm 0.01	7.91 \pm 1.37	1.06 \pm 0.04	5.50 \pm 3.50
2.00	1.88 \pm 0.04	-5.96 \pm 1.75	2.10 \pm 0.04	4.97 \pm 1.92	2.11 \pm 0.04	5.30 \pm 1.80
4.00	3.71 \pm 0.03	-7.26 \pm 0.74	4.24 \pm 0.08	5.88 \pm 1.88	4.23 \pm 0.03	5.75 \pm 0.75
8.00	7.91 \pm -0.83	7.75 \pm 2.13	8.44 \pm 0.17	5.48 \pm 2.10	8.55 \pm 0.06	6.84 \pm 0.79

CN, concentración nominal; CA, concentración analítica; 1.2 \pm 0.1 $\mu\text{g/L}$ ^a; 1.8 \pm 0.2 $\mu\text{g/L}$ ^b; 2.4 \pm 0.7 $\mu\text{g/L}$ ^c.

Los resultados de mortalidad registrados durante el experimento preliminar de Hg realizado a 25 g/L de salinidad durante 72 h de exposición se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) del experimento preliminar con Hg (mg/L) a 25 g/L de salinidad (n = 20).

Tiempo (h)	Concentraciones de prueba (mg/L)				
	(control) 0.0	0.5	2.0	4.0	8.0
24	0 \pm 0	10 \pm 0	10 \pm 0	30 \pm 10	70 \pm 10
48	0 \pm 0	10 \pm 0	20 \pm 0	40 \pm 10	100 \pm 0
72	0 \pm 0	35 \pm 10	40 \pm 10	70 \pm 0	100 \pm 0

Se observó que los juveniles de *L. vannamei* ensayados presentaron una mortalidad del 70% después de 24 h de exposición a la concentración de Hg más alta, aunque al transcurrir las 48 h de exposición, la respuesta letal observada en dicho tratamiento fue del 100%. Al final del

bioensayo, las mortalidades registradas en las concentraciones de prueba con 0.5, 2.0 y 4.0 mg/L Hg disuelto en agua fueron 35, 40 y 70%, respectivamente. A partir de estos resultados fueron elegidas las concentraciones de prueba empleadas en los experimentos de toxicidad aguda de Hg con diferentes salinidades, tal y como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de Hg en 5 g/L de salinidad (n = 30).

Tiempo (h)	Concentraciones de prueba (mg/L)							
	Control (0.0)	0.10	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
24	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 4.7	3.3 \pm 4.7	16.7 \pm 9.4	23.3 \pm 4.7	50.0 \pm 8.2	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
48	0.0 \pm 0.0	13.3 \pm 4.7	13.3 \pm 12.5	16.7 \pm 9.4	26.7 \pm 9.4	76.7 \pm 9.4	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
72	0.0 \pm 0.0	16.7 \pm 4.7	26.6 \pm 9.4	30.0 \pm 8.2	30.0 \pm 8.2	76.7 \pm 9.4	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
96	0.0 \pm 0.0	20.0 \pm 8.2	40.0 \pm 14.1	46.7 \pm 9.4	50.0 \pm 0.0	80.0 \pm 14.1	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

En la prueba de toxicidad aguda practicada a 5 g/L de salinidad (Tabla 13) se obtuvo el 100% de mortalidad en las concentraciones con 4.0 y 8.0 mg/L Hg a las 24 h. En lo que respecta a los niveles de 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 y 2.00 mg/L Hg, las mortalidades registradas al concluir el experimento fueron de 20.0, 40.0, 46.7, 50.0 y 80.0%, respectivamente.

Las CL₅₀ calculadas desde la prueba de Hg con 5 g/L de salinidad y sus respectivos límites de confianza se ilustran en la Tabla 14. Dicha tabla muestra que los valores de las CL₅₀ se mantuvieron dentro de 1.7 y 0.5 mg/L en un periodo de tiempo de 24 a 96 h. Asimismo, se observa que los valores fueron disminuyendo debido al incremento en el tiempo de exposición, encontrándose diferencias significativas entre los valores calculados para las 24 con 72 h. En este sentido se puede concluir que la susceptibilidad al Hg de juveniles de *L. vannamei* en 5 g/L de salinidad incrementó significativamente en las primeras 72 h, y un efecto similar pudo observarse a las 96 h; por lo tanto, se puede inferir que la mitad de una población de *L. vannamei* no podría mantenerse con vida de ser expuesta a un ambiente con 0.5 mg/L Hg durante 96 h.

Tabla 14. Concentraciones letales medias promedio (CL_{50}) y límites de confianza (95%) \pm desviación estándar de Hg (mg/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 5 g/L de salinidad ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tiempo (h)	CL_{50}	Límite inferior	Límite superior
24	1.7 ± 0.3^c	1.2 ± 0.3	2.3 ± 0.2
48	1.2 ± 0.2^{bc}	0.9 ± 0.4	1.7 ± 0.2
72	0.9 ± 0.2^b	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.3
96	0.5 ± 0.1^a	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.2

La dosis-respuesta (concentración-mortalidad) observada para los diferentes niveles de Hg ensayados en la prueba de toxicidad aguda con 10 g/L de salinidad es presentada en la Tabla 15, en la cual se observa que el 100% de mortalidad se presentó en el tratamiento con 8.00 mg/L de Hg a las 24 h de exposición. No obstante, a las 96 h de haber iniciado la prueba, las mortalidades registradas en los tratamientos con 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 y 2.00 fueron 16.7, 26.7, 36.7, 40.7 y 66.7%, respectivamente.

Tabla 15. Mortalidad promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de Hg en 10 g/L de salinidad ($n = 30$).

Tiempo (h)	Concentraciones de prueba (mg/L)							
	Control (0.00)	0.10	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
24	0.0 ± 0.0	3.3 ± 4.7	3.3 ± 4.7	13.3 ± 4.7	16.7 ± 12.5	40.0 ± 16.3	76.7 ± 4.7	100.0 ± 0.0
48	0.0 ± 0.0	3.3 ± 4.7	13.3 ± 4.7	13.3 ± 4.7	20.0 ± 8.2	53.3 ± 9.4	90.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
72	0.0 ± 0.0	13.3 ± 4.7	20.0 ± 8.2	20.0 ± 8.2	26.7 ± 9.4	63.3 ± 9.4	93.3 ± 4.7	100.0 ± 0.0
96	0.0 ± 0.0	16.7 ± 4.7	26.7 ± 12.5	36.7 ± 6.5	40.7 ± 3.3	66.7 ± 4.7	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

Los valores de CL_{50} con sus respectivos límites de confianza para diferentes tiempos de exposición que se observan en la Tabla 16, pertenecen al experimento de toxicidad aguda realizado con 10 g/L de salinidad. Estos valores oscilaron entre 0.8 y 2.2 mg/L Hg, aumentando su toxicidad de forma significativa de las 24 a las 72 h y de las 72 a 96 h de exposición. Con base en lo anterior, se infiere que existe el 95% de probabilidad de que la mitad de una población de camarones juveniles *L. vannamei* sufriría efectos letales si fuera sometida a 2.2 mg/L Hg en 24 h,

y que serían suficientes 0.8 mg/L Hg para que se presentase un efecto similar en un periodo de 96 h.

Tabla 16. Concentraciones letales medias promedio (CL₅₀) y límites de confianza (95%) ± desviación estándar de Hg (mg/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 10 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	CL ₅₀	Límite inferior	Límite superior
24	2.2 ± 0.5 ^c	1.8 ± 0.6	2.6 ± 0.5
48	1.7 ± 0.2 ^c	1.3 ± 0.2	2.3 ± 0.3
72	1.3 ± 0.2 ^b	0.8 ± 0.4	1.9 ± 0.1
96	0.8 ± 0.3 ^a	0.5 ± 0.2	1.3 ± 0.4

De los siete grupos de camarones juveniles expuestos a diferentes niveles de Hg en la prueba de toxicidad aguda desarrollada a 25 g/L de salinidad, los organismos que murieron en su totalidad fueron aquellos sometidos a 8.0 mg/L de Hg (72 h) (Tabla 17); mientras que en las concentraciones con 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 4.00 mg/L Hg los porcentajes de mortalidad fueron de 10.0, 20.0, 20.0, 26.7, 56.7 y 80.0%, respectivamente.

Tabla 17. Mortalidad promedio ± desviación estándar (%) de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de Hg en 25 g/L de salinidad (n = 30).

Tiempo (h)	Concentraciones de prueba (mg/L)							
	Control (0.00)	0.10	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
24	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 4.7	3.3 ± 4.7	3.3 ± 4.7	6.7 ± 4.7	20.0 ± 0.0	56.7 ± 4.7
48	0.0 ± 0.0	3.3 ± 4.7	3.3 ± 4.7	10.0 ± 8.2	13.3 ± 4.7	23.3 ± 9.4	26.7 ± 4.7	70.0 ± 8.2
72	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10.0 ± 8.1	16.6 ± 9.4	26.7 ± 4.7	56.7 ± 20.5	70.0 ± 8.2	100.0 ± 0.0
96	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	20.0 ± 8.1	20.0 ± 8.2	26.7 ± 4.7	56.7 ± 20.5	80.0 ± 8.2	100.0 ± 0.0

Las CL₅₀ de Hg estimadas a las 24 y 96 h de exposición para la prueba de 25 g/L de salinidad se mantuvieron en el orden de 7.0 y 1.5 mg/L (Tabla 18). En este caso, la toxicidad aguda del Hg incrementó de forma significativa de las 24 a las 48 h, y posteriormente a las 96 h de exposición. Lo anterior quiere decir que efectos letales del 50% serían observados en una población de camarones al ser sometida por 4 días a 1.5 mg/L Hg en 25 g/L de salinidad.

Tabla 18. Concentraciones letales medias promedio (CL_{50}) y límites de confianza (95%) \pm desviación estándar de Hg (mg/L) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 25 g/L de salinidad (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tiempo (h)	CL_{50}	Límite inferior	Límite superior
24	7.0 ± 0.3^c	6.1 ± 0.5	7.7 ± 0.5
48	5.7 ± 0.6^b	4.7 ± 0.7	6.2 ± 2.2
72	1.7 ± 0.3^a	1.3 ± 0.1	2.2 ± 0.7
96	1.5 ± 0.2^a	1.0 ± 0.2	2.0 ± 0.8

El comportamiento de las CL_{50} de Hg estimadas para los tres niveles de salinidad a lo largo de 96 h se muestra en la Figura 11. Diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los valores estimados para la salinidad de 25 g/L en relación a los valores determinados para 5 y 10 g/L a las 24 y 48 h de exposición fueron observadas, las cuales disminuyeron conforme transcurrió el tiempo de exposición, ya que a las 72 h, dichas diferencias estadísticas entre los valores dados para las salinidades de 5 y 10 g/L dejaron de ser significativas, y después de 96 h de exposición, se determinó que la CL_{50} calculada para la salinidad de 25 g/L fue estadísticamente más alta a la determinada para 5 g/L de salinidad.

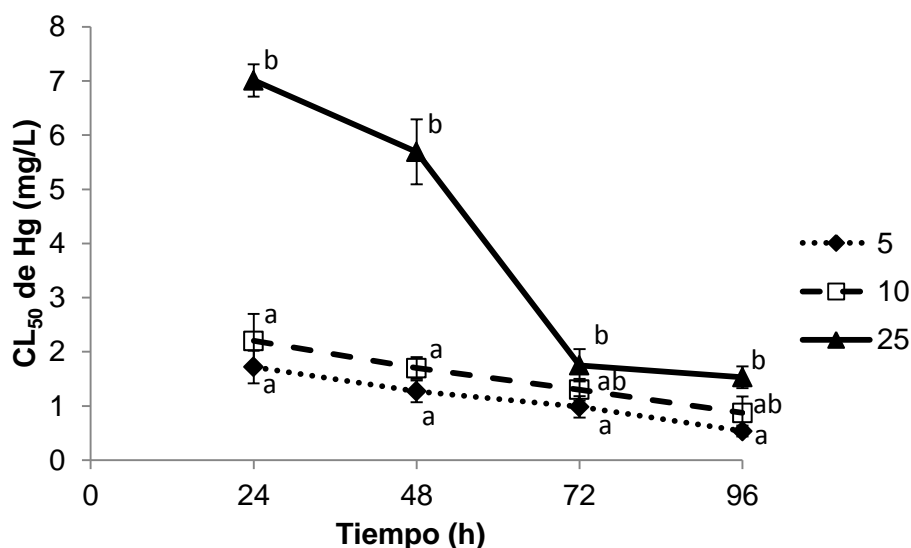


Figura 11. Concentraciones letales medias e intervalos de confianza (barras) de mercurio en juveniles (8.4 ± 0.7 g) de *L. vannamei* calculadas para los tres niveles de salinidad (g/L) en intervalos de 24 h durante 96 h (n = 3). Letras distintas indican diferencias significativas entre valores de diferentes salinidades pero mismo tiempo de exposición ($P < 0.05$).

Lo anterior demuestra que la tolerancia de juveniles (8.4 ± 0.7 g) de *L. vannamei* al Hg no solo es afectada por el tiempo de exposición sino también por la salinidad, siendo este elemento más tóxico en ambientes con menor salinidad, aunque para observar un efecto significativo de dicha variable sobre la toxicidad aguda de este metal a las 96 h, los camarones tendrían que estar expuestos en salinidades con diferencias entre ellas mayores que 5 g/L; sin embargo, es importante señalar que esto se está demostrando para un intervalo de salinidad de 5 a 25 g/L.

En lo que se refiere al análisis de bioconcentración de Hg en el cuerpo completo de los juveniles de *L. vannamei*, los organismos que sobrevivieron a las pruebas de toxicidad aguda (después de 96 h de exposición a los tratamientos con Hg) con diferentes salinidades fueron analizados para el desarrollo de dicho análisis. Es por esto que en la Tabla 19 se muestra el número de organismos analizados por réplica en las en las distintas pruebas de toxicidad aguda con Hg desarrolladas.

Tabla 19. Número de camarones (*L. vannamei*) sobrevivientes por réplica (R1, R2, y R3) correspondientes a cada nivel de mercurio disuelto en el agua (mg/L) ensayado en las pruebas de toxicidad aguda con diferentes salinidades.

Nivel Hg	5 g/L			10 g/L			25 g/L		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0.00	10	10	10	10	10	10	10	10	10
0.10	8	9	7	9	8	8	9	9	9
0.25	4	7	7	6	7	9	8	9	7
0.50	6	4	6	4	7	8	8	7	9
1.00	5	5	5	6	6	6	7	8	7
2.00	3	0	3	3	4	3	2	4	7
4.00	0	0	0	0	0	0	3	2	1
8.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los resultados del análisis de bioconcentración de Hg de los juveniles de *L. vannamei* se muestran en la Figura 12. Dicho análisis permitió evidenciar una relación positiva entre la bioconcentración de Hg en el agua y la bioconcentración de Hg en los organismos después de 96 h de exposición en las tres salinidades ensayadas; sin embargo, esta relación positiva fue

significativa para 5 g/L de salinidad, entre los tratamientos control, 0.10, 0.25, 0.50 y 2.00 mg/L Hg; para 10 g/L de salinidad, entre el control, 0.10, 0.25 y 2.00 mg/L de Hg; y para 25 g/L de salinidad, entre el control, 0.10, 0.50 y 4.00 mg/L de Hg.

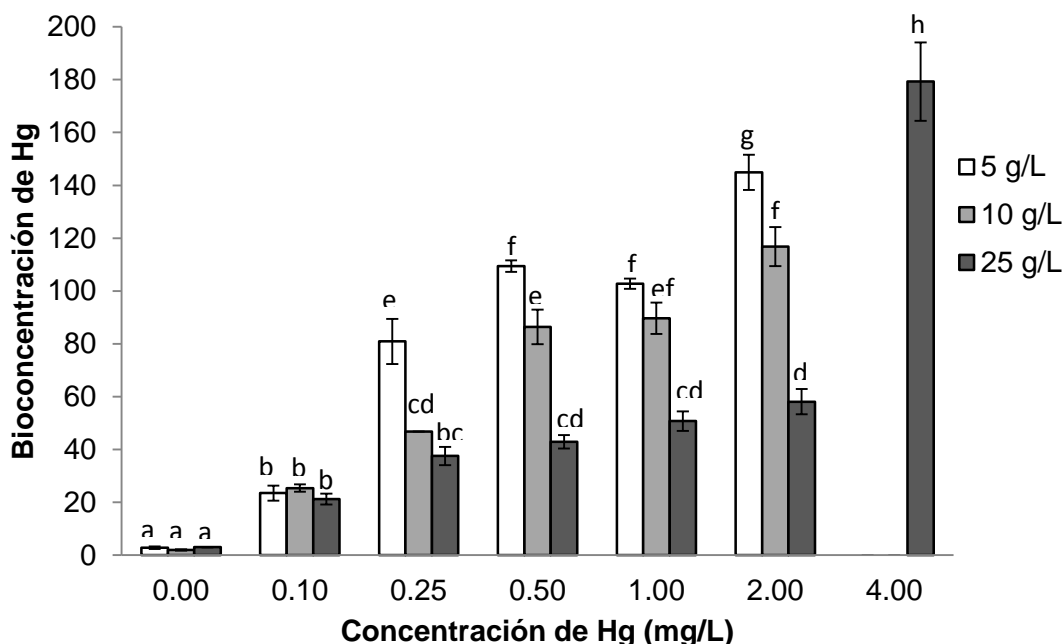


Figura 12. Bioconcentración de mercurio (mg/kg en peso seco) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades y concentraciones de mercurio disuelto en el agua después de 96 h. Los datos se muestran como promedios \pm desviación estándar ($n = 3$). Distintas letras entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Por otra parte, al comparar los valores de bioconcentración de Hg dados para un mismo tratamiento pero en distintas salinidades, diferencias significativas fueron observadas en el tratamiento con 0.25 mg/L de Hg, donde la bioconcentración de Hg en los camarones fue significativamente más alta en la salinidad de 5 g/L que la determinada en 10 y 25 g/L de salinidad. Resultados semejantes se presentaron en el tratamiento con 0.50 mg/L de Hg, puesto que la bioconcentración de Hg en los organismos resultó ser estadísticamente más alta en la salinidad de 5 g/L que la presentada en 10 g/L de salinidad, que a su vez, fue significativamente más alta que la bioconcentración de Hg registrada para la salinidad de 25 g/L. En el tratamiento con 1.00 mg/L de Hg en el agua se observaron resultados comparables, donde la bioconcentración de Hg determinada en los organismos expuestos a 5 y 10 g/L de salinidad fue significativamente superior a la presentada en los camarones sometidos a 25 g/L de salinidad.

En lo que respecta al tratamiento con 2.00 mg/L de Hg en el agua, se calcularon diferencias estadísticas entre la bioconcentración de Hg para cada salinidad, siendo más altos los valores determinados para las salinidades más bajas. Referente al tratamiento con 4.00 mg/L de Hg en el agua, solo se cuenta con la bioconcentración de Hg determinada en los organismos sometidos a la salinidad de 25 g/L, debido a que fue el único ambiente en el que los organismos lograron sobrevivir a dicho tratamiento. El análisis estadístico (ANOVA – 2 vías) demostró una interacción significativa de la concentración de Hg disuelto en el agua y la salinidad sobre la bioconcentración de Hg en los camarones.

Enseguida se muestran los factores de bioconcentración (FBCs) calculados en los organismos expuestos a las diferentes concentraciones de Hg disuelto en el agua después de 96 h de exposición, mismos que oscilaron desde 29 ± 1 hasta 312 ± 36 , los cuales fueron estimados para los tratamientos de 2.00 mg/L de Hg en 25 g/L de salinidad y 0.25 mg/L de Hg en 5 g/L de salinidad, respectivamente (Figura 13).

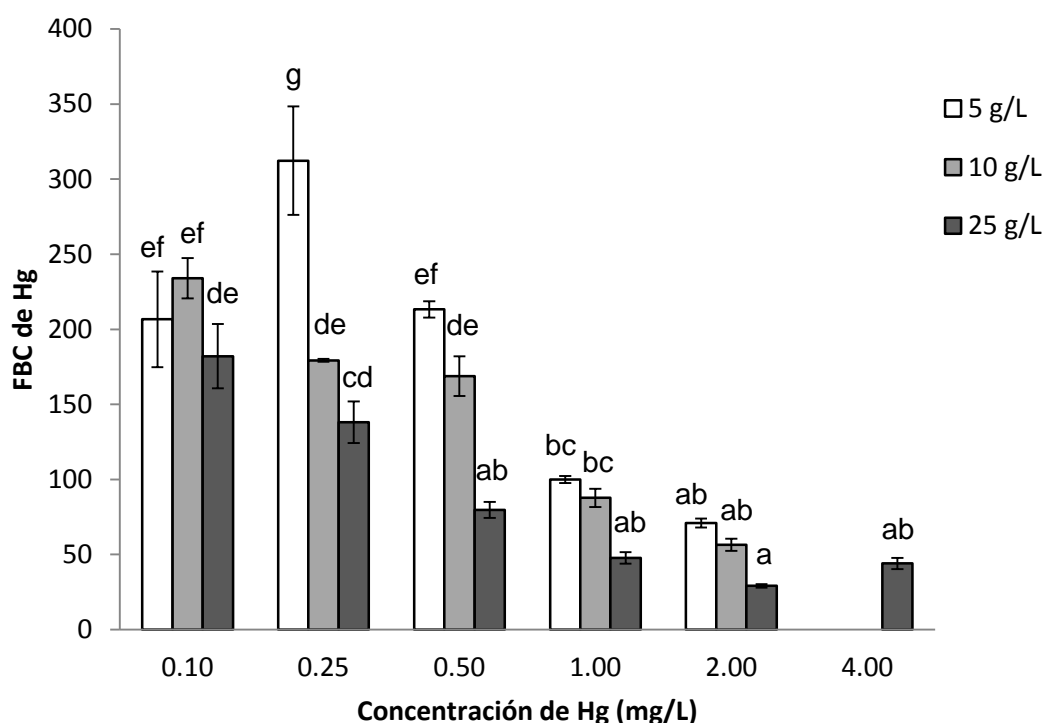


Figura 13. Factor de bioconcentración (FBC) de mercurio (mg/kg en peso seco) en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 96 h a diferentes salinidades y concentraciones de mercurio disuelto en el agua. Los datos se muestran como promedios y desviaciones estándar ($n = 3$). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Al comparar los FBCs calculados para la salinidad de 5 g/L, es evidente que el valor dado para el tratamiento con 0.25 mg/L Hg fue significativamente más alto que el estimado para 0.10 mg/L de Hg (*i.e.* un incremento del 51%). Sin embargo, a partir del tratamiento con 0.25 mg/L de Hg, se puede observar una relación negativa entre los FBCs y la concentración del metal disuelto en el agua, aunque dicha relación negativa fue significativa entre los FBCs calculados para 0.25, 0.50 y 1.00 mg/L de Hg. La misma tendencia a la baja entre los FBCs de Hg y la concentración del metal en el agua es demostrada para 10 y 25 g/L de salinidad. En el caso de la salinidad de 10 g/L, el FBC estimado para 0.10 mg/L de Hg fue significativamente superior al calculado para 1.00 y 2.00 mg/L de Hg; mientras que en la salinidad de 25 g/L, el FBC determinado para 0.10 mg/L de Hg fue estadísticamente más alto ($P < 0.05$) que los calculados para 0.50, 1.00, 2.00 y 4.00 mg/L de Hg.

En lo que se refiere a las comparaciones entre FBCs dados para un mismo tratamiento de Hg, pero a distintas salinidades, en los tratamiento con 0.10, 1.00 y 2.00 mg/L de Hg no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las tres salinidades; sin embargo, en el tratamiento con 0.25 mg/L de Hg, el FBC correspondiente a la salinidad de 5 g/L resultó ser significativamente mayor a los determinados en las salinidades de 10 y 25 g/L. En el caso de tratamiento con 0.50 mg/L de Hg, los FBCs estimados para 5 y 10 g/L de salinidad fueron estadísticamente superiores que el FBC determinado para 25 g/L de salinidad. El análisis estadístico (ANAVA-2 vías) también demostró una interacción significativa de la concentración de Hg disuelto en el agua y la salinidad sobre los FsBC de Hg determinados para los juveniles de *L. vannamei* examinados.

7.3. Pruebas de toxicidad subletal de arsénico

7.3.1. Dosis letal media de *V. parahaemolyticus* de *L. vannamei* (juveniles) aclimatados para la prueba subletal con arsénico

Durante la prueba de toxicidad aguda de *V. parahaemolyticus* realizada en camarones *L. vannamei* con un peso promedio de 9.1 ± 0.8 g aclimatados a 25 g/L de salinidad, se mantuvo una temperatura de 27.2 ± 0.7 °C y una concentración de oxígeno disuelto de 4.9 ± 0.5 mg/L y pH de 7.8 ± 0.1 . La mortalidad acumulada promedio \pm desviación estándar observada a las 48 h en los grupos de organismos expuestos a 0.0 (control), 0.6×10^5 , 1.2×10^5 , 1.8×10^5 , 3.0×10^5 y

6.0×10^5 UFC/g de camarón fue 0.0 ± 0.0 , 13.3 ± 4.7 , 13.3 ± 4.7 , 23.3 ± 4.7 , 43.3 ± 4.7 y $76.6 \pm 12.4\%$, respectivamente.

Con base en lo anterior, la DL_{50-48} h promedio \pm desviación estándar calculada para los organismos ensayados fue de $3.3 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$ UFC/g de camarón; dicho valor fue utilizado posteriormente para el desarrollo de la prueba reto con los organismos sobrevivientes al experimento subletal de As.

7.3.2. Toxicidad subletal del arsénico sobre la oxihemocianina, conteo total de hemocitos y bioacumulación en músculo de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades

El experimento de toxicidad subletal de As se desarrolló a 5 y 25 g/L de salinidad simultáneamente con juveniles de *L. vannamei* con un peso promedio de 9.3 ± 1.1 g. Durante el bioensayo se registraron condiciones fisicoquímicas relativamente estables (*i.e.*, 26.1 ± 0.3 °C de temperatura; 4.3 mg/L de oxígeno disuelto y 7.6 de pH). Las concentraciones analíticas de As determinadas en las soluciones de prueba (tratamientos) ensayadas para ambas salinidades se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Concentraciones promedio de arsénico \pm desviación estándar ($\mu\text{g/L}$) determinadas en las soluciones de prueba ensayadas de las 0 a 48 h (A) y de las 48 a 96 h (B) en el experimento de toxicidad subletal a diferentes salinidades (n = 6).

CN	CA (5 g/L)	V (%)	CA (25 g/L)	V (%)
A				
0	1.9 ± 0.7	0.0	1.6 ± 0.6	0.0
119	127.9 ± 3.2	7.5 ± 2.7	125.5 ± 4.8	5.8 ± 3.1
1190	1220.2 ± 43.2	3.6 ± 2.2	1216.4 ± 58	4.6 ± 2.7
B				
0	2.6 ± 1.8	0.0	2.8 ± 1.1	0.0
119	118.5 ± 10.6	8.8 ± 1.4	119.1 ± 5.9	4.4 ± 2.2
1190	1224.1 ± 74.2	6.2 ± 2.9	1270 ± 47.3	6.7 ± 4.0

CN, concentración nominal; CA, concentración analítica; V, variación entre la concentración nominal y la analítica.

