

12

Toxicidad de los Compuestos del Nitrógeno en Camarones

^{a,b}FRÍAS ESPERICUETA MARTÍN G. y ^{b,c}PÁEZ OSUNA FEDERICO

^a*Laboratorio de Estudios Ambientales, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa*

^b*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM*

^c*Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM*

12.1.	Introducción	253
12.2.	Equilibrio químico y toxicidad del amonio	254
12.3.	Excreción del amonio en crustáceos	256
12.4.	Toxicidad del amonio en diferentes estadios de los peneidos.....	262
12.5.	Toxicidad de los nitritos y nitratos en postlarvas y juveniles de peneidos	266
	Agradecimientos.....	270
	Bibliografía.....	270

12.1. Introducción

El suministro de nitrógeno en exceso respecto a la capacidad asimilativa de los estanques de cultivo o de los cuerpos de agua costeros provoca un deterioro de la calidad del agua, ello a través de la acumulación de compuestos nitrogenados como el amonio, nitritos y nitratos, los

cuales son tóxicos para la biota. La toxicidad de los compuestos del nitrógeno en algas, zooplancton, peces y crustáceos es un fenómeno que ha sido tratado por numerosos investigadores (e.g. Randall y Wright, 1987; Niederlehner y Cairns, 1990; y referencias dadas en estos artículos y en el presente capítulo).

De los tres compuestos más estudiados, nitritos, nitratos y amonio, el que ha llamado más la atención es amonio, el cual sobresale por ser generalmente el más tóxico y el que se encuentra frecuentemente en mayor concentración en las aguas de desecho tanto domésticas, industriales y de la acuicultura. El amonio, es uno de las sustancias químicas industriales y agrícolas más utilizadas, y no es sorprendente que sea considerado comúnmente un contaminante acuático. En adición a su presencia en el agua como un producto natural del metabolismo de las proteínas de los organismos acuáticos, el amonio es frecuentemente descargado a través de los efluentes municipales, efluentes industriales y en la agricultura.

Tanto el amonio, los nitratos y nitritos ocurren naturalmente en las aguas marinas y continentales. Mucho del nitrato resulta de la nitrificación, proceso por el cual el amonio producido durante la descomposición bacteriana y la excreción animal es primeramente convertido a nitritos y subsecuentemente a nitratos por las bacterias aeróbicas autotróficas. Al igual que el amonio, los nitratos y nitritos están también presentes como consecuencia de los escurrimientos terrestres, las descargas municipales, ciertas industrias y las actividades agrícolas.

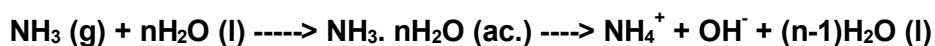
Las concentraciones de amonio, nitritos y nitratos que resultan de las descargas puntuales y no-puntuales son algunas veces elevadas, de manera tal que provocan efectos agudos y/o subletales sobre los organismos que habitan en las aguas receptoras o en estanques de cultivo que son alimentados con aguas que reciben tales descargas. Debido a que los compuestos del nitrógeno (amonio, nitritos y nitratos) son omnipresentes y tóxicos, las consecuencias adversas potenciales a largo y mediano plazo, y exposiciones a bajos niveles son de interés conocerlas. La mayoría de la información sobre la toxicidad de los compuestos del nitrógeno tradicionalmente se ha centrado en los peces, sin embargo, recientemente, se han estudiado los efectos en crustáceos incluidos los camarones. En este capítulo se presenta una revisión sobre los aspectos más sobresalientes de la toxicidad de los compuestos del nitrógeno en los camarones con un especial énfasis hacia las especies de importancia para la camaronicultura en el noroeste de México.

12.2. Equilibrio químico y toxicidad del amonio

La toxicidad del amonio en los organismos acuáticos se ha atribuido a la especie química NH_3 (amoníaco o amonio no-ionizado) mientras que la especie química NH_4^+ (ión amonio o

amonio ionizado) se considera no tóxica o significativamente menos tóxica (Emerson *et al.*, 1975). Los métodos analíticos tradicionales no permiten medir por separado a las dos especies químicas del amonio, en contraste existen varias técnicas analíticas para la determinación de la concentración total de amonio en soluciones acuosas (e.g. Strickland y Parsons, 1972; Grasso *et al.*, 1983) y el porcentaje de amonio total como NH_3 puede solamente ser determinado por cálculos a partir del equilibrio amonio-agua.

En soluciones acuosas el amonio no ionizado existe en equilibrio con el ión amonio y el hidroxilo, la ecuación de este equilibrio ha sido descrita como sigue (Thurston *et al.*, 1981):



La molécula del amoniaco NH_3 disuelto existe en forma hidratada, *i.e.* se une mediante puentes de hidrógeno al menos a tres moléculas de agua. Por conveniencia el amonio no ionizado se representa simplemente como NH_3 y la forma ionizada como NH_4^+ , el amonio total se refiere a la suma de estas dos especies ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$).

Otra manera de representar resumidamente el equilibrio del amonio es la siguiente (Millero, 1996):



Donde la constante de equilibrio queda representada por la expresión:

$$K_a = \frac{(\text{NH}_3)(\text{H}^+)}{(\text{NH}_4^+)}$$

a partir de esta expresión se tiene que las concentraciones relativas de las especies del amonio son dependientes del pH. En realidad la concentración relativa de las dos especies depende de un gran número de factores; en adición a la concentración del amonio total, entre los más importantes está el pH y la temperatura. La fuerza iónica es otro factor de peso importante que influye significativamente en la proporción relativa de las dos especies del amonio. De manera resumida las dificultades para calcular el porcentaje y la concentración de las especies del amonio se relacionan con la evaluación correcta de la constante de ionización ($\text{p}K_a = -\log K_a$) o constante de disociación ácida del ión NH_4^+ .

Emerson *et al.*, (1975) presentan tabulados los $\text{p}K_a$ para diferentes temperaturas y también los porcentajes de NH_3 en soluciones acuosas para diferentes intervalos de pH sin considerar

la salinidad, o sea estos pK_a se aplican para las aguas dulces. Bower y Bidwell (1978) presentan los pK_a y los porcentajes de amonio no-ionizado para diferentes intervalos de temperatura y pH para salinidades de 18 a 40 partes por mil. Soderberg y Meade (1991) presentan una expresión para calcular el pK_a y la fracción de amonio no ionizado para aguas diluidas con una fuerza iónica menor que 0.1 M, *i.e.* aguas dulces cuya salinidad es inferior a 5 partes por mil.

Millero (1996) presenta una expresión para calcular la constante de disociación en función de la temperatura y la salinidad como sigue:

$$\ln KNH_4^+ = 6285.33/T + 0.0001635T - 0.25444 + (0.46532-123.7184/T)S + (-0.01992 + 3.17556/T)S$$

Donde T es la temperatura en $^{\circ}K$ y S la salinidad en ups. Esta expresión se propone para aplicarla en el agua de mar, sin embargo, no se señala para que intervalo es adecuada. A partir de lo anterior es claro que para los valores de pH más comúnmente encontrado en las aguas naturales (6.5-9.0), el equilibrio favorece la forma ionizada del amonio. En pH elevados (>9.0) se favorece la predominancia de la forma del amonio no-ionizada. Por ejemplo, para un agua de mar típica de 35 ups, con un pH de 8.1 y a una temperatura de $25^{\circ}C$ se tiene un pK_a de 9.5 y un porcentaje de amonio ionizado del 95%, mientras que de la forma no-ionizada que viene a ser la más tóxica, un 5%.

La toxicidad del amonio no-ionizado se puede concluir que es función principalmente del pH, temperatura, alcalinidad, salinidad y obviamente de la concentración total del amonio medido en la superficie de las branquias de los organismos expuestos. El amonio es más tóxico para los organismos a pH y temperaturas elevadas, debido a que el equilibrio de disociación se desplaza hacia la forma tóxica no-ionizada NH_3 . Finalmente, es importante señalar que el riesgo a pH elevados y del amonio no-ionizado es mayor en aguas pobremente "buferizadas" o "amortiguadas" al final de la tarde, que es cuando el balance de la respiración-fotosíntesis acoplado con el sistema carbonatos produce los pH más críticos.

