

14. Estudio experimental sobre la transferencia trófica de plomo hacia el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

Soto-Jiménez^a, M.F., Arellano-Fiore^b, C., Rocha-Velarde^c, R., Jaramarini^d, M.E., Ruelas-Inzunza^b, J.R., Páez-Osuna^a F.

^aInstituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México

^bInstituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán, Sinaloa, México

^cAcuario Mazatlán, Mazatlán, México

^dCentro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México

A partir del uso intensivo del plomo, principalmente como aditivo de las gasolinas, la presencia de este metal ha sido observada desde los sitios más urbanizados hasta los más remotos de la tierra. Solamente en México, se estima que se adicionaron más de medio millón de toneladas métricas de tetraetilo de plomo durante el periodo de 1940's-1997 (Soto-Jiménez *et al.*, 2006). Con base en el consumo histórico de gasolina, se ha estimado que se arrojaron al ambiente asociado al Golfo de California, al menos 80,000 toneladas de este metal (Soto-Jiménez y Flegal, 2009). Por tanto, no es sorprendente que se encuentren concentraciones relativamente elevadas del metal en el agua, sedimentos, plantas y animales marinos (Páez-Osuna *et al.*, 1993; 2002; Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 2000; Ruelas-Inzunza *et al.*, 2000; Soto-Jiménez *et al.*, 2003; 2006; 2008; Green-Ruiz y Páez-Osuna, 2001; Morales-Hernández *et al.*, 2004; Soto-Jiménez y Flegal, 2009).

El plomo es un metal no esencial, es decir, sin función biológica conocida. Los organismos filtradores y los de más alto nivel trófico tienden a acumularlo. El plomo es tóxico para especies marinas a intervalos de concentraciones en el agua entre 50 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ y puede afectar el crecimiento, la fecundidad e incrementar la

mortalidad de los organismos (EPA, 1999). Sin embargo, aunque los efectos tóxicos sean reconocidos, la magnitud del impacto en los individuos, especies y ecosistemas es poco entendida. Preguntas básicas sobre cómo el plomo es tomado del ambiente, transferido y acumulado en la cadena trófica de un ecosistema y sus implicaciones para la biodiversidad y la salud pública, aun necesitan respuestas.

Existe una gran controversia sobre si las concentraciones de Pb en tejidos de especies de diferentes niveles tróficos disminuyen o se incrementan con la posición en la cadena alimentaria. Según resultados de estudios realizados en la región (e.g. Soto-Jiménez *et al.*, 2008; Jara-Marini *et al.*, 2009; ver cap. 13), hipotéticamente se ha considerado que no ocurre una bio-magnificación del plomo en la cadena trófica, sino una bio-disminución. Para probar esta hipótesis se formuló la presente investigación que tiene como fin evaluar la transferencia del metal en una cadena trófica simulada desde un productor primario (fitoplancton *Tetraselmis suecica*) hasta un consumidor secundario (camarón blanco *Litopenaeus vannamei*), especies marinas representativas de los ecosistemas costeros del Golfo de California. El camarón blanco *L. vannamei* es el crustáceo de mayor importancia comercial en México y el de mayor cultivo en el país y en el mundo.

La estrategia metodológica estuvo basada en tres aspectos básicos (**Fig. 14.1**) (Soto-Jiménez *et al.*, 2011): (a) el cultivo y/o crianza de tres especies de diferentes niveles tróficos en acuarios separados y alimentados en secuencia progresiva a su nivel trófico; (b) La exposición del productor primario a una dosis de Pb en el agua de ~2.5 veces el nivel de exposición crónica de organismos marinos según el criterio de USEPA ($8.1 \mu\text{g L}^{-1}$) <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/wqcriteria.html> y; (c) el

análisis de concentración del plomo en las especies expuestas al metal y en sus respectivos controles.

