



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Toxicidad Comparada de Zinc, Plomo y
Mercurio para Zoea I de *Chasmagnathus
granulatus* (Brachyura)

Nº 110

Fernanda J. Vázquez

Tutora: Laura López Greco

Departamento de Investigación
Marzo 2005

Agradecimientos...

A Dios por no haberme abandonado "Nunca"...

A mis Padres, por haberme dado todo su Amor, Comprensión y Apoyo a lo largo de toda mi carrera ... donde muchas veces se hacia complicado avanzar...y por sobre todas las cosas, gracias por darme la vida.

A mi Amor Leo, por Apoyarme y comprenderme siempre que me fue necesario...y por alentarme a seguir para adelante siempre...

A la Dra. Laura Lopez Greco, por Confiar y "apostar todas las fichas" en mí, por haberme enseñado y saber llevarme de la mano por el camino de la investigación...Gracias Lau.

Al Dr. Enrique Rodríguez, por que junto a Lau, tambien confió en mí, y me permitio formar parte del "Gran Equipo"...Gracias Doc.

A todo el Laboratorio de Fisiología Animal Comparada...por brindarse, ayudarme siempre que lo necesite...y por las mateadas compartidas...Mariano, Anouk, Ale, Vero, Javi y Dani.

Al Dr. Marcelo Vernengo, porque además de ser un excelente decano, es por sobre todas las cosas una Muy Buena Persona...que siempre esta dispuesto a ayudar.

A mis primos por la paciencia y los veranos con parciales compartidos...

A mis Abuelos y Tios.. por estar siempre y por mimarme.

A Vani y Gaby...por escucharme siempre, ayudarme y alentarme a seguir para adelante...Gracias Chirus.

A mis compañeros y amigos, que sin ellos el largo camino se hace mas difícil de seguir...Gracias a: Eli, Jose, Marina, Erika, Marcela, Gaston y Naty.

Al plantel de profesores que hicieron posible que hoy este en este punto de mi carrera... y aquellos que estuvieron en momentos complicados como: Dra. Claudia Degrossi,; Dr. Claudio Pereira; Dra. Monica Waschman,; Dra. Silvia Gonzalez.

A la Dirección de Empleos y Pasantias, por haberme ayudado siempre que fue necesario y brindarme afecto..Esther, Yessi, Gisella y Matute. Al Lic. Julio Baigorria Bazterrica por haberme tendido una mano cuando mas lo necesite. Gracias.

A Panqui...por lo largo que se hizo el camino...pero llegamos al final, a Bijou y Luna por el afecto a su manera.

A la División Imprenta, por ayudarme con la impresión del tabajo.

...y a todos mis seres queridos...por acompañarme en este primer capitulo del resto de mí vida...

Índice

OBJETIVOS E HIPOTESIS	6
INTRODUCCIÓN	
I. La Bahía de Samborombón	6
A. Flora y Fauna	7
II. La especie en estudio: <i>Chasmagnathus granulatus</i>	8
A. Distribución	8
B. Características alimentarias y rol en la cadena trófica	8
C. Aspectos Reproductivos	8
D. El primer estadio larval: Zoea I	9
E. <i>Chasmagnathus granulatus</i> como modelo biológico en ensayos ecotoxicológicos	10
III. Grado de Contaminación de la Bahía de Samborombón	10
IV. Metales Pesados	11
A. Definición	11
B. Vías de entrada de los metales pesados a los organismos	11
C. Fuentes del Zinc y sus efectos sobre los organismos	11
D. Fuentes del Plomo y sus efectos sobre los organismos	12
E. Fuentes del Mercurio y sus efectos sobre los organismos	13
MATERIALES Y METODOS	
Obtención de las hembras ovígeras <i>Chasmagnathus granulatus</i> y su mantenimiento hasta la eclosión larval	14
Ensayo de Exposición a los tóxicos	14
Ensayo Preliminar: "Range Finding Test"	15
Ensayo Definitivo	15
Análisis estadísticos	16
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	20
BIBLIOGRAFÍA	20
GRÁFICOS	
Histogramas	
Figura 6	24
Figura 7	25
Figura 8	26
Curvas	
Figura 9	27
Figura 10	28
Figura 11	29

Objetivos e hipótesis

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- (1) Determinar la toxicidad letal aguda de los metales pesados: zinc, plomo y mercurio sobre el primer estadio larval del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae).
En el marco de este objetivo se plantea la siguiente hipótesis:
“El estadio larval zoea I de *C. granulatus* presenta toxicidad diferencial para los metales pesados zinc, plomo y mercurio”
- (2) Comparar la toxicidad de los metales ensayados con estudios previos realizados con cobre y cadmio sobre el mismo estadio larval y con idéntico protocolo experimental.
- (3) Establecer niveles de recomendación para la concentración de los tres metales ensayados, en el Estuario de modo de no comprometer la sobrevivencia del primer estadio larval de *C. granulatus*