12.3. Excreción del amonio en crustáceos

De acuerdo con Audesirk y Audesirk (1996) las células vivas se han asemejan con pequeñas fábricas que requieren una entrada constante de materias primas y generan productos de desecho, algunos de los cuales son tóxicos si se encuentran en concentraciones elevadas, por lo cual deben ser excretados. La excreción se define como la eliminación de sustancias de desecho corporales, la cual dependiendo de las especies puede ocurrir por el sistema digestivo, glándulas de la piel, sistema urinario y pulmones. Aunque una gran variedad

de tejidos y órganos contribuyen a la excreción de desechos metabólicos en crustáceos, los órganos primarios de la producción de orina son las glándulas antenales y maxilares (Parry, 1960; McLaughlin, 1983).

Claybrook (1983), comenta que para un mejor entendimiento de la biología de los crustáceos es esencial un detallado conocimiento de los constituyentes nitrogenados, de las rutas metabólicas y de los mecanismos reguladores que controlan su cantidad y distribución. Los compuestos nitrogenados (ácido nucleicos, aminoácidos, enzimas y proteínas, purinas y pirimidinas, coenzimas e innumerables intermediarios metabólicos) son algunos de los principales reguladores de la capacidad genética, control metabólico y transferencia de energía, lo que repercute en la nutrición, crecimiento, desarrollo genético y ajustes fisiológicos a diversas variables endógenas y exógenas de los crustáceos.

Generalmente, la captura de amonio es considerada la fuente primaria de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos no esenciales en animales, donde el glutamato funciona como el donador del grupo amino en los procesos de transaminación (Leninher, 1975). El catabolismo de aminoácidos y proteínas puede servir como una fuente significativa de energía metabólica, ya que estas sustancias son los principales constituyentes de los tejidos de crustáceos (Claybrook, 1983). Sin embargo, los productos finales del metabolismo del nitrógeno y de la descomposición de tejidos deben ser eliminados conforme son producidos, ya que usualmente son tóxicos en cualquier cantidad (Parry, 1960). La formación de amonio es considerada como el sistema más primitivo para la excreción de nitrógeno y la menos cara con respecto al gasto de energía (Forster y Goldstein, 1969).

En crustáceos, como en otros organismos, el amonio es el principal producto nitrogenado de desecho, pero la urea y el ácido úrico son detectables en la mayoría de los casos (Regnault, 1987; Dall *et al.*, 1990). Cockcroft y McLachlan (1987) al medir el nitrógeno total excretado por el decápodo *Macropetasma africanus*, observaron que el amonio varió entre el 85 y 93%, urea del 2 al 4 % y aminoácidos del 5 al 13% del total del nitrógeno excretado. Por esta razón los crustáceos como grupo, pueden ser llamados amoniotélicos (Parry, 1960; Regnault, 1987). Sin embargo, el amonio no es el principal producto de desecho en todos los organismos. En la Tabla 12.1 se presentan la clasificación general de los animales tomando en cuenta sus principales productos de desecho nitrogenados (Campbell, 1973).

En el cangrejo *Carcinus maenas*, la cantidad de amonio excretado varía de acuerdo con un número de factores internos y externos, tales como la dieta, heridas, muda, entorno, salinidad, temperatura y proximidad de otros animales (Needham, 1957). De acuerdo con Parry (1960), la excreción de amonio no parece ser una función importante de las glándulas excretoras en los crustáceos (maxilar en la clase Entomostraca, antenal en Malacostraca), ya que la orina de la mayoría de las especies contiene solamente pequeñas cantidades de amonio, urea y ácido úrico o aminos, insuficiente para explicar el balance metabólico del nitrógeno.

Tabla 12.1. Principales productos nitrogenados excretados por los organismos (Modificado de Campbell, 1973).

Forma	Principal producto excretado	Ejemplos
Amoniotelismo (acuáticos)	NH_4^+	Invertebrados y peces
Amoniotelismo (terrestres)	NH_3	Isópodos terrestres
Ureatelismo	Urea	Planaria, mamíferos
Amoniotelismo-ureatelismo	NH_4^+ -Urea	Gusanos terrestres
Uricotelismo	Acido úrico	Gasterópodos. Insectos, reptiles, aves
Ureatelismo-Uricotelismo	Urea – Acido úrico	Quelonios, reptiles
Amoniotelismo-Uricotelismo	NH_4^+ - Acido úrico	Cocodrilos
Guanotelismo	Guanina	Arácnidos, escorpiones

Boivin (1929) notó por primera vez la incapacidad de la glándula antenal para la excreción del nitrógeno. Este mismo autor observó que el cangrejo *Maja* sp. con un peso de 1000-1500 g excretaba en la orina solamente de 1 a 2 g de nitrógeno en 24 hr, lo cual era insuficiente para un animal de ese tamaño. Krogh (1939) y Parry (1960) concluyeron que todo el nitrógeno de desecho no era eliminado por la glándula antenal y que el epitelio permeable de las branquias debía ser el principal sitio de excreción.

Dall *et al.* (1990) expresaron que las glándulas antenales son órganos para la regulación iónica y que cantidades muy pequeñas de sustancias nitrogenadas son incluidas en su secreción. Raghavaiah *et al.* (1980) y Kormanik y Cameron (1981) encontraron que el amonio es excretado vía branquias, pero todavía no ha sido resuelto si es por simple difusión o por un mecanismo activo de intercambio de $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ a través del epitelio permeable de las branquias (Regnault, 1987).

En la Fig. 12.1 se presentan los procesos incluidos en la eliminación (excreción) del amonio. La hemolinfa, además de distribuir nutrientes y oxígeno a las células, es la encargada de transportar los productos de desecho celulares (amonio) a las branquias; y es en la membrana basolateral de esta última, donde inicia la excreción del amonio. Debido a que las concentraciones de amonio son mayores en la hemolinfa que en el interior de la célula branquial, este proceso se lleva a cabo a través de un mecanismo pasivo, y en el momento en que la molécula del amonio debe ser expulsada al medio acuático, se requiere de un mecanismo de transporte activo (intercambio catiónico: $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$) donde la enzima ATPasa es la encargada de acelerar este proceso. Posteriormente, el ión Na^+ es transportado a partir del borde apical al basolateral, y este lado, aparentemente requiere de otro transporte activo para expulsar el Na^+ a la hemolinfa.

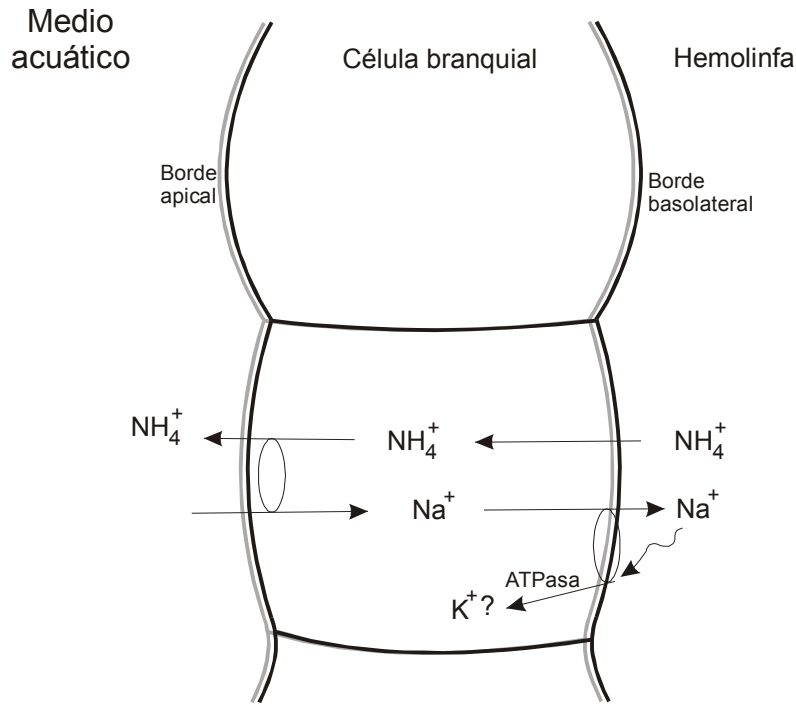


Figura 12.1 Procesos incluidos en la excreción de amonio en las células de las branquias de los crustáceos (↖ Energía).

