

EFFECTOS TÓXICOS DEL NÍQUEL Y EL ZINC EN *Artemia franciscana* (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA)

Toxic effects of nickel and zinc in *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca)

JG Jiménez, R Gelabert, R Brito ✉

((JGJ) (RG) (RB) Facultad de Ciencias Pesqueras. DES Ciencias Naturales y Exactas, UNACAR. Calle 56 No. 4 x Ave. Concordia. Ciudad del Carmen 24118. Campeche, México rbrito@pampano.unacar.mx

Artículo recibido: 11 de septiembre de 2005, **aceptado:** 7 de junio de 2006

RESUMEN. Los efectos del níquel y el zinc se estudiaron, a diferentes concentraciones, sobre la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*, la mortalidad de los nauplios, el crecimiento y el consumo de oxígeno para determinar los niveles de toxicidad aguda y crónica. El porcentaje de eclosión de los quistes disminuyó significativamente en concentraciones de níquel y zinc superiores a 40 mg l⁻¹. El efecto del Ni fue más marcado. La mortalidad de los nauplios tuvo una relación directa con los tiempos de exposición. La concentración letal media (CL₅₀) a las 96 h para el níquel fue de 37.3 ± 5.5 mg l⁻¹ y para el zinc de 44.8 ± 5.4 mg l⁻¹. El crecimiento de *A. franciscana* fue afectado significativamente en concentraciones de Ni y Zn superiores a 5 mg l⁻¹, de las cuales la afectación más severa resultó con el último metal. En organismos expuestos por 120 h a 3.3 y 5 mg Ni l⁻¹ se observó una disminución significativa en el consumo de oxígeno de 23 y 25 %, respectivamente, con respecto al control. En el caso del Zn, los organismos expuestos a concentraciones de 1.7, 3.3 y 5 mg l⁻¹ por 120 h tuvieron una reducción del consumo de oxígeno entre 45 a 65 % con respecto al control. Se comprobó que aún a concentraciones muy por debajo de la CL₅₀ el Ni y el Zn deprimieron el metabolismo respiratorio y el crecimiento en *A. franciscana*.

Palabras clave: Toxicidad, *Artemia*, zinc, níquel

ABSTRACT. The effect of different nickel and zinc concentrations on *Artemia franciscana* cyst hatching, naupliar mortality, growth and oxygen consumption were studied in order to determine levels of acute and chronic toxicity. Cyst hatching percentage significantly decreased at concentrations of nickel and zinc above 40 mg l⁻¹. The effect of nickel was stronger. Naupliar mortality was directly related to the time of exposure. The median lethal concentration (LC₅₀) at 96 h was 44.8 ± 5.4 mg l⁻¹ for zinc and 37.3 ± 5.5 mg l⁻¹ for nickel. *Artemia franciscana* growth was significantly affected by Ni and Zn concentrations above 5 mg l⁻¹, with Zn having a greater effect. Specimens exposed for 120 h to 3.3 and 5 mg Ni l⁻¹ presented a significant oxygen consumption reduction of 23 and 25 % respectively, compared with the control. In the case of Zn, animals exposed to concentrations of 1.7, 3.3 and 5 mg l⁻¹ for 120 h showed a decrease in oxygen consumption of 45 to 65 % compared with the control. Ni and Zn depressed respiratory metabolism and growth of *A. franciscana* even at concentrations considerably lower than LC₅₀.

Key words: Toxicity, *Artemia*, zinc, nickel

INTRODUCCIÓN

Los metales se hallan presentes formando parte de todos los seres vivos. Los metales son considerados no esenciales cuando no tienen una función biológica conocida, y esenciales, entre los que están el níquel y el zinc, cuando son necesarios para

el desarrollo y el crecimiento normal de los organismos (Páez-Osuna 1996a). Los metales esenciales y no esenciales resultan altamente tóxicos en altas concentraciones en el medio y en los tejidos de los organismos, ya que provocan perturbaciones en una amplia variedad de sistemas enzimáticos

en los compartimientos intracelulares (Páez-Osuna 1996b). El peligro de los elementos metálicos potencialmente tóxicos depende de su concentración en el medio y de su combinación con compuestos orgánicos presentes en los sedimentos costeros y su ingreso a las cadenas alimentarias, donde pueden ocurrir procesos de bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación (Ponce-Vélez & Vázquez-Botello 1991). Otros factores como el pH, la concentración de microorganismos y la cantidad o tipo de aguas residuales también pueden afectar en menor grado la toxicidad de los metales (Albek et al. 1997).

La alta concentración de metales en el ambiente tiene frecuentemente un origen antropogénico. Los metales clase B (Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn y Fe) originados por la actividad humana son una de las principales fuentes de contaminación por metales en las aguas marinas (Canli et al. 2001). Los elementos tóxicos que llegan al mar provenientes de fuentes de desechos municipales, agrícolas o industriales, pueden permanecer suspendidos en la columna de agua, ser incorporados por la fauna acuática, o depositarse en el fondo incorporándose a los sedimentos marinos (Beg et al. 2001). Recientemente, Vázquez & Sharma (2004) relacionaron las altas concentraciones de níquel, plomo, zinc y cobre en los sedimentos de la Sonda de Campeche con la combustión de la gasolina y las actividades de exploración, producción de hidrocarburos y al transporte marítimo en el área. Otra fuente de contaminación por metales de los ecosistemas costeros lo constituye el material en suspensión que arrastran los ríos hacia las lagunas costeras durante la época de lluvia. Las partículas en suspensión son el principal medio de transporte de diversos elementos hacia las zonas ribereñas y estuarinas (Shumilin et al. 2005).