Introducción

I. La Bahía de Samborombón

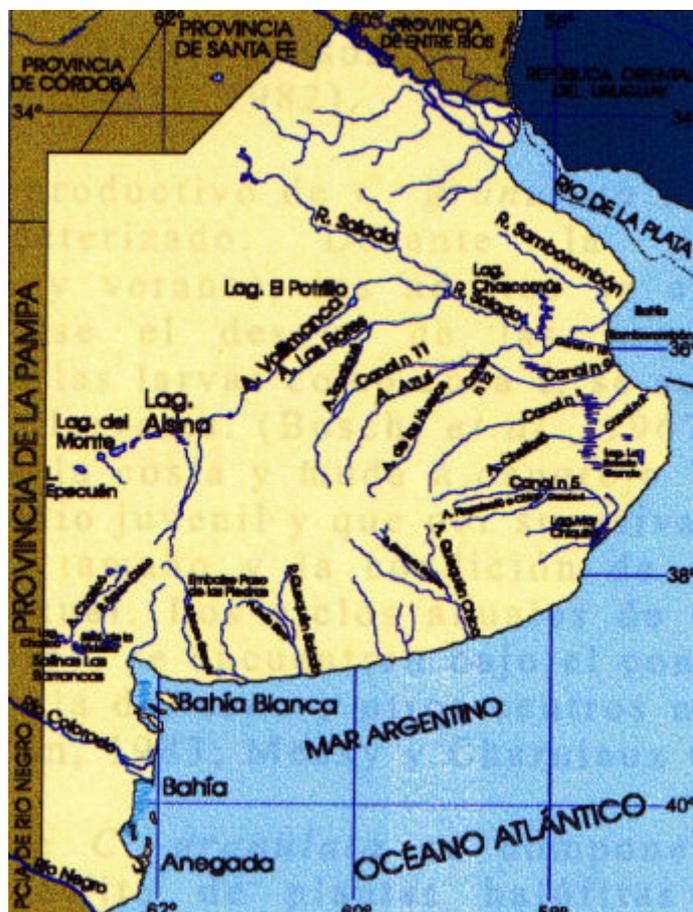
Un Estuario puede definirse, como un cuerpo de agua permanente o temporalmente abierto, con intercambio entre el curso fluvial y el mar, favorable para la vida de organismos eurihalinos y anfibióticos (Boschi, 1988).

El estuario del Plata, que abarca gran parte del litoral de la Provincia de Buenos Aires, es un ecosistema de alta productividad. El gradiente de agua salobre y las partículas de sedimento en suspensión, que son arrastradas por los ríos Paraná y Uruguay hasta la zona del Estuario, así como las corrientes de marea, crean un ambiente propicio para el establecimiento de numerosas poblaciones bentónicas (Boschi, 1988).

La temperatura del agua superficial varía entre los 8°C y los 23°C durante el año, con mayores fluctuaciones estacionales hacia el extremo sur de la subregión (subregión biogeográfica denominada por Boschi (1979) como templado-cálida). Esta subregión tiene como límite norte a Cabo Frío (Brasil, 23° S).

La costa de la Bahía de Samborombón se extiende desde los 35° 26' S, 57° 07' O hasta 36° 18' S, 26° 48' O (Figura 1). Toda la franja costera de esta Bahía se encuentra bajo la acción de las mareas, donde la pleamar introduce agua marina que ingresa principalmente por el fondo del Estuario, y la bajamar permite la dilución de la salinidad, creándose para muchas especies acuáticas situaciones críticas cuando los niveles de salinidad sobrepasan su umbral de tolerancia (Rossi, 1982).

Las aguas de la Bahía de Samborombón se caracterizan por su alta productividad, relacionada con la producción y exportación de detritos y nutrientes desde el ambiente costero al ambiente acuático, lo que explica que la Bahía sea una área importante para el desove y cría de varias especies de peces de interés comercial tales como corvina, lisa y pejerrey (Lasta y Cassia, 1989), como así también de varias especies de crustáceos, con predilección por los ambientes salobres (Menni, 1983; Boschi, 1988).



A. FLORA Y FAUNA

La vegetación de la región se caracteriza por la presencia de especies halófitas, dentro de las cuales se destacan las espartinas, *Spartina alterniflora* y *Spartina densiflora*, y el pasto salado, *Distichlis spicata* y *Salicornia ambigua* (Botto e Irigoyen, 1979; Rossi, 1982) (Figura 2).

La fauna abarca una gran cantidad de aves como cisnes, gansos, gaviotas, flamencos, y varias especies de aves migratorias, así como una importante riqueza ictícola, destándose especies como el pejerrey (*Odonesthes spp*), lisa (*Mugil liza*), corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) y negra (*Pogonias chromis*), lenguado (*Paralichthys orbyanana*) y pescadilla real (*Macrodon ancylodon*). Entre los mamíferos acuáticos se encuentran gran cantidad de nutrias y carpinchos. (Rossi, 1982). La región de la Bahía de Samborombón es, además, el último refugio del venado de las Pampas, *Ozotoceros bezoarticus celer*.

El área de la Bahía de Samborombón, debido a su riqueza florística, faunística y paisajística, y particularmente a la presencia de los «cangrejales» y «espartillares», ha sido protegida desde el año 1999 bajo la figura de Reserva Natural Provincial Bahía Samborombón y Sitio RAMSAR (humedal de importancia internacional).



Figura 2. Zona de muestreo. Buenos Aires.

II. La especie en estudio: *Chasmagnathus granulatus*

A. DISTRIBUCIÓN

La especie *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura) se distribuye ampliamente en el Litoral Atlántico sudamericano, desde Brasil hasta Argentina (Boschi, 1964). Su distribución no es continua, sino que generalmente habita en zonas de albuferas, marismas, o cuerpos de salinidad media.

En Argentina, esta especie forma parte de una comunidad conocida como «cangrejal bonaerense» (Boschi, 1964). La distribución de estos cangrejales esta circunscripta a la subregión biogeográfica denominada por Boschi (1979) como templado-cálida, cuya distribución se extiende desde los 36° S a los 44° S, correspondiendo a la provincia de Buenos Aires y norte de la Patagonia.

B. CARACTERÍSTICAS ALIMENTARIAS Y ROL EN LA CADENA TRÓFICA

El estudio del contenido estomacal permitió inferir que *C. granulatus* es una especie omnívoro-detritívora, predominando en su dieta restos de vegetales superiores y detritos. Asimismo, se determinó que ingiere microflagelados, foraminíferos, diatomeas, fango-arena, ostracodos, cianofíceas, restos de insectos y restos de crustáceos decápodos. Eventualmente adopta comportamiento de tipo carroñero sobre crustáceos, peces y mamíferos acuáticos (Botto e Irigoyen, 1979).

Esta especie cumple diferentes e importantes roles en el Estuario del Plata. La actividad cavícola que desarrolla permite la aireación del suelo, así como el aumento del drenaje y modificación del sustrato; éste comportamiento posibilita el crecimiento y distribución de la vegetación halófila típica del Estuario (Bertness y Miller, 1984; Iribarne et al, 1997).