Dichos resultados demostraron que los niveles de As probados en las primeras 48 h de exposición fueron relativamente cercanos a los niveles de As buscados (Tabla 20, A), ya que la variación calculada entre las concentraciones analíticas y las nominales se mantuvo entre 3.6 y 7.5%; que pudiera considerarse normal y equivalente a la incertidumbre analítica de las determinaciones (Leonard *et al.*, 2011; Valentino-Álvarez *et al.*, 2013). Después de realizado el 60% de recambio de solución de prueba por unidad experimental; es decir, posterior a las 48 h de exposición, esta variación permaneció entre 4.4 y 8.8% (Tabla 20, B), por lo tanto, se puede afirmar que durante todo el experimento se mantuvieron niveles deseables de As disuelto en el agua.

Las concentraciones de As y las salinidades experimentadas no afectaron significativamente ($P > 0.05$) a la mortalidad de los camarones expuestos a los diferentes tratamientos de As probados (Tabla 21), puesto que al final del experimento (después de 96 h de exposición) solo se observó un ($0.7 \pm 1.6\%$) organismo muerto en los tratamientos con 119 $\mu\text{g/L}$ de As a 5 y 25 g/L de salinidad; mientras que en los tratamientos con 1190 $\mu\text{g/L}$ de As se registraron tres (*i.e.*, $2.2 \pm 4.9\%$ de mortalidad) y dos (*i.e.*, $1.5 \pm 3.3\%$ de mortalidad) organismos muertos a 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente. A pesar de esto, es importante señalar que se observó un consumo aparente del 100% del alimento suministrado en todas las unidades experimentales durante las 96 h de exposición.

Tabla 21. Mortalidad acumulada promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de *L. vannamei* registrada a diferentes tiempos de exposición, niveles de arsénico disuelto en agua y salinidades ($n = 135$). No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$).

Tiempo (h)	0 $\mu\text{g/L}$		119 $\mu\text{g/L}$		1190 $\mu\text{g/L}$	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
24	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.7 \pm 1.6	0.7 \pm 1.6	1.5 \pm 3.2	0.7 \pm 1.6
48	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.7 \pm 1.6	0.7 \pm 1.6	1.5 \pm 3.2	0.7 \pm 1.6
96	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.7 \pm 1.6	0.7 \pm 1.6	2.2 \pm 4.9	1.5 \pm 3.3

Con base en los resultados de mortalidad, aunado al consumo de alimento observado, se puede asumir que los niveles de As probados fueron apropiados para evaluar efectos subletales de este metaloide en juveniles de *L. vannamei*. En este contexto, enseguida se muestran las

concentraciones de oxihemocianina determinadas en los *L. vannamei* juveniles examinados durante la prueba de toxicidad subletal de As realizada a 5 y 25 g/L de salinidad (Tabla 22).

Tabla 22. Concentración de oxihemocianina promedio \pm desviación estándar (mmol/L) determinada en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes tiempos de exposición, niveles de arsénico disuelto en agua y salinidades (n = 6). No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (P > 0.05).

Tiempo (h)	0 $\mu\text{g/L}$		119 $\mu\text{g/L}$		1190 $\mu\text{g/L}$	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
24	1.29 \pm 0.21	1.43 \pm 0.10	1.31 \pm 0.16	1.33 \pm 0.04	1.33 \pm 0.24	1.40 \pm 0.15
48	1.27 \pm 0.16	1.49 \pm 0.05	1.32 \pm 0.12	1.29 \pm 0.09	1.32 \pm 0.32	1.40 \pm 0.18
96	1.39 \pm 0.25	1.43 \pm 0.17	1.39 \pm 0.15	1.31 \pm 0.15	1.31 \pm 0.09	1.37 \pm 0.18

Las concentraciones de oxihemocianina variaron entre 1.27 y 1.49 mmol/L, las cuales fueron determinadas a las 48 h de exposición en el tratamiento control en 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente. El análisis estadístico (ANOVA-3 vías) demostró que el tiempo de exposición, salinidad y concentración de As disuelto en el agua no afectaron significativamente (P < 0.05) a la concentración de oxihemocianina, puesto que no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos. Los resultados del CTH en los *L. vannamei* juveniles expuestos a la prueba subletal de As desarrollada a 5 y 25 g/L de salinidad se observan en la Tabla 23.

Tabla 23. Conteo total de hemocitos promedio \pm desviación estándar (10^6 células/mL) de juveniles de *L. vannamei* registrado a diferentes tiempos de exposición, niveles de arsénico disuelto en agua y salinidades (n = 6). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	0 $\mu\text{g/L}$		119 $\mu\text{g/L}$		1190 $\mu\text{g/L}$	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
24	13.17 \pm 2.33 ^{bc}	9.62 \pm 0.59 ^{abc}	9.90 \pm 2.21 ^{abc}	7.65 \pm 2.65 ^{ab}	9.26 \pm 2.37 ^{abc}	6.19 \pm 1.85 ^a
48	13.70 \pm 4.33 ^{bc}	12.07 \pm 5.20 ^{abc}	14.57 \pm 2.08 ^c	12.26 \pm 3.22 ^{abc}	13.04 \pm 0.73 ^{bc}	13.61 \pm 3.14 ^{bc}
96	13.44 \pm 1.02 ^{bc}	10.27 \pm 3.33 ^{abc}	7.60 \pm 1.78 ^{ab}	9.93 \pm 2.68 ^{abc}	9.35 \pm 2.12 ^{abc}	11.30 \pm 2.33 ^{abc}

Las concentraciones de hemocitos totales se mantuvieron en un intervalo de 6.19 a 14.57 $\times 10^6$ células/mL, valores que fueron determinados a las 24 h de exposición en el tratamiento con

1190 µg/L de As en 25 g/L de salinidad, y a las 48 h de exposición en el tratamiento con 119 µg/L en 5 g/L de salinidad, respectivamente. Las concentraciones de hemocitos observadas a las 24 h, 119 µg/L de As en 25 g/L de salinidad (7.65); 24 h, 1190 µg/L de As en 25 g/L de salinidad (6.19); 96 h, 119 µg/L de As en 5 g/L de salinidad (7.60) fueron significativamente más bajas ($P < 0.05$) que la concentración de hemocitos estimada a las 48 h, 119 µg/L de As en 5 g/L de salinidad.

El tiempo de exposición fue un factor que afectó a la concentración de hemocitos, dado que un incremento significativo en dicha variable fue observado en las primeras 48 h de exposición en el tratamiento con 1190 µg/L de As en 25 g/L de salinidad, aunque dicho incremento dejó de ser significativo a las 96 h de exposición. La concentración de As disuelto en el agua y la salinidad no afectaron estadísticamente al CTH. No se observaron interacciones significativas entre los factores tiempo de exposición, concentración de As disuelto en el agua y salinidad.

Los resultados de bioacumulación de As en el músculo de los *L. vannamei* (juveniles) sometidos a la prueba subletal de As desarrollada a 5 y 25 g/L de salinidad se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24. Bioacumulación de arsénico promedio \pm desviación estándar (µg/g en peso seco) en músculo de juveniles de *L. vannamei* determinada a diferentes tiempos de exposición, niveles de arsénico disuelto en agua y salinidades ($n = 3$). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tiempo (h)	0 µg/L		119 µg/L		1190 µg/L	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
24	1.06 \pm 0.18 ^a	1.54 \pm 0.11 ^a	7.44 \pm 0.44 ^b	7.39 \pm 1.18 ^b	6.28 \pm 0.67 ^b	6.39 \pm 0.43 ^b
48	2.17 \pm 0.28 ^a	1.36 \pm 0.11 ^a	7.87 \pm 1.21 ^b	6.29 \pm 0.84 ^b	7.32 \pm 1.59 ^b	6.47 \pm 0.16 ^b
96	1.71 \pm 0.16 ^a	1.44 \pm 0.02 ^a	6.23 \pm 0.33 ^b	5.35 \pm 0.26 ^b	7.31 \pm 0.31 ^b	6.14 \pm 1.03 ^b

Dichos resultados oscilaron entre 1.06 y 7.87 µg/g p.s., los cuales se determinaron a las 24 h, 0 µg/L de As (control) en 5 g/L de salinidad; y a las 48 h, 119 µg/L de As en 5 g/L de salinidad, respectivamente. Las concentraciones de bioacumulación de As en músculo obtenidas en los tres tratamientos fueron estadísticamente comparables a las 24, 48 y 96 h de exposición, por lo tanto, se puede inferir que el tiempo de exposición no afectó significativamente a dicha variable. Sin embargo, la concentración de As disuelto en el agua afectó claramente a la bioacumulación de As en el músculo de los camarones examinados, dado que en los

tratamientos con As disuelto en el agua se determinaron valores significativamente más altos que en el tratamiento control; aunque no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos con 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As disuelto en el agua. En lo que se refiere a la salinidad, esta no demostró afectar significativamente a la bioacumulación del As en el músculo de los organismos. No se observaron interacciones significativas entre los factores tiempo de exposición, concentración de As disuelto en el agua y salinidad.

7.3.3. Toxicidad subletal del arsénico sobre la susceptibilidad de juveniles de *L. vannamei* ante un reto con *V. parahaemolyticus* en diferentes salinidades

Los resultados de mortalidad acumulada a las 48 h de los camarones previamente expuestos 96 h a las concentraciones subletales de As (*i.e.*, 0, 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$) en 5 y 25 g/L de salinidad, y que posteriormente fueron infectados con la bacteria *V. parahaemolyticus* se observan en la Figura 14.

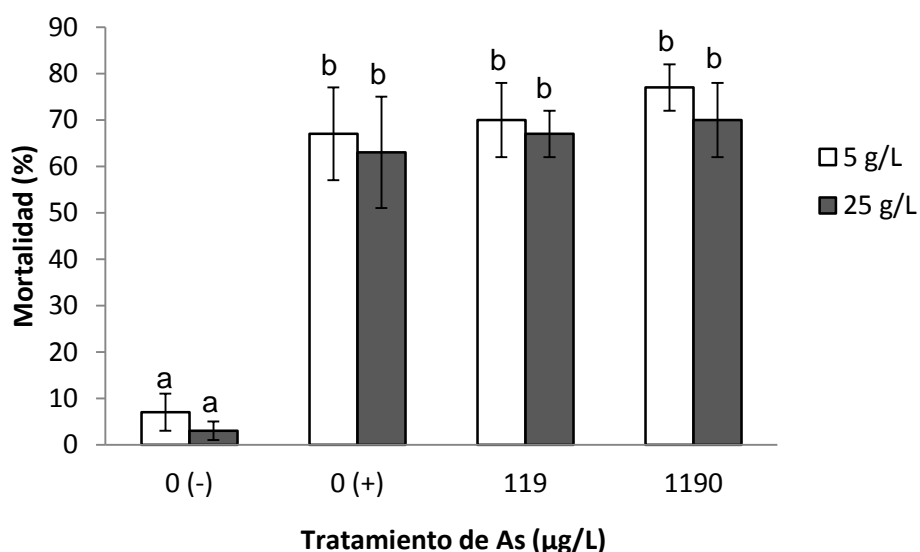


Figura 14. Mortalidad acumulada promedio \pm desviación estándar de juveniles de *L. vannamei* después de 48 h de haber sido infectados con *V. parahaemolyticus* bajo diferentes ambientes de salinidad. El tratamiento 0 (-) (control negativo) se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 0 $\mu\text{g/L}$ de As en agua y posteriormente infectado con solución salina estéril (3% de NaCl); el tratamiento 0 (+) (control positivo) se refiere al grupo de camarones expuestos 96 h a 0 $\mu\text{g/L}$ de As en agua y posteriormente infectado con 3.3×10^5 UFC/g de camarón (DL_{50} -48 h); el tratamiento 119 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 119 $\mu\text{g/L}$ de As en agua y posteriormente infectado con 3.3×10^5 UFC/g de camarón; el tratamiento 1190 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 1190 $\mu\text{g/L}$ de As en agua y posteriormente infectado con 3.3×10^5 UFC/g de camarón. Todos los tratamientos se corrieron por triplicado ($n = 30$) sin

administrar As al agua. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

La mortalidad promedio más baja fue del 3%, registrada en el tratamiento control negativo (0 (-)) en 25 g/L de salinidad, mientras que la mortalidad más alta fue del 77%, observada en el tratamiento con 1190 $\mu\text{g/L}$ de As en 5 g/L de salinidad. De acuerdo al análisis estadístico (ANAVA-dos vías), las mortalidades registradas entre salinidades en los diferentes tratamientos no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$); misma tendencia que se observó al comparar las mortalidades registradas en los camarones del tratamiento control (+), 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As. Esto sugiere que la exposición previa a As y la salinidad no afectaron significativamente a la mortalidad de los camarones. No obstante, las mortalidades observadas en el tratamiento 0 (-) fueron significativamente más bajas a las registradas que en el resto de los tratamientos, lo cual indica que la solución salina estéril inyectada en los organismos ensayados en dicho tratamiento, no provocó efectos letales estadísticamente comparables a los observados en los tratamientos donde se inyectó a los camarones 3.3×10^5 UFC/g de organismo ($DL_{50-48 \text{ h}}$) de *V. parahaemolyticus*. Asimismo, se puede asumir que el daño ocasionado por la inyección no influyó significativamente sobre los resultados de mortalidad del reto bacteriano.

7.3.4. Cálculo de los coeficientes de peligrosidad (HQ) de arsénico en músculo de juveniles de *L. vannamei* expuestos a concentraciones subletales de arsénico en diferentes salinidades

Tomando en cuenta la concentración de As total determinada en el músculo de camarones expuestos 96 h a los diferentes tratamientos con As disuelto en el agua y salinidad, fueron estimadas las concentraciones de As inorgánico (As_i) correspondientes para cada caso de acuerdo a la EFSA (2009) y Olmedo *et al.* (2013); es decir, en el tratamiento control la concentración de As_i fue de 0.014 y 0.012 $\mu\text{g/g}$ en peso húmedo (p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente; en el tratamiento con 119 $\mu\text{g/L}$ de As la concentración de As_i fue de 0.050 y 0.043 $\mu\text{g/g}$ en p.h. para 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente; y en el tratamiento con 1190 $\mu\text{g/L}$ de As la concentración de As_i fue de 0.059 y 0.050 $\mu\text{g/g}$ en p.h. para 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente.

Dichas concentraciones de As_i fueron empleadas para estimar los coeficientes de peligrosidad (HQ) para la salud humana considerando a personas con masas corporales de 10 hasta 100 kg,

con una tasa promedio de ingestión de camarón de 1.37 kg/persona/año (CONAPESCA, 2011), los cuales se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Coeficientes de peligrosidad (HQ) de As calculados considerando las concentraciones promedio de As_i estimadas en el músculo de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de As disuelto en el agua y salinidad.

Peso (kg)	0 µg/L		119 µg/L		1190 µg/L	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
10	0.02	0.01	0.06	0.05	0.07	0.06
20	0.01	0.01	0.03	0.03	0.04	0.03
30	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
40	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02
50	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
60	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
70	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
80	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
90	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
100	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Tomando como dosis de referencia de As 0.0003 mg/kg de peso corporal/día (EPA, 2018), para personas con una masa corporal de 10 hasta 100 kg. No se presentaron valores superiores al valor crítico (HQ ≥ 1).

Los valores de HQ de As calculados para camarones expuestos 96 h a 0, 119 y 1190 µg/L de As en 5 y 25 g/L de salinidad oscilaron entre 0.01 y 0.07; es decir, bajo ningún escenario de toxicidad subletal de As los valores de HQ fueron superiores al valor crítico (HQ ≥ 1), lo cual indica que el consumo aparente de los camarones expuestos a los tratamientos con As evaluados no representa un riesgo para la salud de personas con masas corporales de entre 10 a 100 kg.

7.4. Pruebas de toxicidad subletal de mercurio

7.4.1. Dosis letal media de *V. parahaemolyticus* de los juveniles de *L. vannamei* aclimatados para la prueba subletal con mercurio

La prueba de toxicidad aguda con *V. parahaemolyticus* practicada a 25 g/L de salinidad en juveniles de *L. vannamei* con 6.9 ± 0.5 g de peso promedio, se desarrolló a una temperatura de

26.5 ± 0.2 °C, oxígeno disuelto de 4.5 ± 0.2 mg/L y pH de 7.7 ± 0.1 . La mortalidad acumulada promedio \pm desviación estándar observada a las 48 h en los grupos de organismos expuestos a 0.0 (control), 0.6×10^5 , 1.2×10^5 , 1.8×10^5 , 3.0×10^5 y 6.0×10^5 UFC/g de camarón fue 0.0 ± 0.0 , 13.3 ± 4.7 , 16.7 ± 4.7 , 30.0 ± 8.1 , 60.0 ± 8.1 y $96.7 \pm 4.7\%$, respectivamente.

De acuerdo a lo anterior, la DL_{50-48} h promedio \pm desviación estándar calculada para los organismos ensayados fue de $2.4 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^5$ UFC/g de camarón. Valor de DL_{50} que fue utilizada posteriormente para el desarrollo de la prueba reto con los organismos sobrevivientes al experimento subletal de Hg.

7.4.2. Toxicidad subletal del mercurio sobre la oxihemocianina, conteo total de hemocitos y bioacumulación en músculo de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades

Los experimentos subletales de Hg se realizaron empleando dos niveles de salinidad (5 y 25 g/L) en paralelo, utilizando camarones juveniles de *L. vannamei* con un peso promedio de 7.2 ± 0.6 g. Las variables fisicoquímicas permanecieron relativamente estables durante el experimento; es decir, 26.1 ± 0.4 °C de temperatura, 4.3 ± 0.2 mg/L de oxígeno disuelto y 7.6 ± 0.2 de pH. En cuanto a las concentraciones analíticas de Hg determinadas en las soluciones de prueba (tratamientos) ensayadas para los dos niveles de salinidad, estas se muestran en la Tabla 26.

Los resultados evidenciaron que los niveles analíticos de Hg ensayados en las primeras 48 h de exposición fueron relativamente cercanos a los requeridos para el desarrollo del experimento (Tabla 26, A), puesto que se observó que la variación calculada entre las concentraciones analíticas y las concentraciones nominales oscilaron entre 6.1 ± 2.8 y $7.6 \pm 1.2\%$.

Tabla 26. Concentraciones promedio de mercurio \pm desviación estándar ($\mu\text{g/L}$) determinadas en las soluciones de prueba ensayadas de las 0 a 48 h (A) y de las 48 a 96 h (B) en el experimento de toxicidad subletal a diferentes salinidades (n = 6).

CN	CA (5 g/L)	V (%)	CA (25 g/L)	V (%)
A				
0	0.8 ± 0.3	0.0	0.9 ± 0.2	0.0
15	15.6 ± 1.3	6.9 ± 1.4	15.3 ± 1.0	6.1 ± 2.8
150	154.4 ± 10.6	7.6 ± 1.2	158.4 ± 10.0	8.6 ± 1.5

B				
0	0.6 ± 0.4	0.0	0.8 ± 0.3	0.0
15	16.0 ± 0.4	6.8 ± 0.3	15.6 ± 0.9	6.1 ± 3.0
150	153.2 ± 7.0	4.4 ± 2.5	153.0 ± 9.2	5.6 ± 3.1

CN, concentración nominal; CA, concentración analítica; V, variación entre la concentración nominal y la analítica.

Posterior a la realización del recambio de solución de prueba, que fue del 60% por unidad experimental (después de las 48 h de exposición), dicha variación se mantuvo entre 4.4 ± 2.5 y $6.8 \pm 0.3\%$ (Tabla 26, B). Los relativos bajos porcentajes de variación entre las concentraciones nominales y las analíticas permiten asegurar que los camarones ensayados se mantuvieron bajo condiciones experimentales deseadas.

Los efectos letales sufridos por los juveniles de *L. vannamei* expuestos a los diferentes tratamientos con Hg durante 96 h bajo 5 y 25 g/L de salinidad se observan en la Tabla 27.

Tabla 27. Mortalidad acumulada promedio \pm desviación estándar (%) de juveniles de *L. vannamei* registrada a diferentes tiempos de exposición, niveles de mercurio disuelto en agua y salinidades (n = 135). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	0 $\mu\text{g/L}$		15 $\mu\text{g/L}$		150 $\mu\text{g/L}$	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
24	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	3.8 \pm 2.7 ^b	0.0 \pm 0.0 ^a
48	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	18.4 \pm 3.8 ^c	10.4 \pm 2.7 ^c
96	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	38.4 \pm 3.8 ^d	17.1 \pm 2.0 ^c

Dichos resultados mostraron que la mortalidad acumulada en los camarones expuestos a 0 (tratamiento control) y 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg disuelto en el agua fue del 0% a las 96 h de exposición; mientras que en el mismo tiempo de exposición pero en el tratamiento con 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg disuelto en el agua la mortalidad fue del 38.4 y 17.1% para 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente. En el tratamiento con el mayor nivel de Hg probado, se observó que la mortalidad incrementó significativamente con el tiempo de exposición para ambas salinidades;

asimismo, la concentración de Hg disuelto en el agua influyó significativamente sobre la mortalidad, puesto que a las 48 y 96 h de exposición se observaron mortalidades significativamente más altas en el tratamiento con 150 µg/L de Hg en relación a los tratamientos con 0 y 15 µg/L de Hg.

La salinidad fue un factor que también afectó significativamente a la mortalidad, lo cual se evidenció en el tratamiento con 150 µg/L de Hg a las 24 y 96 h exposición, observándose efectos letales más elevados en la menor salinidad. Es relevante mencionar que se observó un consumo aparente de alimento suministrado del 100% en todas las unidades experimentales de los tratamientos con 0 y 15 µg/L de Hg; mientras que el consumo aparente del alimento suministrado estimado durante las 96 h de exposición en el tratamiento con 150 µg/L de Hg fue del 50 y 70% para 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente.

Los resultados de mortalidad evidenciaron que 15 y 150 µg/L de Hg fueron niveles que permitieron evaluar efecto subletales de Hg en juveniles de *L. vannamei*, y aunque en el tratamiento con el mayor nivel de Hg se obtuvieron efectos letales considerables, el número de organismos que sobrevivió fue suficiente para la determinación de los efectos subletales investigados en el presente estudio. En este contexto, las concentraciones de oxihemocianina determinadas en los juveniles de *L. vannamei* analizados durante la prueba de toxicidad subletal de Hg desarrollada a 5 y 25 g/L de salinidad son presentadas en la Tabla 28.

Tabla 28. Concentración de oxihemocianina promedio \pm desviación estándar (mmol/L) determinada en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes tiempos de exposición, niveles de mercurio disuelto en agua y salinidades (n = 6). Distintas letras entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	0 µg/L		15 µg/L		150 µg/L	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
24	1.39 \pm 0.14 ^{abc}	1.32 \pm 0.09 ^{abc}	1.49 \pm 0.16 ^{bc}	1.20 \pm 0.20 ^{ab}	1.34 \pm 1.19 ^{abc}	1.33 \pm 0.11 ^{abc}
48	1.58 \pm 0.09 ^c	1.50 \pm 0.09 ^{bc}	1.47 \pm 0.10 ^{bc}	1.39 \pm 0.20 ^{abc}	1.21 \pm 0.11 ^{ab}	1.27 \pm 0.18 ^{abc}
96	1.43 \pm 0.16 ^{bc}	1.53 \pm 0.09 ^{bc}	1.48 \pm 0.15 ^{bc}	1.59 \pm 0.14 ^{bc}	1.10 \pm 0.14 ^a	1.09 \pm 0.29 ^{ab}

Dichas concentraciones de oxihemocianina variaron de 1.09 a 1.59 mmol/L, valores que fueron determinados a las 96 h de exposición, tratamiento con 150 µg/L de Hg en 25 g/L de salinidad; y 96 h de exposición, tratamiento con 15 µg/L de Hg en 25 g/L de salinidad respectivamente.

Estos resultados demostraron (Tabla 28) que el tiempo de exposición, como factor individual, no influyó significativamente sobre la concentración de oxihemocianina en los organismos examinados. Sin embargo, la concentración de Hg disuelto en el agua, como factor individual, afectó significativamente a la concentración de oxihemocianina, puesto que a las 48 h de exposición, el valor dado para el tratamiento control en 5 g/L de salinidad fue estadísticamente mayor que el dado para el tratamiento con 150 µg/L de Hg en 5 g/L de salinidad; observándose una tendencia similar a las 96 h de exposición, considerando que la concentración de oxihemocianina observado para el tratamiento control y 15 µg/L de Hg en 5 g/L de salinidad fue estadísticamente más elevado que el valor observado para el tratamiento con 150 µg/L de Hg en 5 g/L de salinidad.

La salinidad, como factor individual, no afectó significativamente a la concentración de oxihemocianina de los camarones examinados; no obstante, el análisis estadístico reveló que se presentaron interacciones significativas entre el tiempo de exposición y concentración de Hg disuelto en el agua; y entre el tiempo de exposición y salinidad. Por otra parte, los resultados del CTH en *L. vannamei* (juveniles) expuestos a la prueba subletal de Hg llevada a cabo a 5 y 25 g/L de salinidad se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Conteo total de hemocitos promedio \pm desviación estándar (10^6 células/mL) de juveniles de *L. vannamei* registrado a diferentes tiempos de exposición, niveles de mercurio disuelto en agua y salinidades (n = 6). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	0 µg/L		15 µg/L		150 µg/L	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
24	16.53 \pm 2.87 ^c	15.33 \pm 1.97 ^c	12.04 \pm 3.55 ^{bc}	11.04 \pm 1.51 ^{bc}	14.26 \pm 2.62 ^c	11.43 \pm 2.66 ^{bc}
48	14.21 \pm 3.56 ^c	12.96 \pm 2.88 ^{bc}	9.99 \pm 3.36 ^{bc}	11.47 \pm 0.87 ^{bc}	12.11 \pm 3.27 ^{bc}	10.26 \pm 2.69 ^{bc}
96	12.51 \pm 1.91 ^{bc}	13.42 \pm 1.68 ^c	7.38 \pm 1.23 ^{ab}	12.50 \pm 4.20 ^{bc}	3.62 \pm 0.74 ^a	7.16 \pm 2.14 ^{ab}

Las concentraciones promedio de hemocitos totales oscilaron entre 3.62 y 16.53 x 10⁶ células/mL, las cuales fueron observadas a las 96 h de exposición, en el tratamiento con 150 µg/L de Hg en 5 g/L de salinidad; y a las 24 h de exposición, 0 µg/L de Hg (control) en 5 g/L de salinidad, respectivamente. Estos resultados demostraron que el tiempo de exposición afectó significativamente al CTH, debido a que en el tratamiento con 150 µg/L de Hg en 5 g/L de salinidad, se observó un decremento significativo en el CTH a las 96 h en relación a las 24 h de exposición.

El incremento en la concentración de Hg disuelto en el agua también provocó un efecto negativo sobre la concentración de hemocitos, particularmente a las 96 h de exposición, debido a que el CTH estimado en el nivel de Hg más elevado fue significativamente menor al observado en el tratamiento control para ambas salinidades. Aunque de manera general se observaron valores de CTH ligeramente menores en la salinidad más baja, el análisis estadístico (ANAVA-3 vías) no evidenció un efecto significativo de la salinidad sobre el CTH. Tampoco se encontraron interacciones significativas entre los factores tiempo de exposición, concentración de Hg y salinidad.

Los resultados de bioacumulación de Hg en el músculo de los juveniles de *L. vannamei* sometidos a la prueba subletal de Hg desarrollada a 5 y 25 g/L de salinidad se presentan en la Tabla 30.

