

Efecto de la concentración de mercurio inorgánico sobre la biometría, supervivencia y DL₅₀ de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 (Crustacea:Anostraca).

Bhattacharjee D,¹ Asem A,² Eimanifar A,³ Castro MJ,^{4*} Castro MG,⁴ Orozco DI⁴

¹CAS in Marine Biology, Annamalai University, Parangipettai, Tamil Nadu, India. 608502.

²Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

³Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld 364, 69120 Heidelberg, Germany

⁴Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso No.1100. Col. Villa Quietud. México, 04960, D.F. Tel (Office): 5255 54837151.

*Correo electrónico: camj7509@correo.xoc.uam.mx

ABSTRACT

Esta investigación muestra el efecto que tienen diferentes concentraciones de mercurio inorgánico (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 ng L⁻¹) sobre la biometría, supervivencia y DL₅₀ en los estadios de nauplio I y II de *Artemia franciscana*. La biometría de N-I y N-II muestras diferencias significativas con respecto a las diferentes concentraciones de mercurio inorgánico probadas (P<0.001). La tasa de mortalidad alcanzó por arriba de 70% cuando la concentración de mercurio inorgánico fue de 24 ng L⁻¹. Los datos biométricos de los estadios N-I y N-II fueron modificados aun en las concentraciones menores de mercurio inorgánico. Con respecto a los organismos "control", la longitud total presentó una reducción del 4.16% en N-I y del 7.81% en N-II; para el ancho del abdomen, se presentó una reducción de 14.48% y 15.38% respectivamente. La DL₅₀ para los nauplios N-I y N-II fue obtenida a las concentraciones de 16.13 y 12.46 ng L⁻¹. El verdadero problema no es tan solo la reducción en el crecimiento de los organismos, así como la rapidez con que se obtiene la DL₅₀, sino la incorporación del mercurio inorgánico en los tejidos de los nauplios. Es por eso que es necesario realizar estas determinaciones químicas para así poder completar la información que se da al respecto.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, crecimiento, mercurio inorgánico, DL₅₀, estadio naupliar, supervivencia.

INTRODUCCIÓN

El mercurio localizado tanto en el suelo como en el agua ha sido señalado como un gran problema de salud en algunas regiones de la India, las cuales son causadas por las actividades industriales que se dan a través de todo el país. Se han reportado niveles de contaminación de hasta 600-700 veces más alto que los límites permitidos por los

estándares Hindúes (Bureau of Indian Standards (BIS)). Este problema no solamente representa un peligro para la salud humana, sino también para los animales acuáticos. El efecto de estos tóxicos sobre el desarrollo de los animales y su crecimiento tienen un enorme valor inherente, debido al incremento del interés sobre los diferentes aspectos de las respuestas fisiológicas al estrés tóxico (Sarabia et al. 1998).

Este pequeño camarón de salmuera (*Artemia*) presenta características biológicas específicas que le permiten ser usado como un modelo para estudios toxicológicos, así como su uso para evaluar perturbaciones de las funciones biológicas de los organismos debido a metales pesados en diferentes estadios de este crustáceo (Gebhardt 1976; Browne 1980; Jayasekara et al. 1986; Bragshaw et al. 1986; Macrae y Pandey, 1991; Brix et al. 2003; Brix et al. 2006). Sin embargo, hay poca información disponible del efecto del mercurio sobre el desarrollo, supervivencia y crecimiento en *Artemia*. Sarabia et al. (1998) reportan el efecto de bajas concentraciones de mercurio sobre la tasa de supervivencia de organismos adultos, así como del incremento del desempeño reproductivo. Experimentos previos en nuestro laboratorio muestran que los estadios tanto de nauplio y metanauplio son significativamente sensibles al mercurio inorgánico. El objetivo de la presente investigación es el de evaluar el efecto del mercurio sobre la biometría y la DL₅₀ de los estadios larvarios de *Artemia* (N-I y N-II).

MATERIALES Y MÉTODOS

Quistes, nauplios y preparación de la solución de mercurio.