La contaminación de este origen puede afectar ecosistemas marinos, acuáticos costeros y limnéticos en los que habitan numerosos organismos de importancia comercial o alto potencial para la acuicultura, entre los que se encuentra el crustáceo Branchiopodo *Artemia franciscana* Kellogg, 1906.

Los diferentes estadios del ciclo de vida del género *Artemia* se han utilizado en diversos estudios toxicológicos que incluyen el efecto de diver-

sos contaminantes como metales (Jayasekara et al. 1986; Chen & Liu 1987; Liu & Chen 1987; MacRae & Pandey 1991; Hadjispyrou et al. 2001), elementos teratogénicos (Kerster & Schaeffer 1983), aguas costeras contaminadas con hidrocarburos del petróleo (Beg et al. 2001), arsénico (Brix et al. 2003), compuestos cuaternarios de amonio (Nalecz-Jawecki et al. 2003), lixiviados de basureños (Svensson et al. 2005) y aldehídos (Taylor et al. 2005), entre otros.

Debido a la facilidad de su cultivo, corto ciclo de vida y a su distribución cosmopolita, *Artemia* ha ganado popularidad como organismo de prueba en estudios de toxicología y es una alternativa al uso de otros invertebrados por la posibilidad de obtener organismos neonatos de forma sincrónica y con una condición fisiológica uniforme (Papadopoulos et al. 2004). Otra característica que hace a este organismo útil en estudios de toxicología es que puede ser cultivado en salinidades que varían entre 5 y 150 ups y se adapta a un amplio intervalo de condiciones ambientales (Panagoula et al. 2002).

Liu & Chen (1987) determinaron el efecto de varios metales sobre el ritmo de eclosión de *Artemia salina*. Ellos registraron al cobre, zinc y níquel como los metales más tóxicos, que afectaron el ritmo de eclosión en función de su concentración en el medio. Teniendo en cuenta lo anterior, se estudió la toxicidad del níquel y el zinc en *Artemia franciscana*, con el objetivo de determinar el efecto de estos metales en el porcentaje de eclosión, la supervivencia de nauplios, el crecimiento y el metabolismo respiratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Organismos de prueba

Los ensayos se realizaron con *Artemia franciscana* (Salt Creek, Inc., Salt Lake City, USA).

Procedimiento para la obtención de las soluciones utilizadas

En todos los experimentos se utilizó agua de mar artificial (Instant Ocean) preparada con agua destilada y ajustada a 35 ups. Las soluciones patrón

fueron preparadas con una concentración de 4000 mg l⁻¹ de níquel y zinc a partir de cloruro de níquel hexahidratado NiCl₂·6H₂O (Riedel-de Haën) y de cloruro de zinc (ZnCl₂) (Baker Analyzed) disueltos en agua de mar artificial (Instant Ocean). Para facilitar la solubilidad de las sales metálicas se utilizó ácido clorhídrico 1 N (Riedel-de Haën) y posteriormente el pH se ajustó entre 7.5 a 8.0 con hidróxido de sodio 1.56 M (Aldrich). Los recipientes experimentales y toda la cristalería utilizada se lavaron con solución Extran al 20 % (Sigma), se enjuagaron con agua destilada para eliminar cualquier vestigio del detergente neutro y se lavaron con HCl al 10 % para eliminar restos de metales.

Condiciones experimentales

Los experimentos se realizaron en un laboratorio climatizado. Los recipientes experimentales se colocaron en baños de agua a 28.0 ± 0.2 °C mantenida con un termostato, con iluminación artificial constante y cuatro repeticiones por tratamiento (en los experimentos de crecimiento se utilizaron tres repeticiones por tratamiento).

Efectos sobre la eclosión

El efecto del níquel y zinc sobre la eclosión se determinó en recipientes de polietileno. En 30 ml de agua de mar artificial se colocaron aproximadamente 100 quistes previamente hidratados en agua dulce durante una hora. Los quistes hidratados se concentraron en un recipiente con agua de mar y aireación y se tomó una muestra equivalente a aproximadamente 100 quistes con una micropipeta. Antes de realizar la transferencia a los recipientes experimentales, los quistes se colocaron sobre una malla de 50 μm y papel absorbente para descartar el agua presente y evitar la dilución de las concentraciones experimentales. Las concentraciones de níquel y zinc utilizadas se establecieron de acuerdo a los resultados de Liu & Chen (1987) y fueron de 0, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 mg l⁻¹. A las 30 h se añadieron dos o tres gotas de Lugol y se cuantificó: 1) el número de quistes sin eclosionar, 2) estadios de gota (estado E-2): en el cual la membrana de eclosión está aún unida al corion, 3) embriones: cuando el embrión se libera totalmente del corion, pero aún está dentro de la membrana

de eclosión y 4) nauplios libres: los que ya lograron romper la membrana de eclosión y nadan libremente (Sorgeloos *et al.* 1986).