Tanto los adultos como los estadios larvales de *C. granulatus* son el alimento de diversas especies de peces de alto valor comercial como la pescadilla, corvina rubia y lenguado.

Debido a su elevado número poblacional y a la numerosa cantidad de larvas que eclosionan y que coinciden con la época reproductiva de las diferentes especies de peces que concurren a la zona a desovar (Lasta y Cassia, 1989), se puede considerar a *C. granulatus* como un eslabón muy importante de la cadena trófica en todas las fases de su ciclo de vida, incluyendo sus estadios larvales, que forman parte del zooplancton.

En este sentido, la especie estudiada juega un papel clave como vector de transferencia neta de materia y energía desde el ambiente terrestre hacia el acuático, dado que consume el detrito aportado por la vegetación halófila y es presa de las diferentes especies de peces y aves de la Bahía (Rodríguez, 1991).

C. ASPECTOS REPRODUCTIVOS

El desove y la incubación de los huevos fecundados se produce en *C. granulatus* durante los meses de primavera y verano, es decir desde Septiembre hasta Marzo (Rodríguez, 1991). Durante el período reproductivo, cada hembra puede tener hasta 3 o 4 desoves (López Greco y Rodríguez, 1999) (Figura 3).

Desde el momento de la puesta y hasta su eclosión, aproximadamente 28 días después (López Greco y Rodríguez, 1999), las hembras ovígeras incuban los huevos bajo el pleon, permaneciendo éstos adheridos a los pleópodos (Figura 4).

Poco antes de la eclosión, las hembras ovígeras cuyo desove se encuentra próximo a la eclosión migran hacia el mar, buscando zonas de temperatura relativamente baja (15 a 17°C) y de salinidad relativamente alta (30 a 35 ‰) siendo éstas las condiciones óptimas para la supervivencia de las larvas, tal como acontece en otros decápodos intermareales (Costlow y Bookhout, 1959).

La eclosión de las larvas ocurre principalmente durante la marea alta, optimizando así su dispersión posterior, lo cual puede ser considerado como una estrategia adaptativa favorable (López Greco y Rodríguez, 1999). En el caso de *C. granulatus*, la eclosión de las larvas se produce principalmente durante las mareas altas de mayor amplitud, es decir las que ocurren entre el cuarto creciente y luna llena (López Greco y Rodríguez, 1999), período coincidente con la migración de las hembras ovígeras maduras hacia el mar.

El desarrollo larval de esta especie de cangrejo comprende cuatro estadios larvales (zona I, II, III y IV) y una postlarva o megalopa (Boschi et al, 1967). Esta última regresa al ambiente costero, para mudar al primer estadio juvenil, que por sucesivas mudas alcanza el tamaño y la condición reproductiva del adulto (López Greco et al, 1997), cerrando de ésta manera el ciclo de vida de la especie. El tiempo estimado desde la eclosión larval hasta la madurez sexual es de 2 a 3 años (López Greco y Rodríguez, 1999).

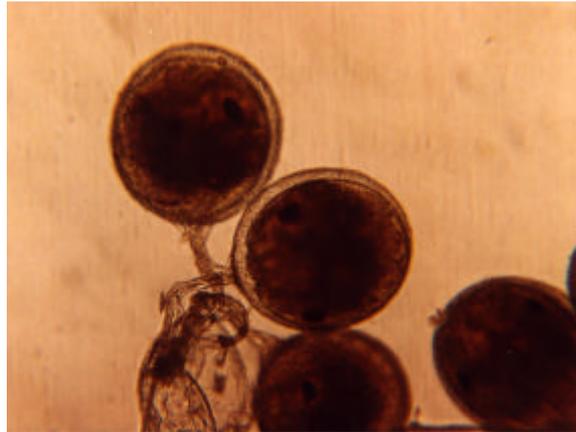


Figura 3. Huevos de *C. granulatus*



Figura 4. Hembra ovígera en estadio avanzado.

D. EL PRIMER ESTADIO LARVAL: LA ZOEA I

La duración del estadio zoea I de *C. granulatus* es de 7 días en promedio (Boschi et al., 1967). El largo total de este primer estadio larval es de 1,17 mm, con un largo de caparazón de 0,37 mm, siendo éste no muy globoso y con el margen posterior redondeado, provisto de dos espinas laterales y de una espina dorsal larga y aguda, curvada hacia atrás. Sus ojos son sésiles, con un rostro agudo y más largo que las antenas. Su telson es ancho, con su margen posterior cóncavo (Figura 5).

Existen varios cromatóforos pardo-oscuros distribuidos en la base de la espina dorsal, de los maxilípedos y en la parte inferior de los somitos del abdomen; el resto del cuerpo carece de cromatóforos y es muy transparente. Sus dos pares de maxilípedos son las principales estructuras vinculadas a la natación. Poseen un par de anténulas unirramosas cónicas, que lleva en las terminales tres estetascos y una seda lisa. Las mandíbulas son pequeñas y poseen una superficie cortante con cinco a seis dientes, pero no existe un palpo mandibular (Boschi et al, 1967).



Figura 5. Larva de *C. granulatus*. Esquema reproducido de Boschi et al, 1967

E. CHASMAGNATHUS GRANULATUS COMO MODELO BIOLÓGICO EN ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS

El ambiente acuático presenta una elevada biodiversidad que puede permitir la identificación de especies adecuadas para su utilización como organismos test en bioensayos de toxicidad (Ramachandran *et al*, 1997; López Greco *et al*, 2001). Los valores de toxicidad letal aguda de contaminantes para los estadios embrionarios y/o larvales, surgidos de ensayos de toxicidad en laboratorio, han sido utilizados en algunas regiones costeras del mundo para determinar valores máximos permitidos de distintos contaminantes (Mortimer y Miller, 1994; Anderson *et al*, 1997; Fichet *et al*, 1998; Itow *et al*, 1998; Oberdorster *et al*, 1999; Preston y Snell, 2001, entre otros).