Los quistes de *Artemia* (Red Jungle Brand, O. S. I. Inc., Snowville, Utah, EUA) fueron separados de los desechos y cáscaras de quistes por el método de densidad de agua dulce durante tres horas. Después de esto, los quistes fueron puestos a eclosionar con agua de mar filtrada (40 g L^{-1} de salinidad), a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación continua e iluminación proveniente de lámparas fluorescentes.

Eclosionados los nauplios fueron colectados y transferidos en agua de mar fresca y cultivados hasta que los organismos alcanzaron el estadio N-I. La mitad de los nauplios eclosionados fueron utilizados inmediatamente para los experimentos, el otro 50% fueron inoculados en recipientes de cultivo por otras 18 horas, las cuales tenían las características físicas anteriormente descritas. Al final del periodo de incubación, la mayoría de los nauplios alcanzaron el estadio N-II y utilizados para el experimento.

Para preparar la solución de mercurio se utilizó 1 g L^{-1} de Cloruro de Mercurio (II) (Producto No. 203777, Sigma-Aldrich, y St. Louis, MO, EUA) para la solución “stock” (1.3535 g L^{-1} de agua Milli Q). Esta solución stock estándar fue diluida con agua de mar esterilizada y filtrada para así poder obtener las concentraciones finales de 4, 8, 12, 16, 20 and 24 ng L^{-1} . El intervalo de concentración fue determinado de acuerdo a Sarabia et al. (1998). Un grupo control fue determinado, este no contó con ninguna concentración de mercurio.

Bioensayo para determinar la biometría

Los nauplios fueron aclimatados previamente en un recipiente con agua de mar filtrada durante cinco horas. Los bioensayos para cada estadio naupliar fue llevado a cabo con cinco organismos colocados en recipientes de vidrio de 200 mL a los cuales se les introdujo el contaminante a la concentración determinada. Cada concentración del mercurio inorgánico fue realizada por triplicado. Los nauplios fueron mantenidos durante 24 horas en

estas condiciones. Los valores biométricos (longitud total y ancho del abdomen) tanto del estadio N-I y N-II, así como del “control” de cada una de las concentraciones del mercurio inorgánico fueron tomados con la ayuda de un Microscopio con Ocular Micrométrico (Bio Slides Laboratorio, Chandigarh, India).

Bioensayos DL_{50}

Los valores de DL_{50} fueron determinados de acuerdo al método descrito por Meyer et al. (1982). Cinco organismos del estadio N-I y N-II, por cada concentración (4, 8, 12, 16, 20 y 24 ng L^{-1}) fueron colocados en recipientes de 200 mL con agua de mar. Los experimentos de dosis letal, por cada concentración, fueron llevados a cabo por triplicado y el porcentaje promedio de la mortalidad fue registrado a las 24 horas de exposición. Durante la exposición al contaminante, los organismos no fueron alimentados.

Análisis estadístico

Un análisis estadístico descriptivo fue llevado a cabo para la longitud para cada uno de los estadios (N-I y N-II). Los valores promedio de la longitud total y el ancho del abdomen fueron analizados para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) con un ANOVA de una sola vía con el programa estadístico SPSS. La diferencia significativa entre los tratamientos fueron evaluados con una prueba de comparación de medias múltiples con la Técnica de Tukey, estableciendo la probabilidad a 5% ($P < 0.05$) para cada conjunto de comparación.

La tasa de porcentaje de mortalidad fue calculada del número total de organismos muertos (N-I y N-II) para cada concentración. La DL_{50} fue calculada usando el análisis de probabilidades (Finney 1953), así como una curva de regresión con una R^2 alta.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los valores promedio \pm D.S. de la longitud total y del ancho del abdomen de los nauplios de *A. franciscana* (N-I y N-II) en las diferentes concentraciones del mercurio inorgánico

en el medio de cultivo. Los valores más altos se encontraron en los organismos colocados en la prueba “control”, con valores de longitud total de 960.80 μm para N-I y 998.70 μm para N-II. Los valores más bajos se encontraron en la concentración de 24 ngL^{-1} de mercurio inorgánico con 920.60 μm y 920.80 μm respectivamente.