Efectos sobre la mortalidad de nauplios

Para obtener los nauplios se utilizó 1 g de quistes hidratados en agua dulce durante 1 h, se colocó en 1l de agua de mar artificial con aireación e iluminación constante y mantenida a 28 °C. A las 30 h se cosecharon los nauplios y se lavaron con suficiente agua de mar artificial para eliminar los desechos de la eclosión.

Con una pipeta Pasteur se capturaron los nauplios, los cuales se transfirieron a los recipientes experimentales siguiendo el mismo método utilizado para los quistes. En cada recipiente experimental se colocaron 10 nauplios en 30 ml de agua de mar artificial, diferentes concentraciones de los metales y 200 000 cel ml⁻¹ de *Dunaliella tertiolecta* como alimento. Las concentraciones de níquel y zinc utilizadas fueron de 0, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 mg l⁻¹. Las concentraciones se establecieron teniendo en cuenta los resultados de un ensayo piloto previo. La mortalidad se cuantificó cada 24 h hasta las 96 h. Los datos de mortalidad se transformaron a valores de Probit (Wepierre 1981) para el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀).

Efectos sobre el crecimiento

Para determinar el efecto de los metales sobre el crecimiento se utilizaron frascos de vidrio de fondo redondo de 1l de capacidad con 500 ml de agua de mar artificial, 20 nauplios de *A. franciscana* por ml, diferentes concentraciones de los metales, 200 000 cel ml⁻¹ de *D. tertiolecta* como alimento y aireación. Los nauplios se obtuvieron y transfirieron a los recipientes experimentales siguiendo el método descrito en el experimento anterior. Las concentraciones de níquel y zinc utilizadas fueron de 0, 5, 10 y 15 mg l⁻¹. La concentración mayor fue inferior a la concentración que mostró algún efecto en el experimento de mortalidad de nauplios. Tres repeticiones se realizaron por concentración. Diariamente se realizó un recambio del 50 % del agua, la cual se repuso con la concentración correspondiente de los metales y ajustándose el alimento. Al inicio del experimento y cada 24 h durante las 240

Tabla 1. Análisis de covarianza del crecimiento de *Artemia franciscana* en diferentes concentraciones de Ni y Zn. Pendientes (b), interceptos (a) y coeficientes de determinación (R^2) de las líneas de regresión calculadas (letras diferentes en una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Todos los valores de R^2 son significativos)

Table 1. Analysis of covariance between *Artemia franciscana* growth at different Ni and Zn concentrations. Slopes (b), intercepts (a) and coefficients of determination (R^2) of the calculated regression lines (different lines in a column indicate significant differences ($p < 0.05$). All R^2 values are significant).

concentración mg l ⁻¹	Ni			Zn		
	b	a	R ²	b	a	R ²
0	0.00345 ^a	2.90834 ^a	0.8749	0.00348 ^a	2.79567	0.8809
5	0.00339 ^a	2.86094 ^b	0.8466	0.00143 ^b	2.81997 ^a	0.6326
10	0.00330 ^a	2.83133 ^c	0.8569	0.00137 ^b	2.83943 ^a	0.6315
15	0.00234 ^b	2.85964	0.7422	0.00122 ^c	2.84727	0.6245

h que duró el experimento, se extrajo una muestra de 10 organismos de cada recipiente, los cuales se fijaron con Lugol para su posterior medición. Las mediciones se realizaron mediante el análisis de imágenes obtenidas con una cámara digital (Evolution MP) acoplada a un microscopio biológico y con la ayuda del software Image Pro Plus (v 4.5). Los organismos se midieron desde la región anterior del rostrum hasta el final de la furca.

Efectos sobre la respiración

Para determinar el efecto de los metales sobre el metabolismo respiratorio los organismos se mantuvieron en las mismas condiciones que en el experimento de crecimiento, las concentraciones de níquel y zinc utilizadas fueron de 0, 1.67, 3.34 y 5 mg l⁻¹, la mayor concentración utilizada representó el 25% de la concentración en la que no se encontró efecto en el experimento de mortalidad de nauplios. El consumo de oxígeno se midió en organismos mantenidos durante 48 y 120 h en las condiciones experimentales. El consumo de oxígeno se determinó con un microrespirómetro cerrado utilizando cámaras respirométricas de vidrio (RC-300, Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK). Doce cámaras respirométricas se conectaron en serie a un baño de temperatura constante (28.0 ± 0.1 °C), utilizando un criotermostato de circulación (Julabo, modelo EC-5). Treinta minutos antes de comenzar las mediciones se colocó un organismo en cada cámara con 1 ml de agua con la concentración del metal correspondiente. Una vez aclimatados los organismos se determinó la variación de la tensión de oxígeno en el agua de las cámaras por un periodo de 5 min utilizando dos microelectrodos de oxígeno conectados a un oxímetro (Strathkelvin Instrument, Glasgow, U.K., modelo 782). Una cámara control sin animal se utilizó por cada cinco cámaras con animales, realizándose 10 mediciones para cada condición experimental. Al finalizar las determinaciones de oxígeno los animales se lavaron con agua destilada, se secaron en una estufa a 60 °C por 24 h y se determinó el peso seco con ayuda de una microbalanza (CAHN modelo C-33) con 0.001 mg de precisión. Los resultados se expresaron en microgramos de oxígeno por hora por miligramo de peso seco ($\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ps}$).