Los crustáceos y en particular sus estadios embrionarios, larvales y postlarvales han sido utilizados extensamente en bioensayos de toxicidad de metales pesados y pesticidas mostrando una particular sensibilidad (López Greco *et al*, 2002).

En particular, dado su rol ecológico, el extenso conocimiento biológico y de las condiciones de mantenimiento en cautividad, *C. granulatus* es un excelente modelo para estudios ecotoxicológicos. En esta especie, se han desarrollado numerosos trabajos sobre efectos letales y subletales de plaguicidas (Rodríguez, 1991; Rodríguez y Pisanó, 1993) y metales pesados (Rodríguez y Medesani, 1994; Rodríguez *et al*, 1998; Zapata *et al*, 2000; Cahansky, 2001; Rodríguez *et al*, 2001; Kesselman, 2002; Lavalpe, 2002 entre otros). En el caso de la zoea I de *C. granulatus* se han determinado los valores de toxicidad letal 50 para los metales cobre y cadmio (López Greco *et al*, 2001).

III. GRADO DE CONTAMINACIÓN DE LA BAHIA DE SAMBOROMBON

El nivel de contaminación de la zona estuarina del Río de la Plata es muy diferente de la del mar adyacente. El mismo estuario presenta aspectos variables a lo largo de su cauce, donde la zona interna es la más afectada por la descarga de efluentes cloacales y cursos de agua tributarios contaminados, producto de la actividad humana.

La concentración de población urbana en ambos márgenes del estuario es muy elevada, sobrepasando los 12.000.000 de habitantes, ya que se encuentran ubicadas allí ciudades populosas como Buenos Aires, Montevideo, La Plata y otras menores.

El crecimiento de las ciudades, el mayor desarrollo industrial, la urbanización, la construcción de rutas y puertos y la actividad recreativa creciente, han cambiado los ambientes naturales, contribuyendo al aumento de la contaminación de las aguas costeras del Río de La Plata (Boschi, 1988).

También las lluvias transportan insecticidas y plaguicidas de los campos, los que finalmente forman parte de los cauces de arroyos y afluentes que desembocan en el río.

El deterioro de las aguas es particularmente evidente en los sectores costeros que lindan con las grandes áreas urbanas y centros industrializados. En general, las zonas de aguas más dulces (zona interna e intermedia del Estuario) evidencian una contaminación más importante en cuanto a metales pesados (cobre, zinc, plomo y cadmio), hidrocarburos (solubles y dispersos) y plaguicidas debido al activo y sostenido vertido de efluentes de empresas papeleras, textiles, químicas y petroquímicas, particularmente en las Cuencas del Riachuelo y del Salado, ambas tributarias del estuario.

La zona externa del Estuario del Plata, presenta en general niveles menores de contaminantes disueltos, debido fundamentalmente a la fluctuación de sedimentos producida por el ingreso de agua marina (Boschi, 1988; Comisión Administradora del Río de La Plata, 1990). Sin embargo, la adsorción de varios contaminantes a los sedimentos que floculan y se depositan puede alcanzar magnitudes significativas (Comisión Administradora del Río de La Plata, 1990; Villar *et al*, 1999).

IV. METALES PESADOS

A. DEFINICIÓN

Los metales pesados pertenecen a los elementos de transición de la tabla periódica, son cationes divalentes de probada toxicidad, siendo los más comunes el mercurio, plomo, cadmio, cobre, zinc y níquel, entre otros.

Tanto el zinc como el cobre son elementos esenciales para el metabolismo celular, mientras que para cadmio, mercurio y plomo no se ha reportado ninguna función biológica (Viarengo y Nott, 1993).

Los metales pesados se consideran contaminantes persistentes, por cuanto una vez ingresados al cuerpo de agua receptor, no se modifican fácilmente en sustancias químicas inofensivas (Comisión Administradora del Río de La Plata, 1990).

Entre los procesos regulatorios y metabólicos más afectados por la presencia de metales pesados se cuentan, entre otros, la respiración celular, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, la síntesis y secreción hormonal, la reproducción y el crecimiento (Fingerman *et al*, 1996). Sus efectos son dependientes de la concentración de exposición, y a nivel fisiológico producen importantes efectos subletales o directamente la muerte de los organismos. Los estadios embrionarios, larvales o juveniles tempranos de las distintas especies de crustáceos y peces son particularmente sensibles a los metales pesados (Rodríguez *et al*, 1998)

B. VIAS DE ENTRADA DE LOS METALES PESADOS A LOS ORGANISMOS

Se conocen dos vías principales mediante las cuales los metales pesados ingresan al organismo:

1. **Por branquias** (vía directa)
2. **Por vía intestinal**, junto con el alimento (vía indirecta)

Ambas vías de ingreso se encuentran relacionadas entre sí, y su importancia varía según, el metal pesado, la especie, las condiciones físico químicas del ambiente, el estadio fisiológico, desarrollo del organismo, y la disponibilidad y tipo de alimento. Para la mayoría de los crustáceos Decápodos, la principal vía de ingreso al organismo de estos metales es directa, por branquias (Dallinger y Rainbow, 1993).

Una vez dentro del organismo, los metales pesados ingresan al citoplasma atravesando la membrana plasmática por diferentes mecanismos. La entrada puede estar mediada por canales iónicos, proteínas transportadoras y por proteínas bombas, que son relativamente específicas para iones tales como Ca^{++} , K^{+} , Na^{+} , etc. (Dallinger y Rainbow, 1993; Rainbow, 1997); por ejemplo el Cd^{++} y el Zn^{++} atraviesan la membrana plasmática por proteínas que transportan normalmente iones Ca^{++} . Estos tres iones pueden ser transportados de la misma manera porque sus tamaños son similares y su valencia idéntica (Dallinger y Rainbow, 1993).