Con respecto al ancho del abdomen, los organismos en la prueba “control” presentaron los valores más altos con 283.60 μm para N-I y 286.30 μm para N-II. Los valores más bajos también se encontraron en la concentración de 24 ngL^{-1} de mercurio inorgánico con 242.40 y 242.80 μm , respectivamente.

Las pruebas de ANOVA y Tukey (comparación de medias múltiples), mostraron diferencias significativas en los parámetros biométricos con respecto a la concentración de mercurio inorgánico ($P < 0.001$).

La comparación entre los valores biométricos entre la prueba “control” y las diferentes concentraciones de mercurio inorgánico mostraron un bajo desarrollo en el crecimiento con respecto a la longitud total y ancho del abdomen entre estos dos estadios de *Artemia franciscana*.

Los valores de la mortalidad después de las 24

Tabla 2. Valores de mortalidad del estadio N-I de *A. franciscana* a diferentes concentraciones de mercurio inorgánico.

Concentración de mercurio inorgánico (ngL^{-1})	Concentración de mercurio inorgánico (ln)	Mortalidad (%)
4	1.39	6.66
8	2.08	13.33
12	2.48	26.66
16	2.77	46.66
20	3.00	66.66
24	3.18	73.33

horas de exposición de los estadios naupliares N-I y N-II se muestran en la Tabla 2 y 3. La figura 1 y 2 presentan la relación logarítmica entre la tasa de mortalidad y el incremento de la concentración de mercurio inorgánico en los estadios naupliares N-I y N-II.

Los valores $DL_{50}(x)$ de *Artemia* estadio N-I, fueron determinados por la ecuación: $y = 13.272 \cdot \ln(x)^2 - 19.365$ y para *Artemia* estadio N-II la ecuación $y = 41.527 \ln(x)^2 - 53.109$. Para N-I, los valores de DL_{50} fueron de 16.14 ng L^{-1} y

Tabla 1. Valores promedio \pm D.S. de la longitud total y ancho del abdomen de los nauplios de *Artemia franciscana* estadios N-I y N-II cultivados en las diferentes concentraciones de mercurio inorgánico.

Tratamientos (ng L^{-1})	Longitud total corporal (μm)		Ancho del abdomen (μm)	
	N-I	N-II	N-I	N-II
Control	960.80 ± 0.42	998.70 ± 1.70	283.60 ± 0.52	286.30 ^a ± 0.67
4	951.80 ± 1.03	966.20 ^a ± 2.10	280.80 ± 0.42	286.90 ± 1.45
8	942.00 ± 2.31	954.90 ± 1.10	277.60 ± 0.52	280.70 ^a ± 0.48
12	954.70 ± 1.25	952.20 ± 0.63	278.70 ± 1.16	279.00 ± 0.94
16	938.20 ± 2.15	951.60 ^a ± 1.26	274.90 ± 0.74	278.90 ± 1.45
20	922.80 ± 1.03	923.30 ± 0.67	256.60 ± 0.84	257.20 ± 1.14
24	920.60 ± 0.97	920.80 ± 1.23	242.50 ± 0.53	242.80 ± 0.92

Nota: letras iguales (en columnas) muestran la no diferencia significativa ($P > 0.05$).

12.46 ng L⁻¹ para N-II (Figura 1 and 2).

Tabla 3. Valores de mortalidad de *A. franciscana*, estadio N-II, a diferentes concentraciones de mercurio inorgánico.