Tabla 30. Bioacumulación de Hg promedio ± desviación estándar (µg/g en peso seco) en músculo de juveniles de *L. vannamei* determinada a diferentes tiempos de exposición, niveles de Hg disuelto en agua y salinidades (n = 3). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tiempo (h)	0 µg/L		15 µg/L		150 µg/L	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
24	0.10 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.60 ± 0.08 ^a	0.85 ± 0.04 ^a	12.39 ± 4.03 ^d	6.12 ± 1.59 ^b
48	0.22 ± 0.11 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.08 ^a	1.03 ± 0.08 ^a	13.36 ± 1.71 ^d	6.57 ± 1.63 ^b
96	0.27 ± 0.04 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	1.41 ± 0.29 ^a	1.62 ± 0.01 ^a	9.52 ± 1.55 ^{cd}	7.20 ± 0.59 ^{bc}

Los niveles de bioacumulación de Hg en músculo de los camarones examinados oscilaron entre 0.10 y 13.36 µg/g, mismos que fueron determinados a las 24 h de exposición, tratamiento con 0

$\mu\text{g/L}$ de Hg disuelto en el agua (control) en 5 g/L de salinidad; y 48 h de exposición, 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg disuelto en el agua en 5 g/L de salinidad, respectivamente. La bioacumulación de Hg en músculo fue estadísticamente comparable a las 24, 48 y 96 h de exposición en todos los tratamientos, lo que indica que el tiempo de exposición no afectó significativamente a dicha variable. Diferencias significativas fueron encontradas entre los resultados de los tratamientos control y 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg con respecto al tratamiento con 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg; lo cual demuestra que la concentración de Hg disuelto en el agua fue un factor que afectó significativamente a la bioacumulación del metal en el músculo de los camarones.

Por su parte, la salinidad también demostró ser un factor que influyó sobre la bioacumulación del metal en el músculo de los camarones, debido a que los valores determinados para el tratamiento con 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg a las 24 y 48 h de exposición fueron significativamente más altos en la salinidad más baja. El análisis estadístico (ANAVA-3 vías) evidenció una interacción significativa entre los factores concentración de Hg disuelto en el agua y salinidad.

7.4.3. Toxicidad subletal del mercurio sobre la susceptibilidad de juveniles de *L. vannamei* ante un reto con *V. parahaemolyticus* en diferentes salinidades

Los resultados de mortalidad acumulada a las 48 h de los camarones *L. vannamei* que sobrevivieron a la prueba subletal de Hg (después de 96 h de exposición), y que posteriormente fueron retados con la bacteria *V. parahaemolyticus* bajo los dos escenarios de salinidad ensayados durante dicha prueba subletal se muestran en la Figura 15.

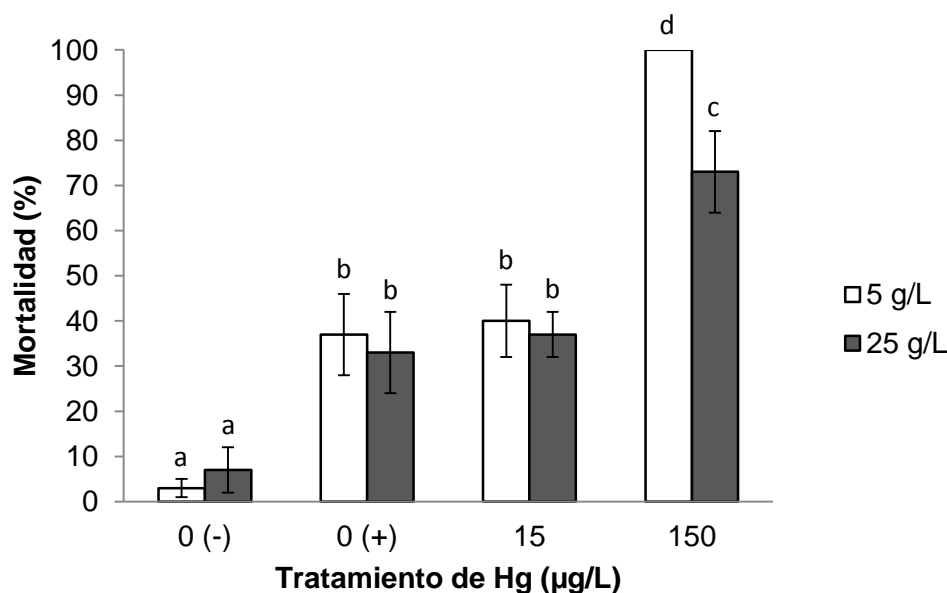


Figura 15. Mortalidad acumulada promedio \pm desviación estándar de juveniles de *L. vannamei* después de 48 h de haber sido infectados con *V. parahaemolyticus* bajo diferentes ambientes de salinidad. El tratamiento 0 (-) (control negativo) se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 0 µg/L de Hg en agua y posteriormente inyectado con solución salina estéril (3% de NaCl); el tratamiento 0 (+) (control positivo) se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 0 µg/L de Hg en agua y posteriormente infectado con 2.4×10^5 UFC/g de camarón (DL_{50} -48 h); el tratamiento 15 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 15 µg/L de Hg en agua y posteriormente infectado con 2.4×10^5 UFC/g de camarón; el tratamiento 150 se refiere al grupo de camarones expuesto 96 h a 150 µg/L de Hg en agua y posteriormente infectado con 2.4×10^5 UFC/g de camarón. Todos los tratamientos se corrieron por triplicado ($n = 3$) sin administrar Hg al agua. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

La mortalidad promedio más baja registrada al final del reto bacteriano fue 3% observada en el tratamiento control negativo (0 (-)) a 5 g/L de salinidad, mientras que la más alta fue 100% encontrada en el tratamiento 150 µg/L de Hg a 5 g/L de salinidad. De acuerdo al análisis estadístico (ANAVA-dos vías), las mortalidades observadas en el tratamiento 0 (-) para 5 y 25 g/L de salinidad fueron significativamente más bajas a las determinadas en el resto de los tratamientos. Asimismo, las mortalidades encontradas en los tratamientos control positivo (0 (+)) y 15 µg/L de Hg para ambas salinidades resultaron ser estadísticamente inferiores ($P < 0.05$) a las observadas a 150 µg/L de Hg. La salinidad también demostró influir significativamente sobre la mortalidad de los camarones del tratamiento 150 µg/L de Hg, puesto que el valor promedio registrado a 5 g/L de salinidad fue estadísticamente más elevado ($P < 0.05$) al

registrado para 25 g/L de salinidad. El análisis estadístico también evidenció una interacción significativa entre el tratamiento de Hg y la salinidad sobre la mortalidad de los organismos retados.

7.4.4. Cálculo de los coeficientes de peligrosidad (HQ) de mercurio en músculo de juveniles de *L. vannamei* expuestos a concentraciones subletales de mercurio en diferente salinidad

De acuerdo a las concentraciones de Hg total determinadas en los músculos de camarones expuestos 96 h a los diferentes tratamientos con Hg disuelto en el agua y salinidad, fueron estimadas las concentraciones de MeHg correspondientes para cada caso de acuerdo a Hoang *et al.* (2017) (*i.e.*, considerando como MeHg el 98.6% de la concentración de Hg total determinado en los camarones analizados); por ejemplo, en el tratamiento control a 5 y 25 g/L de salinidad, la concentración de MeHg fue de 0.06 y 0.051 µg/g en p.h., respectivamente; en el tratamiento con 15 µg/L de Hg a 5 y 25 g/L de salinidad, la concentración de MeHg fue de 0.32 y 0.36 µg/g en p.h., respectivamente; y para el tratamiento con 150 µg/L de Hg a 5 y 25 g/L de salinidad, la concentración de MeHg fue de 2.12 y 1.61 µg/g en p.h., respectivamente.

Cabe señalar que las concentraciones de MeHg antes mencionadas fueron usadas para estimar los coeficientes de peligrosidad para la salud humana, tomando en cuenta a personas con masas corporales de 10 hasta 100 kg, con una tasa promedio de consumo de camarón de 1.37 kg/persona/año (CONAPESCA, 2011), los cuales se muestran a continuación (Tabla 31).

Tabla 31. Coeficientes de peligrosidad (HQ) de Hg calculados considerando las concentraciones promedio de MeHg estimadas para músculo de juveniles de *L. vannamei* s expuestos a diferentes concentraciones de Hg disuelto en el agua y salinidad.

Peso (kg)	0 µg/L		15 µg/L		150 µg/L	
	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L	5 g/L	25 g/L
10	0.23	0.19	1.18	1.36	7.99	6.04
20	0.11	0.10	0.59	0.68	3.99	3.02
30	0.08	0.06	0.39	0.45	2.66	2.01
40	0.06	0.05	0.30	0.34	2.00	1.51
50	0.05	0.04	0.24	0.27	1.60	1.21
60	0.04	0.03	0.20	0.23	1.33	1.01

70	0.03	0.03	0.17	0.19	1.14	0.86
80	0.03	0.02	0.15	0.17	1.00	0.76
90	0.03	0.02	0.13	0.15	0.89	0.67
100	0.02	0.02	0.12	0.14	0.80	0.60

Tomando como dosis de referencia de MeHg 0.0001 mg/kg de peso corporal/día (EPA, 2018), para personas con una masa corporal de 10 hasta 100 kg. Valores en negrita indican alta peligrosidad ($HQ \geq 1$).

Los valores de HQ de Hg determinados en el tratamiento control para ambas salinidades oscilaron entre 0.02 y 0.23, lo cual indica que el consumo aparente de estos camarones no representa un potencial riesgo para la salud humana, debido a que los valores de HQ no fueron superiores al valor crítico ($HQ \geq 1$). Sin embargo, los valores de HQ determinados para los camarones expuestos al tratamiento con 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg variaron de 0.12 a 1.36 para ambas salinidades, sugiriendo que el consumo de dichos camarones representaría un alto riesgo para niños con un peso de 10 kg, mientras que en el caso de personas con pesos igual o mayor que 20 kg, el riesgo por consumir estos camarones puede considerarse bajo.

En lo que se refiere a los camarones previamente expuestos 96 h a 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg en 5 g/L de salinidad, valores de HQ superiores al valor crítico fueron determinados para personas con pesos corporales de 10 a 70 kg; mientras que para los camarones expuestos al mismo tratamiento pero en 25 g/L de salinidad, los valores de HQ superiores al valor crítico se estimaron para personas con pesos corporales de 10 a 60 kg. Esto indica que personas con pesos iguales o mayores que 80 kg estarían en bajo riesgo de sufrir efectos adversos ocasionados por el Hg, en caso de consumir camarones previamente expuestos a 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg en 5 g/L de salinidad; aunque en el caso de los camarones expuestos a la misma concentración de Hg pero en 25 g/L de salinidad, las personas que estarían en bajo riesgo de sufrir efectos adversos por la exposición al Hg serían aquellas con pesos corporales iguales o mayores a 70 kg.

8. DISCUSIÓN

Se ha observado que variables ambientales como la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto pueden tener un efecto considerable en la tolerancia de un organismo acuático a diversos tóxicos, y que su susceptibilidad puede aumentar o disminuir dependiendo de que tanto se aleje la temperatura y la salinidad de su punto isotérmico e isosmótico, respectivamente, y sobre todo de la concentración mínima requerida de oxígeno disuelto (Newman y Unger, 2003).

Por lo anterior, se recomienda ampliamente mantener condiciones ambientales estables cuando se realizan pruebas de toxicidad (McLusky y Hagerman, 1987; Romano y Zeng, 2013). Por esto, es importante señalar que durante los experimentos del presente estudio, la salinidad se mantuvo en los niveles requeridos para cada bioensayo. Tanto el pH (de 7.6 a 8.2), temperatura (de 27.4 a 29.8 °C) y oxígeno disuelto (de 5.8 a 6.5 mg/L) presentaron una variación poco considerable, y por lo tanto, no relevante; particularmente en los experimentos de toxicidad aguda. Tomando en cuenta que los factores de estrés estudiados en el presente trabajo son el As y Hg (como tóxicos), la salinidad y el tiempo de exposición, la siguiente discusión se enfoca particularmente hacia dichos factores.

8.1. Toxicidad aguda

Para poder calcular una CL_{50} (concentración que provoca el 50% de efectos letales en la población expuesta al tóxico en un tiempo determinado) con sus respectivos límites de confianza, es necesario implementar una serie de concentraciones dentro de un intervalo adecuado, el cual permita provocar efectos letales en tres escenarios diferentes; el primero sería que en por lo menos una concentración se observen efectos letales cercanos al 100% de los organismos expuestos; el segundo que en una concentración o más se registre un número de decesos similar al 50% de la población expuesta; y el tercero que se obtengan mortalidades cercanas al 30% o menos (Figura 16); también es importante que no se presente una mortalidad mayor al 10% en el tratamiento control (sin tóxico), ya que la prueba tendría que ser descartada (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013).

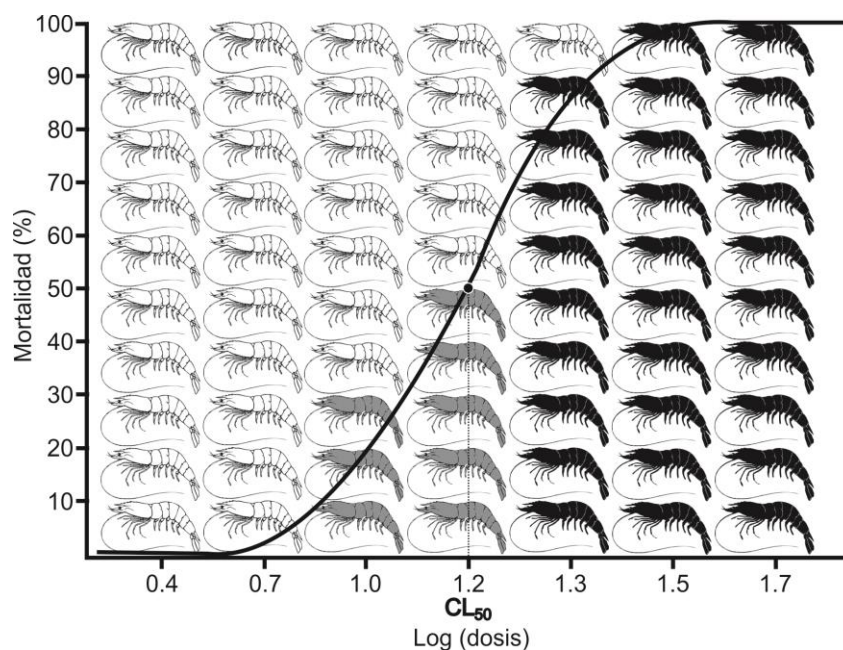


Figura 16. La gráfica que ilustra los escenarios de mortalidad teórica que se obtienen al exponer siete grupos de camarones (10 organismos por grupo) de una misma población al mismo número de concentraciones de un tóxico en un tiempo dado. El primer escenario corresponde a organismos expuestos a las tres concentraciones más altas (camarones muertos con relleno color negro); el segundo está representado por camarones de la tercera y cuarta concentración más baja (camarones muertos con relleno color gris); el tercer escenario está integrado por los organismos de la primera y segunda concentración más baja. Los camarones que sobreviven (sin relleno para los tres escenarios). La curva sigmoideal representa la dosis-respuesta (concentración-mortalidad) de cada grupo de individuos frente al logaritmo de la dosis (modificado de Páez-Osuna, 2011).

Lo anterior permite graficar una curva tipo sigmoideal que posee una zona relativamente lineal en su parte central, misma que es la base de diferentes métodos estadísticos utilizados en la literatura científica para la determinación de CL_{50} , como es el caso de Spearman-Kärber, Litchfield-Wilcoxon, Dixon-Mood, Probit, entre otros (Newman y Unger, 2003). Con base en lo anterior, en el presente estudio se plantearon experimentos preliminares de toxicidad aguda para ambos tóxicos desarrollados a 25 g/L de salinidad, cuyos resultados se muestran en las Tablas 3 (para As) y 12 (para Hg), los cuales evidenciaron los intervalos de concentraciones de prueba apropiados para obtener los tres escenarios de mortalidad necesarios para calcular las CL_{50} de ambos tóxicos en juveniles de *L. vannamei* expuestos a 25 g/L de salinidad.

En cuanto al número de concentraciones de prueba ideal para calcular la CL_{50} de una sustancia en organismos acuáticos, esto depende del tipo de tóxico y el tiempo de exposición que se

pretende investigar (Buikema *et al.*, 1982). Sin embargo, en la literatura científica se pueden encontrar estudios donde han calculado la CL_{50} de metales (Chandurvelan *et al.*, 2017) y metaloides (Li *et al.*, 2008; Valentino-Álvarez *et al.*, 2013) a diferentes tiempos de exposición usando desde cinco hasta nueve concentraciones de prueba, aunque en la mayoría de ellos se han desarrollado con ocho concentraciones. Por esta razón, en el presente trabajo se seleccionaron ocho tratamientos (incluido el control) para la realización de las pruebas de toxicidad aguda considerando los resultados de los experimentos preliminares respectivos para cada tóxico.

Las concentraciones de prueba ensayadas en los experimentos de toxicidad aguda de ambos tóxicos fueron determinadas analíticamente con el objetivo de validar los resultados observados. De acuerdo a Valentino-Álvarez *et al.* (2013) y Chandurvelan *et al.* (2017), los resultados obtenidos en pruebas de toxicidad aguda con metales practicadas en organismos acuáticos, pueden considerarse válidos en caso de ser determinadas variaciones entre las concentraciones nominales (concentraciones requeridas) en relación a las analíticas menores al 10%. Considerando los resultados de las Tablas 2 y 11, se puede observar que las soluciones de prueba ensayadas en los experimentos de toxicidad aguda de ambos tóxicos no presentaron variaciones mayores al 10% en relación a las concentraciones analíticas determinadas en cada tratamiento, por lo que los resultados observados puede considerarse aceptables.

En este contexto, y tomando en cuenta el hecho en que durante las pruebas de toxicidad aguda con ambos tóxicos no se registró ningún organismo muerto en los tratamientos control, se puede asumir que los efectos tóxicos determinados en el presente estudio fueron ocasionados específicamente por el As y Hg administrados en las respectivas unidades experimentales.

8.1.1. Efecto de la baja salinidad sobre la toxicidad aguda y bioconcentración del arsénico en juveniles de *L. vannamei*

El As es un metaloide ampliamente conocido como contaminante en el ambiente acuático, especialmente porque se puede incorporar y concentrarse en los seres vivos afectando su estado fisiológico (Bergés-Tiznado *et al.*, 2013). En el caso de los seres humanos, se estima que alrededor de 200 millones de personas en 70 países consumen agua con niveles elevados de este elemento, representando un importante problema de salud pública debido a su efecto

genotóxico y carcinogénico (Philp, 2013, Bach *et al.*, 2015). La presencia de este elemento en las zonas costeras mexicanas se ha incrementado significativamente (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013), sin embargo la toxicidad de este elemento en organismos acuáticos particularmente en crustáceos ha sido poco investigada (Lobato *et al.*, 2013).

Tres estudios han sido identificados en la literatura disponible (Scopus, 2021) donde se ha investigado la toxicidad del As en crustáceos en tiempos de exposición equivalentes a los del presente estudio (Tabla 32). Donde se encontró que la toxicidad del As en el anfípodo *C. volutator* aumenta significativamente de las 48 a las 96 h en ambientes de 5 a 35 g/L de salinidad (Bryant *et al.*, 1985). Un comportamiento similar fue registrado en *S. serrata* aunque solo a 35 g/L de salinidad (Krishnaja *et al.*, 1987). En el presente estudio, también se observó un incremento significativo en la toxicidad del As en los mismos tiempos de exposición para juveniles de *L. vannamei* a los tres niveles de salinidad investigados. Lo que demuestra que no solo la concentración de As determina su toxicidad sino también el tiempo de exposición.

Tabla 32. CL₅₀ de arsénico (mg/L) para diferentes especies de crustáceos a distintos tiempos de exposición y salinidad. *Datos no disponibles, **juveniles de 40-50 mm de longitud y 60-70 mm de ancho del caparazón.

Especie	Salinidad (g/L)	Estadio de vida o talla	CL ₅₀				Referencia
			24 h	48 h	72 h	96 h	
<i>Corophium volutator</i>	5	*	*	23.0	*	7.5	Bryant <i>et al.</i> (1985)
<i>C. volutator</i>	10	*	*	14.0	*	5.6	Bryant <i>et al.</i> (1985)
<i>C. volutator</i>	15	*	*	20.0	*	7.5	Bryant <i>et al.</i> (1985)
<i>C. volutator</i>	25	*	*	22.0	*	6.0	Bryant <i>et al.</i> (1985)
<i>C. volutator</i>	35	*	*	20.0	*	6.0	Bryant <i>et al.</i> (1985)
<i>Scylla serrata</i>	35	**	33.0	23.0	17.0	17.0	Krishnaja <i>et al.</i> (1987)
<i>L. vannamei</i>	17	1.3 g	*	*	*	7.8	Valentino-Álvarez <i>et al.</i> (2013)
<i>L. vannamei</i>	25	1.3 g	*	*	*	8.5	Valentino-Álvarez <i>et al.</i> (2013)
<i>L. vannamei</i>	35	1.3 g	*	*	*	7.5	Valentino-Álvarez <i>et al.</i> (2013)
<i>L. vannamei</i>	5	8.2 g	30.8	20.2	16.8	13.9	Este estudio
<i>L. vannamei</i>	10	8.2 g	30.4	19.1	16.8	14.8	Este estudio
<i>L. vannamei</i>	25	8.2 g	31.5	19.0	15.0	11.9	Este estudio

Existen estudios realizados en diferentes especies de crustáceos eurihalinos donde se ha demostrado que la salinidad es otro factor importante que influye sobre la toxicidad aguda de elementos pesados como el Cd (Barbieri y Tavares-Paes, 2011), Pb (Doi *et al.*, 2012), Cu (Grosell *et al.*, 2007), B (Li *et al.*, 2008), Zn (Barbieri y Doi, 2011) y Ni (Leonard *et al.*, 2011), siendo estos

elementos significativamente más tóxicos cuando los organismos se encuentran en salinidades más bajas que en su punto isosmótico; por lo tanto, conocer los efectos tóxicos de contaminantes ambientales bajo diferentes condiciones de salinidad es relevante, sobre todo en crustáceos eurihalinos como *L. vannamei*, ya que estos organismos frecuentemente son expuestos a ambientes de salinidad inferiores al ideal (Péqueux, 1995; Grosell *et al.*, 2007).

No obstante, el efecto de la salinidad sobre la toxicidad aguda del As solo ha sido analizado en el anfípodo *C. volutator*, el cual fue expuesto a salinidades de 5 a 35 g/L en intervalos de 5 g/L, concluyendo que la tolerancia de esta especie al As decreció en salinidades más bajas a la ideal (*i.e.*, 30 g/L de salinidad) debido al estrés osmótico (Bryant *et al.*, 1985). Por otra parte, en un estudio realizado en juveniles de *L. vannamei* donde se presentaron las CL₅₀₋₉₆ determinadas a 17 (hipo-osmótico), 25 (isosmótico) y 35 (hiper-osmótico) g/L de salinidad, se concluyó que la sensibilidad de esta especie expuesta a un ambiente hipo-osmótico, así como a un hiper-osmótico fue estadísticamente comparable al observado en un ambiente isosmótico (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013).

Lo anterior coincide con lo observado en el presente estudio, en el cual no se determinó una relación directa entre la salinidad y la susceptibilidad de este elemento, a pesar de que la salinidad más baja ensayada (5 g/L), se encuentra más alejada del punto isosmótico de esta especie (718 mOs/kg o 24.7 g/L que es su equivalente en salinidad, Castille y Lawrence, 1981) que las salinidades examinadas por Valentino-Álvarez *et al.* (2013). Estos resultados sugieren que el As no afecta la capacidad de hyper-osmorregulación de los juveniles de *L. vannamei* bajo las condiciones de salinidad probadas en el presente estudio; además; ello sugiere que esta especie de camarón está mejor adaptada a los ambientes con baja salinidad que *C. volutator*.

Diversos autores han señalado que la edad de los organismos es un factor de gran relevancia a considerar cuando se desea comparar la toxicidad de una sustancia en diferentes especies (Usman *et al.*, 2013; Roos-Muñoz *et al.*, 2018). Esto se ha comprobado en distintos crustáceos decápodos, como por ejemplo en *Farfantepenaeus duorarum*, *Palaemonetes pugio* y *Palaemonetes vulgaris* al ser expuestos a Cd en diferentes estadios de vida, demostrando que las larvas son de 3 a 10 veces más sensibles que los adultos (Nimmo *et al.*, 1977).

En un estudio similar realizado con *L. vannamei*, se observó que postlarvas de 5 días de edad comparadas con juveniles de 9 g fueron 2 veces más sensibles al Cu, debido probablemente a que en estadios tempranos de vida, los organismos no tienen desarrollados sus mecanismos de defensa (Usman *et al.*, 2013); es por esta razón, que al observar los valores de las CL_{50-96} h de As que se muestran en la Tabla 32, los cuales fueron estimados para *L. vannamei* juveniles con 1.3 g (Valentino-Álvarez *et al.*, 2013) y los resultados del presente estudio (organismos con 8.2 g) para el mismo tiempo de exposición, se puede observar que la tolerancia de esta especie al As decrece entre 33.0 y 46.6% en los camarones con menor peso.

Varios estudios han demostrado que cuando los crustáceos han sido expuestos a salinidades más bajas que su punto isosmótico, la capacidad de bioconcentración de algunos elementos pesados se incrementa. Esta situación fue observada para el caso del Cd en *Palaemonetes longirostris* (Pierron *et al.*, 2007) y Ni en *Carcinus maenas* (Blewett *et al.*, 2015); mientras que, para el caso del As Fowler y Ünlü (1978) también encontraron una relación inversa entre la capacidad de bioconcentración del As-74 (As radiomarcado) y la salinidad en juveniles de *Lysmata seticaudata* (1.3 g de peso) cuando ellos fueron expuestos a 16, 26 y 38 g/L de salinidad después de seis días.

Dichos resultados han sido relacionados al incremento en la captación de agua promovida por la exposición al ambiente hipo-osmótico, el cual favorece la difusión de los tóxicos disueltos en las células (Bianchini y Gilles, 1996; Grosell *et al.*, 2007); así mismo, la activación de los mecanismos de osmorregulación (*e.g.* canales, intercambiadores y bombas) incrementan la excreción del exceso de agua, al igual que la captura de los iones mayoritarios (Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , componentes esenciales de los fluidos corporales de los animales marinos) que pueden ser remplazados por elementos tóxicos (Fowler y Ünlü, 1978; Veltman *et al.*, 2008).

En contraste, este estudio demostró que ambientes con baja salinidad (5 y 10 g/L) no afectaron significativamente la capacidad de bioconcentración del As en los juveniles de *L. vannamei* expuestos durante 4 días a las diferentes concentraciones de As examinadas (Figura 9). Por lo tanto, se puede inferir que los mecanismos de osmorregulación de *L. vannamei* fueron suficientemente eficientes como para evitar un potencial incremento en la captación de As inducido por la exposición en ambientes hipo-osmóticos (5 y 10 g/L de salinidad), además del

hecho de que esta especie esta mejor adaptada a los ambientes de baja salinidad en comparación a *L. seticaudata*.