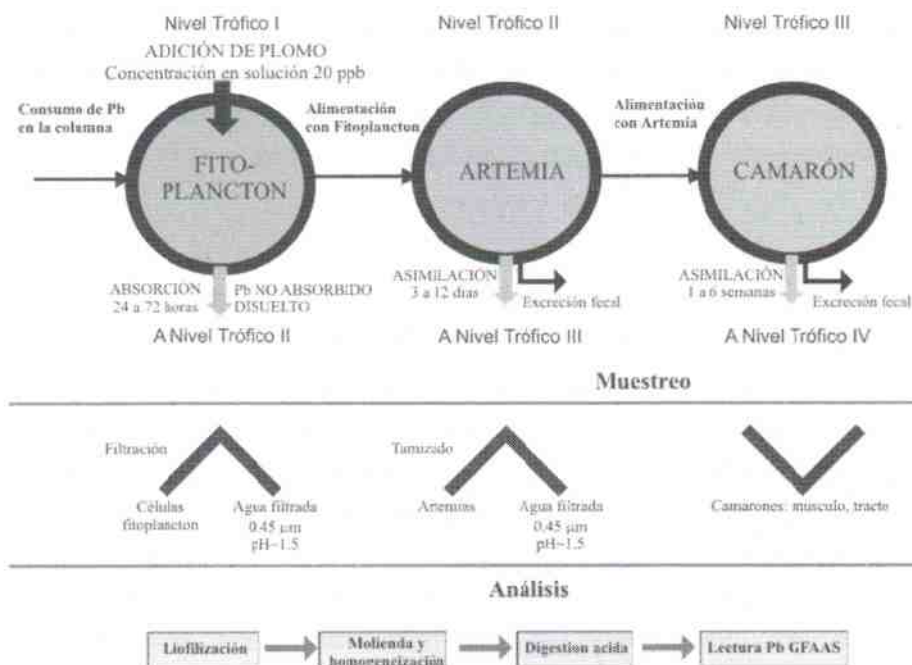


Fig. 14.1. Esquema del diseño experimental para el estudio de transferencia del plomo a través de una cadena trófica simulada.

Las preguntas planteadas en el estudio fueron las siguientes (Soto-Jiménez *et al.*, 2011): (1) sobre la bio-concentración ¿El productor primario, en este caso el fitoplancton marino *T. suecica* (nivel trófico I), toma Pb del agua y lo concentra en su tejido? (2) sobre la biotransferencia ¿El Pb que el fitoplancton concentra del agua es transferido mediante la dieta a la especie zooplanctónica *Artemia salina* (nivel trófico II)?, ¿continúa esta transferencia hasta

el camarón blanco *L. vannamei* (nivel trófico III)? (3) sobre la bioacumulación ¿se incrementa la concentración de Pb al transferirse el metal de un nivel trófico menor a uno mayor? y (4) sobre la biomagnificación ¿el incremento en las concentraciones de Pb ocurre entre los tres escalones tróficos sucesivos considerados en este estudio? Las respuestas a estas preguntas van a permitir un mejor entendimiento de los procesos de transferencia del plomo en los ecosistemas marinos.

14.1. Diseño experimental

Nivel trófico I: productor primario (fitoplancton)

A partir de una cepa pura de la microalga *T. suecica* (nivel trófico I) que fue proporcionada por la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa se realizaron inóculos empleando el medio preparado con base a la serie derivada del medio "F" (Guillard y Ryther 1962), con una variación de diluciones llamadas F/2. Los medios de cultivo fueron enriquecidos con nutrientes esenciales (nitratos de sodio, fosfatos), metales (cloruro de cobalto, sulfato cúprico, cloruro manganoso, molibdato, y sulfato de zinc) y vitaminas (cianocobalamina, tiamina y biotina cristalizada). Las inoculaciones se hicieron en ambiente estéril. La cepa se mantuvo bajo iluminación (75 watts), a temperatura constante (23°C) y haciéndose conteos al microscopio diariamente.