Concentración de mercurio inorgánico (ngmL ⁻¹)	Concentración de mercurio inorgánico (ln)	Mortalidad (%)
4	1.3863	6.66
8	2.0794	33.33
12	2.4849	46.66
16	2.7726	60.00
20	2.9957	66.66
24	3.1781	86.66

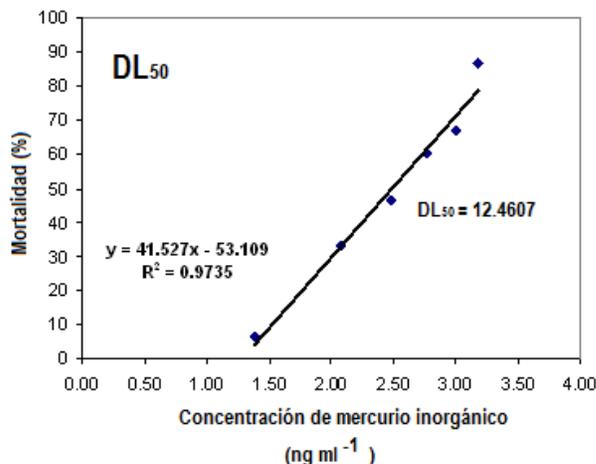


Fig. 2. Relación logarítmica entre la tasa de mortalidad de *Artemia* estadio N-II con respecto al incremento de la concentración de Hg (mercurio inorgánico).

DISCUSIÓN

La ciudad industrial de Bhopal, India, ha sido reportada con incrementos de concentración de mercurio en los recursos de aguas subterráneas (Reporte de Investigación del Instituto de Ciencias del Pueblo (ICP),

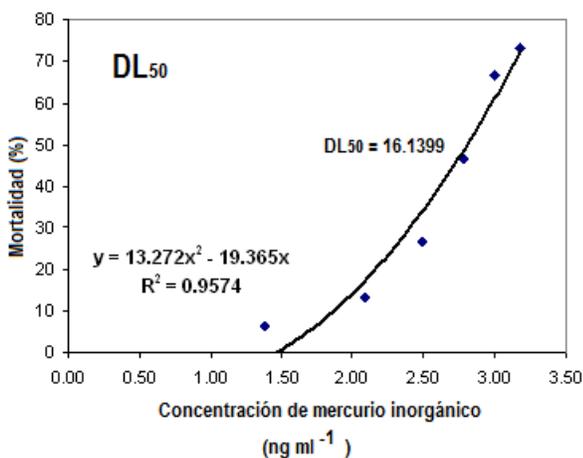


Fig. 1. Relación logarítmica entre la tasa de mortalidad de *Artemia* estadio N-I y el incremento de la concentración de Hg (mercurio inorgánico).

Organización de Investigación Dehra Doon, India sobre la “Contaminación subterránea cerca de la Planta Union Carbide en Bhopal, 2001–2002”). En algunas zonas costeras, el agua subterránea ha sido utilizada para la extracción de sal, en la cual la *Artemia* puede crecer de forma natural y en algunos casos el mercurio inorgánico puede acumularse en la biomasa de *Artemia* y así magnificar el problema en el sistema de la cadena alimenticia. Por otra parte, las aguas costeras utilizadas como salineras se encuentran contaminadas con mercurio, lo cual incrementa la probabilidad de que el mercurio se acumule en los organismos que conforman la cadena alimenticia presente en estos sistemas.

Otros estudios han sido llevados a cabo otros iones metálicos como el níquel y el zinc, los cuales presentan problemas de bioacumulación en los tejidos corporales de los organismos presentes en los hábitats contaminados y por ende transportados eventualmente a la cadena alimenticia en estos ecosistemas. Chen y Liu (1987) encontraron

que los nauplios de *Artemia* pueden acumular el ion níquel y zinc de 10 hasta 100 veces por arriba de la concentración hallada en su medio acuático, lo cual tendrá un efecto directo sobre los organismos que se alimenten de la biomasa de *Artemia*. Este fenómeno se ha demostrado con pesticidas órgano-clorados en larvas de trucha (*Salvelinus fontinalis*). Wang y Simpson (1996) encontraron una acumulación de DDT (diclorodifeniltricloroetano) a través de la cadena alimenticia de los organismos que se alimentaban de nauplios de *Artemia* expuestos al DDT por 24 horas.