La compensación de la salida de NH_4^+ por una entrada equivalente de Na^+ fue verificada en el cangrejo *Callinectes sapidus* (Pressley *et al.*, 1981) y en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (Armstrong *et al.*, 1981), donde la excreción de amonio es consumada a través de las branquias, siendo los tres pares posteriores, al menos en esos organismos, los que hacen la mayor contribución (Pequeux y Gilles, 1981); y como en los peces, este intercambio iónico requiere de la enzima Na/K-ATPasa como el compuesto acarreador (Towle *et al.*, 1976).

Por otro lado, la excreción de amonio en crustáceos depende de varios factores que incluye a la salinidad, temperatura, el ciclo de muda, el nivel nutricional y el control endocrino, a continuación se discuten por separado cada uno de ellos. Es importante señalar que esto ha sido estudiado en diferentes crustáceos, más no en los camarones de interés comercial de la región noroeste de México, sin embargo, se puede asumir en principio que los procesos que ocurren entre las especies son comparables.

12.3.1. Influencia de la salinidad y la temperatura

Algunos investigadores como Magnum *et al.* (1976) y Claybrook (1983) han observado un incremento en la tasa de excreción de amonio de crustáceos al transferirlos a un medio diluido, donde el contenido de aminoácidos libres decaía. Esto puede deberse al intercambio de NH_4^+ por Na^+ del medio, y/o por un incremento en el catabolismo de aminoácidos u otros compuestos nitrogenados incluidos en la regulación osmótica (Emerson, 1969). Krishnamoorthy y Srihari (1973) expresaron que la enzima glutaminasa suministra iones NH_4^+ para intercambiar iones Na^+ del medio ambiente.

Siebers *et al.* (1972) al transferir al cangrejo *Carcinus maenas* de 11 a 38 ‰ encontraron que el contenido de aminoácidos libres sufrió un gran incremento dentro de las primeras 12 hr, seguido por un aumento gradual del 60% dentro de los primeros 10 días. Sin embargo, estos autores y Gilles (1975) observaron un decremento en las proteínas de la hemolinfa, sugiriendo que la hidrólisis de las proteínas de la hemolinfa provee aminoácidos libres para incrementar la osmolaridad de los fluidos extracelulares.

De acuerdo con Regnault (1987), la tasa de excreción de amonio generalmente se incrementa cuando la temperatura aumenta, sin embargo la relación entre la tasa de excreción y la temperatura difiere según la especie y el intervalo de temperatura considerado.

12.3.2. Influencia del ciclo de muda

La excreción de amonio presenta un patrón cíclico durante el ciclo de muda (Regnault, 1987). En *Crangon crangon* la excreción fue mínima antes de la ecdysis, y máxima inmediatamente después (Regnault, 1979). Las variaciones en la tasa de excreción a través del ciclo de muda pueden estar directamente relacionadas con las perturbaciones del metabolismo del nitrógeno en varios tejidos como el músculo, el hepatopáncreas y el integumento (Regnault, 1987). Sin embargo, Chang (1996) observó que en la fase postmuda, los peneidos reducen al máximo su tasa de excreción, esto con el fin de evitar la pérdida de agua en esa fase, ya que esa agua será reemplazada por tejido, contribuyendo a un mejor crecimiento del crustáceo.

12.3.3. Influencia del nivel nutricional

De acuerdo con Regnault (1987) el efecto del ayuno sobre la tasa de excreción ha sido estudiado en varias especies. El primer efecto observado durante las primeras 24 hr de ayuno fue un decremento general en la tasa de excreción de amonio. Needham (1957) con *Carcinus maenas* y Regnault (1981) con *Crangon crangon*, notaron que después de un decremento temporal, la tasa de excreción incrementó y se mantuvo más alta que la tasa de excreción de los organismos alimentados, manteniéndose esta nueva tasa por varias semanas; por lo tanto, los cambios en la tasa de excreción con el ayuno son dependientes de las reservas del cuerpo

que los organismos metabolizan para su gasto de energía.

Por otro lado, la cantidad de amonio excretada por los camarones está determinada en función directa con la cantidad de proteína contenida en el alimento. Rosas *et al.* (1996) midieron la cantidad de amonio excretado en postlarvas de *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* y *P. notialis* alimentadas con diferentes cantidades de proteínas en el alimento y observaron que la excreción de amonio se incrementó conforme aumentaba la cantidad de proteína ingerida en el alimento. Posteriormente, Shishehchian *et al.* (1999) al alimentar a postlarvas de *P. monodon* con diferentes dietas, encontraron una mayor cantidad de amonio excretado en aquellos organismos alimentados con dietas artificiales que con dietas naturales (rotíferos, zooplancton, oligoquetos, etc.). Por lo anterior, se deduce que la comida natural juega un papel muy importante en los estanques de cultivo de camarón, por lo que un balance adecuado entre el alimento artificial y el natural puede ser más eficiente para un mejor crecimiento de los peneidos y regular la calidad del agua, y con esto evitar los efectos tóxicos del amonio.

12.3.4. Influencia del control neuro-endocrino

Algunas hormonas secretadas por los pedúnculos oculares de decápodos regulan diversos procesos fisiológicos (Anantha-Raman *et al.*, 1981). Con base en lo anterior, Raghavaiah *et al.* (1980) en un experimento con el decápodo *Oziotelphusa senex*, al extirparle los pedúnculos oculares notaron dos efectos: (1) un incremento en la tasa de eliminación del nitrógeno no proteico como resultado de un aumento del metabolismo; por lo tanto, estos órganos normalmente secretan, durante el estadio de intermuda, uno o más factores que inhiben el catabolismo de componentes nitrogenados de los tejidos. (2) Un incremento en la tasa de eliminación de amonio. La mayoría del amonio eliminado es probablemente derivado de la desaminación de aminoácidos y de la hidrólisis de los grupos aminos de la glutamina y asparagina, infiriendo estos autores que los pedúnculos oculares inhiben estos procesos. Anantha-Raman *et al.* (1981) observaron el mismo fenómeno en *Macrobrachium lanchesteri* por lo que se puede esperar que suceda lo mismo con otros crustáceos incluidos los camarones.

Posteriormente, Ramamurthi *et al.* (1982), continuando con el experimento anterior, encontraron cambios en la actividad de las enzimas que liberan amonio (glutaminasa y asparaginasa) por hidrólisis u oxidación de aminoácidos, concluyendo estos autores que el sistema neuro-endocrino de los pedúnculos oculares actúa para prevenir la pérdida de nitrógeno durante el estadio de intermuda.

12.4. Toxicidad del amonio en diferentes estadios de los peneidos

El entendimiento de la acción fisiológica de un tóxico es la clave para predecir importantes efectos subletales. El conocimiento de su modo de acción podría ayudar a prevenir conclusiones incorrectas acerca de la toxicidad del compuesto (Sprague, 1971). En la acuicultura, la toxicidad de los compuestos del nitrógeno excretado, es el parámetro más limitante, una vez que los niveles de oxígeno son mantenidos adecuadamente (Colt y Armstrong, 1981).

La mayor fuente de compuestos del nitrógeno en sistemas de cultivo proviene del metabolismo de las proteínas contenidas en el alimento (Colt y Armstrong, 1981). Por otro lado, el amonio es el principal producto de desecho del catabolismo de las proteínas de peces, crustáceos (Dall *et al.*, 1990) y moluscos (Campbell, 1973). Por esto, los problemas de toxicidad pueden ocurrir en todos los tipos de sistemas de cultivo.