Mediante la técnica de dilución de 1:2 las cepas se fueron desdoblado (duplicando el volumen de incubación) hasta 16 litros, empleando agua de mar filtrada tratada con cloro y tiosulfato de sodio y aireada. Finalmente, la microalga a nivel de garrafón se desdobló en columnas transparentes de fibra de vidrio de 160 L expuestas a luz natural. En esta fase del cultivo, la microalga se

sometió a una concentración aproximada de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb mediante la adición de una solución de plomo de 1000 mg L^{-1} (como Pb^{+2} preparado a partir de PbNO_3). El Pb se adicionó junto con los nutrientes (nitratos, fosfatos, solución de vitaminas y metales) cada tercer día. Se mantuvo una columna de microalga no expuesta a la solución de plomo. La columna de microalga con Pb se mantuvo por al menos 48 horas para que el metal fuese asimilado antes de usarse como alimento de *A. salina* (nivel trófico I).

Nivel trófico II: consumidor primario (*Artemia salina*)

Quistes secos de *A. salina* (Inve Aquaculture®) se descapsularon en agua de mar en presencia de hidróxido de sodio y cloro que permiten que la cáscara del nauplio se disuelva y se asegure la eclosión. Los nauplios de Artemias nacen después de transcurridas 12 hr. Una vez eclosionados los quistes, los nauplios se transfirieron a tinas de fibra de vidrio (3000 L) con agua de mar filtrada adicionada con sal de mar sin yodo hasta una salinidad de 60 g L^{-1} . Esta salinidad previene el crecimiento de bacterias, principalmente del género *Proteus*. El agua en la tina se mantuvo a una temperatura de entre 26 y 28 °C con oxigenación casi a saturación. Inicialmente los nauplios se alimentaron con una mezcla de harina de arroz tamizada (100 micras) dos veces al día (mañana y tarde). Este alimento se les proporciona hasta que el nauplio alcanza la talla de juvenil (<5 mm), lo cual ocurre entre los 8 y 12 días después de la eclosión. Posteriormente, la artemia se alimentó con la microalga cultivada en las columnas por al menos una semana antes de ser utilizada como alimento para el camarón. Se estimó un aporte diario de 3.3-5.6 g de microalga por tina de artemia.

Nivel trófico III: consumidor secundario (*Litopenaeus vannamei*)

El camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* fue usado para este experimento (alrededor de unos 600 individuos). Los organismos fueron obtenidos de una granja del Valle de la Urraca localizada en Nayarit. El camarón tenía 23 días de haberse sembrado al arrancar este experimento, con un peso y talla promedio de 2 gramos y de 3 a 4 centímetros, respectivamente. El camarón fue capturado empleando un chinchorro, y se colocó en hieleras con agua de la granja, enfriada a 24°C y aireada para reducir el estrés de los organismos durante el transporte. Una vez en el Acuario Mazatlán, los camarones fueron colocados en una tina de fibra de vidrio de 3000 L de capacidad con agua de mar filtrada a temperatura aproximada de 26-28°C, salinidad de 34-36‰ y oxigenación casi a saturación. La aclimatación se realizó por 3 días antes de iniciar el experimento. En este periodo los camarones fueron alimentados a saciedad dos veces por día con artemia adulta viva alimentada con fitoplancton sin exposición a niveles altos de plomo.

Después de la aclimatación, los camarones se distribuyeron aleatoriamente en 16 acuarios (100 L) con 30 ejemplares en cada uno. Doce acuarios se utilizaron para los especímenes expuestos a Pb y 4 para los controles. Los camarones en los acuarios expuestos a Pb fueron alimentados dos veces al día hasta la saciedad con la artemia adulta previamente alimentada con microalgas expuestas a Pb, mientras que los camarones control fueron alimentados con artemia no expuesta. Con el fin de garantizar la cantidad suficiente de alimento para estimular el crecimiento de los camarones y para minimizar el canibalismo, los hábitos de alimentación fueron cuidadosamente observados durante y después de comer. El exceso de comida fue retirado después de 1 hora (hasta la saciedad aparente). Los especímenes que fueron atacados durante las fases

de muda fueron retirados de los experimentos. Durante el período experimental se observaron 3-4 acontecimientos de muda. Las características biométricas del camarón fueron monitoreadas durante los experimentos.