El factor que afectó la bioconcentración de As en *L. vannamei* fue la concentración de As disuelto en el agua (Figura 9), lo cual también explica los resultados de mortalidad (Tablas 4, 6 y 8), debido a que los efectos letales observados durante las pruebas de toxicidad aguda incrementaron a medida que aumentó la captación de As en los camarones (es decir, a mayores concentraciones de As disuelto en el agua), siendo estos efectos letales estadísticamente comparables en los tres niveles de salinidad evaluados. En este sentido, estos resultados soportan lo previamente concluido acerca de que el efecto tóxico del As no incrementa significativamente en función de la salinidad, al menos bajo las condiciones fisicoquímicas y tiempos de exposición probados en este estudio.

El As puede ocurrir en ambientes acuáticos en cuatro estados de oxidación (-3, 0,+3 y +5) en formas orgánicas e inorgánicas; sin embargo, este metaloide es encontrado principalmente en las aguas naturales y agua de mar como oxianiones de arsenito (As^{3+} [principalmente, H_3AsO_3 y H_2AsO_3^-] y arseniato (As^{5+} [principalmente, HAsO_4^{2-} y H_2AsO_4^-]) (Smedley y Kinniburgh, 2002), los cuales representan a las especies químicas más tóxicas para los organismos acuáticos (Mandal y Suzuki, 2002). La especiación química del As está principalmente influenciada por el potencial redox y el pH del agua (Smedley y Kinniburgh, 2002), mientras que la salinidad no tiene un efecto importante sobre la especiación química del As, debido a que cuando este metaloide reacciona en un medio acuoso, las diferentes especies de oxianiones de As formadas tienen poca afinidad para formar complejos adicionales con los componentes mayoritarios del agua de mar (Cullen y Reimer, 1989).

A diferencia del As, los oligo-metales ocurren en soluciones acuosas como cationes libres (*e.g.*, Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}), los cuales tienen afinidad para formar complejos o pares iónicos con los aniones mayoritarios del agua de mar (*i.e.* Cl^- , SO_4^{2-} , F^- , CO_3^{2-}) (Piazza *et al.*, 2016); por esta razón, a mayor nivel de salinidad, los iones metálicos libres decrecen, lo que da lugar a una reducción en la toxicidad del metal disuelto en el agua, debido a que la forma ionizada libre para estos metales es la más tóxica para los organismos acuáticos (Verslycke *et al.*, 2003). Esto explica porque un efecto significativo de la salinidad no fue observado en este estudio sobre la toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración del As en *L. vannamei*,

fenómeno que ha sido reportado para otros elementos pesados en crustáceos mencionados anteriormente.

Los efectos causados por el arsenito y el arseniato en organismos acuáticos a nivel celular han sido investigados por Ventura-Lima *et al.* (2011) y Kumari *et al.* (2017), quienes mencionan que el arsenito puede afectar las funciones y síntesis de enzimas como la glutatión reductasa, tioredoxin reductasa (enzimas fundamentales del sistema antioxidante) y piruvato deshidrogenasa (necesaria para el desarrollo del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs), debido a su alta afinidad para enlazarse con el grupo “tiol” o “sulfhidrilos”. Por su parte, el arseniato puede causar una disrupción de la actividad de la enzima hexoquinasa (importante en el proceso de la glicolisis), lo cual puede inhibir la formación de moléculas de adenosin-5-trifosfato (mecanismo llamado arsenolisis); así mismo, el arseniato puede tomar el lugar del fosfato en las cadenas de ADN causando genotoxicidad (Kumari *et al.*, 2017).

Los efectos asociados al arseniato fueron aquellos que pudieron haber ocasionado la muerte de los camarones probados en este estudio, porque los experimentos fueron desarrollados en una ambiente oxidante (oxígeno disuelto 6.2 ± 0.4 mg/L; Eh 267 ± 24 mV) y en un pH ligeramente básico (7.9 ± 0.4), condiciones fisicoquímicas en las cuales los oxianiones de arseniato predominan (Smedley y Kinniburgh, 2002).

Con respecto a los organismos que sobrevivieron a los diferentes tratamientos de As disuelto en el agua, puede ser inferido basado en el análisis de los FBCs que el As acumulado en los juveniles de *L. vannamei* fue proporcional a la concentración de As disuelto en el agua perteneciente a cada tratamiento para 96 h de exposición, independientemente de la salinidad, debido a que todos los valores de FBC fueron estadísticamente comparables a 1, valor que fue determinado en el tratamiento de 2.5 mg/L de As disuelto en el agua a 5 g/L de salinidad (Figura 10).

No obstante, es importante resaltar que el comportamiento observado en este estudio entre la bioconcentración de As y la concentración de As disuelto en el agua fue demostrado en periodos cortos de exposición (96 h); por lo tanto, experimentos con periodos de exposición más prolongados (28 o 30 días) tendrían que ser desarrollados para corroborar si este comportamiento es mantenido durante exposiciones crónicas. Esto debido a que diversos

estudios han demostrado una relación inversa entre los FBCs y la concentración de diferentes elementos pesados disueltos en el agua en numerosas especies acuáticas (McGeer *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2006; DeForest *et al.*, 2007).

La relación inversa entre los FBC a y la concentración de un contaminante disuelto en el agua fue reportada por Leonard *et al.* (2011) en camarones juveniles de *L. vannamei* cuando fueron expuestos a diferentes concentraciones de Zn a las 96 h, lo cual fue explicado por una alta capacidad de captación de esta especie para satisfacer sus necesidades metabólicas a bajos niveles; sin embargo, en altas concentraciones, el Zn es regulado para evitar que se incremente su captación en proporción a los niveles de Zn en el agua. En el presente estudio se encontró una tendencia relativamente estable en el comportamiento de los FBCs calculados para las diferentes concentraciones de As disuelto en el agua después de 96 h de exposición en las tres salinidades probadas (Figura 10). Esto indica que este metaloide fue regulado en la misma proporción en todas las concentraciones de As disuelto en el agua probadas aquí, probablemente porque este elemento no es necesario para el desarrollo de ninguna función metabólica en crustáceos.

Las evaluaciones de riesgo ambiental son requeridas para predecir efectos adversos crónicos causados por metales y metaloides en organismos acuáticos, los cuales son basados en los datos de toxicidad aguda que permiten estimar concentraciones de seguridad de estos contaminantes en el agua (Mariño-Balsa *et al.*, 2000). En este sentido, los niveles de seguridad tradicionalmente se han estimado multiplicando la $CL_{50-96\text{ h}}$ por un factor de aplicación de 0.1 (Sprague, 1971), el cual es un valor que teóricamente no causa ningún efecto adverso a los procesos fisiológicos de un organismo o población expuesta de forma continua (Buikema *et al.*, 1982).

El factor de 0.1 ha sido utilizado por diversos autores (Ahsanullah y Arnott, 1978; Ahsanullah *et al.*, 1981; Greenwood y Fielder, 1983) para proponer niveles de seguridad de metales y otros tóxicos como nitrito (Huang *et al.*, 2006) y amonio (Cobo *et al.*, 2014) para crustáceos. Existe evidencia que demuestra que este factor puede ser subestimado al someter a los organismos durante un periodo largo a dichas concentraciones de seguridad (Mariño-Balsa *et al.*, 2000; Frías-Espericueta *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006).

Frías-Espéricueta *et al.* (2001; 2003) comprobaron que al someter a *L. vannamei* durante 21 días a concentraciones subletales de Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn producto de multiplicar la CL₅₀-96 h con diferentes factores de aplicación (0.01, 0.025, 0.05 y 0.1), encontraron que el factor de 0.01 es más apropiado para proponer niveles de seguridad para metales pesados de forma individual. Siguiendo este último criterio, los valores de seguridad provisional de As para juveniles de *L. vannamei* de 8.2 g en salinidades de 5, 10 y 25 g/L, son 140, 150 y 120 µg/L, respectivamente.

Contrastando las concentraciones de seguridad de As estimadas en este estudio para *L. vannamei* con el criterio de concentración continua para la vida acuática marina de As establecido desde 1995 por la agencia de protección al ambiente de los Estados Unidos (36 µg/L) (EPA, 2020), así como con el límite máximo permisible de As (200 µg/L) establecido por la norma oficial mexicana NOM-001-ECOL-1996 (DOF, 1997), se puede asumir que el criterio establecido por la EPA es seguro para el camarón *L. vannamei*, mientras que el criterio establecido por las leyes mexicanas es potencialmente inseguro para esta especie de camarón en las salinidades mencionadas.

Por otra parte, el camarón *L. vannamei* es una especie que se encuentra de forma natural en la zona costera de México (Edwards, 1978), donde se han registrado niveles de As en agua de hasta 35 µg/L en la laguna costera Boca de Camichín, Nayarit (Girón-Pérez *et al.*, 2013); de 280 µg/L en Bahía Concepción, Baja California Sur (Prol-Ledesma *et al.*, 2004); y 1869 µg/L en esteros del Alto Golfo de California, Sonora (García-Hernández *et al.*, 2013), niveles que llegan a exceder las concentraciones de seguridad propuestas en este estudio, por lo que se puede afirmar que existen cuerpos de agua en las costa mexicanas con niveles de As que ponen en potencial riesgo a las poblaciones silvestres de esta especie; así como, a los cultivos de camarón que se desarrollan en la zona costera y que emplean estas aguas. Por lo tanto, es recomendable mantener un monitoreo sobre los niveles de este metaloide en esta zona, así como realizar estudios enfocados a determinar los posibles efectos que podrían causar concentraciones subletales a largo plazo sobre esta especie.

8.1.2. Efecto de la baja salinidad sobre la toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración del mercurio en juveniles de *L. vannamei*

Dentro del ambiente acuático, la toxicidad aguda del Hg ha sido estudiada en diferentes grupos de organismos. Eisler y Hennekey (1997) determinaron la CL₅₀-96 h de Hg, Cd, Zn, Cr y Ni en el caracol *Nassarius obsoletus*, la almeja *Mya arenaria*, el pez *Fundulus heteroclitus*, el gusano *Nereis virens*, la estrella de mar *Asterias forbesi* y el cangrejo *Pagurus longicarpus*, resultando que el Hg fue hasta dos veces más tóxico en los cinco grupos de organismos que el resto de los metales investigados. Además, se observó que de las seis especies ensayadas, el crustáceo decápodo *Pagurus longicarpus* fue la más sensible al Hg.

Existen otros estudios realizados particularmente en crustáceos donde se ha comparado el efecto tóxico del Hg con otros elementos pesados. Por ejemplo, Connor (1972) determinó la CL₅₀-48 h de Zn, Cu y Hg en larvas de *Carcinus maenas*, *Crangon crangon*, y *Homarus gammarus*. Los resultados demostraron que el Hg fue 42, 33 y 2 veces más tóxico que el Cu en *C. maenas*, *C. crangon* y *H. gammarus*, respectivamente, y hasta 99 veces más que el Zn en *C. maenas*.

Por su parte, Krishnaja *et al.* (1987) compararon la toxicidad del Hg con Cd, Pb, As y Se, determinando que el Hg fue más tóxico en *S. serrata* que el resto de los elementos. Esto también ha sido comprobado en otras especies de crustáceos como, *Palaemon serratus*, *Maja squinado*, *Homarus gammarus* (Mariño-Balsa *et al.*, 2000), *L. vannamei* (Frías-Espericueta *et al.*, 2001; 2003), *Neomysis intenger* (Verslycke *et al.*, 2003) y *Artemia salina* (Umarani *et al.*, 2012). Con base en lo anterior, se puede asumir que de los elementos pesados en los que se ha investigado su toxicidad aguda, el Hg ha llamado la atención por ser el más tóxico para los organismos acuáticos. Es por esto, que en la Tabla 33 se muestran CL₅₀ de Hg para un mayor número de especies de crustáceos que las CL₅₀ investigadas para As en este mismo grupo de organismos acuáticos (Tabla 32).

Cinco estudios han sido identificados en la literatura disponible (Scopus, 2020) en los que se ha investigado la toxicidad aguda del Hg en crustáceos a los mismos tiempos de exposición que los probados en el presente estudio (Tabla 33). Por ejemplo, Krishnaja *et al.* (1987) observaron que la toxicidad del Hg en cangrejos adultos *S. serrata* incrementó significativamente de las 24 a las 72 h de exposición. Este mismo resultado ha sido determinado para otras especies como *L. vannamei* (Frías-Espericueta *et al.*, 2001; Roos-Muñoz *et al.*, 2018), *P. monodon* y *P. indicus* (Das

y Sahu, 2002). Lo anterior coincide con los resultados del presente estudio, ya que se observó un incremento de la toxicidad aguda del metal a medida que aumentó el tiempo de exposición en las tres salinidades evaluadas, lo cual permite afirmar, que la toxicidad del Hg no está solo en función de su concentración, sino también del tiempo de exposición al que es sometido el organismo.

Tabla 33. CL₅₀ de mercurio (mg/L) para diferentes especies de crustáceos a diferentes tiempos de exposición y salinidad.

Especie	Salinidad (g/L)	Estadio de vida o talla	CL ₅₀				Referencia
			24 h	48 h	72 h	96 h	
<i>C. maenas</i>	AM	Adulto	*	1.20	*	*	Connor (1972)
<i>C. maenas</i>	AM	Larva 1-3 días	*	0.01	*	*	Connor (1972)
<i>C. crangon</i>	AM	Adulto	*	5.70	*	*	Connor (1972)
<i>C. crangon</i>	AM	Larva 1-3 días	*	0.01	*	*	Connor (1972)
<i>H. gammarus</i>	AM	Larva 1-3 días	*	0.03-0.1	*	*	Connor (1972)
<i>P. setiferus</i>	25	PL (7-13 mm)	*	*	*	0.02	Green <i>et al.</i> (1976)
<i>P. setiferus</i>	25	PL (15-25 mm)	*	*	*	0.02	Green <i>et al.</i> (1976)
<i>P. vulgaris</i>	25	Adulto	0.40	*	*	*	Ray y Trip (1976)
<i>H. americanus</i>	AM	Larva 1	*	*	*	0.02	Johnson y Gentile (1979)
<i>Cancer magister</i>	34	Zoea 1	*	*	*	0.08	Martin <i>et al.</i> (1981)
<i>P. pugio</i>	20	Adulto (30-40 mm)	*	*	*	2.60	Kraus y Kraus (1986)
<i>S. serrata</i>	35	Adulto (40-50 mm)	0.93	0.80	0.68	0.68	Krishnaja <i>et al.</i> (1987)
<i>P. longicarpus</i>	20	Adulto (0.5 g)	2.20	*	*	0.05	Eisler y Hennekey (1997)
<i>P. serratus</i>	AM	Zoea 1	*	*	0.07	*	Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>M. squinado</i>	AM	Zoea 1	*	*	0.07	*	Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>H. gammarus</i>	AM	Mysis 1	*	0.04	*	*	Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>L. vannamei</i>	34	PL18	1.76	1.40	1.27	1.23	Frias-Espericueta <i>et al.</i> (2001)
<i>P. monodon</i>	5	Juvenil (55-75 mm)	0.04	0.04	0.03	0.03	Das y Sahu (2002)
<i>P. monodon</i>	15	Juvenil (55-75 mm)	0.05	0.04	0.04	0.03	Das y Sahu (2002)
<i>P. monodon</i>	25	Juvenil (55-75 mm)	0.07	0.06	0.05	0.04	Das y Sahu (2002)
<i>P. indicus</i>	5	Juvenil (55-75 mm)	0.04	0.04	0.04	0.03	Das y Sahu (2002)
<i>P. indicus</i>	15	Juvenil (55-75 mm)	0.06	0.05	0.04	0.04	Das y Sahu (2002)
<i>P. indicus</i>	25	Juvenil (55-75 mm)	0.07	0.07	0.05	0.04	Das y Sahu (2002)
<i>N. intenger</i>	5	*	*	*	*	6.90**	Verslycke <i>et al.</i> (2003)
<i>N. intenger</i>	25	*	*	*	*	7.00**	Verslycke <i>et al.</i> (2003)
<i>F. brasiliensis</i>	36	Juvenil (0.8 g)	0.13	0.05	0.05	0.05	Barbieri <i>et al.</i> (2005)
<i>M. rosenbergii</i>	2	Juvenil (14.8 g)	*	*	*	0.43	Kaoud <i>et al.</i> (2011)
<i>A. salina</i>	40	Juvenil	*	*	*	0.01	Umarani <i>et al.</i> (2012)
<i>A. salina</i>	60	Juvenil	*	*	*	0.01	Umarani <i>et al.</i> (2012)
<i>A. salina</i>	80	Juvenil	*	*	*	<0.01***	Umarani <i>et al.</i> (2012)
<i>L. vannamei</i>	34	PL15	0.35	0.30	0.28	0.25	Roos-Muñoz <i>et al.</i> (2018)
<i>L. vannamei</i>	34	Juvenil (8.6 g)	0.95	0.75	0.55	0.50	Roos-Muñoz <i>et al.</i> (2018)
<i>L. vannamei</i>	5	Juvenil (8.4 g)	1.72	1.27	0.98	0.53	Este estudio
<i>L. vannamei</i>	10	Juvenil (8.4 g)	2.22	1.71	1.31	0.87	Este estudio
<i>L. vannamei</i>	25	Juvenil (8.4 g)	7.01	5.69	1.75	1.53	Este estudio

AM, agua de mar; *datos no registrados; **datos reportados en µg/L; ***30 µg/L.

Otro factor que puede influir sobre la sensibilidad de los crustáceos a los metales pesados es la salinidad, siendo estos elementos potencialmente más tóxicos a medida que los organismos se encuentran en salinidades más alejadas de su punto isosmótico (Grosell *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Leonard *et al.*, 2011). En lo que respecta al Hg, se encontraron tres estudios en la literatura disponible donde se ha investigado el efecto de la salinidad sobre la toxicidad aguda de este metal. Un ejemplo es el estudio realizado por Das y Sahu (2002), quienes demostraron que juveniles de *P. monodon* y *P. indicus* sometidos a 25 g/L de salinidad resultaron ser 33% más tolerantes al Hg que aquellos mantenidos a 5 g/L de salinidad, después de 96 h de exposición.

Sin embargo, Verslycke *et al.* (2003) observaron que el efecto tóxico del Hg en *N. intenger* fue semejante al exponerlo a 5 y 25 g/L de salinidad, asumiendo que la capacidad de osmorregulación de esta especie es suficientemente eficiente cuando se encuentra en salinidades bajas (5 g/L), lo cual impide que el metal se acumule en los fluidos internos del organismo. No obstante, Umarani *et al.* (2012) encontraron que juveniles de *Artemia salina* fueron 233% más sensibles al Hg en 80 g/L de salinidad que en 40 g/L de salinidad (punto isosmótico); es decir, la toxicidad incrementó cuando la salinidad se alejó más de su concentración ideal.

En este contexto, el presente estudio difiere con lo registrado por Verslycke *et al.* (2003) en *N. intenger*; aunque coincide con lo señalado por Das y Sahu (2002) en *P. monodon* y *P. indicus*, al igual que con Umarani *et al.* (2012) en *A. salina*, puesto que los juveniles de *L. vannamei* mantenidos en 25 g/L de salinidad fueron 84 y 189% más tolerantes al Hg que aquellos sometidos a 10 y 5 g/L de salinidad después de 96 h de exposición, respectivamente. Esto demuestra que la exposición al Hg puede provocar un incremento en el estrés osmótico de juveniles de *L. vannamei* cuando son expuestos a ambientes alejados de su punto isosmótico (24.7 g/L de salinidad, Castille y Lawrence, 1981), como lo son las bajas salinidades (5 y 10 g/L) examinadas en el presente estudio.

Tomando en cuenta que la edad de los crustáceos también juega un papel importante en la tolerancia a las sustancias tóxicas (Usman *et al.*, 2013; Roos-Muñoz *et al.*, 2018), los resultados del presente estudio para *L. vannamei* pueden ser comparados con los resultados de Das y Sahu (2002), ya que ambos estudios se desarrollaron con organismos en estado juvenil y salinidades comparables. Es por esto que considerando las CL₅₀-96 h de Hg calculadas para 25 g/L de

salinidad en cada especie (Tabla 33), se puede observar que *L. vannamei* resulta ser hasta 37 veces más tolerante al Hg que *P. monodon* y *P. indicus*.

Los resultados observados por Roos-Muñoz *et al.* (2018) también pueden ser contrastados con los resultados del presente estudio, ya que se examinó a la misma especie de camarón con tallas similares, aunque en diferentes salinidades. En este sentido, los organismos ensayados en el presente estudio a 5 g/L de salinidad, resultaron tener una sensibilidad similar al Hg que los analizados por Roos-Muñoz *et al.* (2018) a 34 g/L de salinidad; sin embargo, los camarones probados en este estudio a 10 y 25 g/L de salinidad, fueron 66 y 206%, respectivamente más tolerantes al metal que los examinados por dichos autores a 34 g/L de salinidad.

La amplia diferencia observada entre los resultados de Roos-Muñoz *et al.* (2018) y los del presente estudio, puede deberse a que los organismos empleados fueron recolectados desde diferentes granjas de cultivo de *L. vannamei*, las cuales manejan distintos protocolos de producción (*i.e.* diferentes densidades de siembra, tasas de recambios de agua, alimento balanceado, entre otros), mismos que pudieron haber afectado la sensibilidad al Hg de esta especie. Esto quiere decir, que aunque se trate de la misma especie, la tolerancia al Hg puede variar significativamente cuando se comparan poblaciones con distintos orígenes (historia de exposición previa al tóxico), lo cual debe ser considerado cuando se desarrollen estudios de toxicidad en organismos acuáticos.

En lo que se refiere al efecto de la salinidad sobre la capacidad de bioconcentración de los metales pesados en el cuerpo de los crustáceos eurihalinos, diversos estudios han demostrado que a medida que los organismos son expuestos a salinidades más bajas a la de su punto isosmótico, estos tienden a acumular una mayor concentración del metal en sus tejidos (Wright, 1995; Grosell *et al.*, 2007). Esto ha sido observado para el caso del Zn en el camarón *P. elegans* (Nugegoda y Rainbow, 1989), Cd en el cangrejo *Uca rapax* (Zanders y Rojas, 1996) y el camarón *P. longirostris* (Pierron *et al.*, 2007), al igual que el Ni para el cangrejo *C. maenas* (Blewett *et al.*, 2015). En cuanto al Hg, también se ha observado una relación inversa entre su capacidad de bioconcentración y la salinidad del medio ambiente en los cangrejos *E. sinensis*, *C. pagurus* (Bianchini y Gilles, 1996) y *C. maenas* (Laporte *et al.*, 1997).

Dichos resultados han sido relacionados con un incremento en la captación pasiva de agua, causado por la diferencia de osmolalidad presente en los fluidos internos de los organismos (hiper-osmótico) y el medio ambiente exterior (hipo-osmótico), lo que permite que las sustancias disueltas en el agua ingresen a las células por medio de difusión (Verslycke *et al.*, 2003; Grosell *et al.*, 2007). Este fenómeno también provoca un incremento en la actividad de los mecanismos de osmorregulación (*e.g.* canales, intercambiadores y bombas), lo cual induce a la excreción del agua en exceso, así como la captura de los principales iones que componen los fluidos corporales de los crustáceos (Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}), mismos que pueden ser remplazados por ciertos elementos tóxicos (*e.g.* Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} , Veltman *et al.*, 2008), originándose disrupción en los mecanismos de osmorregulación e incremento en el estrés osmótico (Péqueux, 1995; Paquin *et al.*, 2002; Veltman *et al.*, 2008).

En relación al Hg, concentraciones más elevadas del metal se ha observado que causan mayor disrupción en los mecanismos de osmorregulación de crustáceos eurihalinos (Bjerregaard y Vislie, 1985; Barradas y Péqueux, 1996), siendo estas más agudas a menores salinidades (Péqueux *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 1997). Esto explica por qué en este estudio (Figura 12) un efecto significativo de la baja salinidad sobre la capacidad de bioconcentración del Hg no fue observada en los organismos expuestos a la concentración de Hg ambiental más baja (0.10 mg/L), mientras que lo contrario se determinó en mayores concentraciones de Hg disuelto en el agua (0.25, 0.50, 1.00 y 2.00 mg/L).

La concentración de Hg disuelto en el agua fue un factor que influyó significativamente en la capacidad de bioconcentración del metal en *L. vannamei* (Figura 12), lo cual explica los resultados de mortalidad (Tablas 13, 15, 17), puesto que la letalidad del Hg aumentó a medida que incrementó la acumulación del metal en los organismos; es decir, a mayores concentraciones de Hg ambiental, siendo los efectos letales más agudos en los ambientes de menor salinidad.

La salinidad también puede afectar de forma importante la especiación química de metales pesados como, Ag, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd y Hg (Byrne *et al.*, 1988), lo cual es relevante en términos toxicológicos, ya que dentro de sus especies químicas inorgánicas, las formas ionizadas libres (*e.g.* Ag^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} y Hg^{2+}) son las más tóxicas para los organismos acuáticos (Newman y Unger, 2003). En este contexto, se ha comprobado que conforme incrementa la

salinidad, la fracción del metal en su forma ionizada libre decrece, porque se tienden a formar complejos y pares iónicos con algunos aniones mayoritarios del agua de mar (*i.e.* Cl^- , SO_4^{2-} , F^- , CO_3^{2-}), lo que provoca que su toxicidad disminuya (Verslycke *et al.*, 2003; Dutton y Fisher, 2011).

Es importante mencionar que en lo que respecta al Hg, su forma química más tóxica es el MeHg (forma orgánica) (Newman y Unger, 2003); sin embargo, dicha especie química es poco probable que se presentara en las soluciones de prueba del presente estudio, debido a que la fuente del metal que se utilizó fue inorgánica (HgCl_2), además que dichas soluciones de prueba fueron recambiadas al 100% cada 24 h, con el objetivo de mantener las concentraciones de Hg inorgánico estables durante los bioensayos. Considerando lo anterior, a continuación se muestra un análisis comparativo de las especies químicas de Hg inorgánico que teóricamente se presentaron en las soluciones de prueba, tomando en cuenta el nivel más bajo (0.1 mg/L) y alto (8.0) de Hg total ensayados a las distintas salinidades en el presente estudio (Tabla 34).

Dicho análisis muestra que las principales formas químicas del Hg estuvieron asociadas al ion cloruro e hidróxido, mientras que la fracción de su forma ionizada libre fue prácticamente despreciable (<0.001%) en todos los casos. Asimismo, se demuestra que la concentración de Hg total disuelto en el agua no afectó de manera importante a la especiación química de este metal, debido a que las fracciones de cada forma química estimadas para los dos niveles de Hg disuelto total fueron similares en las tres salinidades. Sin embargo, se observó que la salinidad sí influyó sobre la especiación química del Hg; esto es evidente en los casos de las especies no ionizadas ($\text{Hg}(\text{OH})_2$, HgCl_2 y HgClOH), ya que sus fracciones disminuyeron cuando la salinidad decreció; y un efecto contrario de la salinidad fue determinado para el ion HgCl_4^{2-} .

Tabla 34. Distribución (%) de las especies químicas de mercurio inorgánico presentes en las soluciones de prueba en relación a los niveles extremos de mercurio total ensayados en los experimentos de toxicidad aguda a diferentes salinidades. La especiación fue calculada utilizando el programa Visual MINTEQ versión 3.1, mismo que fue alimentado con la composición química teórica del agua de mar diluida a las distintas salinidades calculadas de acuerdo a Millero (2006).