Como se señaló en el inicio En el agua, el amonio está comprendido de una forma no ionizada (NH_3) y otra ionizada (NH_4^+), siendo el primero más tóxico debido a su habilidad para difundirse rápidamente a través de la membrana celular (Fromm y Guillette, 1968), mientras que el segundo es considerado menos tóxico (Tabata, 1962). Esto se debe a que el NH_3 es lipofílico y el NH_4^+ lipofóbico (Kormanik y Cameron, 1981). Chen y Chin (1989) demostraron que la toxicidad del amonio se incrementa conforme aumenta la proporción de NH_3 en una solución dada. El mecanismo más directo de toxicidad letal parece ser el deterioro del metabolismo de la energía cerebral debido al elevado gasto de compuestos de energía en el cerebro (Smart, 1978).

12.4.1. Efectos a nivel celular

El NH_3 liberado desde el medio circundante a la hemolinfa o el que se genera a partir de la producción metabólica, es convertido a NH_4^+ con la liberación de OH^- . Esto quizás provoca un aumento del pH intracelular afectando las reacciones enzimáticas y la estabilidad de la membrana (Campbell, 1973). Además, altas concentraciones de NH_4^+ provocan una reacción inversa de la enzima glutamato-deshidrogenasa, retirando cetoglutarato del ciclo de Krebs, decreciendo la cantidad de NADH disponible para la oxidación (Campbell, 1973). Por lo tanto, el aumento en la concentración de glutamato podría servir para disminuir la concentración celular de ATP debido al incremento en la conversión de glutamato a glutamina (Colt y Armstrong, 1981) y disminuir la cantidad de energía para cualquier proceso fisiológico (e.g. reproducción, crecimiento, osmoregulación).

12.4.2. Efectos sobre la excreción de nitrógeno

Conforme el nivel de amonio en el agua aumenta, la excreción de amonio de la mayoría de

los animales acuáticos decrece y el nivel de amonio en la hemolinfa y tejidos aumenta. Este incremento puede tener serios efectos sobre la fisiología del animal a nivel celular, de órganos y sistemas (Colt y Armstrong, 1981). Por lo tanto, al volverse difícil la excreción, la primera reacción del organismo puede ser el cese y/o reducción de la alimentación, lo cual reduce la formación de amonio metabólico. Por lo anterior, uno de los principales efectos subletales del amonio es la reducción en la tasa de crecimiento (Colt y Armstrong, 1981), lo cual tendría graves efectos en los sistemas de cultivo camarónicolas.

Chen y Nan (1993) concluyeron que en *Penaeus chinensis* la tasa de excreción de amonio fue mayor en los organismos expuestos a 5 mg/L amonio-N que en los controles (aquellos que no tenían amonio en la solución), sugiriendo que el organismo podría mejorar la actividad de la ATPasa y gastar energía extra para prevenir la captura de amonio y consume menos alimento para evitar la producción de éste. Chen y Kou (1993) en un experimento con *Penaeus monodon*, indicaron que las concentraciones de NH_3 y NH_4^+ afectan la acumulación de amonio en la hemolinfa de los camarones. Chen y Lin (1991) determinaron que la excreción de amonio en *P. chinensis* fue reducida cuando este compuesto en el ambiente excedió 10 mg/L. Esto sugiere que cuando el camarón es expuesto a más de 10 mg/L de amonio-N, la difusión de NH_3 de la hemolinfa al agua es invertida, y una vez que el organismo acumula arriba de 20 mg/L en la hemolinfa, este finalmente muere (Chen y Kou, 1993).

12.4.3. Efectos sobre la osmoregulación

Niveles altos de amonio pueden afectar la osmoregulación de especies acuáticas, incrementando la permeabilidad del animal, y por lo tanto, reduciendo la concentración iónica de la hemolinfa (osmolaridad) (Lloyd y Orr, 1969; Chen y Chen 1996). Por otro lado, la adición de iones NH_4^+ al medio externo resulta en la inhibición de la absorción de Na^+ (Magnum *et al.*, 1976) y siendo este el catión más abundante de la hemolinfa, se reduce su osmolaridad (Chen y Chen, 1996). Chen *et al.* (1994) observaron que los aminoácidos taurina y glutamina, así como la urea, son los principales constituyentes orgánicos que actúan como osmoreguladores cuando *P. japonicus* es expuesto a amonio, y de esta manera aumenta la osmolaridad de la hemolinfa; aunque la captura/entrada de amonio puede afectar el metabolismo de las proteínas de la hemolinfa.

La Na/K-ATPasa, la cual juega un papel en la regulación iónica y en la excreción de amonio (Chen y Nan, 1993), es la enzima específica que se requiere para el intercambio activo $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$. Varios estudios han descrito la presencia de Na/K-ATPasa en las branquias de crustáceos, las cuales son el principal sitio de la absorción de sales (Towle, 1981). Chen y Nan (1993), en un estudio con *Penaeus chinensis* determinaron que los camarones expuestos a 5 mg/L de amonio-N, tuvieron una actividad mayor de esa enzima que los controles, mientras que a 10 y 20 mg/L la actividad fue menor. Estos autores concluyeron que cuando el

organismo es expuesto a una baja concentración, se incrementa su metabolismo para hacer frente a esa situación, y el incremento en la actividad de la enzima se debe a una continua difusión de NH_3 o NH_4^+ de la hemolinfa al medio ambiente y ocurre un intercambio de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$. Mientras que el decremento en la actividad de dicha enzima a mayor concentración sugiere que un flujo inverso tiene lugar.

12.4.4. Efectos sobre el transporte de oxígeno

De acuerdo con Colt y Armstrong (1981), el amonio puede tener varios efectos sobre la habilidad de las especies acuáticas para transportar O_2 a los tejidos. Estos efectos incluye daños a las branquias, reducción de la capacidad de la sangre para transportarlo a consecuencia de cambios en el pH, un incremento en la demanda de oxígeno y daños histológicos a las células rojas y órganos que las producen.

Aunado a esto, la toxicidad del amonio puede aumentar a bajas concentraciones de O_2 . Allan *et al.* (1990) encontraron que a 1.6 mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$ y 2.3 mg/L de O_2 , *Penaeus monodon* tuvo una mortalidad del 90% en 96 hr de exposición; mientras que en ese mismo tiempo y esa misma concentración, pero con nivel de O_2 de 5.7 mg/L, la mortalidad fue del 33%. Esto ha sido atribuido a un incremento en la captura de amonio como consecuencia de un incremento en la tasa de ventilación de las branquias para prevenir la hipoxia (Allan *et al.*, 1990). Alcaraz *et al.* (1999a) al someter postlarvas de *P. setiferus* a 0.7 mg/L de NH_3 , observaron severos efectos sobre la tasa respiratoria, siendo letal a bajas concentraciones de oxígeno disuelto.

12.4.5. Pruebas de toxicidad aguda en crustáceos

Por lo anterior, el conocimiento del efecto tóxico de las sustancias químicas sobre la biota acuática es especialmente importante cuando se trata de preservar a las especies y los ecosistemas (Espina y Vanegas, 1996) y para poder evaluar el nivel de riesgo para el ecosistema son necesarias evidencias tanto biológicas como químicas y toxicológicas (Cairns y Pratt, 1989), que se puedan obtener directamente mediante pruebas ecotoxicológicas. Una prueba de toxicidad acuática es un procedimiento mediante el cual se usan las respuestas de los organismos acuáticos para detectar y cuantificar la presencia y/o el efecto de una o más sustancias, desechos o factores ambientales solos o en combinación sobre un organismo determinado. De acuerdo con APHA-AWWA-WPCF (1989) las pruebas de toxicidad son útiles para una variedad de propósitos que se refieren a la detección de:

- La adaptación de la vida acuática a las condiciones ambientales
- Factores ambientales favorables y/o desfavorables
- Los efectos de factores ambientales sobre el grado de toxicidad de sustancias de desecho

- La toxicidad de sustancias de desecho sobre los organismos de prueba
- La sensibilidad relativa de los organismos acuáticos a un efluente o tóxico en particular
- El tipo, el grado y la duración del tratamiento para el control de la contaminación de las aguas
- Las tasas de descarga de efluentes permitidos.