matados los organismos se determinó la variación de la tensión de oxígeno en el agua de las cámaras por un periodo de 5 min utilizando dos microelectrodos de oxígeno conectados a un oxímetro (Strathkelvin Instrument, Glasgow, U.K., modelo 782). Una cámara control sin animal se utilizó por cada cinco cámaras con animales, realizándose 10 mediciones para cada condición experimental. Al finalizar las determinaciones de oxígeno los animales se lavaron con agua destilada, se secaron en una estufa a 60 °C por 24 h y se determinó el peso seco con ayuda de una microbalanza (CAHN modelo C-33) con 0.001 mg de precisión. Los resultados se expresaron en microgramos de oxígeno por hora por miligramo de peso seco ($\mu\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ps}$).

Análisis estadístico.

Los datos de porcentaje de nauplios, estadios de gota y embriones se transformaron con arcsen y posteriormente se aplicó un análisis de varianza seguido de una prueba de Dunnett para contrastar los tratamientos con el control. Para determinar el efecto de los metales sobre el crecimiento los datos de longitud se transformaron a logaritmos, se realizó un análisis de regresión y posteriormente las curvas de crecimiento obtenidas se contrastaron mediante análisis de covarianza y se utilizó el método de comparación múltiple de Tukey-Kramer para determinar cuales pendientes o interceptos eran diferentes de los demás. Los valores de consumo de

oxígeno obtenidos para cada concentración de metal se compararon utilizando un análisis de varianza y prueba de Dunnett (Zar 1984).

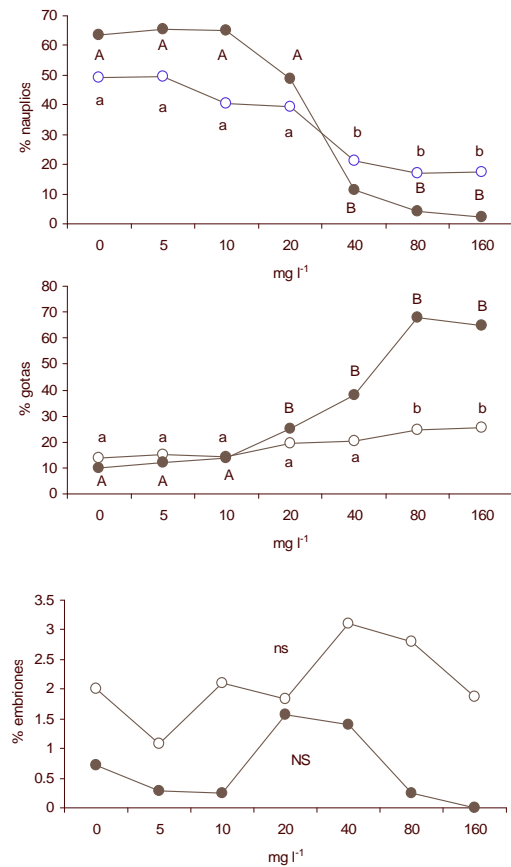


Figura 1. Porcentaje de nauplios, estadios de gota y embriones de *Artemia franciscana* después de 30 h de incubación en diferentes concentraciones de níquel (Ni²⁺) y zinc (Zn²⁺). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), (ns, $p > 0.05$). Círculos blancos, letras minúsculas = zinc; círculos negros, letras mayúsculas = níquel.

Figure 1. Percentage of *Artemia franciscana* nauplii, drop stages and embryos obtained after a 30 h exposure to different nickel (Ni²⁺) and zinc (Zn²⁺) concentrations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), ns = no significant differences ($p > 0.05$). Open circles, lower case = zinc; solid circles, capital letters = nickel.

RESULTADOS

Efectos sobre la eclosión.

El porcentaje de eclosión disminuyó (Figura 1) al incrementarse las concentraciones de níquel y

zinc. Las concentraciones superiores a 40 mg l⁻¹ de ambos metales afectaron significativamente el porcentaje de eclosión (Dunnett; $F = 71.21$, $p = 0.000$ y $F = 32.66$, $p = 0.000$) para Ni y Zn, respectivamente. En concentraciones superiores a 40 mg l⁻¹ de Zn se obtuvieron porcentajes de eclosión inferiores al 20 %. Este efecto fue más marcado con el Ni, con el cual en concentraciones superiores a 40 mg l⁻¹, la eclosión fue menor al 10 %.