Especie química	5 g/L		10 g/L		25 g/L	
	0.1 mg/L	8.0 mg/L	0.1 mg/L	8.0 mg/L	0.1 mg/L	8.0 mg/L
Hg ²⁺	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Hg(OH) ₂	1.54	1.55	0.26	0.26	0.01	0.01
HgCl ₂	37.92	37.93	22.81	22.82	6.55	6.56
HgCl ₃ ⁻	29.43	29.41	35.48	35.48	25.76	25.76
HgCl ₄ ²⁻	13.80	13.78	35.93	35.90	67.00	66.99
HgClOH	17.29	17.32	5.52	5.53	0.68	0.68
HgOHCO ₃ ⁻	0.03	0.03	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Aunque es sabido que la forma ionizada libre del Hg es su especie química más biodisponible y por lo tanto tóxica (Laporte *et al.*, 1997; Verslycke *et al.* 2003; Li *et al.*, 2017), es poco probable que los efectos tóxicos observados en los camarones del presente estudio hayan sido causados por este ion (Hg²⁺), debido a la muy baja proporción en la que se presentó en las soluciones de prueba a consecuencia de la alta afinidad del metal por los iones Cl⁻ principalmente.

La biodisponibilidad de las diferentes especies químicas del Hg inorgánico en crustáceos ha sido estudiada por diversos autores (Péqueux *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 1997; Laporte *et al.*, 2002; Andres *et al.*, 2002), sin embargo, los resultados en dicho tema han sido poco consistentes. Por ejemplo, Péqueux *et al.* (1996) encontraron evidencias que sugieren que el Hg puede interferir con el transporte de Cl⁻ en el epitelio branquial de *Eriocheir sinensis*, debido a la competencia del HgCl₃⁻ y HgCl₄²⁻ por los canales y transportadores de Cl⁻, lo cual indica que dichas especies químicas están relacionadas con la captación de Hg ambiental en dicha especie. Posteriormente, Laporte *et al.* (1997) demostraron que la bioacumulación de Hg en las branquias de *C. maenas* se correlacionó positivamente con el HgCl₂ y no así con el HgCl₄²⁻; sugiriendo que la biodisponibilidad del Hg está más bien relacionada con una especie química neutra y no con una ionizada, por lo que se puede asumir que la captación de Hg ambiental se lleva a cabo por difusión pasiva, contrastando con lo concluido por Péqueux *et al.* (1996).

La hipótesis de Laporte *et al.* (1997) sobre la captación pasiva del Hg ambiental fue sustentada con base en los estudios realizados por Gutknecht (1981) y Bienvenue *et al.* (1984), quienes determinaron que los flujos transmembranales del HgCl_2 fueron mayores que los presentados por el $\text{Hg}(\text{OH})_2$, mientras que la especie química cargada (HgCl_4^{2-}) fue incapaz de traspasar la membrana fosfolipídica. Por otro lado, Andres *et al.* (2002) encontraron evidencias que indican que el Hg ambiental es captado por las branquias y el intestino de *Callinectes sapidus* a través de mecanismos activos y pasivos; lo que coincide con lo determinado por Laporte *et al.* (2002) en la misma especie de cangrejo, quienes además concluyeron que la captación de Hg en las células de las branquias involucra a los canales diseñados para el transporte de aminoácidos, mismos que pueden movilizar especies químicas no ionizadas de Hg en lugar de aminoácidos.

Los resultados del presente estudio sugieren que las especies químicas neutras fueron las más biodisponibles, debido a que sus fracciones disminuyeron a medida que incrementó la salinidad (Tabla 34), lo cual contribuye a explicar la relación negativa entre la toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración del Hg con respecto a la salinidad. Estos resultados también coinciden con lo concluido por Laporte *et al.* (1997), ya que se puede asumir que los efectos tóxicos observados en los camarones examinados en el presente estudio fueron causados principalmente por el HgCl_2 , porque fue la especie química que destacó por su abundancia en los tres niveles de salinidad evaluados. Lo anterior a su vez concuerda con lo concluido por Andres *et al.* (2002) y Laporte *et al.* (2002), debido a que el HgCl_2 , por ser neutro, pudo haber sido captado por medio de difusión pasiva o por los canales transportadores de aminoácidos en las células branquiales del camarón principalmente, y posteriormente haberse distribuido a todo el cuerpo de los organismos examinados.

La alta capacidad lipofílica del Hg promovió que el metal se acumulara en los juveniles de *L. vannamei* del presente estudio en niveles mucho más altos a los determinados en el ambiente (Figura 13). De acuerdo al análisis de los FBCs de Hg, el metal se bioconcentró entre 29 y 312 veces lo correspondiente a la concentración de Hg disuelto en el agua, observándose una tendencia a la baja a medida que los organismos fueron sometidos a concentraciones de Hg más altas en las tres salinidades evaluadas, lo que sugiere un decremento en la tasa de acumulación de Hg en los camarones cuando incrementó el nivel del metal en el agua.

La relación inversa entre los FBCs y la concentración ambiental de diferentes metales pesados ha sido ampliamente demostrada en diversas especies acuáticas (McGeer *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2006; DeForest *et al.*, 2007) incluida *L. vannamei* (Leonard *et al.*, 2011), misma que ha sido explicada como resultado de una alta capacidad de detoxificación y almacenamiento de los metales (esenciales y no esenciales) cuando se encuentran en niveles bajos, mientras que a niveles elevados, los mecanismos de regulación, detoxificación y excreción de metales se saturan, lo que inhibe la tasa de captación del metal (McGeer *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2006; DeForest *et al.*, 2007). Este fenómeno fue observado por Andres *et al.* (2002) en branquias de *C. sapidus* en relación al Hg, el cual fue atribuido al efecto causado por la facilidad del metal para enlazarse con los abundantes grupos tiol presentes en las membranas celulares provocando una saturación, y por consecuencia una disminución en la tasa de captación de Hg ambiental, lo cual contribuye a explicar los resultados del presente estudio.

El tejido nervioso ha demostrado ser particularmente sensible a los efectos tóxicos ocasionados por la alta acumulación de Hg en crustáceos (Devi y Fingerman, 1995; Roos-Muñoz *et al.*, 2018). Por ejemplo, Devi y Fingerman (1995) observaron una reducción significativa en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el tejido nervioso de camarones *Procambarus clarkii*, la cual fue provocada por una exposición de 24 h a 0.2 mg/L de Hg, concluyendo que la disminución en la transmisión de impulsos nerviosos, como consecuencia pudo originar la muerte de los organismos. Por su parte, Roos-Muñoz *et al.* (2018) encontraron que postlarvas PL₁₂ (2.1 mg) y juveniles (8.6 g) de *L. vannamei* expuestos 96 h a intervalos de concentración de 0.01 a 0.50, y de 0.10 a 0.75 mg/L de Hg, respectivamente, no presentaron alteraciones histológicas en el hepatopáncreas, branquias y epipoditos, sin embargo, necrosis celular severa en el tejido nervioso fue observada en las postlarvas y juveniles expuestos a partir de 0.1 mg/L de Hg.

El Hg también puede inducir estrés oxidativo en las células, el cual es generado cuando el metal provoca daños en las mitocondrias promoviendo un incremento en la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wu *et al.*, 2016). El exceso en los niveles de ROS dentro del citoplasma puede originar daño enzimático, oxidación de las membranas celulares y rompimiento de las cadenas de ADN, lo que puede conducir a la muerte celular (Lee *et al.*, 2017). Dicho mecanismo de toxicidad del Hg ha sido observado en hemocitos, branquias y hepatopáncreas del cangrejo *Charybdis japonica* después de ser expuesto a 2.5 y 5.0 µg/L de Hg

(Zhang *et al.*, 2009); así como en el camarón *P. monodon* a las 4 h de exposición a 3.4 mg/L de Hg (Jose *et al.*, 2011). Con base a lo anterior, se infiere que los organismos del presente estudio pudieron haber sufrido estrés oxidativo a consecuencia de los elevados niveles de Hg ambiental, al igual que los efectos tóxicos asociados al sistema nervioso, lo que pudo ocasionar su muerte.

Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda también han sido usados frecuentemente para estimar los niveles umbrales de toxicidad de diversos tóxicos en numerosas especies acuáticas, con el objetivo de conocer sus riesgos ambientales y estimar concentraciones de seguridad (Newman y Unger, 2003). En lo que se refiere a metales pesados, un criterio considerado como apropiado para estimar concentraciones de seguridad es el de multiplicar la CL_{50-96} h del metal por el factor de aplicación 0.01 (Frías-Espericueta *et al.*, 2001; 2003). De acuerdo a lo anterior, las concentraciones de seguridad provisional de Hg para juveniles de *L. vannamei* expuestos a 5, 10 y 25 g/L de salinidad son 5.3, 8.3 y 15.3 $\mu\text{g/L}$ de Hg, respectivamente.

Es importante señalar que existen registros de Hg disuelto en agua de mar en Bahía Concepción, Baja California Sur, tan altos como 98, 138 y 1,384 $\mu\text{g/L}$, los cuales han sido relacionados a la actividad hidrotermal que se registra en la zona a poca profundidad (5 m) (Prol-Ledesma *et al.*, 2004), además, mencionar que esta región del Golfo de California es conocida por albergar diferentes especies de camarones, entre ellos *L. vannamei*. Por otro lado, en aguas subterráneas (con salinidades de 0.6 a 5 g/L) cercanas a la línea de costa en el sur de Sinaloa y Colima, se han presentado concentraciones de hasta 28 y 33 $\mu\text{g/L}$ de Hg, respectivamente, las cuales están siendo utilizadas para el cultivo de *L. vannamei* (Ramírez-Rochín, 2014). Por lo anterior, se puede precisar que tanto en su hábitat natural como en estanques de cultivo, ya sea en baja salinidad o agua salobre, *L. vannamei* es expuesto frecuentemente a niveles de Hg que sobrepasan los niveles de seguridad propuestos en este estudio. En este sentido, se puede considerar que existen ambientes en México que son potencialmente riesgosos para las poblaciones silvestres y aquellas en cultivo.

8.2. Toxicidad subletal

Los contaminantes suelen encontrarse más frecuentemente en los ecosistemas acuáticos en niveles que no causan muerte celular en la biota; sin embargo, sus efectos pueden ocasionar alteraciones fisiológicas, las cuales pueden repercutir en consecuencias letales en un contexto

ecológico (Barbieri y Doi, 2011). Por ejemplo, una especie que no cuenta con un buen estado fisiológico es probable que su capacidad para competir con otras especies por alimento, evitar depredadores, sobreponerse ante agentes infecciosos o condiciones climáticas adversas se vea disminuida considerablemente (Newman y Unger, 2003). En este sentido, el estudio de los efectos subletales causados por los metales-metaloides en especies de interés ecológico y económico es de gran relevancia para la ecotoxicología acuática (Manahan, 2010).

Una estrategia utilizada recurrentemente para investigar el impacto de los contaminantes sobre la fisiología de los organismos acuáticos es realizar pruebas de toxicidad en condiciones controladas (*i.e.*, en laboratorio), en las que se exponen a grupos de organismos de una especie de interés bajo concentraciones subletales de un metal-metaloide o en combinación con otros tóxicos durante un tiempo determinado (Páez-Osuna, 2011). Para establecer dichas concentraciones subletales, en la literatura científica se han utilizado diferentes criterios. Uno de ellos es el de probar niveles del metal-metaloide similares a los más altos registrados en el medio ambiente donde se distribuye la especie de interés, bajo condiciones ambientales ideales o desfavorables (*i.e.*, salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto, principalmente) que se presentan en dicho ambiente; esto con el objetivo de determinar los potenciales efectos adversos que podría estar sufriendo la especie de interés en su hábitat natural a causa de la acción tóxica de dicho metal-metaloide (*e.g.*, Rosenberg y Costlow, 1976; Metian *et al.*, 2010; Núñez-Nogueira *et al.*, 2010; 2012; Wang *et al.*, 2012; Blewett *et al.*, 2015; Greani *et al.*, 2017).

Otro criterio que ha sido ampliamente referido en la literatura para establecer concentraciones subletales de metales-metaloides es el de probar niveles máximos permisibles establecidos por Normas Oficiales de diferentes países (*e.g.*, Cordeiro *et al.*, 2016; Blewett *et al.*, 2015; Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014; 2015; Ronci *et al.*, 2017), con el objetivo de determinar si dichos niveles son seguros para una especie de interés en particular. Por otro lado, diversos estudios han establecido concentraciones subletales considerando el 1 (Mariño-Balsa *et al.*, 2000; Paila *et al.*, 2010; Roos-Muñoz *et al.*, 2018), 5 (Boyd, 1998) y 10% (Sprague, 1971; Chen y Lin, 2001) de la $CL_{50-96 h}$ de un metal-metaloide estimada para una especie determinada, debido a que dichos porcentajes de la $CL_{50-96 h}$ han sido considerados como niveles de seguridad para exposiciones crónicas de dicha especie; sin embargo, también se ha sugerido que, para poder ser establecidas como criterio de calidad del agua para una especie en particular, dichas

concentraciones deben ser probadas y no ocasionar efectos adversos sobre algún proceso fisiológico en la especie de interés (Páez-Osuna, 2011).

Este último criterio fue tomado en cuenta para establecer las concentraciones subletales ensayadas en el presente estudio, en el que se probaron durante 96 h en 5 y 25 g/L de salinidad, el 1 y 10% de la CL_{50-96} h de As y Hg determinadas previamente para 25 g/L de salinidad, con el objetivo de evaluar el efecto combinado de la baja salinidad y concentraciones teóricamente seguras de As y Hg disueltas en el agua (es decir, pruebas individuales para cada tóxico) sobre la concentración de oxihemocianina, CTH, bioacumulación del tóxico en músculo de camarón y su potencial riesgo para la salud humana, así como el aumento en la susceptibilidad de los *L. vannamei* juveniles ante una infección con la bacteria *V. parahaemolyticus* causada por la previa exposición a dichos escenarios de toxicidad.

8.2.1. Efecto de la baja salinidad y niveles subletales de arsénico sobre la oxihemocianina, CTH, bioacumulación del metaloide en músculo de juveniles de *L. vannamei* y su susceptibilidad ante una infección con *V. parahaemolyticus*

Diversos estudios se han enfocado en evidenciar efectos ocasionados por la exposición a concentraciones teóricamente seguras de metales equivalentes al 1 y 10% de la respectiva CL_{50-96} h en crustáceos (Santos *et al.*, 2000; Umarani *et al.*, 2012; Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014; 2015); sin embargo, este tipo de información no ha sido reportada en la literatura científica disponible en relación al As (Scopus, 2020), por lo tanto, se puede asumir que el presente estudio es el primero en el que se investigan los efectos causados por exposiciones a concentraciones teóricamente seguras de As, las cuales fueron determinadas para un ambiente isosmótico (25 g/L) y probadas también en un ambiente de baja salinidad (5 g/L) en crustáceos.

En relación a los efectos letales causados por 119 (1% de la CL_{50-96} h determinada para 25 g/L de salinidad) y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As disuelto en el agua (10% de la CL_{50-96} h determinada para 25 g/L de salinidad) observados en este estudio, se encontró que dichas concentraciones no causaron mortalidades estadísticamente diferentes de las registradas en los respectivos tratamientos control (*i.e.*, sin tóxico) para 5 y 25 g/L de salinidad después de 96 h de exposición; es decir, los niveles de As resultaron ser no letales para los grupos de *L. vannamei* expuestos, asimismo, la baja salinidad no provocó un aumento significativo de la mortalidad (Tabla 21). Resultados

similares fueron encontrados por Santos *et al.* (2000) en *Farfatepenaeus paulensis* PL₁₇, debido a que no se presentó un incremento significativo en la mortalidad de los organismos después de 35 días de exposición a concentraciones equivalentes al 1% de la CL_{50-96 h} de Cu (17 µg/L) y Zn (41 µg/L) en 25 g/L de salinidad.

Lo anterior coincide con los resultados observados por Umarani *et al.* (2012) en *Artemia salina* juveniles, puesto que después de 15 días de exposición a concentraciones equivalentes al 10% de la CL_{50-96 h} de Hg (12 µg/L) y Cu (132 µg/L) en 40 g/L de salinidad, no se encontraron mortalidades significativamente diferentes a las determinadas en los respectivos tratamientos control. Los resultados de Bautista-Covarrubias *et al.* (2014; 2015) también demostraron que niveles de Cd y Cu equivalentes al 1 y 10% de las respectivas CL_{50-96 h} no ocasionaron efectos letales significativos en juveniles de *L. vannamei* después de 96 h de exposición en 34 g/L de salinidad.

En este contexto, se puede concluir que concentraciones de Cd, Cu y As equivalentes al 1 y 10% de sus respectivas CL_{50-96 h}, pueden considerarse como subletales para crustáceos expuestos durante 96 h, y en el caso particular de juveniles de *L. vannamei* con respecto al As, dichas concentraciones determinadas para un ambiente isosmótico (25 g/L) pueden asumirse como no letales también para baja salinidad (5 g/L).

Por otra parte, una de las variables fisiológicas que ha sido considerada como un importante biomarcador de toxicidad para elementos pesados es el monitoreo en los niveles de oxihemocianina en crustáceos (Spicer y Weber, 1991; Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014; 2015); esto debido a la alta susceptibilidad de dicha proteína a sufrir alteraciones cuando los organismos se encuentran en ambientes con concentraciones elevadas de dichos contaminantes, así como a la importante función que realiza la oxihemocianina (*i.e.*, principal proteína presente en la hemolinfa encargada de transportar y distribuir el oxígeno desde las branquias al resto de los tejidos; Cheng *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1994) durante el proceso de respiración celular (Qian *et al.*, 2020).

Por ejemplo, Bautista-Covarrubias *et al.* (2014) observaron que juveniles de *L. vannamei* expuestos a 24.9 y 1245.0 µg/L de Cd durante 96 h en 34 g/L de salinidad, sufrieron una disminución significativa en los niveles de oxihemocianina en relación a los organismos

expuestos al tratamiento control (0.0 µg/L). En un estudio similar Bautista-Covarrubias *et al.* (2015) demostraron que los niveles de oxihemocianina en juveniles de *L. vannamei* s expuestos a 3, 370, 3730 y 18650 µg/L de Cu disminuyeron significativamente cuando se incrementó el tiempo de exposición de 5 a 96 h en todos los tratamientos. Sin embargo, dichos resultados contrastan con los determinados en el presente estudio, esto debido a que los tratamientos con 119 y 1190 µg/L de As no provocaron alteraciones significativas en los niveles de oxihemocianina determinados en los camarones en relación al tratamiento control (0 µg/L) durante las 96 h de exposición en 5 y 25 g/L de salinidad; asimismo, el tiempo de exposición no fue un factor que afectara a dicha variable (Tabla 22).

Bautista-Covarrubias *et al.* (2014; 2015) concluyeron que la oxihemocianina disminuyó en los tratamientos con Cd y Cu a través del tiempo porque el estrés generado por el metal incrementó la demanda energética de los organismos, lo cual provocó que las proteínas transportadas por la oxihemocianina fueran utilizadas como fuente de energía, mismas que se fueron agotando sin poder ser reemplazadas debido a que los organismos no fueron alimentados durante el bioensayo. Esto contribuye a explicar los resultados del presente estudio, ya que la falta de efecto del As sobre la oxihemocianina pudo deberse a que en este caso los camarones fueron alimentados durante todo el bioensayo, observándose un consumo aparente de alimento balanceado del 100% en todos los tratamientos, lo cual indica que las concentraciones de As evaluadas no fueron lo suficientemente altas como para incrementar significativamente la demanda de energía de los camarones.

En cuanto a estudios enfocados a investigar el efecto combinado de la baja salinidad y concentraciones elevadas de elementos pesados sobre la oxihemocianina, a la fecha no se ha encontrado algún antecedente en la literatura disponible; sin embargo, se ha comprobado que la exposición a ambientes de baja salinidad puede provocar incremento en la concentración de oxihemocianina en decápodos (Boone y Schoffeniels, 1979). Esta tendencia ha sido observada por Li *et al.* (2008) en juveniles de *L. vannamei* aclimatados a 3 g/L de salinidad con respecto a camarones mantenidos en 17 y 32 g/L de salinidad, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de oxihemocianina determinados a 17 y 32 g/L de salinidad.

El aumento en los niveles de oxihemocianina en crustáceos facilita la captación y transporte de oxígeno, lo cual conduce al incremento en la producción de energía necesaria para mantener

funcionando los mecanismos de osmorregulación cuando los organismos se encuentran en condiciones hipo-osmóticas; es decir, el aumento en los niveles de oxihemocianina puede ser considerado como un mecanismo de compensación a la baja salinidad (Li *et al.*, 2007; 2008). Sin embargo, en el presente estudio no se observó un efecto significativo de la baja salinidad sobre los niveles de oxihemocianina en los *L. vannamei* (juveniles) del tratamiento control (Tabla 22), lo cual discrepa con los resultados obtenidos por Li *et al.* (2008). Esto puede deberse a que la salinidad más baja (3 g/L) examinada por dichos autores fue menor a la ensayada en el presente estudio (5 g/L), lo que sugiere que el medio hipo-osmótico empleado en este estudio no representó un gasto energético significativo para los camarones evaluados.

Con base en lo anterior, se puede concluir que el efecto causado por concentraciones de As equivalentes al 1 y 10% de la CL_{50-96} determinada para 25 g/L de salinidad sobre los niveles de oxihemocianina, no es afectado significativamente por la exposición a un medio hipo-osmótico (*i.e.*, 5 g/L de salinidad) en juveniles de *L. vannamei*, esto bajo las condiciones experimentales ensayadas en el presente estudio.

El monitoreo del conteo total de hemocitos (CTH) es considerado como un sensible indicador de respuesta inmune ante factores de estrés de tipo ambiental, debido a que estas células distribuidas a través de la hemolinfa son las encargadas de llevar a cabo los procesos de coagulación, fagocitosis, encapsulación y melanización en crustáceos (Xian *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2020). En este sentido, se ha observado que los metales pesados son contaminantes que pueden alterar considerablemente la concentración de hemocitos circulantes en dichos organismos (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014; 2015).

Estudios realizados en *L. vannamei* (Yeh *et al.*, 2004; Bautista-Covarrubias *et al.*, 2015) y *P. monodon* (Xian *et al.*, 2010) han demostrado que el Cu puede ocasionar una disminución significativa en el CTH. Esta misma tendencia fue determinada en *L. vannamei* con respecto al Cd (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014) y Pb (Wu *et al.*, 2017). Este fenómeno ha sido asociado a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno inducida por la acumulación de elementos pesados en la hemolinfa, las cuales al sobrepasar la capacidad antioxidante de las células causan daño oxidativo a las membranas y al ADN, provocando apoptosis celular (*i.e.*, muerte celular programada) (Chang *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2020).

Los resultados del presente estudio contrastan con los resultados observados para el Cu en *L. vannamei* (Yeh *et al.*, 2004; Bautista-Covarrubias *et al.*, 2015) y *P. monodon* (Xian *et al.*, 2010), así como para el caso del Cd (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014) y Pb (Wu *et al.*, 2017) en *L. vannamei*, puesto que el As no afectó significativamente al CTH en los camarones evaluados (Tabla 23). Con base en lo anterior se puede especular que la exposición a 119 y 1190 µg/L de As no fue suficiente como para incrementar significativamente el proceso de apoptosis celular en los hemocitos de los camarones de este estudio después de 96 h de exposición en 5 y 25 g/L de salinidad.

Se ha observado que la exposición a la baja salinidad también puede disminuir la concentración de hemocitos circulantes en la hemolinfa de penaeidos (Le Moullac y Haffner, 2000; Li *et al.*, 2010). Por ejemplo, Le Moullac y Haffner (2000) demostraron que el CTH en juveniles de *Farfantepenaeus paulensis* después de 7 días de cultivo en 13 g/L de salinidad fue significativamente menor que el de camarones cultivados a 34 g/L de salinidad, lo cual fue relacionado a un decremento en la actividad mitótica del tejido hematopoyético causado por el ambiente hipo-osmótico. Sin embargo, en el presente estudio se observó que el CTH en *L. vannamei* después de 4 días de exposición a 5 g/L de salinidad no fue afectado significativamente en relación a los camarones mantenidos en 25 g/L de salinidad (Tabla 23). Estos resultados indican que *L. vannamei* está mejor adaptado a los ambientes de baja salinidad que *F. paulensis*.

A pesar de lo anterior, Li *et al.* (2010) encontraron que el CTH en *L. vannamei* puede verse disminuido significativamente cuando los organismos son transferidos directamente de 35 a 15 g/L de salinidad. Esto ha sido explicado como resultado del estrés osmótico sufrido por los organismos, que como consecuencia provoca un aumento en la captación de agua y hemodilución de los componentes de la hemolinfa (Wang y Chen, 2006; Li *et al.*, 2010). En los camarones *L. vannamei* examinados en el presente estudio no se observó dicho fenómeno porque los organismos fueron previamente aclimatados durante 13 días hasta alcanzar las salinidades evaluadas (5 y 25 g/L) antes de tomar las muestras de hemolinfa para la determinación del CTH, lo cual sugiere que los cambios bruscos de salinidad son los que pueden afectar al CTH en esta especie, y no así la exposición a ambientes de baja salinidad cuando los organismos son apropiadamente aclimatados.

En lo que se refiere al efecto combinado de la baja salinidad y concentraciones elevadas de elementos pesados sobre el CTH en crustáceos, en la literatura disponible no se ha reportado ningún estudio enfocado a esta temática. No obstante, en el presente estudio se demostró que el efecto causado por los niveles de As experimentados sobre el CTH en juveniles de *L. vannamei* no fue afectado significativamente por la baja salinidad, lo que demuestra la alta tolerancia de esta especie al As, así como su gran capacidad de adaptación a los ambientes de baja salinidad.

Por otro lado, es sabido que en crustáceos decápodos el músculo abdominal tiende a acumular niveles significativamente más bajos de contaminantes ambientales en comparación con otros órganos-tejidos como el hepatopáncreas, branquias y exoesqueleto; por tal razón, el músculo no es considerado como un buen bioindicador de contaminación ambiental (Phillips, 1990; Canli y Furness, 1993). Sin embargo, determinar la capacidad de bioconcentración de los elementos pesados en el músculo de organismos marinos de interés comercial, como es el caso de *L. vannamei*, bajo condiciones controladas (*i.e.*, experimentos en laboratorio), permite estimar los niveles que podrían bioacumularse del contaminante en el músculo de organismos silvestres de presentarse condiciones similares a las experimentadas en el ambiente natural (Newman y Unger, 2003). Esto es de gran relevancia para la salud humana, pues se ha comprobado que los alimentos de origen acuático son una de las principales fuentes de metales y metaloides tóxicos para el ser humano (*e.g.* As) (Wu *et al.*, 2017), y es precisamente el músculo el tejido mayormente consumido como alimento.

Bajo dicho contexto, Lobato *et al.* (2013; 2018) determinaron que los juveniles de *L. vannamei* pueden acumular entre 1.1 ± 0.2 y 1.8 ± 0.3 $\mu\text{g/g}$ (en p.s.) de As en el músculo después ser expuestos durante 48 h a 1000 $\mu\text{g/L}$ de As disuelto en 30 g/L de salinidad. Estos resultados fueron entre 249 y 618% menores que los determinados en el presente estudio para la misma especie de camarón pero expuestos 48 h a 119 $\mu\text{g/L}$ de As en 5 y 25 g/L de salinidad; asimismo, dichos resultados fueron entre 259 y 564% más bajos que los determinados en el presente estudio para el tratamiento con 1190 $\mu\text{g/L}$ de As en 5 y 25 g/L de salinidad (Tabla 24). Lo anterior llama la atención sobre todo en los camarones expuestos a 119 $\mu\text{g/L}$ de As, puesto que a pesar de que la concentración de As ambiental fue menor que la experimentada por Lobato *et*

al. (2013; 2018), los organismos de este estudio acumularon niveles más elevados del metaloide en el músculo.