14.2. Muestreo y análisis

Con el fin de cuantificar las concentraciones de Pb en *T. suecica* y en la fracción disuelta del agua de mar, se tomó una muestra del cultivo en botellas de 1 L (LDPE, Nalgene) dos veces por semana. En el laboratorio, el fitoplancton fue separado por el filtrado de 100-300 mL de agua de cultivo a través de filtro de Teflón MilliPore^R de 0.45 µm previamente lavado para metales y empleando una bomba de vacío de cámara seca. El filtro se secó en estufa a 60°C por 24 horas y el agua filtrada se acidificó con 2 mL de ácido clorhídrico concentrado (Grado Óptima, Fisherbrand) a un pH~1.5.

Muestras de artemia (4-5 g) y camarones seleccionados al azar (3-6 organismos) fueron tomados semanalmente de los experimentos expuestos a Pb y de los controles. Los organismos fueron recogidos después de varias horas (6-12 h) de la última comida, por lo que no era necesaria la depuración. Asimismo, los desechos fecales de artemias y camarones fueron recolectados dos veces por semana, el muestreo se hizo por sifoneo y filtración por medio de una red de 40 µm. Los especímenes de camarón fueron disectados para la separación del músculo, exoesqueleto (incluyendo apéndices y pedúnculos), órganos blandos (hepatopáncreas, gónadas), y vísceras junto con tejidos restantes. Las muestras de filtros, organismos y de desechos fecales fueron congeladas y liofilizadas (133×10^{-3} mBar y -40°C por 72 horas). Una vez secas, las muestras fueron molidas, homogenizadas y

almacenadas hasta su análisis en recipientes de polipropileno con cierre hermético.

Digestión y análisis químico de muestras. Una alícuota seca, molida y homogeneizada (100-200 mg) fue digerida en bombas de Teflón con agua regia preparada con HNO_3 y HCl (3:1) (Fisher, Trace Metal Grade), en un equipo ModBlock a 120°C durante 12 horas. La muestra digerida se reconstituyó con una solución 6 N de HNO_3 y se aforó a 10 mL con agua milli-Q. Las concentraciones de Pb fueron determinadas en un espectrómetro de absorción atómica por horno de grafito (GFAAS, Varian SpectrAA 220). El Pb disuelto en las muestras de agua acidificadas se determinó también por GFAAS usando corrección de ruido de fondo con una lámpara de deuterio, y un modificador químico (nitrato de amonio) de las características de la volatilización del NaCl y mediante la extensión del tiempo de volatilización durante el análisis (Soto-Jiménez *et al.*, 2008). Este procedimiento reduce al mínimo el efecto de las interferencias de la sal en el agua de mar. El límite de detección para Pb fue $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Para validación del método, en este estudio se emplearon diferentes materiales de referencia certificados (SLEW-2 agua estuarina ($n=5$), DORM-2 músculo de pescado ($n=6$) y NIST 1566b tejido de ostión ($n=4$)). Los resultados del análisis del material de referencia mostraron una recuperación de 87-91% del valor certificado con una variación menor al 6%. El muestreo y análisis del Pb se realizó siguiendo un protocolo de técnicas limpias para minimizar la contaminación potencial (Soto-Jiménez *et al.*, 2008).