Los porcentajes de estadios de gota se incrementaron conforme la concentración de ambos metales aumentó y la eclosión disminuyó. En el caso del Zn, la prueba mostró un incremento significativo de los estadios de gota respecto al control en concentraciones de 80 mg l⁻¹ y superiores (Dunnett; $F = 6.24$, $p = 0.003$), en estas concentraciones el porcentaje de estadios de gota superó el 24 %. El efecto del Ni fue más marcado, ya que el porcentaje de estadios de gota se incrementó significativamente a partir de 20 mg l⁻¹ (Dunnett; $F = 68.69$, $p = 0.001$), llegando hasta 68 % en la concentración de 80 mg l⁻¹.

El porcentaje de embriones encontrados fue bajo en todas las concentraciones de Zn y Ni probadas y no presentó diferencias significativas con el control (Dunnett; $F = 1.22$, $p = 0.339$ y $F = 1.36$, $p = 0.276$, respectivamente).

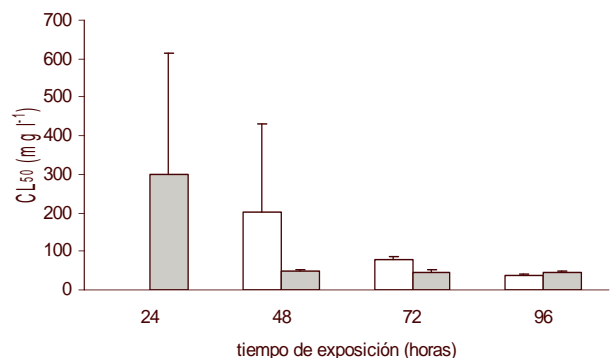


Figura 2. Valores de las concentraciones letales (CL₅₀) de nauplios de *Artemia franciscana* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición al níquel (Ni²⁺) y zinc (Zn²⁺). Las líneas indican la desviación estándar. Barras blancas = níquel; barras grises = zinc.

Figure 2. Lethal concentration values (LC₅₀) for *Artemia franciscana* nauplii after 24, 48, 72 and 96 h of exposure to nickel (Ni²⁺) and zinc (Zn²⁺). Lines represent standard deviation. White bars = nickel; grey bars = zinc.

Efectos sobre la mortalidad de nauplios

La mortalidad de los nauplios de *Artemia* en las diferentes concentraciones de níquel y zinc tuvo una relación directa con los tiempos de exposición (Figura 2). En concentraciones iguales y superiores a 80 mg l⁻¹ los nauplios de *Artemia* resultaron más sensibles al Ni, aunque en esta concentración ambos metales provocaron la muerte de más del 50 % de los individuos a las 72 h de exposición. La mortalidad fue de 73.7 % a las 72 h con el Ni y de 59.1 % con el Zn y a las 96 h la mortalidad alcanzó 94.9 % para el Ni y 76.5 % para el Zn. A partir de concentraciones de 160 mg L⁻¹ de los metales la respuesta de los nauplios cambió. Esta concentración provocó 90.2 % de mortalidad en el Zn y 54.5 % en el Ni a las 48 h de exposición con mortalidades de prácticamente del 100 % a partir de las 72 h. Concentraciones de Zn de 320 y 640 mg l⁻¹ causaron 55.7 y 75.4 % de mortalidad, respectivamente a las 24 h de exposición y la muerte de todos los individuos a las 48 h. Valores semejantes de mortalidad se encontraron en estas mismas concentraciones para el caso del Ni a las 48 h de exposición con 59.5 y 71.4 % de mortalidad respectivamente. A partir de las 72 h de exposición se produjo la muerte de todos los individuos.

Para el Ni no se muestra la CL₅₀ 24 h, ya que ninguna de las concentraciones probadas causó la muerte del 50 % de los nauplios en 24 horas. Los valores de CL₅₀ (96 h) fueron de 44.8 ± 5.4 mg l⁻¹ para el Zn y 37.3 ± 5.5 mg l⁻¹ para el Ni.

Efectos sobre el crecimiento.

Para todas las líneas de crecimiento calculadas a partir de mediciones diarias de los largos en organismos mantenidos durante 240 h en diferentes concentraciones de Zn y Ni se obtuvieron coeficientes de determinación (R²) significativos (Tabla 1). En el caso del níquel, el análisis de covarianza mostró que las pendientes de las líneas de crecimiento correspondientes al control, 5 y 10 mg l⁻¹ fueron iguales, pero sus interceptos fueron diferentes, por lo que representan líneas diferentes. La línea del crecimiento en 15 mg l⁻¹ tuvo una pendiente significativamente menor a las demás (Tabla 1). El crecimiento de *A. franciscana* fue afectado significativamente desde una concentración de 5

mg Ni l⁻¹.

Cuando se analizan los resultados obtenidos con el Zn, el análisis de covarianza muestra que para todas las concentraciones del metal probadas el crecimiento es significativamente menor que en el control (Tabla 1), en este caso las concentraciones de 5 y 10 mg l⁻¹ afectaron por igual el crecimiento con líneas de pendientes e interceptos iguales. Este metal afectó más el crecimiento que el Ni en todas las concentraciones, con una menor pendiente en las líneas de crecimiento.