Tabla 12.2. Valores de LC₅₀ (mg/l) de N-amonio para algunas especies de peneidos a diferentes estadios.

Especie	LC ₅₀			Referencia
	24 hr	48 hr	96 hr	
<i>P. indicus</i> (mysis)	46.01			Jayasankar y Muthu /1983a)
<i>P. paulensis</i> (PL1)	24.19	8.59	5.49	Ostrensky y Wasielesky (1995)
<i>Metapenaeus ensis</i> (PL1)	30.3	16.7		Chen <i>et al.</i> (1991)
<i>P. monodon</i> (PL6)	52.1	27.7	11.5	Chin y Chen (1987)
<i>L. vannamei</i> (PL12)	17.9	12.5	12.2	Frías-Espericueta <i>et al.</i> (2000)
<i>P. japonicus</i> (PL12)	53.4	33.8	28.9	Chen <i>et al.</i> (1989)
<i>P. setiferus</i> (PL25)	11.5	9.4		Alcaraz <i>et al.</i> (1999b)
<i>P. semisulcatus</i> (juvenil, 0.3-2.4 g)			23.7	Wajsbrodt <i>et al.</i> (1990)
<i>P. chinensis</i> (juvenil, 0.36 g)	79.9	51.1	35.1	Chen <i>et al.</i> (1990a)
<i>L. vannamei</i> (juvenil, 0.99 g)	113.4	92.5	65.2	Frías-Espericueta <i>et al.</i> (1999)
<i>M. macleayi</i> (juvenil, 2 g)			26.3	Allan <i>et al.</i> (1990)
<i>P. monodon</i> (juvenil, 2.2 g)			37.7	Allan <i>et al.</i> (1990)
<i>L. vannamei</i> (juvenil, 3.8 g)		110.6	70.9	Frías-Espericueta <i>et al.</i> (1999)
<i>P. monodon</i> (juvenil, 4.87 g)	97.7	88	42.6	Chen <i>et al.</i> (1990b)
<i>P. paulensis</i> (juvenil 5.4 g)	51.8	43.1	38.7	Ostrensky y Wasielesky (1995)

En la Tabla 12.2 se presentan los valores de las LC₅₀ de N-amonio (nitrógeno como amonio) para diferentes especies de camarones en diferentes estadios, desde el larvario hasta la talla juvenil. Claramente se aprecia que los juveniles poseen una mayor resistencia al tóxico

que los estadíos tempranos y que la tolerancia al amonio varía de especie a especie.

Uno de los objetivos de las pruebas de toxicidad aguda es la de determinar la sensibilidad y la potencialidad de las diversas sustancias químicas en las especies acuáticas, y con base en estos resultados, obtener concentraciones “seguras” bajo condiciones continuas de exposición al tóxico, utilizando los valores de las LC_{50} y factores de aplicación (Sprague, 1969; 1971; Chen *et al.*, 1990a; 1990b; Frías-Espéricueta *et al.*, 1999; 2000). Dicho valor obtenido, no deberá provocar efecto adverso alguno sobre cualquier proceso fisiológico de las poblaciones expuestas, *i.e.* sobre el crecimiento, respiración, reproducción y enfermedades (Buikema *et al.*, 1982; Frías-Espéricueta *et al.*, 1999).

Con base en los resultados obtenidos por Frías-Espéricueta *et al.* (1999, 2000) en postlarvas y juveniles de *Litopenaeus vannamei*, se concluyó que es importante monitorear continuamente los niveles de amonio en las aguas de cultivo de esta especie, y dichos valores no deben ser mayores a 1.2 y 6.5 mg/L para postlarvas y juveniles, respectivamente, y de esta forma evitar los efectos tóxicos que este compuesto produce y obtener así mejores resultados en el cultivo de esta especie.

Aunque no existe una relación directa entre los resultados de los bioensayos llevados a cabo bajo condiciones de laboratorio con respecto a las condiciones del campo (estanques camaronícolas) esta información es útil para predecir el efecto de los diferentes niveles del amonio y otros compuestos nitrogenados, lo cual resulta de gran importancia para determinar la máxima concentración que puede ser alcanzada en los estanques de cultivo sin ningún efecto deletéreo sobre la salud de los peneidos y la producción del estanque (Alcaraz *et al.*, 1999b).

12.5. Toxicidad de los nitritos y nitratos en postlarvas y juveniles de peneidos

De acuerdo con Colt y Armstrong (1981), tanto el amonio como el nitrito pueden estar presentes en los sistemas de cultivo a niveles tóxicos; al igual que el amonio, el nitrito recientemente ha llamado la atención como contaminante en los sistemas acuáticos (Russo *et al.*, 1981), puesto que como un producto intermediario durante la nitrificación, puede estar presente a altas concentraciones en los sistemas de cultivo camaronícolas, aún con recambios de agua frecuentes (Chen y Chen, 1992) e incluso en cuerpos acuáticos que reciben los efluentes nitrogenados de diversas industrias, debido a un desbalance entre las poblaciones de bacterias encargadas de los procesos de nitrificación y desnitrificación (Cheng y Chen, 1998). Entre los principales efectos tóxicos del NO_2^- sobresalen aquellos que tienen una relación directa sobre el transporte del oxígeno, oxidación de importantes compuestos y daños

a los tejidos. Jensen (1990) al someter al crustáceo *Astacus astacus* a diferentes concentraciones de NO_2^- , observó que éste era rápidamente acumulado en sus compartimentos extracelulares provocando un incremento en el pH (“alcalosis”) de la hemolinfa, originado por el incremento en la concentración de CO_2 , el cual es convertido a HCO_3^- . Sin embargo, Chen y Cheng (1996) observaron que el pH de la hemolinfa de *P. japonicus* (juveniles) disminuye al incrementar la concentración de NO_2^- en el ambiente. Estos autores explicaron que la formación de HNO_2 es el responsable de este fenómeno. Empero, tanto el aumento como la disminución del pH de la hemolinfa, alteran la actividad de varias enzimas, interrumpiendo algunos procesos fisiológicos de los camarones.

Tabla 12.3 Valores de LC_{50} (mg/L) de N-nitritos para algunas especies de peneidos a diferentes estadios.

Especie	LC_{50}		Referencia
	48 hr	96 hr	
<i>P. indicus</i> (zoea)	15.37		Jayasankar y Muthu (1983b)
<i>Metapenaeus ensis</i> (mysis)	20.67		Chen y Nan (1991)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (larva)	27.7	11.5	Armstrong <i>et al.</i> (1976)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (larva)	12.5	12.2	Chen y Lee (1997)
<i>Metapenaeus ensis</i> (PL1)	33.8	28.9	Chen y Nan (1991)
<i>P. paulensis</i> (PL1)	9.4		Ostrensky y Poersch (1992)
<i>P. japonicus</i> (PL2)		23.7	Chen y Tu (1990)
<i>P. monodon</i> (PL6)	51.1	35.1	Chen y Chin (1988)
<i>P. japonicus</i> (PL12)	92.5	65.2	Lin <i>et al.</i> (1993)
<i>P. setiferus</i> (PL25)		26.3	Alcaraz <i>et al.</i> (1999b)
<i>P. chinensis</i> (juveniles)		37.7	Chen <i>et al.</i> (1990a)
<i>P. monodon</i> (adolescentes)	88	42.6	Chen <i>et al.</i> (1990b)

Los crustáceos contienen hemocianina en lugar de hemoglobina (pigmento respiratorio de los peces) la cual cambia a metahemoglobina en presencia del nitrito y provoca hipoxia y cianosis. De acuerdo con Wickins (1976), esta misma reacción pudiera ocurrir en la hemocianina de los camarones. En la hemocianina, cada sitio de unión con el O_2 contiene dos

átomos de cobre ($\text{Cu}^I \text{ Cu}^I$, conocida como deoxihemocianina) la cual cambia su estado de oxidación cuando se le une el O_2 ($\text{Cu}^{II} \text{ Cu}^{II}$, conocida como oxihemocianina) (Chen y Cheng, 1995). De esta manera, la hemocianina sufre una reacción de oxido-reducción en los procesos de oxigenación-deoxigenación, y el NO_2^- puede reaccionar con la hemocianina de los crustáceos para formar metahemocianina, y así reducir su afinidad por el O_2 . Tahon *et al.* (1988), demostraron que la reacción del NO_2^- con la deoxihemocianina es 15 veces más rápida que con la oxihemocianina, lo cual imposibilita la capacidad de la hemolinfa para transportar el O_2 , incrementándose la $p\text{O}_2$ (presión parcial del oxígeno) en la hemolinfa (Chen y Cheng, 1996). Chen y Cheng (1995) y Chen y Lee (1997) al someter a *Penaeus japonicus* y *Macrobrachium rosenbergii*, respectivamente, a concentraciones externas de nitritos, observaron una reducción en la cantidad de oxihemocianina, lo cual indica un decremento en la habilidad de la hemocianina para transportar oxígeno.