Procesamiento de datos. El procesamiento de datos se hizo con los programas computacionales Excel y Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Los datos fueron procesados para análisis de comparación (ANOVAS de una y dos vías), pruebas *t*, se aplicaron modelos de

regresión lineal y no lineal, y pruebas de igualdad de pendientes e interceptos en ANCOVA. El nivel de significancia se obtuvo con base al 95% de confianza ($P < 0.05$). El factor de bioconcentración (FBC) fue calculado dividiendo la concentración de Pb en el agua de mar del experimento entre la concentración de Pb en el fitoplancton. El factor de bioacumulación (FBA) fue determinado como la proporción de Pb en el tejido del depredador respecto al de su presa.

14.3. Pb en agua de mar

De acuerdo con los resultados de los análisis de agua de mar monitoreados semanalmente, las concentraciones de Pb total variaron entre 1.8-4.43 $\mu\text{g L}^{-1}$ (promedio $2.93 \pm 1.8 \mu\text{g L}^{-1}$), del cual >90% estuvo como Pb particulado. De acuerdo a la OMS (1993), haciendo referencia a Flegal *et al.*, (1987), el agua oceánica natural contiene alrededor de 0.001-0.014 $\mu\text{g L}^{-1}$ de plomo. Por tanto, los niveles encontrados en el agua de mar de la bahía de Mazatlán se encuentran enriquecidos >200 veces respecto a sus valores naturales. Aun así estos niveles están por debajo de los considerados con el criterio de USEPA y de los límites máximos permisibles para agua marina (en zonas costeras) de 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ según los Criterios Ecológicos para la vida silvestre del INE de México. Además representan el 1.5% del nivel de exposición aguda de 210 $\mu\text{g L}^{-1}$ (www.epa.gov/waterscience/criteria/wqcriteria.html).

De acuerdo a Soto-Jiménez y Flegal (2009) más del 95% del Pb en las aguas costeras del Golfo de California están relacionadas a actividades humanas, principalmente quema de combustibles fósiles y actividad minera. Soto-Jiménez *et al.* (2008) encontraron que el Pb acumulado por organismos representativos de una típica cadena trófica en el puerto de Mazatlán es derivado de las emisiones de automóviles (40-70% del total de Pb) y de emisiones de Estados

Unidos (10-20%), con sólo 10-30% del total derivado de fuentes naturales.

14.4. Pb en fitoplancton

Las concentraciones de Pb en la microalga *T. suecica* no expuesta oscilaron desde 2.48 a 7.59 $\mu\text{g g}^{-1}$ ($4.37 \pm 1.90 \mu\text{g g}^{-1}$), en tanto que en la microalga expuesta varió de 4.0 a 28.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ ($21.79 \pm 3.93 \mu\text{g g}^{-1}$) (**Fig. 14.2a**). El Pb es tomado de la solución por las células a través de las membranas permeables (Rainbow, 1997^a; 1997^b; Rainbow y Black, 2003). En este estudio, estimamos que las células de *T. suecica* expuestas a $\sim 20 \mu\text{g L}^{-1}$ absorbieron solamente el 25-40% del Pb agregado durante las 24 a 72 horas de exposición. El FBC del fitoplancton osciló de 1,090 a 1,430 después de una exposición mínima de 48 h. Las células expuestas acumularon en promedio 11 veces más plomo que las controles ($\sim 41.2 \times 10^{-6}$ y $3.673 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ de Pb/célula para las expuestas y control, respectivamente). En un estudio de exposición a Cd ($600 \mu\text{g L}^{-1}$, por 6 días) realizado con la misma especie por Pérez Rama *et al.* (2002), también se encontró que la microalga acumuló el 98.1% del Cd que se le adicionó conteniendo $0.392 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ de Cd/célula. Durante los experimentos la población celular osciló entre 6.45 a 9.5×10^5 y de 3.37 a $6.1 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ en fitoplancton no expuesto y expuesto al Pb, respectivamente (**Fig. 14.2b**). Se observó que las células expuestas presentaron conteos menores en un 40% a los de células no expuestas (promedios de 5.02×10^5 y $8.3 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$, respectivamente) ($p < 0.05$). Los resultados muestran que las células expuestas al Pb presentan efectos sobre su reproducción alterando