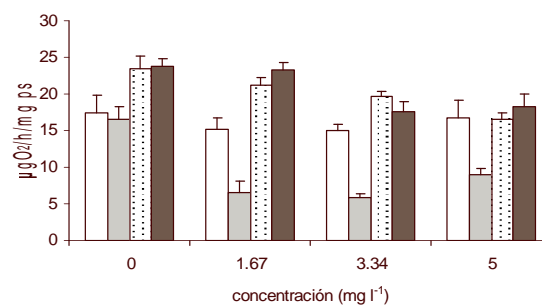


Figura 3. Valores medios del consumo de oxígeno (µg O₂ h⁻¹ mg⁻¹ ps) de *Artemia franciscana* mantenidas por 48 y 120 h en diferentes concentraciones de níquel (Ni²⁺) y zinc (Zn²⁺). Las líneas representan la desviación estándar. Barras blancas = zinc 48 h; barras grises = zinc 120 h; barras punteadas = níquel 48 h; barras negras = níquel 120 h.

Figure 3. Mean oxygen consumption values (µg O₂ h⁻¹ mg⁻¹ dw) for *Artemia franciscana* reared during 48 and 120 h at different nickel (Ni²⁺) and zinc (Zn²⁺) concentrations. Lines represent standard deviation. White bars = zinc 48 h; grey bars = zinc 120 h; dotted bars = nickel 48 h; black bars = nickel 120 h.

Efectos sobre la respiración.

El efecto de los dos metales (Figura 3, Tabla 2) no fue el mismo en los diferentes tiempos de exposición. En las primeras 48 h, solamente en los organismos mantenidos en la concentración de 5 mg Ni l⁻¹ se observó una depresión (29 %) significativa del consumo de oxígeno (F = 5.4; p = 0.001). A las 120 h de exposición se estimó una disminución significativa del consumo de oxígeno con respecto a los organismos control en concentraciones de 3.34 mg Ni l⁻¹ (25 %) y 5 mg Ni l⁻¹ (23 %) (F = 5.90; p = 0.009 y p = 0.012, respectivamente). A las 120 h de exposición, todas las concentraciones de Zn probadas tuvieron un efecto significativo sobre el consumo de oxígeno con una disminución entre 45 y 65 % respecto a los valores del grupo control (F = 16.20; p < 0.000).

Tabla 2. Resultados de la prueba de Dunnett para los valores de consumo de oxígeno de *Artemia franciscana* mantenidas por 48 y 120 h en diferentes concentraciones de níquel y zinc.

Table 2. Results of the Dunnett test for oxygen consumption values for *Artemia franciscana* reared for 48 and 120 h in different nickel and zinc concentrations.

metal	concentración mg l ⁻¹	48 hrs	120 hrs
		p	p
níquel	0	-	-
	1.67	0.4122	0.9748
	3.34	0.0996	0.0091
	5	0.0015	0.0120
zinc	0	-	-
	1.67	0.7043	0.0000
	3.34	0.6989	0.0000
	5	0.9884	0.0004

DISCUSIÓN

Algunos metales esenciales como el Zn y el Ni participan en reacciones redox, en la transferencia de electrones y en la catálisis enzimática de multitud de reacciones (Zenk 1996) y pueden volverse tóxicos cuando están presentes en concentraciones suficientemente altas en el medio (Khan & Nugegoda 2003). Las concentraciones subletales de Zn y Ni afectan a los mecanismos de osmorregulación, la actividad de la Na/K ATPasa o el flujo de agua e iones, o ambas en numerosos crustáceos (Lignot *et al.* 2000).

Los efectos significativos del Ni y el Zn sobre la eclosión a partir de una concentración de 40 mg l⁻¹ y el mayor efecto tóxico del Ni que del Zn estimados en este estudio resultaron contradictorios con los obtenidos por otros autores que analizaron los efectos de diferentes metales sobre la eclosión de *Artemia*. Liu & Chen (1987) y MacRae Pandey (1991) registraron que el Zn resultó más tóxico que el Ni. Esta contradicción se atribuye a la diferencia en la respuesta de diferentes estirpes de *Artemia* como han señalado Sorgeloos *et al.* (1978) y Vanhaecke & Sorgeloos (1982).

Además de la diferencia en el grado de to-

xicidad, el Ni y el Zn afectaron de diferente forma el proceso de eclosión, en el caso del Zn, a partir de 40 mg l⁻¹ más del 55% de los quistes fue contabilizado en la categoría en la que no se observó evidencia del comienzo del proceso de eclosión (quistes no eclosionados). Mientras que en el caso del Ni, el mayor porcentaje de los organismos que no eclosionaron se encontraron en el estadio de gota, lo que indicó que en este momento se detuvo el proceso de eclosión. Este diferente efecto de distintos metales en el proceso de eclosión no lo hemos encontrado reportado en otro trabajo y merece un estudio más detallado que permita esclarecer qué mecanismo específico afecta cada metal durante la eclosión.