La presencia de iones de Ca^{++} y Cl^- en el medio (Russo *et al.*, 1981), pueden reducir la toxicidad en peces por un factor de 20 a 60. Recientemente, Chen y Lee (1997) observaron que la toxicidad de los nitritos en el crustáceo *Macrobrachium rosenbergii* era disminuida al incrementar la concentración de Cl^- en el medio, pero en menor proporción con respecto a peces. Esto es debido a que estos iones compiten con el NO_2^- por el mismo sitio de transporte a través de las branquias, y de esta manera reducen la toxicidad (Colt y Armstrong, 1981). Otro efecto deletéreo no menos importante que los anteriores, es el efecto en la osmoregulación, una actividad fisiológica muy importante de los camarones como *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Cheng y Chen (1998) observaron una reducción en la osmolaridad de la hemolinfa de *Penaeus japonicus* al ser expuesto a nitrito; donde los principales electrolitos (iones) que disminuyeron su concentración fueron el Cl^- y el Na^+ , los iones más abundantes en la hemolinfa de crustáceos; lo cual puede provocar desajustes en el equilibrio osmótico (osmoregulación) de dichos organismos.

Wickins (1976) presenta una LC_{50} para peneidos de 8.5 a 15.4 mg/L NO_2^- . Catedral *et al.* (1977) observaron una sobrevivencia del 60% en larvas de *Penaeus monodon* al ser sometidas a 15 mg/L de NO_2^- . Chen y Chin (1989) hacen referencia a una mortalidad del 20% en juveniles de *P. monodon* (2.5 cm) expuestos a 66.96 mg/L de NO_2^- . Esto demuestra que los juveniles tienen una mayor tolerancia al nitrito que las larvas y postlarvas. Manthe *et al.* (1984) observaron que niveles de 20 mg/L de $\text{NO}_2\text{-N}$ provocaron la mortalidad en el cangrejo *Callinectes sapidus* en el estadio intermuda, pero en aquellos que se encontraban en la fase ecdysis, la mortalidad se presentó a niveles más bajos (2 mg/L). Por lo anterior, es necesario estudiar el efecto del nitrito en camarones en la fase ecdysis, ya que en esta fase se incrementa la demanda metabólica de energía para satisfacer los diversos procesos fisiológicos.

El efecto del nitrito sobre el crecimiento de camarones dulceacuícolas y marinos ha sido

documentado por Armstrong *et al.* (1976) y por Wickins (1976); quienes observaron que 1.8 y 6.4 mg/L de $\text{NO}_2\text{-N}$ provoca una reducción del 35 y 50 % en el crecimiento de larvas de *Macrobrachium rosenbergii* y postlarvas de *Penaeus indicus*, respectivamente. Posteriormente, Chen *et al.* (1990c) determinaron que un nivel de concentración de 21.38 mg/L de $\text{NO}_2\text{-N}$ redujo el 50% del crecimiento de *P. monodon*. Con base en lo anterior, Chen y Chen (1992) sometieron a juveniles de *P. monodon* a concentraciones subletales de NO_2^- por un periodo de 80 días consecutivos y observaron que tanto el peso como la longitud de los organismos fueron reducidos significativamente ($P < 0.05$) entre los peneidos expuestos a 20 mg/L con respecto a aquellos que se mantuvieron en el control (sin NO_2^-). Durante los 80 días de exposición, el peso medio final de los camarones mantenidos en el control fue de 4.1 veces mayor que el peso inicial, mientras que en aquellos mantenidos a 20 mg/L, el crecimiento fue sólo de 2.7 veces mayor que el inicial. Además, el NO_2^- incrementó la frecuencia de muda en los juveniles de *P. monodon*. De acuerdo con Wassenberg y Hill (1984), factores externos como la luz y la temperatura pueden estimular el sistema nervioso e incrementar la secreción hormonal, lo cual podría afectar el ciclo de muda de los crustáceos. Debido a que tanto la temperatura como el ciclo diurno durante el experimento, fueron similares a los del ambiente natural, los mecanismos por los cuales el NO_2^- estimula la frecuencia de la muda en *Penaeus monodon*, requiere de futuras investigaciones (Chen y Chen, 1992).

Con respecto a los nitratos, el producto final de la nitrificación aeróbica (Pierce y Weeks, 1993), estos son los compuestos nitrogenados inorgánicos menos tóxicos, sin embargo pueden ser un potencial problema cuando sus niveles aumentan y se acumulan. La toxicidad de estos compuestos es debido a sus efectos sobre la osmoregulación y posiblemente sobre el transporte de oxígeno (Colt y Armstrong, 1981). De acuerdo con Wickins (1976), el valor de la LC_{50} a 96-hr para organismos acuáticos varía de 1000 a 3000 mg/L de N-NO_3^- .

En sistemas cerrados y semi-cerrados, tales como los sistemas de cultivo, los nitratos frecuentemente, se hallan presentes en niveles mucho más elevados que los que se encuentran en las aguas costeras naturales. El nitrato está presente en estos sistemas debido a la nitrificación y particularmente, en la acuicultura como consecuencia de la adición de microalgas que se emplean en algunos casos como fuente de alimentación. Los nitratos son la principal fuente de nitrógeno en la mayoría de los medios de cultivos de microalgas y usualmente se proporciona en exceso para asegurar el crecimiento algal adecuado. Consecuentemente, el nitrato no asimilado es añadido en el medio de cultivo. Esta práctica es común en los cultivos de larvas para peces, moluscos y crustáceos.

Los nitratos, tienden a acumularse debido a la ausencia de los procesos que normalmente remueven los nitratos. En algunos de estos sistemas semi-cerrados o cerrados se ha involucrado a los métodos biológicos a partir de la asimilación y la denitrificación. Sin embargo, su aplicación es limitada debido a las dificultades de operación y a que se considera que los

nitratos no constituyen un riesgo en las concentraciones en que normalmente se encuentran en tales sistemas o en las aguas contaminadas (Spotte, 1979). El nivel aceptable de nitratos para agua de mar de cultivo se considera generalmente de 88.6 mg NO₃⁻/L (Kinne, 1976; Spotte, 1979). Aunque este nivel se basa sobre relativamente poca información experimental, la mayoría referente a pruebas de toxicidad aguda en peces adultos. La toxicidad en estadios tempranos son generalmente los más sensibles y en los que no se ha determinado para la mayoría de los organismos marinos. Muir *et al.* (1991) examinaron aparentemente por primera vez, los efectos de los nitratos en *Penaeus monodon* protozoa, y encontraron que se presenta una significativa mortalidad dentro de las 40 horas en concentraciones de nitratos tan bajas como de 1 mg NO₃⁻/L. Los efectos subletales de esta concentración resultaron en cambios en las neuropilas gangliónicas y los músculos. En concentraciones más elevadas (10-100 mg NO₃⁻/L) fueron adicionalmente afectadas la hipodermis, la glándula digestiva y el proventriculus.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo otorgado por el CONACYT para los proyectos 0625-N9110 y 32501-T, con los cuales se generó parte de la información presentada en este capítulo. A Ramírez Jáuregui M.C. por su valiosa colaboración en la adquisición y revisión del acervo bibliográfico y a Ramírez Reséndiz G. por la preparación de figuras.