Se ha observado que cuando los crustáceos son expuestos al As vía alimento (*i.e.*, alimento contaminado con As) la capacidad de acumulación del metaloide en el músculo es significativamente mayor que cuando la vía de exposición es el agua (Hunter *et al.*, 1998). Esto contribuye a explicar los resultados obtenidos en el presente estudio en relación a los determinados por Lobato *et al.* (2013; 2018), porque a diferencia de los camarones *L. vannamei* examinados por dichos autores, los juveniles empleados en el presente estudio fueron alimentados durante todo el experimento, lo cual pudo haber promovido que una fracción del As disuelto en el agua se acumulara en el alimento suministrado, lo que a su vez facilitó la bioacumulación del metaloide en el músculo de los organismos, considerando que en todos los tratamientos se observó un consumo aparente de alimento del 100%.

Sin embargo, lo anterior no explica porque en el presente estudio no fue encontrado un incremento significativo en la bioconcentración de As en el músculo de los camarones expuestos a 1190 µg/L de As, en comparación con los camarones sometidos a 119 µg/L de As tanto en 5 como en 25 g/L de salinidad, esto a pesar de que el primer tratamiento fue nueve veces más elevado que el segundo (Tabla 24). Cabe señalar que una tendencia similar fue observada por Chávez-Ramos (2019) en un estudio realizado con juveniles de *L. vannamei* expuestos 96 h a 2500 y 5000 µg/L de As en 5 g/L de salinidad. Estudio en el cual se demostró que aunque la bioacumulación del As en el músculo fue estadísticamente comparable para ambos tratamientos, la bioacumulación del metaloide fue significativamente más alta en el hepatopáncreas, branquias, exoesqueleto y restos (tejido integrado por la cabeza, pleópodos y pereiópodos) de los camarones expuestos al tratamiento con el nivel de As más elevado.

Lo anterior indica que la alta capacidad del hepatopáncreas, branquias, exoesqueleto y restos para detoxificar y almacenar el As capturado por los camarones, funciona como una barrera que limita la cantidad del metaloide capturado que pudo ser transportado por la hemolinfa y depositado en el músculo (Chávez-Ramos, 2019); lo cual coincide con lo concluido por Canli y Furness (1993) para el caso del Cu, Zn y Pb en la langosta *Neprops norvegicus*, y por Zanders y Rojas (1996) en el cangrejo *Uca rapax* para el caso del Cd. Un fenómeno similar pudo haber ocurrido en el presente estudio, lo cual explica porque no se observó un incremento

significativo en los niveles de bioacumulación de As en el músculo de los camarones expuestos a 1190 $\mu\text{g/L}$ de As en relación a los organismos expuestos a 119 $\mu\text{g/L}$ de As en 5 y 25 g/L de salinidad.

Se ha observado que cuando los crustáceos eurihalinos son expuestos a ambientes de baja salinidad la capacidad de acumulación en el músculo de elementos pesados como el Cd (Wright, 1977; Zanders y Rojas, 1996), Hg (Bianchini y Gilles, 1996) y Ni (Blewett *et al.*, 2015) se incrementa con respecto a la determinada en ambientes salobres y marinos. En el caso del As, a la fecha no se ha encontrado ningún estudio en la literatura disponible en el que se evalúe dicho fenómeno en el músculo de crustáceos; sin embargo, en el presente estudio se observó que la capacidad de bioacumulación del As en el músculo de juveniles de *L. vannamei* no fue significativamente afectada por la baja salinidad (Tabla 24) durante 96 h de exposición a 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As, lo que contrasta con lo observado para Cd (Wright, 1977; Zanders y Rojas, 1996), Hg (Bianchini y Gilles, 1996) y Ni (Blewett *et al.*, 2015).

Es sabido que la capacidad de los elementos pesados disueltos en el ambiente para ser captados por los organismos acuáticos (biodisponibilidad) depende en gran medida de su especiación química, así como de la forma en que ésta es influenciada por las condiciones fisicoquímicas del ambiente (Paquin *et al.*, 2002). Por ejemplo, en el caso de elementos metálicos como el Cd, Hg y Ni, se ha observado que sus especies químicas más biodisponibles, y por lo tanto más tóxicas son las especies ionizadas libres (*i.e.*, Cd^{2+} , Hg^{2+} y Ni^{2+}) (Verslycke *et al.*, 2003), las cuales tienen una alta afinidad para asociarse con los aniones mayoritarios del agua de mar (*i.e.* Cl^- , SO_4^{2-} , F^- y CO_3^{2-}) (Piazza *et al.*, 2016); es decir, a mayor salinidad, menor proporción de las especies ionizadas libres de los metales en el ambiente, y por consecuencia menor biodisponibilidad. En contraste a dichos metales, el As es un metaloide que se encuentra principalmente en ambientes oxidantes como oxianiones de arsenato (*i.e.*, HAsO_4^{2-} y H_2AsO_4^-) (Smedley y Kinniburgh, 2002), formas químicas del As que no tienen afinidad para asociarse químicamente con los componentes del agua de mar (Cullen y Reimer, 1989); es decir, la salinidad no afecta la especiación química de este metaloide, y por tanto, tampoco afecta su biodisponibilidad.

Lo anterior explica la relación inversa observada entre la salinidad y la capacidad de bioacumulación del Cd (Wright, 1977; Zanders y Rojas, 1996), Hg (Bianchini y Gilles, 1996) y Ni (Blewett *et al.*, 2015) en el músculo de crustáceos eurihalinos, así como el hecho de que la

capacidad de bioacumulación del As en el músculo de los juveniles de *L. vannamei* examinados en este estudio fue independiente de la salinidad (Tabla 24).

La exposición a concentraciones subletales de elementos pesados también ha demostrado que puede causar inmunodepresión en crustáceos, provocando que los organismos sean más susceptibles a enfermedades infecciosas (Liao *et al.*, 2006; Abad-Rosales *et al.*, 2019). Por ejemplo, Yeh *et al.* (2004) observaron que la mortalidad de juveniles de *L. vannamei* ante un reto con *V. alginolyticus* aumentó significativamente en los camarones expuestos 48 h a 5, 10 y 20 mg/L de Cu; mientras que la mortalidad de los organismos infectados con la bacteria y expuestos a 1 mg/L de Cu no incrementó significativamente. Resultados similares fueron observados por Subramannian y Phillip (2012), quienes demostraron que una exposición de 14 días a 150 µg/L de Cu provocó un incremento significativo en la mortalidad de camarones infectados con el virus WSSV (White Spot Syndrome Virus, por sus siglas en inglés); sin embargo, también se observó que la mortalidad de los camarones expuestos a 75 µg/L de Cu disminuyó con respecto al tratamiento control. Esto último, es debido a que el Cu en concentraciones suficientes (bajas o moderadas) actúa como un elemento esencial que mejora el metabolismo de los organismos y promueve la respuesta inmune (Lee y Shiau, 2002; Bharadwaj *et al.* 2014).

Los resultados del presente estudio demuestran que la susceptibilidad de los juveniles ante una infección con *V. parahaemolyticus* no fue afectada significativamente después de una exposición de 96 h a 119 y 1190 µg/L de As en 5 y 25 g/L de salinidad (Figura 14); lo cual coincide con lo observado por Yeh *et al.* (2004) y Subramannian y Phillip (2012) en los tratamientos con los niveles más bajos de Cu, aunque también contrastan con lo observado por estos autores en los tratamientos con los niveles más elevados de Cu.

El aumento en la susceptibilidad de *L. vannamei* (Yeh *et al.*, 2004) y *F. indicus* (Subramannian y Phillip, 2012) ante *V. alginolyticus* y WSSV, respectivamente, fue correlacionada con un decremento en la capacidad de respuesta del sistema inmunológico (*i.e.*, decremento en el CTH, actividad fagocítica, fenoloxidasa, catalasa, así como a un incremento en la inducción de especies reactivas de oxígeno) provocado por las elevadas concentraciones de Cu ambiental, lo cual no fue observado en la concentración de Cu más baja probada en ambos estudios. En el presente estudio tampoco se observó un decremento significativo en el CTH de los camarones expuestos a 119 y 1190 µg/L de As (Tabla 23), lo cual sugiere que los niveles del metaloide

probados no fueron suficientemente elevados como para provocar una disminución significativa en la respuesta inmunológica de los camarones, y por tanto, un incremento en su susceptibilidad ante *V. parahaemolyticus*.

Cambios bruscos de salinidad de 25 a 5 g/L han demostrado que aumentan significativamente la susceptibilidad de *L. vannamei* ante un reto con *V. alginolyticus* (Wang y Chen, 2005), lo cual también ha sido observado para la misma especie de camarón y bacteria pero desde cambios de salinidad de 35 a 15 g/L (Li *et al.*, 2010). Este aumento en la susceptibilidad de *L. vannamei* ante una infección con *V. alginolyticus* ha sido explicado como resultado del incremento en el estrés osmótico, causando una hemodilución debido a la exposición a un medio hipo-osmótico, y por consecuencia un decremento en la actividad de parámetros inmunológicos (*i.e.*, CTH, actividad fenoloxidasa, superóxido dismutasa, fagocítica y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno).

En el presente estudio no se observó un efecto significativo de la salinidad sobre la susceptibilidad de *L. vannamei* ante un reto con *V. parahaemolyticus* (Figura 14), a pesar de que las salinidades evaluadas (5 y 25 g/L) fueron semejantes a las probadas por Wang y Chen (2005) y Li *et al.* (2010). Esto pudo deberse a que en el presente estudio los organismos fueron previamente aclimatados a 25 y 5 g/L de salinidad; es decir, los camarones no se sometieron a cambios bruscos de salinidad, lo cual evitó el estrés osmótico, un decremento significativo en el CTH (Tabla 23), así como una disminución en la respuesta inmunológica.

Con respecto al efecto combinado de la baja salinidad y la exposición a As sobre la susceptibilidad de *L. vannamei* ante la infección con *V. parahaemolyticus*, no se observó una interacción significativa de dichas variables sobre la susceptibilidad de los camarones a la infección bacteriana (Figura 14). Estos resultados indican que la susceptibilidad de una población de juveniles de *L. vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus* no incrementaría de presentarse en el ambiente niveles de As de 119 a 1190 $\mu\text{g/L}$ de As y salinidades de 5 a 25 g/L.

8.2.2. Evaluación de riesgo a la salud humana por consumo de músculo de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes niveles de arsénico y salinidad

En el presente estudio se determinaron los índices de peligrosidad para la salud humana (HQ, por sus siglas en inglés: Hazard Quotient) que representaría el consumo aparente del músculo

de los camarones expuestos a los diferentes tratamientos con As y salinidad evaluados (Tabla 25). Los valores de HQ determinados en los juveniles de *L. vannamei* expuestos 96 h a 0, 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As en 5 y 25 g/L de salinidad, demostraron que los camarones no acumularon suficiente As en el músculo como para representar un potencial riesgo para la salud de personas con masas corporales de entre 10 a 100 kg, asumiendo un consumo promedio de camarón de 1.37 kg/persona/año, el cual es la tasa de ingestión promedio al año de camarón en México (CONAPESCA, 2011).

Estos resultados llaman la atención considerando las altas concentraciones experimentales a las que fueron expuestos los camarones en el presente estudio, esto tomando en cuenta que la concentración típica promedio de As del agua de mar se encuentra entre 1 y 10 $\mu\text{g/L}$ (Mandal y Suzuki, 2002); no obstante, lo anterior se debe a que la estimación de los valores de HQ están basados en las concentraciones de As inorgánico (As_i) que fueron calculadas para el músculo de los camarones ensayados de acuerdo a la EFSA (2009), cuya proporción en relación a la concentración de As total en el músculo de los organismos es relativamente baja (*i.e.*, 3.5%) (ver apartado 6.4.4. en Materiales y Métodos), asimismo a la reducida tasa de ingestión anual de camarón por persona que existe en México.

Por otro lado, basados en las concentraciones de As_i estimadas en los músculos de los camarones expuestos a los diferentes tratamientos con As disuelto en el agua y salinidad evaluados en el presente estudio (*i.e.*, 0.014 y 0.012 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 0 $\mu\text{g/L}$ de As; 0.050 y 0.043 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 119 $\mu\text{g/L}$ de As; 0.059 y 0.050 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 1190 $\mu\text{g/L}$ de As), fueron calculadas las raciones máximas diarias de músculo que pueden consumirse en cada caso para no exceder la dosis de referencia de As_i establecida por la EPA (2018), considerando personas con 72 kg de peso (peso promedio en la población mexicana; CANAIVE, 2012).

Bajo este contexto, personas con dicho peso corporal no deberían consumir raciones diarias de 1542 y 1800 g de músculo de aquellos camarones expuestos al tratamiento control en 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente; en el caso de los camarones mantenidos en el tratamiento con 119 $\mu\text{g/L}$ de As en 5 y 25 g/L de salinidad, la ración de músculo que no debería ser excedida es de 432 y 502 g, respectivamente; mientras que para los camarones expuestos a 1190 $\mu\text{g/L}$ de As

en 5 y 25 g/L de salinidad, la ración máxima segura es de un consumo no mayor a 366 y 432 g, respectivamente.

Para el caso de los camarones expuestos al tratamiento control, la ración máxima diaria de consumo de músculo de camarón que puede ser considerada segura, ya que es poco probable de ser consumida por una persona; sin embargo, las raciones máximas diarias de consumo de músculo de camarón calculadas para los organismos expuestos a los tratamientos 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As en agua, parecen ser probables de ser consumidas y sobrepasadas por una persona con un peso cercano a la media nacional en México, sobre todo si se trata de un individuo que radica en la zona costera del país, donde la ingesta promedio de productos pesqueros siempre es más alta que el promedio nacional, y por tanto, podría estar en mayor riesgo de sufrir efectos adversos ocasionados por el As.

Por otro lado, de acuerdo a las concentraciones de As total determinadas en el músculo de los camarones examinados en el presente estudio (*i.e.*, 0.3 y 0.3 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 0 $\mu\text{g/L}$ de As; 1.4 y 1.2 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 119 $\mu\text{g/L}$ de As; 1.7 y 1.4 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 1190 $\mu\text{g/L}$ de As), se puede afirmar que una exposición de 96 h a 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As disuelto en el agua con salinidades de 5 y 25 g/L no causó que los organismos expuestos acumulasen concentraciones del metaloide mayores al límite máximo permisible de As para productos pesqueros que establece la norma oficial mexicana (*i.e.*, 80 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) NOM-242-SSA1-2009, DOF, 2011).

Es importante precisar que los escenarios de toxicidad subletal experimentados en el presente estudio fueron establecidos con el objetivo de evaluar concentraciones teóricamente seguras de As, con niveles de salinidad frecuentemente observados tanto en el ambiente natural como en estanques de cultivo; sin embargo, dichos niveles de As (*i.e.*, 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$) son comparables con niveles del metaloide encontrados en ambientes costeros del Pacífico mexicano (*i.e.*, 1900 $\mu\text{g/L}$), donde *L. vannamei* se desarrolla durante las etapas tempranas de su ciclo de vida (larvas-postlarvas hasta juveniles) (García-Hernández *et al.*, 2013); además, niveles de As incluso más altos a los probados en este estudio se han registrado en cuerpos de agua cercanos a estanques de cultivo de esta especie (*i.e.*, 5000 $\mu\text{g/L}$) (Huang *et al.*, 2003).

Por lo anterior, el análisis de riesgo para la salud humana desarrollado en el presente estudio cobra relevancia, debido a que no solo muestra que camarones expuestos a estos niveles teóricamente seguros de As no son riesgosos para la salud humana en México, sino también evidencia lo que puede estar ocurriendo en el ambiente natural, lo cual sugiere que es necesario realizar un monitoreo continuo de las concentraciones de As en camarones capturados en zonas donde se han reportado niveles de As comparables a los de este estudio, puesto que es probable que personas que habitan en zonas cercanas estén sobrepasando la ración máxima diaria segura de consumo de este metaloide.

8.2.3. Efecto de la baja salinidad y niveles subletales de mercurio sobre la oxihemocianina, CTH, bioacumulación del metal en músculo de juveniles de *L. vannamei* y su susceptibilidad ante una infección con *V. parahaemolyticus*

Diferentes estudios han probado concentraciones subletales equivalentes al 1 y 10% de la respectiva CL₅₀-96 h de metales en crustáceos (Santos *et al.*, 2000; Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014; 2015); sin embargo, en lo que se refiere al Hg, solo se ha encontrado en la literatura disponible el estudio realizado por Umarani *et al.* (2012). Estos autores observaron que una exposición de 15 días a una concentración equivalente al 10% (12 µg/L) de la CL₅₀-96 h de Hg provocó un incremento significativo en la mortalidad de *A. salina* en 40 g/L de salinidad. Un resultado similar fue observado en el presente estudio, debido a que un incremento en la mortalidad de camarones juveniles de *L. vannamei* fue observado después de 48 h de exposición, a una concentración equivalente al 10% de la CL₅₀-96 h de Hg estimada para 25 g/L de salinidad (150 µg/L), y probada en 5 y 25 g/L de salinidad (Tabla 27); sin embargo, también se observó que el 1% de dicha CL₅₀-96 h de Hg (15 µg/L) no produjo efectos letales durante el experimento (96 h) en las dos salinidades evaluadas.

La salinidad fue un factor que afectó a la mortalidad de los camarones expuestos al tratamiento con 150 µg/L de Hg, siendo más agudo el efecto del metal en los organismos mantenidos en la salinidad más baja (Tabla 27). En este contexto, la interacción significativa encontrada entre los factores nivel de Hg ambiental, salinidad y tiempo de exposición sugiere que una concentración equivalente al 10% de la CL₅₀-96 h de Hg calculada para 25 g/L de salinidad, no puede ser considerada como subletal para *L. vannamei*; mientras que el 1% de dicha CL₅₀-96 h de Hg

puede ser asumida como subletal para ambientes salobres y de baja salinidad (*i.e.*, desde 5 a 25 g/L).

Una de las variables bioquímicas que ha llamado la atención debido a su alta sensibilidad a los metales pesados es el monitoreo de la oxihemocianina (Qian *et al.* 2020). La oxihemocianina es la principal proteína encargada de transportar el oxígeno a través del cuerpo en los crustáceos, por lo tanto, cualquier alteración en sus niveles puede afectar la fisiología de los organismos (Cheng *et al.*, 2002). El Cd y Cu son elementos pesados que han demostrado pueden provocar un decremento significativo en los niveles de oxihemocianina en juveniles de *L. vannamei* (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014; 2015). Esta misma tendencia fue observada en los niveles de oxihemocianina de *L. vannamei* en el presente estudio, esto a las 96 h de exposición en 150 µg/L de Hg en 5 y 25 g/L de salinidad (Tabla 28); aunque en el tratamiento con 15 µg/L de Hg no se observó tal efecto sobre la oxihemocianina.

El efecto negativo del Cd y Cu sobre la oxihemocianina en *L. vannamei* fue atribuido al estrés ocasionado por el metal, lo que incrementó la demanda energética de los organismos, y a su vez, provocó que la oxihemocianina fuera utilizada como fuente de energía, misma que se fue agotando a través del tiempo sin poder ser reemplazadas por otra fuente energética debido a que los organismos no se alimentaron (Bautista-Covarrubias *et al.*, 2014; 2015). Aunque los organismos del presente estudio fueron alimentados, se observó que los camarones expuestos a 150 µg/L de Hg presentaron un consumo aparente de alimento del 50 y 70% a 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente.

El incremento en la demanda energética ocasionado por el Hg, aunado al decremento en el consumo aparente de alimento, pudo provocar la disminución en los niveles de oxihemocianina observada en los camarones expuestos al tratamiento con 150 µg/L de Hg, mientras que en los camarones sometidos a 15 µg/L de Hg, no se observó tal efecto porque el nivel del metal en el agua no fue suficientemente alto como para provocar un incremento en la demanda energética, y una disminución en el consumo de alimento.

Se ha demostrado que los niveles de oxihemocianina incrementan significativamente en *L. vannamei* cuando es expuesto a 3 g/L en relación a 32 g/L de salinidad, debido a que el estrés osmótico provoca un aumento en la demanda energética a causa de un incremento en la

actividad de los mecanismos de osmorregulación (Li *et al.*, 2007; 2008). Estos resultados difieren de los observados en el tratamiento control del presente estudio (Tabla 28), esto puede deberse a que el nivel de baja salinidad (5 g/L) ensayado fue más cercano al punto isosmótico de *L. vannamei* (25 g/L) que el empleado por Li *et al.* (2007; 2008), lo cual sugiere que el estrés osmótico presentado en los camarones de este estudio no incrementó de forma significativa la demanda energética.

En lo que se refiere al efecto combinado de la baja salinidad y concentraciones elevadas de metales sobre la oxihemocianina, actualmente no se ha encontrado ningún estudio enfocado a esta temática en la literatura disponible. No obstante, en el presente estudio se observó que el efecto de los niveles de Hg evaluados sobre la oxihemocianina de *L. vannamei* no se incrementó significativamente debido a la exposición al medio hipo-osmótico (Tabla 28).

Por otro lado, se sabe que concentraciones subletales de Hg pueden afectar significativamente el número de hemocitos circulantes (células encargadas de llevar a cabo los procesos relacionados al sistema inmunológico) en la hemolinfa de *C. maenas* (Truscott y White, 1990), *Macrobrachium idea* (Victor *et al.*, 1990), *Palaemon elegans* (Lorenzon *et al.*, 2011), *M. rosenbergii* (Kaoud *et al.*, 2011) *Scylla serrata* (Singaram *et al.*, 2013). Una tendencia similar fue observada en el presente estudio (Tabla 29), debido a que una disminución significativa en el CTH de *L. vannamei* se presentó a las 96 h de exposición en 150 µg/L de Hg en 5 y 25 g/L de salinidad, aunque este efecto no fue observado en el tratamiento con 15 µg/L de Hg.

Se ha demostrado que el Hg puede causar estrés oxidativo, y como consecuencia, apoptosis y necrosis celular en hemocitos (Jose *et al.*, 2011), branquias (Kaoud *et al.*, 2011) y tejido nervioso (Roos-Muñoz *et al.*, 2018). También se ha observado una movilización de hemocitos en tejidos dañados por Hg, lo cual es considerado como un mecanismo que permite reducir el daño a través de la coagulación y melanización, pero que disminuye la concentración de hemocitos en la hemolinfa (Victor *et al.*, 1990; Kaoud *et al.*, 2011); asimismo, se ha reportado que el Hg retrasa la maduración y liberación de hemocitos desde el tejido hematopoyético a la hemolinfa (Le Moullac y Haffner, 2000). Estos mecanismos de toxicidad del Hg explican la relación negativa observada en este estudio entre el CTH de *L. vannamei* y la concentración del metal en el agua.

Por otra parte, Roos-Muñoz *et al.* (2019) demostraron que el Hg afectó la concentración del CTH en juveniles de *L. vannamei* con talla similar (6.2 ± 0.7 g) a los empleados en el presente estudio (7.2 ± 0.6 g); sin embargo, dichos autores observaron que una exposición de 24 h a $2.3 \mu\text{g/L}$ de Hg en 34 g/L de salinidad fueron suficientes para disminuir significativamente el CTH en los camarones, lo cual contrasta con los resultados de este estudio porque una exposición de 24 h a una concentración más alta ($15 \mu\text{g/L}$) no provocó una disminución significativa en el CTH de los camarones examinados en ambas salinidades (Tabla 29). El número de hemocitos circulantes en la hemolinfa es sensible a los cambios ambientales (*e.g.*, cambios de temperatura, salinidad, pH, deterioro de la calidad del agua) (Le Moullac y Haffner, 2000; Wang y Chen, 2005; Jia *et al.*, 2014), razón por la cual se considera como un buen indicador de estrés o condición fisiológica (Lorenzon *et al.*, 2011).

En este contexto, y considerando que en *L. vannamei* con tallas de 4 a 13 g expuestos a salinidades desde 0.5 a 36 g/L se han determinado concentraciones de hemocitos desde 6.8×10^6 hasta 26.5×10^6 células/mL, siendo los valores promedio de hemocitos mayormente observados de 9×10^6 a 14×10^6 células/mL para esta especie (Yeh *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Wang y Chen, 2005; Vargas-Albores *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017), se puede especular que los camarones empleados por Roos-Muñoz *et al.* (2019) se encontraban inmunodeprimidos, puesto que al inició del experimento la concentración promedio de hemocitos fue de $4.5 \pm 0.7 \times 10^6$ células/mL, valor que es bajo comparado a las concentraciones promedio mayormente observadas para esta especie (Yeh *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Wang y Chen, 2005; Vargas-Albores *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017), así como con las concentraciones observadas al inicio del experimento en el presente estudio (*i.e.*, $16.5 \pm 2.8 \times 10^6$ y $15.3 \pm 2.0 \times 10^6$ células/mL para 5 y 25 g/L de salinidad respectivamente).

Los camarones ensayados por Roos-Muñoz *et al.* (2019) fueron recolectados desde una granja comercial, lo que sugiere que las condiciones ambientales en las que se desarrollaron los organismos probablemente no fueron apropiadas para la especie, lo cual explicaría los bajos niveles en el CTH reportados, así como la menor tolerancia al Hg que demostraron dichos organismos en comparación a los camarones probados en este estudio.

La salinidad es un factor ambiental que también ha demostrado que puede provocar cambios relevantes en el CTH en penaeidos (Le Moullac y Haffner, 2000; Li *et al.*, 2010). Esto ha sido observado en *F. paulensis* aclimatados a 13 y 34 g/L de salinidad, encontrándose valores de CTH significativamente menores en la menor salinidad, efecto que fue relacionado con una disminución en la actividad de división celular del tejido hematopoyético (Le Moullac y Haffner, 2000). No obstante, un efecto significativo de la baja salinidad sobre el CTH de los juveniles no fue observado en el presente estudio (Tabla 29), esto a pesar de que el nivel de baja salinidad evaluado fue menor al ensayado por dichos autores, lo cual probablemente se debe a que la capacidad osmorreguladora de *L. vannamei* es más eficiente que la de *F. paulensis*.

El efecto combinado de la salinidad y concentraciones elevadas de Hg sobre el CTH en crustáceos no ha sido previamente evaluado en la literatura disponible; sin embargo, en el presente estudio se observó que a pesar de que los niveles de hemocitos tendieron a ser menores en el tratamiento con la mayor concentración de Hg y baja salinidad a las 96 h, estadísticamente no se demostró un efecto de la salinidad, concentración de Hg y tiempo de exposición sobre el CTH en los organismos examinados bajo las condiciones experimentales descritas.

La capacidad de bioacumulación del Hg en el músculo de crustáceos ha llamado la atención por ser más alta que la observada en otros metales (Canli y Furnes, 1993; Verslycke *et al.*, 2003; Kaoud *et al.*, 2011), esto debido a que es el músculo abdominal el tejido consumido como alimento para la población humana (Zhang *et al.*, 2017). En un estudio donde fueron expuestos camarones *Crangon crangon* en agua de mar con 17 µg/L de Hg, se observó que la concentración del Hg acumulado en el músculo se mantuvo estadísticamente estable durante los 14 días de exposición, alcanzándose el nivel más alto del metal al final del periodo de exposición (Andersen y Baatrup, 1988).