El efecto de los metales sobre la mortalidad de los nauplios varió de acuerdo a la concentración de los metales en el medio y al tiempo de exposición al tóxico, lo que se puede relacionar también con la edad de los individuos. En las primeras 48 h de exposición a los metales el Zn resultó más tóxico que el Ni, mientras que a las 72 y 96 h los valores de la concentración letal media (CL₅₀) son muy semejantes para ambos metales. Sin embargo, en concentraciones bajas de los metales los nauplios parecieron ser más sensibles al Ni y en las concentraciones más altas el Zn tuvo un efecto más marcado. También se puede hacer notar que ambos metales tuvieron un efecto mayor en la eclosión que sobre los nauplios. Estos resultados coinciden con los encontrados por MacRae & Pandey (1991) cuando analizaron los efectos del Ni y el Zn sobre la eclosión y la mortalidad de larvas y adultos de *Artemia*.

En este estudio se encontró que aún en concentraciones notoriamente menores que la CL₅₀ el Ni y el Zn afectaron negativamente el crecimiento de *A. franciscana* y deprimieron significativamente la respiración. Estos resultados confirman la importancia de incorporar investigaciones relacionadas con el metabolismo en condiciones subletales a los estudios de toxicología, como una alternativa a las pruebas de toxicidad aguda (O'Mahony *et al.* 2005).

El Ni en concentraciones altas afecta la supervivencia, el crecimiento y la reproducción de los organismos acuáticos (Khan & Nugegoda 2003), el Ni también altera el metabolismo de carbohi-

dratos y proteínas en diversas especies y deteriora las señales celulares, lo que unido a su capacidad de disminuir las reservas de glutatión en las células constituye un mecanismo epigenético de carcinogénesis (Krezel & Bal 2004). Estos autores también mostraron que el Ni afecta el sistema de señalización redox de las células. Kwast & Hand (1996) demostraron que las condiciones de hipoxia y otros inhibidores del transporte electrónico que reducen el estado redox en la matriz mitocondrial redujeron significativamente la síntesis de proteínas en mitocondrias aisladas de *A. franciscana*. La exposición aguda al Zn redujo la ingestión de alimento y el consumo de oxígeno (32%) en los estadios postlarvales del camarón *Farfantepenaeus paulensis*, lo que explica la reducción del crecimiento encontrada en estos estadios cuando se sometieron a una exposición crónica al metal (Santos et al. 2000). El efecto negativo del Zn sobre el crecimiento también está relacionado con una disminución en el porcentaje del área celular del hepatopáncreas como encontraron Odendaal & Reinecke (2004) en el anfípodo *Porcellinides pruinosis*, una reducción en el tamaño de las células B del hepatopáncreas podría afectar el crecimiento en los crustáceos si se tiene en cuenta que estas células están involucradas en los procesos de digestión y absorción como han mostrado Al-Mohana & Nott (1986).

Al analizar el efecto tóxico de los metales se debe considerar la posibilidad de su acumulación y transporte a través de la trama trófica en organismos que se desarrollan en ambientes contaminados. Chen & Liu (1987) encontraron que el Ni y el Zn pueden concentrarse en nauplios de *Ar-*

temia salina de 10 a 100 veces por encima de su concentración en el medio. La concentración interna de los metales en nauplios de *Artemia* podría afectar a sus depredadores como se ha demostrado que ocurre con los pesticidas organoclorados, en larvas de trucha *Salvelinus fontinalis* Wang & Simpson (1996) encontraron una acumulación de DDT a través de la cadena alimenticia cuando los organismos fueron alimentados con nauplios de *Artemia salina* que habían sido expuestos a diferentes concentraciones del tóxico durante 24h.

El crecimiento y el metabolismo respiratorio son parámetros que reflejan la condición fisiológica general de los organismos y ayudan a evaluar el efecto de los cambios ambientales sobre los mismos. A pesar de que el Ni y el Zn son micro nutrientes esenciales, aún en concentraciones muy por debajo de la concentración letal media deprimen el metabolismo respiratorio y el crecimiento en *A. franciscana*, lo que demuestra que el estudio de los procesos fisiológicos constituye una herramienta importante para comprender los mecanismos toxicológicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos PROMEP (UACAR-PTC-27) y UNACAR (DIP/16/2003). Los autores agradecen a la Biol. Gabriela Palomino por facilitar las cepas de microalgas utilizadas, así como a la Ing. Ana Mercedes Centeno Metelín por el manejo de los cultivos de microalgas. Agradecemos a la Quim. Mirna Sabido Pérez a la Facultad de Química de la UNACAR por las facilidades brindadas para la realización de los experimentos.

LITERATURA CITADA

- Albek ML, Yetis U, Gökçay CF (1997) Effects of Ni(II) on respirometric oxygen uptake. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 636-641.
- Al-Mohana SY, Nott JA (1986) B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). J. Mar. Biol. Ass. U.K. 66: 403-414.
- Beg MU, Al-Muzaini S, Saeed T, Jacob PG, Beg KR, Al-Bahloul M, Al-Matrouk K, Al-Obaid T, Kurian A (2001) Chemical contamination and toxicity of sediment from a coastal area receiving industrial effluents in Kuwait. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41: 289-297.
- Brix KV, Cardwell RD, Adams WJ (2003) Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 54 (2): 169-175.