Bibliografía

- Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., Espinoza, V. y Vanegas, C. (1999a). Acute toxicity of ammonia and nitrite on respiration of *Penaeus setiferus* postlarvae under different oxygen levels. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31: 98-106.
- Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., Espinoza, V. y Vanegas, C. (1999b). Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31: 90-97.
- Allan, G.F., Maguire, G.B. y Hopkins, S.J. (1990). Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. *Aquaculture*, 91: 263-280.
- Anantha-Raman, K.V., Shakuntala, K.S. y Reddy, S.R. (1981). Influence of endogenous factors on the pattern of ammonia excretion in the prawn *Macrobrachium lanchesteri*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 19: 42-45.

- APHA-AWWA-WPCF (1989). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th ed. American Public Health Association, Washington D.C. p. var.
- Armstrong, D.A., Stephenson, J.J. y Knight, A. (1976). Acute toxicity of nitrite of the giant Malasyan prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 9: 39-46.
- Armstrong, D.A., Strange K., Crowe, J., Knight, A. y Simmons, M. (1981). High salinity acclimation by the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: uptake of exogenous ammonia and changes in endogenous nitrogen compounds. *The Biological Bulletin*, 160: 349-365.
- Audesirk, T. y Audesirk, G. (1996). *Biología. La vida en la tierra*. Prentice Hall Hispanoamericana, México. 947p.
- Boivin, A. (1929). Contribution a létude des corps puriques du "sang" des Crustacés Décapodes. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie*, 102: 688-699.
- Bower, C.E. y Bidwell, J.P. (1978). Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35: 1012-1016.
- Buikema, A.L., Niederlehner, R.R. y Cairns, J.J. (1982). Biological monitoring Part IV. Toxicity testing. *Water Research*, 16:239-262.
- Cairns, J. Jr. y Pratt, J.R. (1989). The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia*, 188/189: 5-20.
- Campbell, J.M. (1973). Nitrogen excretion. *In*: Prosser, C.L. (Ed.). *Comparative Animal Physiology*. Third edition. W.B. Sanders, Philadelphia, U.S.A. p. 279-315.
- Catedral, F.F., Gerochi, D.D., Quibuyen, A.T. y Casilmir, C.M. (1977). Effect of nitrite, ammonia, and temperature on *P. monodon* larvae. *Quartely Research Report Aquaculture Department Southeast Asian Fisheries Development Center*, 1: 9-12.
- Chen, J.C. y Chin, T.S. (1988). Acute toxicity of nitrite to tiger prawn *Penaeus monodon* larvae. *Aquaculture*, 69: 253-262.
- Chen, J.C. y Chin, T.S. (1989). Effect of ammonia at different pH levels on *Penaeus monodon* postlarvae. *Asian Fisheries Science*, 2: 233-238.
- Chen, J.C., Tu, C.C. y Yang, W.S. (1989). Acute toxicity of ammonia to larval *Penaeus japonicus*. *Journal of Fisheries Society of Taiwan*, 16: 261-270.
- Chen, J.C. y Tu, C.C. (1990). Acute toxicity of nitrite to larval *Penaeus japonicus*. *Journal of Fisheries Society of Taiwan*, 17: 227-237.
- Chen, J.C., Ting, Y.Y., Lin, J.N. y Lin, M.N. (1990a). Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. *Marine Biology*, 107: 427-431
- Chen, J.C., Liu, P.C. y Lei, S.C. (1990b). Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture*, 89: 127-137.
- Chen, J.C., Lei, S.C. y Liu, P.C. (1990c). Effect of ammonia and nitrite on *Penaeus monodon*

- juveniles. *In*: Hirano, Y. y Hanyu, C. (Eds.). The Second Asian Fisheries Forum. Tokyo, Japan. p. 65-68.
- Chen, J.C. y Lin, M.N. (1991). Lethal and sublethal effects of ammonia to *Penaeus penicillatus* juveniles. *Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica*, 30: 73-80.
- Chen, J.C., Liu, P.C. y Nan, F.H. (1991). Acute toxicity of ammonia to larval *Metapenaeus ensis*. *Asian Fisheries Science*, 4: 41-51.
- Chen, J.C. y Nan, F.H. (1991). Lethal effects of nitrite on *Metapenaeus ensis* larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 22: 51-55.
- Chen, J.C. y Chen, S.F. (1992). Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 109: 177-185.
- Chen, J.C. y Kou, Y.Z. (1993). Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101C: 453-458.
- Chen, J.C. y Nan, F.H. (1993). Effects of ammonia on oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* after prolonged exposure to ammonia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51: 122-129.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y. y Chen, C.T. (1994). Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109A: 339-347.
- Chen, J.C. y Cheng, S.Y. (1995). Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Aquatic Toxicology*, 33: 215-226.
- Chen, J.C. y Chen, S.F. (1996). Changes of osmotic and electrolyte concentrations in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114C: 35-38.
- Chen, J.C. y Cheng, S.Y. (1996). Hemolymph osmolality, acid base balance, and ammonia excretion of *Penaeus japonicus* Bate exposed to ambient nitrite. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30: 151-155.
- Chen, J.C. y Lee, Y. (1997). Effects of nitrite on mortality, ion regulation and acid-base balance of *Macrobrachium rosenbergii* at different external chloride concentration. *Aquatic Toxicology*, 39: 291-305.
- Cheng, S.Y. y Chen, J.C. (1998). Effects of nitrite exposure on the hemolymph electrolyte, respiratory protein and free amino acid levels and water content of *Penaeus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 44: 129-139.
- Chin, T.S. y Chen, J.C. (1987). Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 66: 247-253
- Claybrook, D.L. (1983). Nitrogen Metabolism. *In*: Bliss, D.E. y Mantel, L.H. (Eds.). *The Biology of Crustacea*. Volume 5. Academic Press, New York. p. 163-213.

- Cockcroft, A.C. y McLachlan, A. (1987). Nitrogen regeneration by surf zone penaeid prawn *Macropetasma africanus*. *Marine Biology*, 96: 343-348.
- Colt, J.E. y Armstrong, D.A. (1981). Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. *Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture*. Fish Culture Section of the American Fisheries Society (FCS Publ. 1): 34-47.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. y Sharples, D.J. (1990). Moulting and Growth. *In: Blaxter, J.M.S. y Southward, A.J. (Eds.). The Biology of Penaeidae*. *Advances in Marine Biology*, Vol. 27. Academic Press. London. p. 213-250.
- Emerson, D.N. (1969). Influence of salinity on ammonia excretion rates and tissue constituents of euryhaline invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 29: 1115-1133.
- Emerson, K, Russo, R.C., Lund, R.E. y Thurston, R.V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32: 2379-2383.
- Espina, S. y Vanegas, C. (1996). Ecotoxicología y contaminación. *In: Botello, A.V., Rojas-Galaviz, J.L., Benítez, J.A. y Zárate-Lomelí, D. (Eds.). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. Campeche, Mex. EPOMEX Serie Científica. 5. p. 69-106.
- Forster, R.P. y Goldstein, L. (1969). Formation of excretory products. *In: Hoar, W. y Randall, R. (Eds.). Fish Physiology*. Vol.1. Academic Press, New York. p. 313-350.
- Frías-Espéricueta, M.G., Harfush-Meléndez, M., Osuna-López, J.I. y Páez-Osuna, F. (1999). Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 646-652.
- Frías-Espéricueta, M.G., Harfush-Meléndez, M. y Páez-Osuna, F. (2000). Effects of ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65: 98-103.
- Fromm, P.O. y Guillette, J.R. (1968). Effect of ambient ammonia on blood ammonia and nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26: 887-896.
- Gilles, R. (1975). Mechanisms of ion and osmoregulation. *In: Kinne, O. (Ed.). Marine Ecology. A Comprehensive, Integrated Treatise on Life in Oceans and Coastal Waters*. Volume II, Part. I. John Wiley & Sons, London. p. 259-347.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M. y Kremling, K. (1983). *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, Alemania. 419 p.
- Jayasankar, P. y Muthu, M.S. (1983a). Toxicity of ammonia to the larvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian Journal of Fisheries*, 30: 1-12.
- Jayasankar, P. y Muthu, M.S. (1983b). Toxicity of nitrite to the larvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian Journal of Fisheries*, 30: 231-240.