Una vez incorporado, el metal pesado se une a diferentes ligandos, presentando una alta afinidad principalmente por los grupos sulfhidrilos de proteínas (Rainbow, 1997; Viarengo y Nott, 1993). La unión a metalotioneínas (proteínas fijadoras de metales pesados), que ayudan a mantener la homeostasis, y la inmovilización en gránulos o compartimentos intracelulares, son las principales vías de detoxificación celular, que tienen como finalidad remover el metal pesado para que no se encuentre biodisponible en la célula (Dallinger y Rainbow, 1993).

El almacenamiento como estrategia de acumulación de los metales pesados, tanto en gránulos como en diferentes compartimentos celulares, es más frecuente que la estrategia de regulación (relacionada con la biosíntesis de metalotioneínas). Esta última estrategia estaría restringida, para los crustáceos decápodos en particular, a los metales pesados esenciales y se encuentra asociada con la capacidad de excretarlos, permitiendo así balancear la elevada incorporación de estos metales pesados (Dallinger y Rainbow, 1993).

C. FUENTES DEL ZINC Y SUS EFECTOS SOBRE LOS ORGANISMOS

El zinc que las fuentes antropogénicas vierten al medio ambiente supera con amplitud el ingreso de zinc proveniente de fuentes naturales.

Los vertidos antropogénicos incluyen los producidos por galvanoplastia, fundición y procesamiento de minerales, los desagües ácidos provenientes de la industria minera, los efluentes de procesos químicos (producción de fertilizantes, pintura, pigmentos y textiles), así como las descargas de aguas servidas domésticas sin tratamiento. A menudo se olvida que estas últimas pueden resultar una fuente importante de

metales pesados, donde el zinc es el metal pesado más abundante en agua y sedimentos, presente en concentraciones de aproximadamente 50ug/l en algunas zonas del Estuario del Plata (Comisión Administradora de La Plata, 1990; Bilos *et al*, 1998).

El zinc es un metal esencial que actúa como cofactor de numerosas enzimas relacionadas con el metabolismo energético, la transcripción y la traducción (Mertz, 1981). Entre las enzimas que utilizan al zinc como cofactor se encuentran la anhidrasa carbónica, la fosfatasa alcalina; también está presente el zinc en el pigmento respiratorio de los crustáceos, la hemocianina. Por otra parte, el zinc es uno de los metales pesados esenciales que producen efectos tóxicos cuando se encuentra en elevadas concentraciones (Rainbow, 1988).

Dada su naturaleza de metal «fisiológico», existen mecanismos de detoxificación que permiten disminuir ó eliminar el exceso de este metal. Se pueden encontrar dos casos extremos de los diferentes modos de detoxificación de zinc en crustáceos:

- ✂ Aquellos organismos que son grandes acumuladores de zinc, donde hay alta tasa de incorporación, sin excreción significativa del metal; lo almacenan en una forma detoxificada, como ser unido a gránulos de pirofosfato (Ej: *Elminus modestus*) (Rainbow, 1993).
- ✂ Aquellos organismos que sí regulan la concentración del zinc dentro del cuerpo (Ej: *Palaemon elegans*) y mantienen una concentración aproximadamente constante dentro de un amplio rango de disponibilidad del metal traza (Rainbow, 1993).

Se ha reportado para músculos de diferentes crustáceos, que el zinc soluble se distribuye en tres componentes:

1. Unido a la hemocianina.
2. Unido a la enzima arginina kinasa.
3. Unido a metalotioneínas saturadas con zinc.

El zinc es un inhibidor de la arginina kinasa, que cataliza la formación de arginina fosfato, un compuesto que actúa como reservorio de energía disponible para la rápida refosforilación del ADP durante la contracción muscular. Por tanto, el zinc regula la actividad de esta enzima, mientras que las metalotioneínas controlarían la disponibilidad intracelular del zinc (Rainbow, 1993).

En los crustáceos, el zinc produce severas alteraciones morfológicas durante el desarrollo embrionario y la eclosión larval, así como una mortalidad significativa en estadios larvales y postlarvales (Mc Kenney y Neff, 1979; Martin *et al*, 1981; Greenwood y Fielder, 1983; Bodar *et al*, 1989; Uma Devi y Prabhakara Rao, 1989; Mac Rae y Pandey, 1991; Dallinger y Rainbow 1993; Cripe, 1994; Selvakumar *et al*, 1994; Harris y Santos, 2000; Lavolpe, 2002)

D. FUENTES DEL PLOMO Y SUS EFECTOS SOBRE LOS ORGANISMOS

Las fuentes de este metal son los vertidos provenientes del procesamiento y fundido primario y secundario de metales, como así también de otras fuentes menos directas pero igualmente significativas, tales como desagües urbanos, descargas de aguas servidas de los hogares y emisiones automotrices.

La absorción de este metal a los sedimentos ocurre rápidamente, de allí que las concentraciones observadas en las muestras de agua y sedimentos en el Estuario del Plata alcanzan valores promedio mayores a 7 ug/l durante el invierno, superando así el límite recomendado para la protección de la vida acuática (Comisión Administradora del Río de la Plata, 1990). En sedimentos, la concentración de plomo en el mismo estuario puede ser de 1 a 3 órdenes de magnitud mayor que en el agua (aproximadamente 10 ug/l) (Comisión Administradora del Río de la Plata, 1990; Verrengia Guerrero y Kesten, 1998).

El plomo es un metal blando y pesado, muy poco resistente a la tracción, carente de valor biológico, es decir, no es requerido para el funcionamiento normal de los seres vivos. Sin embargo, debido a su tamaño y carga, el plomo puede sustituir de manera preferente al calcio (Pb^{2+} : 0.84 Å; Ca^{2+} : 0.99 Å), siendo su principal sitio de acumulación el tejido óseo; esto determina que el mecanismo de detoxificación en crustáceos sea menos eficiente que para otros metales.

El plomo, como todos los metales pesados, posee elevada afinidad por ligandos que contengan sulfuro y nitrógeno, por lo tanto se une relativamente fácil a moléculas orgánicas tales como proteínas (Nieboer y Richardson, 1980; Williams, 1981). Interfiere con proteínas, ácidos nucleicos y moléculas energéticas, compitiendo con cationes esenciales tales como calcio (Vallee y Ulmer, 1972), inhibe la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa en diversos tipos de células, y tiene la capacidad de unirse con alta afinidad a la melanina (Ireland *et al*, 1979).