Muchos de los contaminantes ambientales tienen efectos tóxicos los cuales pueden alterar el proceso de muda en crustáceos. El efecto más común de los metales pesados es la pérdida del proceso de ecdisis (Weis et al. 1992). En el presente estudio, sin embargo, el proceso del ciclo de muda no se vio alterado en las diferentes concentraciones estudiadas de mercurio inorgánico. Por otro lado, el efecto de inhibición sobre el crecimiento fue muy obvio, ya que los datos muestran una reducción de 4.16% en la longitud de total y de 14.48% para el ancho del abdomen en el estadio N-I y de 7.81% y de 15.38% respectivamente en el estadio N-II.

La variación biométrica en N-I y N-II en la longitud total fue de 3.65% y para el ancho del abdomen de tan solo 0.9%. ha sido bien documentado que la longitud total y el ancho del abdomen están regulados por las condiciones tanto ambientales como genéticas (Criel y Macrae 2002; Triantaphyllidis et al. 1998; Gajardo et al. 1998).

Ochi et al. (1985) demostraron que la supresión en el crecimiento se debe al bloqueo del grupo SH de la proteína. Benova et al. (2007) describieron para el ion cadmio que niveles bajos de producción de metalotioneína provocan un incremento en la fuente de cadmio para las células y por consiguiente un

incremento peligroso para el organismo resultando un efecto tóxico a nivel celular. Es posible que esto pueda ocurrir para el ion mercurio.

Altas concentraciones de metales esenciales y no-esenciales disueltos en un medio acuático, son consideradas como tóxicos para los tejidos de los organismos, ya que causan interferencias en el sistema enzimático a nivel intracelular (Páez-Osuna 1996). El problema no está solamente restringido a su concentración en el agua, sino también en la combinación con compuestos orgánicos, en sedimentos costeros y su depósito en las cadenas alimenticias que pueden causar bio-acumulación en el tejido de los organismos (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello 1991).

Otros factores como el pH, concentración de microorganismos y tipos de aguas de desecho, pueden afectar la toxicidad de los diferentes iones metálicos (Albek et al. 1997).

Reportes realizados en 2003 (Amenaza de mercurio, contaminación de mercurio en India, Nov. 7, 2003) indican que el cálculo de niveles de mercurio en peces fue de 0.03–0.82 mg Hg kg⁻¹ (peso seco) y para cangrejos de 1.42–4.94 µg Hg kg⁻¹ (peso seco) comparado con los niveles permitidos de 0.5 µg kg⁻¹. Niveles de mercurio en ostras en Karwar presentaron un intervalo entre 0.18–0.54 µg kg⁻¹ (peso seco). Al norte del río Koel se encontraron niveles de mercurio 600-700 veces más que los límites permitidos. El mercurio en aguas subterráneas y superficiales fueron detectados a través de todo el país incluyendo Delhi, Mumbai, Vadodara, Vapi, Ankleshwar, Bhopal, Panipat, Singhrauli, Ganjam, Dhanbad, Durgapur, Howrah y Medak. Niveles alto (límites permitidos) de mercurio fueron encontrados en unidades de producción de cloro-álcali, cemento y otros compuestos químicos, así como centrales térmicas.

El presente estudio es único y sólo considera la biometría larvaria inicial como parámetro para comprobar el efecto secundario de mercurio inorgánico en *Artemia*. Nuestras observaciones apoyan parcialmente estudios anteriores, pero son insuficientes debido a la falta de detalles para poder hacer la comparación en las diferentes etapas de desarrollo de *Artemia*.

Por lo tanto, se recomienda evaluar la toxicidad secundaria de mercurio en las poblaciones de *Artemia*. En esta investigación no se consideró su mortalidad como punto final definitivo, pero si su biometría como una correlación para su aplicación en la acuicultura. La aplicación de este tipo de estudios también permitirá que utilicemos los primeros estadios larvales como organismos modelo para encontrar ambientes alternos que nos permitan tener una seguridad de no encontrar niveles tóxicos no solo de mercurio, sino también de otros iones metálicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. T. Balasubramanian, Director del Centro de Estudios Avanzados en Biología Marina, Universidad de Annamalai, Parangipettai, India 608502, que permitió las facilidades para realizar la investigación.