Resultados similares fueron determinados en el presente estudio en el tratamiento con 15 µg/L de Hg en 5 y 25 g/L de salinidad, puesto que no se observó un incremento significativo en la bioacumulación del Hg en el músculo de los camarones durante los 4 días de exposición (Tabla 30). Estos resultados coinciden con los observados en langostas *Nephrops norvegicus* expuestas 30 días a 10 µg/L de Hg en agua de mar, debido a que la bioacumulación del metal no se incrementó significativamente en el músculo de los organismos (Canli y Furness, 1993). De

acuerdo a Andersen y Baatrup (1988) y Canli y Furnes (1933), la concentración de Hg en el músculo de *C. crangon* y *N. norvegicus* no se incrementó significativamente a través del tiempo, porque el metal acumulado quedó almacenado principalmente en las branquias y hepatopáncreas, lo cual también muy probablemente pudo haber ocurrido en los camarones del presente estudio.

Sin embargo, en el presente estudio se demostró que una exposición de 24 h a 150 µg/L de Hg en 5 y 25 g/L de salinidad ocasionó que el metal se acumulara significativamente en el músculo de *L. vannamei* (Tabla 30), lo cual coincide con lo observado en *M. rosenbergii*, debido a que 10 µg/L de Hg no ocasionaron un incremento significativo en la bioacumulación del metal en el músculo de los cangrejos, mientras que 100 y 200 µg/L de Hg provocaron un aumento significativo sobre la bioacumulación de Hg en el músculo de los organismos.

Cuando los crustáceos son expuestos a niveles ambientales de metales pesados relativamente bajos, el metal acumulado tiende a depositarse mayormente en el hepatopáncreas y las branquias, ya que estos son los órganos con la mayor capacidad de detoxificación, regulación y almacenaje de xenobióticos en los crustáceos (Andersen y Baatrup, 1988; Felix-Portillo *et al.* 2014); sin embargo, cuando los niveles ambientales de los metales sobrepasan la capacidad de regulación y almacenaje de xenobióticos de las branquias y hepatopáncreas, los metales son transportado a través de la hemolinfa acumulándose en el exoesqueleto y músculo (Zanders y Rojas, 1996; Zhang *et al.*, 2017). Esto explica porque el tratamiento con 15 µg/L de Hg no ocasionó una bioacumulación significativa del metal en el músculo de los camarones expuestos, mientras que en el tratamiento con 150 µg/L de Hg se determinó una bioacumulación significativa en el músculo de los organismos.

La salinidad es un factor que ha demostrado que influye de manera relevante en la capacidad de bioacumulación de los metales en el músculo de los crustáceos, presentándose mayores tasas de captación del metal cuando la salinidad disminuye (Wright, 1977; Zanders y Rojas, 1996; Blewett *et al.*, 2015). En el caso del Hg, este fenómeno ha sido observado en cangrejos *Cancer pagurus* expuestos a 1000 µg/L de Hg y 17 g/L de salinidad en relación a 34 g/L de salinidad (Bianchini y Gilles, 1996), lo cual coincide con los resultados del presente trabajo observados en el tratamiento con 150 µg/L de Hg, donde la bioacumulación del metal en el músculo fue

significativamente más elevada en la baja salinidad (5 g/L) en relación a la salinidad isosmótica (25 g/L) a las 24 y 48 h (Tabla 30).

Lo anterior ha sido relacionado con el aumento en la captación pasiva de las formas químicas hidrofílicas de los metales provocada por la exposición hipo-osmótica (Blewett *et al.*, 2015); así como al hecho de que las formas químicas de los metales con mayor biodisponibilidad (iones libres) disminuyen a menor salinidad (Verslycke *et al.*, 2003; Bielmyer-Fraser *et al.*, 2018).

La exposición a metales pesados como el Pb, Cu, Mn, Zn, Cd y Fe ha demostrado que estos pueden incrementar la susceptibilidad de *L. vannamei* a enfermedades infecciosas como la causada por el virus de la mancha blanca (*i.e.*, WSSV, white spot syndrome virus, por su siglas en inglés) (Abad-Rosales *et al.*, 2019). En lo que se refiere al Hg, diversos estudios han concluido que este metal puede provocar una disminución significativa en la respuesta inmune en decápodos como *M. idea* (Le Moullac *et al.*, 2000), *Palaemon elegans* (Lorenzon *et al.*, 2000), *M. rosenbergii* (Kaoud *et al.*, 2011) y *L. vannamei* (Roos-Muñoz *et al.*, 2019), lo cual incrementa la susceptibilidad de los organismos ante patógenos oportunistas; sin embargo, hasta el momento esto no había sido previamente demostrado experimentalmente empleando un patógeno específico.

Bajo dicho contexto, los resultados del presente estudio demostraron que una exposición de 96 h a 15 µg/L de Hg no incrementó la susceptibilidad de *L. vannamei* ante una infección con la bacteria *V. parahaemolyticus*; sin embargo, lo contrario fue observado después de una exposición a 150 µg/L de Hg en 5 y 25 g/L de salinidad, siendo los camarones expuestos en baja salinidad significativamente más susceptibles a *V. parahaemolyticus* que los sometidos al medio isosmótico (Figura 15). En otras palabras el efecto sinérgico ocasionado por el Hg y la baja salinidad aumentaron la sensibilidad de los camarones a la infección con *V. parahaemolyticus*.

Dichos resultados se correlacionan con el hecho de que en los camarones expuestos a 15 µg/L de Hg no se observó una disminución significativa sobre el consumo aparente de alimento, nivel de oxihemocianina y CTH, asimismo, no se determinó un aumento significativo en la captación del Hg en el músculo de los organismos, mientras que lo contrario ocurrió en los camarones expuestos a 150 µg/L de Hg.

Lo anterior sugiere que el efecto tóxico ocasionado por 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg no fue suficiente como para provocar una disminución significativa en la respuesta inmune del camarón, y por consecuencia en su susceptibilidad a *V. parahaemolyticus*. Además, también se puede inferir que el efecto tóxico causado por 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg disminuyó la capacidad inmune de los camarones, siendo este efecto más agudo en baja salinidad debido a la mayor captación del metal en los organismos, promovido por el estrés osmótico.

8.2.4. Evaluación de riesgo a la salud humana por consumo de músculo de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes niveles de mercurio y salinidad

El potencial riesgo para la salud humana que representa el consumo aparente del músculo de los camarones expuestos a los diferentes tratamientos con Hg y salinidad evaluados en este estudio, fue estimado calculando los respectivos índices de peligrosidad (HQ, por sus siglas en inglés: Hazard Quotient) (Tabla 31). Dichos valores de HQ demostraron que los organismos expuestos 96 h al tratamiento control en 5 y 25 g/L de salinidad no son riesgosos para personas con masas corporales de entre 10 a 100 kg; sin embargo, los camarones expuestos al tratamiento con 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg en 5 y 25 g/L de salinidad, acumularon suficiente metal en el músculo como para representar un potencial riesgo para la salud de personas con un peso de 10 kg; mientras que en el caso del tratamiento con 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg, se observó que los organismos expuestos a 5 g/L de salinidad representaron un alto riesgo para personas con pesos iguales o menores a 70 kg, aunque los camarones expuestos a 25 g/L de salinidad fueron riesgosos para personas con pesos de 10 a 60 kg. Lo anterior fue estimado considerando un escenario con tasas de consumo promedio de camarón de 1.37 kg/persona/año (*i.e.*, tasa de ingestión promedio de camarón en México) (CONAPESCA, 2011).

Por otro lado, con base en las concentraciones de metil-Hg (MeHg) estimadas en el músculo de los camarones expuestos a los diferentes tratamientos con Hg disuelto total en el agua y salinidad evaluados en el presente estudio (*i.e.*, 0.06 y 0.05 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 0 $\mu\text{g/L}$ de Hg total; 0.31 y 0.36 $\mu\text{g/g}$ (en p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg total; 2.12 y 1.61 $\mu\text{g/g}$ en (p.h.) para 5 y 25 g/L de salinidad en 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg total), fueron calculadas las raciones máximas diarias de músculo que pueden ser consumidas para cada caso sin exceder la dosis de referencia de MeHg (0.0001 mg/kg de peso corporal/día)

establecida por la EPA (2018), esto considerando personas con 72 kg de peso (peso promedio de la población mexicana; CANAIVE, 2012).

De acuerdo a lo anterior, personas con un peso promedio igual a la media nacional (72 kg) no deberían consumir raciones diarias de 1200 y 1411 g de camarones expuestos al tratamiento control en 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente, en el caso de los camarones mantenidos en el tratamiento con 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg total en 5 y 25 g/L de salinidad, la ración de músculo que no deberían ser excedidas son 228 y 198 g de camarones expuestos a 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg total en 5 y 25 g/L de salinidad, respectivamente; mientras que para los camarones expuestos a 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg total en 5 y 25 g/L de salinidad, la ración máxima segura es un consumo no mayor a 33 y 44 g, en el orden.

Para el caso de los camarones del tratamiento control, la ración máxima diaria de consumo de músculo se puede considerar segura, puesto que es poco probable de ser excedida por una persona; sin embargo, las raciones máximas diarias de consumo de músculo de camarón estimada para los tratamientos con 15 y 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg total en 5 y 25 g/L de salinidad parecen ser altamente probables de ser sobrepasadas por una persona con un peso cercano a la media nacional en México, particularmente por la población que habita en las zonas costeras del país, donde el consumo de productos pesqueros generalmente es más alto que el promedio nacional, y por tanto, dicha población es la que podría estar en mayor riesgo de sufrir efectos adversos relacionados al Hg.

Por otra parte, con base en las concentraciones estimadas de MeHg en el músculo de los camarones examinados en este estudio, se puede afirmar que una exposición de 96 h a 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg en 5 y 25 g/L de salinidad no causó que los organismos expuestos acumularan concentraciones del metal mayores al límite máximo permisible de MeHg para productos pesqueros que estable la norma oficial mexicana (*i.e.*, 1 $\mu\text{g/g}$ en p.h. NOM-242-SSA1-2009, DOF, 2011); sin embargo, los camarones expuestos al tratamiento con 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg en ambas salinidades acumularon concentraciones estimadas de MeHg superiores a dicho límite máximo permisible. Estos resultados demuestran que a pesar de que los camarones examinados fueron expuestos a concentraciones teóricamente seguras de Hg, ambientes con 15 y 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg y salinidades de 5 a 25 g/L no son recomendables para esta especie debido a que los organismos

expuestos podrían acumular concentraciones del metal en el músculo que podrían causar efectos adversos en la salud de las personas que los consumen.

Aunque se ha observado que los niveles de Hg encontrados en *L. vannamei* de cultivo (Delgado-Álvarez *et al.*, 2015) y silvestres (Frías-Espéricueta *et al.*, 2016) recolectados en diferentes regiones del noroeste de México no han representado un alto riesgo para la salud humana, existen ambientes marinos donde esta especie se distribuye naturalmente en los que se han reportado concentraciones de Hg más altas a las probadas en este estudio (1384 µg/L) (Prol-Ledesma *et al.*, 2004); así como ambientes de baja salinidad utilizados para el cultivo de esta especie en México con concentraciones de Hg comparables a las empleadas en el presente trabajo (33 µg/L; Ramírez-Rochín, 2014). Por lo anterior y considerando los resultados observados en este estudio, se puede especular que existen regiones en México donde poblaciones de cultivo y silvestres de *L. vannamei* están siendo expuestas a concentraciones de Hg riesgosas para los consumidores de estos organismos. Es por esto que se sugiere realizar un estudio de evaluación de riesgo a la salud humana de camarones recolectados en ecosistemas altamente impactados por actividades antropogénicas en México.

9. CONCLUSIONES

9.1. Toxicidad aguda y bioconcentración de arsénico y mercurio en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades

- La salinidad no fue un factor que afectase significativamente la toxicidad aguda del As y su capacidad de bioconcentración en el cuerpo de *L. vannamei*, a pesar de que las bajas salinidades (5 y 10 g/L) probadas fueron contrastantes al punto isosmótico (25 g/L).
- La capacidad de bioconcentración del As en el cuerpo completo del camarón fue proporcional a la concentración de As ambiental (disuelto) en los tratamientos y salinidades examinadas en un periodo de exposición de corto plazo (96 h).
- La toxicidad aguda del Hg en *L. vannamei* juveniles expuestos a baja salinidad (5 y 10 g/L) fue significativamente más alta que en un ambiente isosmótico (25 g/L).
- La capacidad de bioconcentración del Hg en el cuerpo de los camarones fue estadísticamente más elevada en ambientes con baja salinidad después de 96 h de exposición en los tratamientos con Hg.
- La tasa de acumulación de Hg en los camarones no se incrementó en proporción a la concentración ambiental del metal porque los mecanismos de captación y almacenamiento de los organismos se saturaron a mayores concentraciones de Hg ambiental en las tres salinidades ensayadas.
- Por lo tanto, la hipótesis que establece un efecto significativo de la baja salinidad sobre la toxicidad aguda y capacidad de bioconcentración del As y Hg, es rechazada para el As pero aceptada para Hg.

9.2. Toxicidad subletal del arsénico y mercurio en juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes salinidades

- Las concentraciones de As equivalentes al 1 (119 µg/L) y 10% (1190 µg/L) de la CL₅₀-96 h estimada para juveniles de *L. vannamei* en 25 g/L de salinidad, fueron apropiadas para determinar efectos subletales del metaloide en camarones expuestos a 5 y 25 g/L de salinidad, porque no provocaron efectos letales después de 96 h de exposición.

- La exposición de 96 h a 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As en 5 y 25 g/L de salinidad no afectó significativamente el consumo aparente de alimento, niveles de oxihemocianina, CTH y la susceptibilidad de los camarones expuestos ante una infección con *V. parahaemolyticus*, por lo que estos niveles de As pueden considerarse fisiológicamente seguros para juveniles de *L. vannamei*.
- Aunque los tratamientos con As evaluados no provocaron una bioacumulación del metaloide en el músculo de los camarones riesgosa para la salud humana de la población en general de México (*i.e.*, HQ < 1), es probable que las personas que habitan las zonas costeras, sobrepasen las raciones máximas diarias de consumo seguras estimadas considerando los camarones expuestos a dichos tratamientos con As. Por lo tanto, se concluye que las concentraciones de 119 y 1190 $\mu\text{g/L}$ de As no son concentraciones apropiadas para el cultivo de *L. vannamei* en aguas con salinidades de 5 a 25 g/L.
- Las concentraciones de Hg equivalentes al 1 (15 $\mu\text{g/L}$) y 10% (150 $\mu\text{g/L}$) de la CL₅₀-96 h calculada para los juveniles de *L. vannamei* en 25 g/L de salinidad, permitieron determinar efectos subletales del metal en camarones expuestos 96 h a 5 y 25 g/L de salinidad; no obstante, en el caso de la concentración más elevada no puede ser considerada estrictamente como subletal, porque produjo mortalidades significativamente más altas que los respectivos controles para ambas salinidades.
- La exposición de 96 h a 15 $\mu\text{g/L}$ de Hg en 5 y 25 g/L de salinidad no afectó significativamente el consumo aparente de alimento, niveles de oxihemocianina, CTH y la susceptibilidad de los camarones expuestos ante una infección con *V. parahaemolyticus*, sin embargo, la exposición a 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg ocasionó efectos adversos sobre dichas variables en ambas salinidades, aunque estos efectos fueron más agudos en baja salinidad, por lo que solo la concentración más baja del metal puede considerarse como fisiológicamente segura para juveniles de *L. vannamei*.
- La exposición a 15 y 150 $\mu\text{g/L}$ de Hg provocó una bioacumulación del metal en el músculo de los camarones significativamente riesgosa para la salud de la población en general de México (*i.e.*, HQ \geq 1), sobre todo en baja salinidad. Por lo tanto, se concluye que dichos niveles de Hg no son apropiados para el cultivo de *L. vannamei* en aguas con salinidades de 5 a 25 g/L.

- Por tanto, la hipótesis que sostiene que el efecto combinado de la baja salinidad y niveles de As y Hg equivalentes al 1 y 10% de sus respectivas CL_{50-96} h determinadas para un ambiente isosmótico, provoca alteraciones en los niveles de oxihemocianina, CTH, mayor susceptibilidad de los camarones ante una infección con *V. parahaemolyticus*, así como un incremento en la bioacumulación de los tóxicos en el músculo de los organismos representando un potencial riesgo para la salud humana, es rechazada para el As pero aceptada para el Hg.
- Como necesidad de investigación a futuro, se plantea evaluar durante periodos de exposición mayores (14 o 28 días), el efecto de concentraciones de As y Hg semejantes a las probadas en este estudio sobre otros biomarcadores de toxicidad, tales como actividades enzimáticas relacionadas al sistema inmune del camarón, mecanismos de osmorregulación y ensayos cometa para la determinación de daños al ADN, lo cual permitiría mejorar el entendimiento de la toxicología de estos elementos en esta importante especie de camarón.

10. LITERATURA CITADA

- Abad-Rosales SM, Frías-Espericueta MG, Romero-Bernal OG, Lozano-Olvera R, García-Gasca SA, Montoya-Rodríguez L, *et al.*, White spot syndrome virus (WSSV) infection and immunity responses in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to sublethal levels of metals. *Aquaculture Res.* 2019; 50: 758-764.
- Ahsanullah M, Arnott GH. Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to larvae of the crab *Paragrapsus quadridentatus* (H. Milne Edwards), and implications for water quality criteria. *Aust J Mar Freshw Res.* 1978; 29: 1-8.
- Ahsanullah M, Negilski DS, Mobley MC. Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*: Effects of individual metals. *Mar Biol.* 1981; 64: 299-304.
- Alday-Sanz V. The shrimp book. Nottingham: Nottingham University Press; 2010. 920 p.
- Andersen JT, Baatrup E. Ultrastructural localization of mercury accumulations in the gills, hepatopancreas, midgut, and antennal glands of the brown shrimp, *Crangon crangon*. *Aquat Toxicol.* 1988; 13: 309-324.
- Andres S, Laporte JM, Mason RP. Mercury accumulation and flux across the gills and the intestine of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Aquat Toxicol.* 2002; 56: 303-320.
- APHA-AWWA-WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater: eighteenth edition. Washington D.C: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation; 1992.
- Arredondo-Vega BO, Voltolina D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: Arredondo-Vega BO, Voltolina D, editores. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. La Paz: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2007. p. 17-25.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Substance Priority List; 2020 [citado 3 de diciembre del 2020]. Recuperado a partir de: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>.
- Bach J, Peremartí J, Annagi B, Marcos R, Hernández A. Reduced cellular DNA repair capacity after environmentally relevant arsenic exposure: Influence of Ogg1 deficiency. *Mutat. Res.* 2015; 779: 144-151.

- Barbieri E, Doi SA. The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*). *Mar Freshw Behav Physiol*. 2011; 44: 251-263.
- Barbieri E, Pasos EA, García CAB. Use of metabolism to evaluate the sublethal toxicity of mercury on *Farfantepenaeus brasiliensis* larvae (Latreille 1817, crustacean). *J. Shell Res*. 2005; 24: 1229-1233.
- Barbieri E, Tavares-Paes, E. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. *Chemosphere* 2011; 84: 9-16.
- Barradas C, Péqueux A. Uptake of mercury by the gills of the fresh water Chinese crab *Eriocheir sinensis* (Milne-Edwards). *Comp Biochem Physiol C*. 1986; 113: 157-160.
- Bautista-Covarrubias JC, Frías-Espericueta MG, Velarde-Montes GJ, Voltolina D, García-de la Parra LM, Soto-Jiménez MF. Relationships between copper and stress indicators in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Mar Freshw Behav Phys*. 2015; 48: 193-203.
- Bautista-Covarrubias JC, Velarde-montes GJ, Voltolina D, García-de la Parra LM, Soto-Jiménez MF, Frías-Espericueta MG. Humoral and haemocytic responses of *Litopenaeus vannamei* to Cd exposure. *Scient W J*. 2014; doi: 10.1155/2014/903452.
- Bergés-Tiznado ME, Páez-Osuna F, Notti A, Regoli F. Arsenic and arsenic species in cultured oyster (*Crassostrea gigas* and *C. corteziensis*) from coastal lagoons of the SE Gulf of California, Mexico. *Biol Trace Elem Res*. 2013; 151: 43-49.
- Bharadwaj AS, Patnaik S, Browdy CL, Lawrence AL. Comparative evaluation of an inorganic and a commercial chelated copper source in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed diets containing phytic acid. *Aquaculture* 2014; 422: 63-68.
- Bianchini A, Gilles R. Toxicity and accumulation of mercury in three species of crabs with different osmoregulatory capacities. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1996; 57: 91-98.
- Bielmyer-Fraser GK, Harper B, Picariello C, Albritton-Ford A. The influence of salinity and water chemistry on acute toxicity of cadmium to two euryhaline fish species. *Comp Biochem Physiol C*. 2018; 214: 23-27.

- Bienvenue E, Boudou A, Desmazes JP, Gavach C, Georgescauld D, *et al.* Transport of mercury compounds across bimolecular lipid membranes: effect of lipid composition, pH and chloride concentration. *Chem Biol Interact.* 1984; 48: 91-101.
- Bjerregaard P, Vislie T, Effects of mercury on ion and osmoregulation in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comp Biochem Physiol. C* 1985; 82: 227–230.
- Blewett TA, Glover CN, Fehsenfeld S, Lawrence MJ, Niyogi S, Goss GG, *et al.* Making sense of nickel accumulation and sub-lethal toxic effects in saline waters: fate and effects of nickel in the green crab, *Carcinus maenas*. *Aquat Toxicol.* 2015; 164: 23–33.
- Boone W, Schoffeniels E. 1979. Haemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas*. *Comp Biochem Physiol B.* 1979; 63: 2017-2014.
- Boyd CE. Trace metals toxic at high concentrations. *Glob Aquaculture Advo.* 2009; 12: 24-26.
- Boyd CE. Water quality for pond aquaculture. Research and Development Series No. 43 International Center for Aquaculture and Aquatic Environment. Auburn: Auburn University; 1998. 36 p.
- Boudet LC, Polizzi P, Romero MB, Robles A, Gerpes M. Lethal and sublethal effects of cadmium in the white shrimp *Palaemonetes argentinus*: A comparison between populations from contaminated and reference sites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013; 89: 52-58.
- Bray WA, Lawrence AL, Leung-Trujillo JR. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture* 1994; 122: 133–146.
- Bryant V, Newbery DM, McLusky DS, Campbell R. 1985. Effect of temperature and salinity on the toxicity of arsenic to three estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*, *Tubifex costatus*). *Mar Ecol Prog Ser.* 1985; 24: 129-137.
- Buikema AL, Niederlehner BR, Cairins J. Biological Monitoring. Part IV – Toxicity testing. *Water Res.* 1982; 16: 239-262.
- Byrne RH, Kump LR, Cantrell KJ. The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Mar Chem.* 1988; 163-181.
- Campa-Córdova AI, León-Gallo AF, Romero-Maldonado A, Ibarra-Serrano AC, Rosales-Mendoza S, Hirono I, *et al.* Recombinant PirA-like toxin protects shrimp against challenge with *Vibrio*

- parahaemolyticus*, the aetiological agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. J Fish Dis. 2017; doi:10.1111/jfd.12625.
- CANAIVE. Cuánto mide México? El tamaño sí Importa. México DF: Cámara Nacional de la industria del vestido; 2012. 42 p.
- Canli M, Furness RW. Toxicity of heavy metals dissolved in sea water and influences of sex and size on metal accumulation and tissue distribution in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. Mar Environ Res. 1993; 36: 217-236.
- Castille FL, Lawrence AL. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. Comp Biochem Physiol. 1981; 68: 75-80.
- Chandurvelan R, Marsden ID, Gaw S, Glover CN. Acute and sub-chronic effects of sub-lethal cadmium exposure on energy metabolism in the freshwater shrimp, *Paratya curvirostris*. Ecotoxicol Environ Saf. 2017; 135: 60-67.
- Chang M, Wang WN, Wang AL, Tian TT, Wang P, Zheng Y, Liu Y. Effects of cadmium on respiration burst, intracellular Ca^{2+} and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comp Biochem Physiol C. 2009; 149: 581-586.
- Chávez-Ramos MA. Efecto subletal del arsénico en tejidos de *Litopenaeus vannamei*: bioconcentración y distribución en baja salinidad [tesis de licenciatura]. Mazatlán: Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa; 2019. 68 p.
- Chen JC, Cheng SY, Chen CT. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicas* exposed to ambient ammonia. Comp Biochem Physiol A. 1994; 109: 339-347.
- Chen JC, Lin CH. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture 2001; 192: 55-65.
- Cheng W, Chieu HT, Tsai CH, Chen JC. Effects of dopamine on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Sell Immunol. 2005; 375-383.
- Cheng W, Liu CH, Yan DF. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. Aquaculture 2000; 22: 325-339.
- Cheng W, Liu CH, Yan DF, Chen JC. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality

- and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. *Aquaculture* 2002; 211: 325-339.
- Chin TS, Chen JC. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 1987; 66: 247-253.
- Cresswell T, Smith REW, Nuggeoda D, Simpson SL. Comparing trace metal bioaccumulation characteristics of three freshwater decapods of the genus *Macrobrachium*. *Aquat Toxicol.* 2014; 152: 256-263.
- Cobo ML, Sonnenholzner S, Wille M, Sorgeloos P. Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Res.* 2014; 45: 470–475.
- CONAPESCA. Anuario estadístico de pesca y acuicultura. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, Instituto Nacional de Pesca. 2011; Mazatlán.
- CONAPESCA. Información estadística por especie y entidad; 2020 [citado 13 marzo del 2020]. Recuperado a partir de: https://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/informacion_estadistica_por_especie_y_entidad.
- Connor PM. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar Pollut Bull.* 1972; 3: 190-192.
- Cordeiro L, Müller L, Gelesky MA, Wasielesky W, Fattorini D, Regoli, F, *et al.* Evaluation of coexposure to inorganic arsenic and titanium dioxide nanoparticles in the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Environ Sci Pollut Res.* 2016; 23: 1214-1223.
- Costa A, Buglione C, Bezerra F, Martins P, Barracco M. Immune assessment of farmreared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture* 2009; 291: 141–146.
- Culberson C, Pytkowicz RM, Hawley JE. Seawater alkalinity determination by the pH method. *J Mar Res.* 1969; 3: 156-161.
- Cullen W, Reimer KJ. Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev.* 1989; 89: 713-764.
- Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Sharples DJ. The biology of the Penaeidae. London: Academic Press Limited; 1990. 489 p.
- Das S, Sahu BK. Toxicity of Hg (II) to prawns *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus* (Crustacea: Penaeidae) from Rushikulya estuary, Bay of Bengal. *Indian J Mar Sci.* 2002; 31: 337-339.