Visto desde un punto de vista bioquímico, los efectos del plomo pueden estar relacionados con una importante inhibición del número total de proteínas, ADN y ARN, como así también a una disminución general de las actividades celulares como resultado de la inhibición de procesos metabólicos claves.

Este metal puede también unirse a metalotioneínas (Hallberg y Lofsson, 1989), pero posee una afinidad

probablemente mayor por los ligandos metabólicos a menudo asociados a gránulos inorgánicos que se depositan con un alto contenido de calcio (Simkiss, 1981).

Los efectos reportados hasta ahora sobre la toxicidad del plomo en crustáceos son: inhibición o estimulación de la secreción hormonal, como por ejemplo el control hormonal de la glucemia en *Uca pugilator* (Reddy *et al*, 1995), inhibición de enzimas responsables de la síntesis de varios pigmentos, como ser la síntesis de hemoglobina por inhibición de la enzima ALA-D (Mayer *et al*, 1992)

Sobre larvas de crustáceos, se han reportado tanto para *Lithodes santolla* (Amin *et al*, 1998) como para *C. granulatus* (Keselman, 2002), diversas patologías en larvas eclosionadas de desoves expuestos, tales como atrofia de espina dorsal y espinas laterales, hipertrofia ocular, ausencia de pigmentos, melanización, atrofia de pleon y telson.

E. FUENTES DEL MERCURIO Y SUS EFECTOS SOBRE LOS ORGANISMOS

La principal fuente de contaminación con mercurio, en relación con la actividad minera, proviene de los gases emitidos por las plantas de tratamiento de cinabrio. El mercurio gaseoso emitido por los hornos (especialmente en los antiguos procesos de tratamiento), es depositado en los suelos que rodean a las instalaciones metalúrgicas. Otras fuentes de contaminación son, la utilización de combustibles fósiles, la industria cloro-alcalina, las centrales de energía eléctrica, la fabricación de pinturas, los procesos de refinación y la preparación de la pasta de papel.

La incorporación del mercurio adsorbido a sedimentos puede ser una vía predominante de ingreso de este metal a los organismos acuáticos, causando concentraciones relativamente altas en animales que se alimentan en los sedimentos tanto de sistemas estuarinos como de agua dulce (Bryan y Langston, 1992). Los factores más importantes que afectan la toxicidad del mercurio en especies acuáticas son la concentración y la especie química del mercurio presente. Otros factores incluyen el estadio de desarrollo de los organismos expuestos y los parámetros físico-químicos del ecosistema, como el pH, la temperatura, la salinidad, la dureza de las aguas, los niveles de oxígeno, etc.

El mercurio es un metal brillante color plata, que a temperatura ambiente se encuentra en estado líquido. La forma principal de mercurio en la naturaleza es el cinabrio (HgS), el que constituye la fuente principal para la obtención de este metal.

Aunque hay evidencias que vinculan los niveles de mercurio total en el medio ambiente con los presentes en predadores superiores como los peces, la preocupación principal ha sido la acumulación de metil mercurio (MeHg) en los organismos. El mercurio inorgánico puede ser metilado por microorganismos naturales del suelo, de los sedimentos, y del agua dulce y salada, interviniendo en este proceso diversas poblaciones microbianas en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas.

Está ampliamente aceptado que las formas orgánicas de mercurio son incluso más tóxicas que las inorgánicas. La forma orgánica más común del mercurio es el metil mercurio, que posee una alta solubilidad en lípidos y por eso atraviesa fácilmente las membranas celulares, ingresando así con rapidez en la cadena alimentaria acuática. En los organismos posee además una vida media elevada, y debido al aumento en la longevidad de los predadores superiores, constituye uno de los ejemplos clásicos de biomagnificación de metales pesados en cadenas alimentarias.

La bioacumulación de mercurio metilado en las cadenas alimentarias acuáticas resulta interesante porque de esta manera se constituye en la fuente más importante de exposición humana, fuera del riesgo laboral. Como ya se ha mencionado, el mercurio es un metal sumamente tóxico, es persistente y se bioacumula. No se conoce ningún proceso de homeostasis que lo involucre; por consiguiente, cabe esperar que cualquier tipo de exposición de largo plazo provoque progresivamente alteraciones graves en el funcionamiento normal de cualquier órgano que lo acumule (Nriagu, 1988).

En algunas zonas del Estuario del Plata, la concentración de mercurio presente es de aproximadamente 1ug/l (Comisión Administradora del Río de La Plata, 1990) lo que excede el nivel guía de calidad de agua recomendado para la protección de la biota (0,01-0,03ug/l).

Desde un punto de vista bioquímico, se conoce que el mercurio inhibe la actividad de algunas enzimas y estimula la de otras, y que también se acumula dentro de lisosomas junto con cationes esenciales para el organismo, generando así alteraciones metabólicas en el animal y modificando de esta forma su metabolismo (Fowler, 1987).

Este metal es un fuerte inhibidor de los puentes disulfuros; debido a la alta afinidad que presenta el mercurio por los grupos sulfhidrilos (SH), produce un cambio de la estructura y función de las proteínas, afectando así la fisiología celular (Viarengo *et al*, 1993). Particularmente, el mercurio actúa como bloqueante de microtúbulos y microfilamentos y como inhibidor del metabolismo general; generando en consecuencia un cambio en diferentes actividades tales como la glucólisis, la división y diferenciación celular y las migraciones celulares, procesos subyacentes en la morfogénesis embrionaria (Itow *et al*, 1998).

El mercurio es también un importante inhibidor de regeneración de los apéndices (Itow *et al*, 1998), y de la maduración ovárica (Reddy *et al*, 1997); modifica del comportamiento normal de natación (DeCousey y Vernserg, 1972; Mirkes *et al*, 1978), produce severas alteraciones morfológicas en embriones (Cahansky, 2001), retardo de la muda y del crecimiento (Green *et al*, 1976), y un alto porcentaje de mortalidad en larvas de crustáceos (Shealy y Sandifer, 1975; Selvakumar *et al*, 1994).