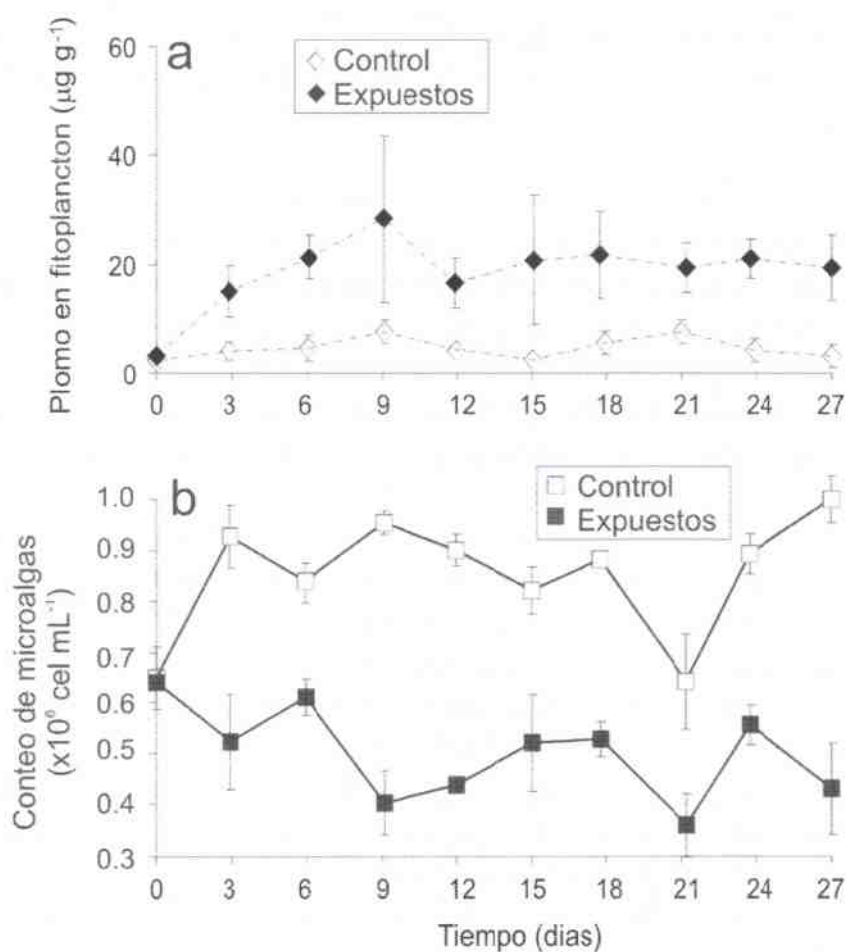


Fig. 14.2. (a) Concentración de plomo en fitoplancton (*T. suecica*) ($\mu\text{g g}^{-1}$) y (b) conteo de células fitoplanctónicas expuestas a plomo y en los controles.

la tasa de crecimiento de la población de las microalgas. El efecto de inhibición de la población causada por el Pb se observó en las organismos expuestos al menos por 24 h. Estudios previos han

registrado efectos de metales pesados en el crecimiento y el desarrollo de fitoplancton (González-Dávila *et al.*, 2000; Barata *et al.*, 2002).