- DeForest DK, Brix KV, Adams WJ. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat Toxicol.* 2007; 84, 236-246.
- Delgado-Álvarez CG, Ruelas-Inzunza J, Osuna-López JI, Voltolina D, Frías-Espéricueta MG. Mercury content and their risk assessment in farmed shrimp *Litopenaeus vannamei* from NW Mexico. *Chemosphere* 2015; 119: 1015-1020.
- Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, Rodríguez J, Bulet P, Comps M y Bachère E. Penaedins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci.* 2000; 113: 461-469.
- Devi M, Fingerman M. Inhibition of the acetylcholinesterase activity in the central nervous tissue of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium and lead. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1995; 55: 746–750.
- Doi SA, Lisboa-Collaco F, Sturaro LGR, Barbieri E. Lead's effects on oxygen consumption and ammonia excretion in the pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) in relation to salinity. *O Mundo Saúde Sao Paulo* 2012; 36: 594-601.
- DOF. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales; 1997 [citado el 21 julio del 2018]. Recuperado a partir de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997.
- DOF. Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y Servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y método de prueba; 2011 [citado el 25 de julio del 2020]. Recuperado a partir de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5177531&fecha=10/02/2011.
- Dugassa H, Gaetan G. Biology of white leg shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. *World J Fish Mar Sci.* 2018; 10: 5-17.
- Dutton J, Fisher NS. Salinity effects on the bioavailability of aqueous metals for the estuarine killifish *Fundulus heteroclitus*. *Environ Toxicol Chem.* 2011; 30: 2017-2114.
- Edwards RRC. The fishery and fisheries biology of *penaeid* shrimp on the Pacific coast of Mexico. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev.* 1978; 16: 145-180.

- EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* 2009; 34: 1-14.
- Eisler R, Hennekey RJ. Acute Toxicities of Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} to estuarine macrofauna. *Arch Environm Contam Toxicol.* 1977; 6: 315-323.
- EPA. Integrated Risk Information System (IRIS): Chemical Assessment summary. Environmental Protection Agency, Washington DC; 2018 [citado 23 de diciembre del 2018]. Recuperado a partir de: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0278_summary.pdf#nameddest=rfd.
- EPA. National Recommended Water Quality Criteria — Aquatic Life Criteria. Environmental Protection Agency, Washington DC; 2020 [citado 12 de marzo 2020]. Recuperado a partir de: <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>.
- Esparza-Leal HM, Ponce-Palafox JT, Valenzuela-Quiñónez W, Cabanillas-Beltrán H, Arredondo-Figueroa JL. The effect of low salinity water with different ionic composition on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in intensive culture. *J. App. Aquaculture* 2009; 21: 215-227.
- FAO. Global Aquaculture production 1950-2018; 2020 [citado 2 de diciembre del 2020]. Recuperado a partir de: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/es>.
- FAO. Programa de Información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*; 2006 [citado 3 de diciembre del 2020]. Recuperado a partir de: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es.
- Felix-Portillo M, Martinez-Quintana JA, Peregrino-Uriarte AB. The metallothionein gene from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and expression in response to hypoxia. *Mar Environ Res.* 2014; 91-100.
- Fowler SW, Ünlü MY. Factors affecting bioaccumulation and elimination of arsenic in the shrimp *Lysmata seticaudata*. *Chemosphere* 1978; 7: 711-720.

- Frías-Espericueta MG, Abad-Rosales S, Nevárez-Velázquez AC, Osuna-López I, Páez-Osuna F, Lozano-Olvera R, *et al.* Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicol.* 2008; 89: 152-157.
- Frías-Espericueta MG, Aguilar-Juárez M, Osuna-López I, Abad-Rosales S, Izaguirre-Fierro G, Voltolina D. Los metales y la camaronicultura en México. *Hidrobiológica* 2011; 21: 217-228.
- Frías-Espericueta MG, Ramos-Magaño BY, Ruelas-Inzunza J, Soto-Jiménez MF, Escobar-Sánchez O, Aguilar-Juárez M, *et al.* Mercury and selenium concentrations in marine shrimps of NW Mexico: health risk assessment. *Environ Monit Assess.* 2016; doi: 10.1007/s10661-016-5645-0.
- Frías-Espericueta MG, Voltolina D, Osuna-López JI. Acute toxicity of cadmium, mercury, and lead to whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2001; 67: 580-586.
- Frías-Espericueta MG, Voltolina, D, Osuna-López JI. Acute toxicity of copper, zinc, iron, and manganese and of the mixtures copper-zinc and iron-manganese to whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2003; 71: 68-74.
- Frías-Espericueta, MG, Harfush-Melendez M, Osuna-López JI, Páez-Osuna F. Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1999; 62: 646-652.
- García-Hernández J, Glenn EP, Flessa K. Identification of chemicals of potential concern (COPECs) in anthropogenic wetlands of the Colorado River delta. *Ecol Eng.* 2013; 59: 52-60.
- Girón-Pérez MI, Romero-Bañuelos CA, Toledo-Ibarra GA, Rojas-García AE, Medina-Díaz IM, Robledo-Marenco ML, *et al.* Evaluation of pollution in Camichin estuary (Mexico): Pro-oxidant and antioxidant response in oyster (*Crassostrea corteziensis*). *Comp Biochem Physiol A.* 2013; 165: 476-482.
- Godínez-Siordia DE, Chávez-Sánchez MC, Gómez-Jiménez S. Epicontinental aquaculture of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Trop Subtrop Agroecosys.* 2011; 14: 55-62.
- Greani S, Lourkisti R, Berti L, Marchand B, Giannettini J, Santini J, *et al.* Effect of chronic arsenic exposure under environmental conditions on bioaccumulation, oxidative stress, and

- antioxidant enzymatic defense in wild trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). *Ecotoxicol.* 2017; 26: 930-941.
- Green FA, Anderson JW, Petrocelli SR, Presley BJ, Sims R. Effect of mercury on the survival, respiration, and growth of postlarval white shrimp, *Penaeus setiferus*. *Mar Biol.* 1976; 37: 75-81.
- Greenwood JG, Fielder DR. Acute toxicity of zinc and cadmium to zoea of three species of portunid crabs (Crustacea: Brachiura). *Comp Biochem Physiol.* 1983; 75: 141-144.
- Grosell M, Blanchard J, Brix KV, Gerdes R. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquat Toxicol.* 2007; 84: 162–172.
- Gutknecht J. Inorganic mercury (Hg²⁺) transport through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol.* 1981; 61: 6-66.
- Hoang VAT, Sakamoto M, Yamamoto M. Mercury and selenium levels, and their molar ratios in several species of commercial shrimp in Japan regarding the health risk of methylmercury exposure. *J Toxicol Sci.* 2017; 42: 509-517.
- Huang XH, Li CL, Zheng L, Liu CW, Zhou J. The toxicity of NO₂-N on *Litopenaeus vannamei* and effects of NO₂-N on factors relating to the anti-disease ability. *Acta Hydrobiol. Sinica* 2006; 30: 466–471.
- Huang, YK, Lin KH, Chen HW, Chang CC, Liu CW, Yang MH, et al. Arsenic species contents at aquaculture farm and in farmed mouthbreeder (*Oreochromis mossambicus*) in blackfoot disease hyperendemic areas. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41: 1491-1500.
- Hunter DA, Goessler W, Francesconi KA. Uptake of arsenate, trimethylarsine oxide, and arsenobetaine by the shrimp *Crangon crangon*. *Mar Biol.* 1998; 131: 543-552.
- Jia X, Wang F, Lu Y, Zhang D, Dong S. Immune responses of *Litopenaeus vannamei* to thermal stress: a comparative study of shrimp in freshwater and seawater conditions. *Mar Freshw Behav Physiol.* 2014; 47: 79-92.
- Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K, Söderhäll K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 2000; 191: 45-52.
- Johnson MW, Gentile JH. Acute toxicity of cadmium, copper, and mercury to larval American lobster *Homarus americanus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1979; 22: 258-264.

- Jose S, Jayesh P, Mohandas A, Philip R, Bright-Singh IS. Application of primary haemocyte culture of *Penaeus monodon* in the assessment of cytotoxicity and genotoxicity of heavy metals and pesticides. *Mar Environ Res.* 2011; 71: 169-177.
- Kaoud HA, Zaki MM, Ismail MM. Effect of exposure to mercury on health in tropical *Macrobrachium rosenbergii*. *Life Sci J.* 2011; 8: 154-163.
- Kraus ML, Kraus DB. Differences in the effects of mercury on predator avoidance in two populations of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Mar Environ Res.* 1986; 18: 277-289.
- Krishnaja AP, Rege MS, Joshi AG. Toxic effects of certain heavy metals (Hg, Cd, Pb, As and Se) on the intertidal crab *Scylla serrata*. *Mar Environ Res.* 1987; 21: 109-119.
- Kumari B, Kumar V, Sinha AK, Ahsan J, Ghosh AK, Wang H, *et al.* Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environ Chem Lett.* 2017; 15: 43–64.
- Laporte JM, Andres S, Mason RP. Effect of ligands and other metals on the uptake of mercury and methylmercury across the gills and the intestine of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Comp Biochem Physiol.* 2002; 131: 185-196.
- Laporte JM, Truchot JP, Ribeyre F, Boudou A. Combined effects of water pH and salinity on the bioaccumulation of inorganic mercury and methylmercury in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar Pollut.* 1997; 34: 880-893.
- Le Moullac, G. Haffner, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 2000; 191: 121-131.
- Lee JH, Kang HM, Kim DH, Wang M, Jeong CB, Lee JS. Adverse effects of methylmercury (MeHg) on life parameters, antioxidant systems, and MAPK signaling pathways in the copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat Toxicol.* 2017; 184: 133-141.
- Lee MH, Shiau S. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. *Fish Shell. Immunol.* 2002; 13: 259-270.
- Leonard EM, Barcarolli I, Silva KR, Wasielesky W, Wood CM, Bianchini A. The effects of salinity on acute and chronic nickel toxicity and bioaccumulation in two euryhaline crustaceans: *Litopenaeus vannamei* and *Excirolana armata*. *Comp Biochem Physiol C.* 2011; 154: 409-419.
- Li CC, Yeh ST, Chen JC. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. *Fish Shell Immunol.* 2010; 28: 121-127.

- Li E, Chen L, Zeng C, Chen X, Yu N, Lai Q, *et al.* Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture* 2007; 265: 385-390.
- Li E, Xiong Z, Chen L, Zeng C, Li K. Acute toxicity of boron to juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei* at two salinities. *Aquaculture* 2008; 278: 175-178.
- Li Y, Wang WX, Wang M. Alleviation of mercury toxicity to a marine copepod under multigenerational exposure by ocean acidification. *Sci Rep.* 2017; 7: 1-9.
- Liao CM, Chan CF, Yeh CH, Chen SC, Chiang KC, Chio CP, *et al.* Metal stresses affect the population dynamics of disease transmission in aquaculture species. *Aquaculture.* 2006; 257: 321-332.
- Liao S, Li Q, Wang A, Xian J, Chen X, Gou N, *et al.* Effect of nitrite on immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low temperature and low salinity. *Ecotoxicol.* 2012; 21: 1603-1608.
- Liu CH, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shell Immunol.* 2004; 16: 321-334.
- Lobato RO, Nunes SM, Fattorini D, Regoli F, Wasielesky W, Monserrat JM, *et al.* The effect of diet enriched with lipoic acid in the accumulation and metabolism of metals in different organs of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Res.* 2018; 49: 3702-3710.
- Lobato RO, Nunes SM, Wasielesky W, Fattorini D, Regoli F, Monserrat, JM. *et al.* The role of lipoic acid in the protection against of metallic pollutant effects in the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comp Biochem Physiol.* 2013; 165: 491-497.
- Lorenzon S, Francese M, Smith VJ, Ferrero EA. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish Shell Immunol.* 2011; 11: 549-472.
- Luis-Villaseñor, IE, Castellanos-Cervantes T, Gómez-Gil B, Carrillo-García AE, Campa-Córdova AI, Ascencio F. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013; 29: 257-265.
- Luoma SN, Rainbow PS. *Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management.* New York: Cambridge University Press; 2008. 573 p.

- Mackay D, Fraser A. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ Pollut.* 2000; 110: 375-391.
- Mair JM, Watkins JL, Williamson DI. Factors affecting the immigration of postlarval penaeid shrimp into a Mexican lagoon system. *Ocean Acta* 1982; 339-345.
- Manahan SE. *Environmental Chemistry*. Boca Raton: Taylor & Francis; 2010. 753 p.
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 2002; 58: 201-235.
- Mariño-Balsa JC, Poza-Vázquez E, Beiras R. Comparative toxicity of dissolved metals to early larval stage of *Palemon elegans*, *Maja squinado* and *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Arch Environ Contam Toxicol.* 2000; 39: 345-351.
- Martin M, Osborn KE, Billig P, Glickstein N. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* Larvae. *Mar Pollut Bull.* 1981; 12: 305-308.
- Mason RP, Fitzgerald WF, Morel MM. The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences. *Geochim Cosmochim Acta* 1994; 58: 3191-3198.
- McGeer JC, Brix KV, Skeaff JM, DeFores DK, Brigham SI, Adams WJ, *et al.* Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem.* 2003; 22: 1017–1037.
- McLusky DS, Hagerman L. The toxicity of chromium, nickel and zinc: effects of salinity and temperature, and the osmoregulatory consequences in the mysid *Praunus flexuosus*. *Aquat Toxicol.* 1987; 10: 225-238.
- Metian M, Hédouin L, Eltayeb, MM, Lacoue-Labarthe T, Teyssié JL, Mugnier C, *et al.* Metal and metalloid bioaccumulation in the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (stimpson) from New Caledonia: Laboratory and field studies. *Mar Pollut Bull.* 2010; 61: 576-584.
- Millero F. *Chemical Oceanography*. Boca Raton: CRC Press; 2006. 469 p.
- Moody J, Lindstrom R. Selection and cleaning of plastic containers for storage of trace element samples. *Analy Chem.* 1977; 49: 2264–2267.
- Morales V, Cuellar-Anjel J. *Guía Técnica - Patología e inmunología de camarones penaeidos*. Panamá: OIRSA; 2014. 382 p.
- Newman MC, Unger MA. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Boca Raton: CRC Press; 2003. 458 p.

- Nickerson KW, Van-Holde KE. A comparison of molluscan and arthropod haemocyanin. Circular dichroism and absorption spectra. *Comp Biochem Physiol.* 1971; 39: 855-872.
- Nimmo DR, Lighter DV, Bahner LH. 1977. *Physiological Responses of Marine Biota to Pollutants.* New York: Academic Press; 1977. 183 p.
- NRC-CNRC. DOLT-4, Dogfish liver Certified Reference Material for Trace Metals. Ottawa: National Research Council Canada – Conseil National de Recherches; 2012.
- NRC-CNRC, 2014. DOLT-5, Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals. National Research Council Canada, Ottawa.
- Nugeoda D, Rainbow PS. Salinity, osmolality and zinc uptake in *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Mar Ecol Prog Ser.* 1989; 55: 149-157.
- Núñez-Nogueira G, Mouneyrac C, Muntz A, Fernandez-Bringas Laura. Metallothionein-like proteins and energy reserve levels after Ni and Pb exposure in the Pacific white prawn *Penaeus vannamei*. *J Toxicol.* 2010; doi: 10.1155/2010/407360.
- Núñez-Nogueira G, Fernández-Bringas L, Ordiano-Flores A, Gómez-Ponce A, Ponce de León-Hill C, González-Farías F. Accumulation and regulation effects from the metal mixture of Zn, Pb, and Cd in the tropical shrimp *Penaeus vannamei*. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 150: 208-2013.
- Oliveira-Cesar JR, Zhao B, Malecha S, Ako H, Yang J. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture* 261; 688-694.
- Olmedo P, Pla A, Hernández AF, Barbieri F, Ayouni L, Gil F. Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environ Int.* 2013; 59: 63-72.
- Osuna-Martínez CC, Armienta MA, Bergés-Tiznado ME, Páez-Osuna F. Arsenic in waters, soils, sediments, and biota from Mexico: An environmental review. *Sci Total Environ.* 2021; doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142062.
- Outridge PM, Mason RP, Wang F, Guerrero S, Heimbürger LE. Updated global and oceanic mercury budgets for the United Nations Global Mercury Assessment 2018. *Environ Sci Technol* 2018; 52: 11466–11477.

- Páez-Osuna F, Álvarez-Borrego S, Ruiz-Fernández AC, García-Hernández J, Jara-Marini ME, Bergés-Tiznado ME, *et al.*, Environmental status of the Gulf of California: A pollution review. 2017; *Earth Sci Rev.* 166: 181-205.
- Páez-Osuna F. Metales en camarón de cultivo y silvestre: importancia, efectos y transferencia trófica. México: Universidad Nacional Autónoma de México, El colegio de Sinaloa, Universidad Politécnica de Sinaloa, Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora; 2011. 438 p.
- Paila RV, Yallapragada PR. Bioaccumulation and toxic effects of copper on growth and oxygen consumption by the postlarvae of *Penaeus indicus*. *Chem Ecol.* 2010; 26: 209-221.
- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, *et al.* The biotic ligand model: a historical overview. *Comp Biochem Physiol C.* 2002; 133: 3-35.
- Peng T, Wang WN, Gu MM, Xie CY, Xiao YC, Liu Y, *et al.* Essential roles of Cdc42 and MAPK in cadmium-induced apoptosis in *Litopenaeus vannamei*. *Aquat Toxicol.* 2015; 163: 89-96.
- Péqueux A, Bianchini A, Gilles R. 1996. Mercury and osmoregulation in the euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp Biochem Physiol C.* 1996; 113: 149-155.
- Péqueux A. Osmotic regulation in crustaceans. *J Crustac Biol.* 1995; 15: 1-60.
- Philp R. Ecosystem and human health: toxicology and environmental hazards. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2013. 418 p.
- Phillips DJH. Arsenic in aquatic organisms: a review, emphasizing chemical speciation. *Aquat Toxicol.* 1990; 16: 151-186.
- Piazza V, Gambardella C, Canepa S, Costa E, Faimali M, Garaventa F. Temperature and salinity effects on cadmium toxicity on lethal and sublethal responses of *Amphibalanus amphitrite* nauplii. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016; 123: 8-17.
- Pierron F, Baudrimont M, Boudou A, Massabuau JC. Effects of salinity and hypoxia on cadmium bioaccumulation in the shrimp *Palaemon longirostris*. *Environ Toxicol Chem.* 2007; 26: 1010-1017.
- Prapaiwong N, Boyd CE. Trace elements in waters of inland, low-salinity shrimp ponds in Alabama. *Aquaculture Res.* 2014; 45: 327-333.

- Prol-Ledesma RM, Canet C, Torres-Vera MA, Forrest MJ, Armienta MA. Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico. *J volcanol Geotherm Res.* 2004; 137: 311-328.
- Qian D, Xu C, Chen C, Qin JG, Chen L, Li E. Toxic effect of chronic waterborne copper exposure on growth, immunity, anti-oxidative capacity and gut microbiota of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shell Immunol.* 2020; 100: 445-455.
- Qin Z, Babu VS, Wan Q, Zhou M, Liang R, Muhammad A, Zhao L, Li J, Lan J, Lin L. Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged by *Vibrio parahaemolyticus* reveals unique immune-related genes. *Fish Shell Immunol.* 2018; 77: 164-174.
- Ramírez-Rochín J. Estudio sobre el efecto del nitrito en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* expuestos a baja salinidad [tesis de maestría]. Mazatlán: Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa; 2014. 91 p.
- Ray GL, Tripp MR. The uptake of mercury from water by the grass shrimp, *Palaemonetes vulgaris*. *J Environ Qual.* 1976; 5: 193-196.
- Rivas-Montaña, AM, Luis-Villaseñor IE, Piña-Valdez P, Gómez-Gil B, Lizarraga-Partida ML. Distribución espaciotemporal de *Vibrio parahaemolyticus* con relación a los parámetros ambientales en una laguna costera en la costa del Pacífico del noroeste de México. *Cienc Mar.* 2018; 44: 141-153.
- Romano N, Zeng C. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapods crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanism. *Rev Fisheries Sci.* 2013; 21: 1-21.
- Ronci L, Matthaeis E, Chimenti C, Davolos D. Arsenic-contaminated freshwater: assessing arsenate and arsenite toxicity and low-dose genotoxicity in *Gammarus elvirae* (Crustacea; Amphipoda). *Ecotoxicol.* 2017; 26: 581-588.
- Roos-Muñoz S, Abad-Rosales SM, Aguilar-Juárez M, Frías-Espericueta MG, Voltolina D. Acute toxicity of mercury and nervous tissue damage in postlarvae and juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Thalassas* 2018; doi: 10.1007/s41208-018-0085-y.
- Roos-Muñoz S, Voltolina D, Aguilar-Juárez M, Abad-Rosales S, Bautista-Covarrubias JC, Bañuelos-Vargas MI, et al. DNA damage and immunological responses in the whiteleg shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) exposed to sublethal levels of mercury. Bull Environ Contaminant Toxicol. 2019; 102: 186-190.
- Rosenberg R, Costlow JD. Synergistic effects of cadmium and salinity combined with constant and cycling temperatures on the larval development of two estuarine crab species. Mar Biol. 1976; 38: 291-303.
- Roy LA, Davis DA, Saoud IP, Boyd CA, Pine HJ, Boyd CE. Shrimp culture in inland low salinity waters. Aquaculture 2010; 2: 191-208.
- Ruelas-Inzunza J., García-Rosales SB, Páez-Osuna F. Distribution of mercury in adult penaeid shrimps from Altata-Ensenada del Pabellón lagoon (SE Gulf of California). Chemosphere 2004; 57: 1657-1661.
- Santos MHS, Cunha NT, Bianchini A. Effects of copper and zinc on growth, feeding and oxygen consumption of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae (Decapoda: Penaeidae). J Exp Mar Biol Ecol. 2000; 233-242.
- Singaram G, Harikrishnan T, Chen FY, Bo J, Giesy JP. Modulation of immune-associated parameters and antioxidant responses in the crab (*Scylla serrata*) exposed to mercury. Chem. 2013; 90: 917-928.
- Sivadasan CR. Nambisan PNK, Damodaran R. Toxicity of mercury, copper and zinc to the prawn *Metapenaeus dobsoni*. Current Sci. 1986; 55: 337-340.
- Smedley PL, Kinniburgh DG. A review of the source, behavior and distribution. Appl Geochem. 2002; 17: 517-568.
- Spicer JJ, Weber RE. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. Comp Biochem Physiol C. 1991; 100: 339-342.
- Sprague JB. Measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sublethal effects and "safe" concentrations. Water Res. 1971; 5: 245-266.
- Strickland JDH, Parsons T. A manual for seawater analysis. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada; 1972. 311 p.
- Subramannian S, Philip R. Pharmacological level of copper induces the immune and antioxidant mechanisms of *Fenneropenaeus indicus* conferring better protection against white spot syndrome virus infection. Aquaculture Int. 2012; 20: 635-647.

- Sullivan JK. Effects of salinity and temperature on the acute toxicity of cadmium to the estuarine crab *Paragrapsus gaimardii*. Aust J Freshwater Res. 1977; 28: 739-743.
- Truscott R, White KN. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. Funct Ecol. 1990; 4: 455-461.
- Umarani R, Kuramaguru AK, Nagarani N. Investigation of acute toxicity of heavy metals in *Artemia salina* acclimated to different salinity. Toxicol Environ Chem. 2012; 94: 1547-1556.
- Usman N, Irawan B, Soegianto A. Effect of copper on survival and osmoregulation in different life stages of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. Cah Biol Mar. 2013; 54: 191-197.
- Valencia-Castañeda G, Frías-Espéricueta MG, Vanegas-Pérez RC, Chávez-Sánchez MC, Páez-Osuna F. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Litopenaeus vannamei* juveniles in low-salinity water in single and ternary exposure experiments and their environmental implications. Environ Toxicol Pharmacol. 2019; doi:10.1016/j.etap.2019.05.002.
- Valentino-Álvarez JA, Núñez-Nogueria G, Fernández-Bringas L. Acute toxicity of arsenic under different temperatures and salinity conditions on the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Biol Trace Elem Res. 2013; 152: 350-357.
- Van Holde K E, Miller K I. Hemocyanins. Q. Rev. Biophys. 1982; 15: 1-129.
- Vargas-Albores F, Gollas-Galván T, Hernández-López J. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. Aquaculture Res. 2005; 352-360.
- Van Wyk PM. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Florida, USA. 1999; 220 p.
- Veltman K, Huijbregts MAJ, Kolck MV, Wang WX, Hendriks AJ. Metal bioaccumulation in aquatic species: quantification of uptake and elimination rate constants using physicochemical properties of metals and physiological characteristics of species. Environ Sci Technol. 2008; 42: 852-858.
- Ventura-Lima J, Bogó MR, Monserrat JM. 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: a comparative biochemical approach. Ecotoxicol Environ Saf. 74: 2011; 211-218.
- Verslycke T, Vangheluwe M, Heijerick D, De Schamphelaere K, Sprang PV, Janssen CR. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. Aquat Toxicol. 2003; 64: 307-315.

- Victor B, Narayanan M, Nelson JD. Gill pathology and hemocyte response in mercury exposed *Macrobrachium idae* (Heller). J Environ Biol. 1990; 11: 61-65.
- Wang FI, Chen JC. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*. Fish Shell Immunol. 2006; 20: 671-681.
- Wang WN, Li BS, Liu JJ, Shi L, Alam MJ, Su SJ, *et al.* The respiratory burst activity and expression of catalase in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during long-term exposure to pH stress. Ecotoxicol. 2012; 21: 1609-1616.
- Wang Z, Yan C, Yan Y, Chi Q. Integrated assessment of biomarker responses in caged shrimps (*Litopenaeus vannamei*) exposed to complex contaminants from the Maluan Bay of China. Ecotoxicol. 2012; 21: 869-881.
- Wang, L.U., J.C., Chen. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. Fish Shellfish Immunol. 2005; 18: 269-278.
- Williams L, Schoof RA, Yager JW, Goodrich-Mahoney JW. Arsenic bioaccumulation in freshwater fishes. Hum Ecol Risk Assess. 2006; 12: 904-923.
- Wright DA. The effect of salinity on cadmium uptake by the tissues of the shore crab *Carcinus maenas*. J Exp Biol. 1977; 67: 137-146.
- Wright DA. Trace metal and major ion interactions in aquatic organisms. Mar Pollut Bull. 1995; 31: 8-18.
- Wu H, Liu J, Bi X, Lin G, Feng C, Li Z, *et al.* Trace metals in sediments and benthic animals from aquaculture ponds near a mangrove wetland in Southern China. Mar Pollut Bull. 2017; 486-491.
- Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. Environ Sci Pollut Res. 2016; 23: 8244-8259.
- Xian JA, Wang AL, Ye CX, Chen XD, Wang WN. Phagocytic activity, respiratory burst, cytoplasmic free-Ca²⁺ concentration and apoptotic cell ratio of haemocytes from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* under acute copper stress. Comp Biochem Physiol C. 2010; 152: 182-188.

- Yeh ST, Liu CH, Chen JC. Effect of copper sulfate on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shell Immunol.* 2004; 17: 437-446.
- Zanders IP, Rojas WE. Salinity effects on cadmium accumulation in various tissues of the tropical fiddles crab *Uca rapax*. *Environ Pollut.* 1996; 94: 293-299.
- Zhang C, Yu K, Li F, Xiang J. Acute toxic effects of zinc and mercury on survival, standard metabolism, and metal accumulation in juvenile ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017; 145: 549-556.
- Zhang H, Pan L, Miao J, Xu C. Effects of mercury chloride on antioxidant system and DNA integrity of the crab *Charybdis japonica*. *J ocean Univ China.* 2009; 8: 416-424.