Materiales y métodos

OBTENCIÓN DE LAS HEMBRAS OVÍGERAS DE *Chasmagnathus granulatus* Y SU MANTENIMIENTO HASTA LA ECLOSIÓN LARVAL

Los animales utilizados en los bioensayos, se recolectaron en el cangrejal del Faro de San Antonio, extremo sur de la Bahía de Samborombón (36° 18' S 56° 48' W) durante el mes de Febrero del 2003.

Este lugar de muestreo fue elegido porque constituye una zona del estuario abierta al mar y relativamente libre de contaminación (Comisión Administradora Del Río De La Plata, 1990).

Las hembras ovígeras de *Chasmagnathus granulatus* fueron colectadas manualmente y transportadas en recipientes plásticos que contenían agua del sitio de muestreo, para su transporte y llegada a destino en buenas condiciones.

Una vez en el laboratorio fueron colocadas en acuarios de 37,5cm x 58cm x 20 cm con una capacidad de 30l aproximadamente, conteniendo 600ml de agua salina 30g/l. El agua salina de todos los recipientes fue preparada mediante la dilución de sales artificiales (Wiegandt, Krefeld, Alemania) en agua de clorada a pH 7.8. La temperatura se mantuvo en $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y el fotoperíodo 14:10 horas luz: horas oscuridad, de acuerdo a ensayos previos realizados con la misma especie (Rodríguez y Pisanó, 1993; Rodríguez y Medesani, 1994; Zapata *et al*, 2001).

Las hembras fueron alimentadas *ad libitum* dos veces a la semana con alimento balanceado para conejo (Cooperación Argentina). Luego de 3 a 4 horas de alimentación se procedió a la renovación del volumen salino de los acuarios.

Se separaron tres grupos de hembras ovígeras en función del grado de desarrollo embrionario: temprano, medio y avanzado (Bas y Spivak, 2000). Esas fases del desarrollo embrionario fueron macroscópicamente identificadas mediante la coloración del desove: violeta intenso, violeta claro y marrón claro para los estadios temprano, medio y tardío respectivamente. Las hembras ovígeras de estadio avanzado fueron individualmente separadas en recipientes de vidrio de 1 litro de capacidad, conteniendo 200ml de agua salina 30g/l hasta llegar el momento de la eclosión.

Una vez eclosionadas; las larvas zoea I fueron separadas y posteriormente fraccionadas en recipientes de vidrio.

ENSAYOS DE EXPOSICIÓN A LOS TÓXICOS

Todos los bioensayos toxicológicos se realizaron de acuerdo con los lineamientos metodológicos establecidos por las entidades internacionales competentes en la materia (American Public Health Association *et al*, 1992).

Se utilizaron sales de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck), plomo ($\text{PbNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Merck) y mercurio (Cl_2Hg , Merck) en estado de máxima pureza con las que se prepararon las soluciones stock de las que se pipetearon los volúmenes correspondientes para alcanzar las concentraciones de ensayo.

Para cada concentración se seleccionaron 10 larvas por envase de vidrio de 180ml de capacidad, conteniendo 100ml de agua salina 30g/l de pH 7.8.

Las Zoeas I de *C. granulatus* fueron incubadas a $16^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ por 12: 12 horas luz: horas oscuridad en un equipo refrigerado.

Cada 24 horas las zoeas I fueron alimentadas *ad libitum* durante 4-5 horas con larvas *nauplius* recién eclosionadas de *Artemia salina* (Artemiux Premium), cuyos huevos de resistencia se pusieron a eclosionar 24hs antes de ser utilizados, en una ampolla de decantación conteniendo agua salina 30g/l con aireación e iluminación constantes.

Luego de la alimentación, se realizó el recuento de zoeas vivas y muertas, retirando estas últimas, y se procedió a la renovación del medio salino y de las concentraciones de cada metal a ensayar. Las larvas se consideraron muertas al no observarse movimiento alguno, luego de ser cuidadosamente inspeccionadas dentro de una pipeta colocada frente a una luz intensa.

ENSAYO PRELIMINAR: «RANGE FINDING TEST»

Esta prueba preliminar se realizó para poder determinar el rango de concentraciones a utilizarse en los ensayos definitivos, para cada uno de los tóxicos estudiados.

Este ensayo preliminar comprendió una duración de 96hs, con recambio de todas las soluciones y alimentación de las larvas cada 24hs. De acuerdo a la American Public Health Association *et al* (1992), la mayor concentración a utilizarse en los ensayos definitivos debe causar una mortalidad importante (> 50 %) a las 24 hs, mientras que la menor concentración a utilizarse en tales ensayos no debe causar prácticamente mortalidad al término del ensayo (96 hs). Estas concentraciones se establecen justamente a partir de los resultados de los ensayos preliminares.

Se constituyeron los siguientes grupos experimentales:

- ✂ **Control:** conteniendo 10 larvas por frasco en agua salina sin contaminante.
- ✂ **C/ Contaminante:** tres concentraciones de cada uno de los metales a ensayar conteniendo 10 larvas por frasco en agua salina con la concentración de cada metal a ensayar.

Las concentraciones de ensayo fueron: 0,01; 0,1 y 1mg/l para zinc y plomo y 0,001; 0,01 y 0,1mg/l para mercurio, mientras que las concentraciones de las soluciones stock fueron de 1mg/l para el zinc y para el plomo y de 0,01 mg/l para el mercurio. Todas las concentraciones y el control fueron ensayadas por duplicado.

Por último, una vez preparadas las soluciones, se procedió a exponer a las larvas a las distintas concentraciones de los tóxicos cada 24hs hasta el término del ensayo.

II. ENSAYO DEFINITIVO

Este ensayo, también tuvo una duración de 96hs y se procedió de la misma forma anteriormente descrita para los ensayos preliminares.