- Canli M, Kalay M, Ay O (2001) Metal (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Cr, Ni) concentrations in tissues of a fish *Sardina pilchardus* and a prawn *Peaenus japonicus* from three stations on the Mediterranean Sea. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 75-82.
- Chen JC, Liu PC (1987) Accumulations of heavy metals in the nauplii of *Artemia salina*. *J. World Aquac. Soc.* 18 (2): 84-93.
- Hadjispyrou S, Kungolos A, Anagnostopoulos A (2001) Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49 (2): 179-186.
- Jayasekara S, Drown DB, Sharma RP (1986) Tolerance to cadmium and cadmium-binding ligands in Great Salt Lake brine shrimp (*Artemia salina*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 11 (1): 23-30.
- Kerster HW, Schaeffer DJ (1983) Brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii as a teratogen test system. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 7 (3): 342-349.
- Khan S, Nugegoda D (2003) Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* accumulates and deperates nickel. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: 308-314.
- Krezel A, Bal W (2004) Contrasting effects of metal ions on S-nitrosoglutathione, related to coordination equilibria: GSNO decomposition assisted by Ni(II) vs stability increase in the presence of Zn(II) and Cd(II). *Chem. Res. Toxicol.* 17: 392-403.
- Kwast KE, Hand SC (1996) Acute depression of mitochondrial protein synthesis during anoxia. Contributions of oxygen sensing, matrix acidification, and redox state. *J. Biol. Chem.* 271 (13): 7313-7319.
- Lignot JH, Spanings-Pierrot C, Charmantier G (2000) Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191: 209-245.
- Liu PC, Chen JC (1987) Effects of heavy metals on the hatching rates of brine shrimp *Artemia salina* cysts. *J. World Aquac. Soc.* 18 (2): 78-83.
- MacRae TH, Pandey AS (1991) Effects of metals on early life stages of the brine shrimp, *Artemia*: a developmental toxicity assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20 (2): 247-252.
- Nalecz-Jawecki G, Grabińska-Sota E, Narkiewicz P (2003) The toxicity of cationic surfactants in four bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 87-91.
- Odendaal JP, Reinecke AJ (2004) Bioaccumulation of cadmium and zinc, and field validation of a histological biomarker in terrestrial isopods. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 769-776.
- O'Mahony FC, O'Donovan C, Hynes J, Moore T, Davenport J, Papkovsky DB (2005) Optical oxygen microrespirometry as a platform for environmental toxicology and animal model studies. *Environ. Sci. Technol.* 39: 5010-5014.
- Páez-Osuna F (1996a) Efectos de los metales. En: Vázquez-Botello A, Rojas-Galaviz JL, Benítez JA, Zárate-Lomeli D (eds) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica; (5): 666 pp.
- Páez-Osuna F (1996b) Fuentes de metales en la zona costera marina. En: Vázquez-Botello A, Rojas-Galaviz JL, Benítez JA, Zárate-Lomeli D (eds) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5: 666 pp.
- Panagoula B, Panayioti M, Iliopoulou-Georgudaki J (2002) Acute Toxicity of TBT and IRGAROL in *Artemia salina*. *Int. J. Toxicol.* 21: 231-233.
- Papadopoulos AI, Lazaridou E, Mauridou G, Touraki M (2004) Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. *Mar. Biol.* 144: 259-301.
- Ponce-Vélez G, Vázquez-Botello A (1991) Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Términos, Campeche. *Hidrobiologica* 1(2): 1-10.
- Santos MH, Troca da Cunha N, Bianchini A (2000) Effects of copper and zinc on growth, feeding and oxygen consumption of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae (Decapoda: Penaeidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247 (2): 233-242.

- Shumilin E, Meyer-Willerer A, Marmolejo-Rodríguez AJ, Morton-Bermea O, Galicia-Pérez MA, Hernández E, González-Hernández G (2005) Iron, cadmium, chromium, copper, cobalt, lead, and zinc distribution in the suspended particulate matter of the tropical Marabasco River and its estuary, Colima, Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 74: 518-525.
- Sorgeloos P, Remiche-Van Der Wielen C, Persoone G (1978) The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests - a critical analysis. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2: 249-255.
- Sorgeloos P, Lavens P, Lè P, Tackaert W, Versichele D (1986) Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. State University of Ghent, Belgium. Faculty of Agriculture: 319 pp.
- Svensson BM, Mathiasson L, Mårtensson L, Bergström S (2005) *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. Environ. Monit. Assess. 102 (1-3): 309-21.
- Taylor RL, Caldwell GS, Bentley MG (2005) Toxicity of algal-derived aldehydes to two invertebrate species: do heavy metal pollutants have a synergistic effect? Aquat. Toxicol. 74 (1): 20-31.
- Vanhaecke P, Sorgeloos P (1982) International study on *Artemia*. 18. The hatching rate of *Artemia* cysts - a comparative study. Aquacult. Eng. 1: 263-273.
- Vázquez FG, Sharma VK (2004) Major and trace elements in sediments of the Campeche Sound, southeast Gulf of Mexico. Mar. Pollut. Bull. 48: 87-90.
- Wang JS, Simpson KL (1996) Accumulation and depuration of DDTs in the food chain from *Artemia* to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56: 888-895.
- Wepierre J (1981) Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire, Masson et Cie, Paris. 203 pp.
- Zar JH (1984) Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 718 pp.
- Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. Gene 179: 21-30.