BIBLIOGRAPHY

- Albek ML, U Yetis, CF GÄok»cay. 1997. Effects of Ni(II) on respirometric oxygen uptake. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 48:636-641.
- Bagshaw JC, P Rafiee, CO Matthews, TH MacRae. 1986. Cadmium and zinc reversibly arrest development of *Artemia* larvae. *Bull Environ Contam Toxicol*. 37:289-296.
- Banerjee S. 2003. On the brink of a disaster. Mercury pollution of India. In: Bhushan C. (ed.) *Mercury Menace. Hidden and Dangerous*. Industry and Environment Unit, CSE. November.
- Benova K, M Toropila, M Falis, P Dvorak. 2003. Influence of ionizing radiation on the activity of selected adaptive enzymes in chickens and rats. *Acta Vet Brno* 72: 201-205.
- Brix KV, RD Cardwell, WJ Adams. 2003. Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol Environ Saf* 54: 169-175.
- Brix KV, RM Gerdes, WJ Adams, M Grosell. 2006. Effects of copper, cadmium, and Zinc on the hatching success of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Arch Environ Contam Toxicol* 51: 580-583.
- Brown RA. 1980. Acute response versus reproductive performance in five strains of brine shrimp exposed to copper sulphate. *Mar Environ Res* 3: 185-193.
- Chen JC, Liu PC (1987) Accumulations of heavy metals in the nauplii of *Artemia salina*. *J World Aquac Soc* 18 (2): 84-93.
- Criel GRJ, TH Macrae. 2002. Chapter 1. *Artemia* morphology and structure. In: Abatzopoulos TJ, Beardmore JA, Clegg JS & Sorgeloos P eds. *Biology of aquatic organisms: Artemia* basic and applied biology. 171-224. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 1-38.
- Doon D. 2001. Groundwater Contamination near the Union Carbide Plant at Bhopal . A Draft Research Report. Environmental Quality Monitoring Group. PSI. 18 p.
- Finney DJ. 1953. Probit analysis. 2nd ed. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Gajardo G, N Colihueque, M Parraguez, P Sorgeloos. 1998. Internacional study on *Artemia* LVIII. Morphologic differentiation and reproductive isolation of *Artemia* populations from South America. *Internacional Journal of Salt Lake Research* 7: 133-151.
- Gebhardt KA. 1976. Effects of heavy metals (cadmium, copper and mercury) on reproduction, growth and survival of brine shrimp (*Artemia salina*). Utah State University, Logan, UT.
- Jayasekara S, DB Brown, RP Sharma. 1986. Tolerance to cadmium and cadmium binding ligands in Great Salt Lake brine shrimp (*Artemia salina*). *Ecotoxicol Environ Saf* 11: 23-30.
- MacRae TH, AS Pandey. 1991. Effects of metals on early life stages of the brine shrimp *Artemia*: A developmental toxicity assay. *Arch Environ Contam Toxicol* 20:247-252.

- Meyer BN, NR Ferrigni, JE Putnam, LB Jacobsen, DE Nichols, JL McLaughlin. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45: 31–34.
- Ochi T, M Osawa. 1985. Participation of active oxygen species in the induction of chromosomal aberrations by cadmium chloride in cultured Chinese hamster shells. *Mutation Research* 143:137-142.
- Páez-Osuna F. 1996. Fuentes de metales en la zona costera marina. In: 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, pp. 1-666.
- Ponce-Vélez G, A Vázquez-Botello. 1991. Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Términos, Campeche. *Hidrobiologica* 1(2): 1-10.
- Sarabia R, A Torreblanca, OJJ Del-Ram, J Diaz-Mayan. 1998. Effects of low mercury concentration exposure on hatching, growth and survival in the *Artemia* strain La Mata parthenogenetic diploid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 120:93-97.
- Triantaphyllidis GV, TJ Abatzopoulos, P Sorgeloos. 1998. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography* 25: 213-226.
- Wang JS, KL Simpson. 1996. Accumulation and depuration of DDTs in the food chain from *Artemia* to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 56: 888-895.