14.5. Plomo en artemia

Los niveles de Pb presentes en *A. salina* no expuestas oscilaron en promedio de 0.66 a 1.54 $\mu\text{g g}^{-1}$ ($1.06 \pm 0.35 \mu\text{g g}^{-1}$) y las expuestas variaron desde 1.32 a 13.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ ($8.58 \pm 4.17 \mu\text{g g}^{-1}$) (**Fig. 14.3a**). Se observaron variaciones de tipo senoidal en las concentraciones de Pb, las cuales están asociada a las curvas de crecimiento de la artemia. La enorme variabilidad entre muestras es atribuida a los distintos estadios de crecimiento y a los diferentes días de exposición. Los niveles de Pb en heces de *A. salina* no expuestas variaron desde 2.3 a 5.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ y las expuestas de 4.35 a 10.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ (**Fig. 14.3a**). Se observó que las concentraciones de Pb en las heces de las artemias expuestas presentaron una clara tendencia a incrementarse en función del tiempo ($r = 0.96$; $p < 0.05$).

Los efectos observados en las artemias alimentadas con microalgas expuestas a Pb incluyen una reducción de la movilidad, el peso y la talla con respecto a las no expuestas. Se observó una disminución en la biomasa final después de 17 a 20 días de exposición promediando $28.3 \pm 7.2 \text{ kg m}^{-3}$ comparado al control con $41.7 \pm 2.14 \text{ kg m}^{-3}$ (peso húmedo). Además se observó una reducción en el porcentaje de sobrevivencia del 25 al 30% respecto al control. Fisher y Hook (2002) observaron efectos sobre la capacidad reproductiva de los copépodos *Acartia tonsa* y *Acartia hudsonica*, alimentados con diatomeas contaminadas con Cd, Zn, Ag y Mn. Ellos atribuyeron este efecto al daño sobre la vitelogénesis según lo evidenciado por la reducción del desarrollo del ovario y la

disminución del contenido proteico en la yema del huevo. Otros estudios han registrado cambios en la tasa de sobrevivencia de *A. salina*, en el peso seco y longitud total, en el % de hembras preñadas, talla de los quistes, % de desoves y en el número de nauplios por desove. Además se han observado cambios en la tasa de conversión alimenticia. En observaciones al microscopio estereoscópico realizadas en este estudio se encontraron cambios relacionados con la talla de los especímenes, el número de hembras preñadas y en el número y tamaño de los quistes entre organismos expuestos y controles ($p < 0.05$; Fig. 14.4). Además se observó una menor motilidad en los individuos expuestos a partir del día 10 de exposición.

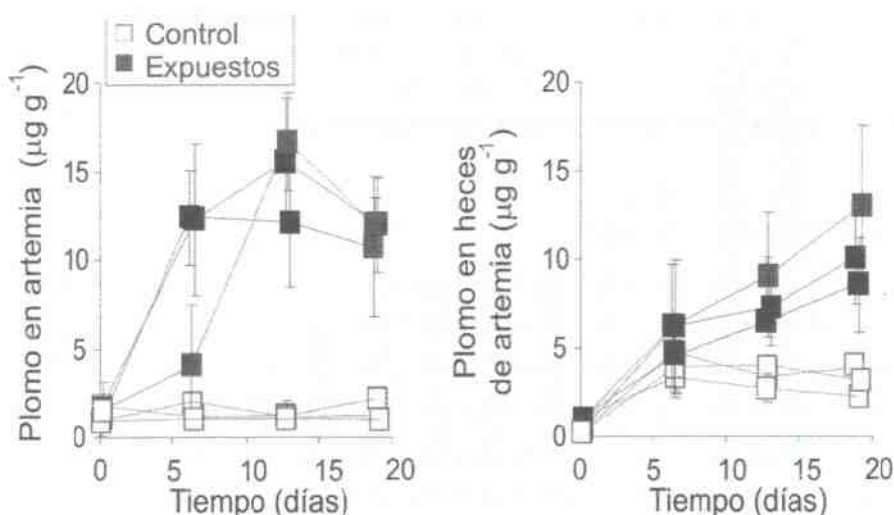


Fig. 14.3. (a) Concentración de plomo en *A. salina* ($\mu\text{g g}^{-1}$) y (b) en heces fecales de artemias expuestas a plomo y en los controles.