- Jensen, F.B. (1990). Sublethal physiological changes in freshwater crayfish, *Astacus astacus*, exposed to nitrite: haemolymph and muscle tissue electrolyte status, and haemolymph acid-base balance and gas transport. *Aquatic Toxicology*, 18: 51-60.
- Kormanik, G.A. y Cameron, J.N. (1981). Ammonia excretion in animals that breath water: A review. *Marine Biology Letters*, 2: 11-23.
- Krishnamoorhy, R.V. y Srihari, K. (1973). Changes in excretory patterns of the freshwater field crab *Paratelphusa hydrodromus* upon adaptation to higher salinities. *Marine Biology*, 21: 341-348.
- Krogh, A. (1939). Osmotic regulation in aquatic animals. Cambridge University Press, New York. 242 p.
- Lehninger, A.L. (1975). Bioquímica. Ediciones Omega, Barcelona. 887 p.
- Lin, H., Thuet, P., Trilles, J.P., Mounet-Guillaume, R. y Charmantier, G. (1993). Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, 117: 591-598.
- Lloyd, R. y Orr, L.D. (1969). The diuretic response by rainbow trout to sublethal concentrations of ammonia. *Water Research*, 3: 335-344.
- Magnum, C.P., Silverthorn, S.U., Harris, J.L., Towle, D.W. y Krall, A.R. (1976). The relationship between blood pH, ammonia excretion and adaptation to low salinity in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Zoology*, 195: 129-136.
- Manthe, D.P., Malone, R.F. y Kumar, S. (1984). Limiting factors associated with nitrification in closed blue crab shedding systems. *Aquacultural Engineering*, 3: 119-140.
- McLaughlin, P.A. (1983). Internal Anatomy. *In*: Bliss, D.E. y Mantel, L.H. (Eds.). *The Biology of Crustacea*. Vol. 5. Academic Press, New York. p. 1-53.
- Millero, F. (1996). Chemical Oceanography. CRC Press, Boca Raton, Fla. 469 p.
- Muir, P.R., Sutton, D.C. y Owens, I. (1991). Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoa. *Marine Biology*, 108: 67-71.
- Needham, A.E. (1957). Factors affecting nitrogen excretion in *Carcinus maenas*. *Oecologia*, 4:209-239.
- Niederlehner, B.R. y Cairns, J. (1990) Effects of ammonia on periphitic communities. *Environmental Pollution*, 66: 207-221.
- Ostrensky, A. y Poersh, L.H. (1992). Toxicidade aguda do nitrito na larviculturado camarao-rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante. 1967. *Nerítica Curitiba*, 7: 101-107.
- Ostrensky, A. y Wasielesky, W. (1995). Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Sao Paulo shrimp *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 132:339-347.
- Parry, G. (1960). Excretion. *In*: Waterman, T.H. (Ed.). *The Physiology of Crustacea*. Vol. 1. Academic Press, New York. p. 341-366.
- Pequeux, A. y Gilles, R. (1981). Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the chinese crab

- Eriocheir sinensis*. Journal of Experimental Biology, 92: 173-186.
- Pierce, R.H. y Weeks, J.M. (1993). Nitrate toxicity to five species of marine fish. Journal of the World Aquaculture Society, 24: 105-107.
- Pressley, T.A., Graves, J.S. y Krall, A.R. (1981). Amiloride-sensitive ammonium and sodium ion transport in the blue crab. American Journal of Physiology 241: 370-378.
- Randall, D.J. y Wright, P.A. (1987). Ammonia distribution and excretion in fish. Fish Physiology and Biochemistry, 3: 107-120.
- Raghavaiah, K., Ramamurthi, R., Chandrasekharam, V. y Scheer, B.T. (1980). Neuroendocrine control of nitrogen metabolism in the Indian field crab *Oziotelphusa senex* Fabricius. I. End-products and elimination. Comparative Biochemistry and Physiology, 67B: 437-445.
- Ramamurthi, R., Raghavaiah, K., Chandrasekharam, V. y Scheer, B.T. (1982). Neuroendocrine control of nitrogen metabolism in the Indian field crab *Oziotelphusa senex* Fabricius. II. Enzymes activities. Comparative Biochemistry and Physiology, 71B:223-228.
- Regnault, M. (1979). Ammonia excretion of the sand shrimp *Crangon crangon* (L.) during the moult cycle. Journal of Comparative Physiology, 133:199-204.
- Regnault, M. (1981). Respiration and ammonia excretion of the shrimp *Crangon crangon* L. Metabolic responses to prolonged starvation. Journal of Comparative Physiology, 141:549-555.
- Regnault, M. (1987). Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea. Biological Review 62:1-24.
- Rosas, C., Sánchez, A., Díaz, E., Soto, L.A., Gaxiola, G. y Brito, R. (1996). Effect of dietary protein on apparent heat increment and postprandial nitrogen excretion of *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae. Journal of the World Aquaculture Society, 27: 92-102.
- Russo, R.C., Thurston, R.V. y Emerson, K. (1981). Acute toxicity of nitrate to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effects of pH, nitrite species, and anion species. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 38 (4): 387-393.
- Shishehchian, F., Yusoff, F.M., Omar, H. y Kamarudin, M.S. (1999). Nitrogenous excretion of *Penaeus monodon* postlarvae fed with different diets. Marine Pollution Bulletin, 39: 224-227.
- Siebers, D., Lucu, C., Sperling, K.R. y Eberlein, K. (1972). Kinetics of osmoregulation in the crab *Carcinus maenas*. Marine Biology, 17: 291-303.
- Smart, G.R. (1978). Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) exposed to acutely lethal concentrations. Journal of Fish Biology, 12: 93-104.
- Soderberg, R.W. y Meade, J.W. (1991). The effects of ionic strength on un-ionized ammonia concentration. The Progressive Fish-Culturist, 53: 118-120.
- Sprague, J.B. (1969). Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute

- toxicity. *Water Research*, 3: 793-821.
- Sprague, J.B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Research*, 5: 245-266.
- Strickland, J.D.H. y Parsons, T.R. (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. 2nd. ed. Fisheries Research Board of Canada Bulletin 167, Ottawa, Canada. 310 p.
- Tabata, K. (1962). Toxicity of ammonia to aquatic animals with reference to the effect of pH and carbon dioxide. Citado por: Chen y Chin (1989). *Asian Fisheries Science*, 2: 233-238.
- Tahon, J.P., Van Hoof, D., Vinckier, C., Witters, R., Deley, M. y Lontie, R. (1988). The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. *Biochemical Journal*, 249: 891-896.
- Thurston, R.V., Russo, R.C. y Vinogradov, G.A. (1981). Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on the toxicity of the un-ionized ammonia species. *Environmental Science & Technology*, 15: 837-840.
- Towle, D.W. (1981). Transport related ATPases as probes of tissue function in three terrestrial crabs of Palau. *Journal of Experimental Zoology*, 218: 89-95.
- Towle, D.W., Palmer, G.E. y Harris, J.L. (1976). Role of gill Na⁺-K⁺-dependent ATPase in acclimation of the blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *Journal of Experimental Zoology*, 196: 315-322.
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Krom, M.D. y Samocha, T.M. (1990). Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9: 497-504.
- Wassenberg, T.J. y Hill, B.J. (1984). Monitoring behavior of the tiger prawn *Penaeus esculentus* (Haswell). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 35:561-571.
- Wickins, J.F. (1976). The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture*, 9: 19-37.