En este ensayo, para cada metal, se constituyeron dos grupos control y siete concentraciones. Las concentraciones ensayadas y las de las soluciones stock correspondientes se indican en la Tabla 1

METAL ENSAYADO	Concentración a ensayar (ug/l)	Concentración de la solución stock (mg/l)
Control (1)	0	0
Control (2)	0	0
<u>III.</u> Zn ⁺⁺	0,1	0,001
	0,68	0,001
	4,6	0,01
	32	0,1
	220	1
	1.470	1
	10.000	1
Control (1)	0	0
Control (2)	0	0
<u>IV.</u> Pb ⁺⁺	4,6	1
	32	1
	220	1
	1.470	0,1
	10.000	0,01
	68.000	10
	460.000	10
Control (1)	0	0
Control (2)	0	0
<u>V.</u> Hg ⁺⁺	0,001	0,00001
	0,0068	0,00001
	0,046	0,0001
	0,32	0,001
	2,154	0,01
	14,8	0,01
	100	0,01

Tabla1: Concentraciones de plomo, zinc y mercurio a las que fueron expuestas las zoeas I de *Chasmagnathus granulata* durante el ensayo definitivo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el análisis Probit (Finney, 1971) para estimar los valores de la concentración letal 50 (CL50) y el intervalo de confianza para cada uno de los metales ensayados, aplicando la corrección de Abbot para la mortalidad de los controles.

Para comparar los valores de CL50, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) cuando el cociente entre la mayor CL50/menor CL50 fuera MAYOR que el correspondiente valor crítico establecido por la American Public Health Association *et al* (1995).

RESULTADOS

La **Tabla 2** muestra los resultados de la Toxicidad Letal Aguda (CL50) correspondientes a los bioensayos realizados con los distintos metales pesados en el estadio de zoea I de *Chasmagnathus granulata*.

Tabla 2: Parámetros de Toxicidad Letal Aguda (CL50) de los Bioensayos con Zinc, Plomo y Mercurio para el estadio zoea I de *C. granulata*.

Metales+ Pesados	Tiempo Exposición (hs)	VI. CL_{50} (ug/l)	Intervalos de Confianza al (95%)(ug/l)	Pendiente Pendiente	Coefficiente de Correlación R^2
	24	4801,61	4757,91 - 4844,96	1,05	1,00
	48	892,00	440,90 - 1566,16	2,05	0,81
A. Zn⁺⁺	72	799,70	782,83 - 816,60	3,70	1,00
	96	213,83	70,01 - 653,13	4,34	0,25
	24	8926,80	4733,20 - 15337,20	2,02	0,80
	48	7246,30	3443,03 - 12875,13	1,94	0,80
B. Pb⁺⁺	72	3207,20	1546,80 - 5444,30	3,17	0,90
	96	2936,13	1395,42 - 5089,74	2,90	0,62
C. Hg⁺⁺	24	74,85	74,85 - 74,85	7,00	1,00
	48	68,21	16,13 - 288,50	3,50	0,80
	72	21,01	9,53 - 46,31	6,29	0,05
	96	16,42	8,00 - 31,53	1,65	0,60

Al comparar los valores de la CL50 de los metales ensayados para los distintos tiempos, solo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el zinc entre las 24 y 48 horas de exposición y entre las 72 y 96 horas de exposición (**Tabla 3**).

En las **Figuras 6, 7 y 8**, se observan los valores de CL50 de cada metal en relación al tiempo de exposición, indicándose las diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3: Comparación de valores de CL50 entre tiempos de exposición para cada uno de los metales ensayados en larvas zoea I de C. granulata.

Metales	Comparación entre Horas de Exposición	Resultados de la Comparación
Zn ⁺⁺	24 hs y 48 hs	p <0,05
	48 hs y 72 hs	p >0,05
	72 hs y 96 hs	p <0,05
Pb ⁺⁺	24 hs y 48 hs	p >0,05
	48 hs y 72 hs	p >0,05
	72 hs y 96 hs	p >0,05
Hg ⁺⁺	24 hs y 48 hs	p >0,05
	48 hs y 72 hs	p >0,05
	72 hs y 96 hs	p >0,05

Los valores de CL 50 a las 96 horas difieren estadísticamente ($p < 0,05$) entre los metales ensayados (**Tabla 4**) determinándose el siguiente orden de toxicidad decreciente para el estadio de zoea I en *C. granulata*: **Mercurio > Zinc > Plomo**.

Tabla 4: Comparación de la CL50 de los metales zinc, plomo y mercurio a las 96 horas de exposición en larvas zoea I de C. granulata.

Comparación entre Metales a 96hs de Exposición	Resultados de la Comparación
Zn ⁺⁺ y Pb ⁺⁺	p <0.05
Zn ⁺⁺ y Hg ⁺⁺	p <0.05
Hg ⁺⁺ y Pb ⁺⁺	p <0.05

En las **Figuras 9, 10 y 11**, se observa el porcentaje de mortalidad, en función del tiempo de exposición a los diferentes metales pesados.

Discusión

Los tres metales ensayos afectaron significativamente la sobrevivencia de las larvas zoea I de *C. granulatus* mostrando la siguiente toxicidad relativa:

mercurio > zinc > plomo

Mercurio

La mayor toxicidad del mercurio respecto de los otros metales pesados ensayados, concuerda con otros trabajos realizados en larvas y postlarvas de crustáceos. En larvas zoea I de los cangrejos *Neoepisesarma mederi*, *Nonosesarma batavicum* (Selvakumar *et al*, 1994) y *Cancer magister* (Martin *et al*, 1981) y de

la postlarva de *Penaeus setiferus* (Green *et al*, 1976), los valores de CL50 a las 96 horas de exposición presentaron valores similares a los determinados en el presente trabajo. En el caso del camarón *Palaemonetes vulgaris* (Shealy y Sandifer, 1975), los valores de toxicidad para el mercurio reportados para 48 horas de exposición (35,3 -52,3 ug/l) también resultaron del mismo orden que los valores encontrados en *C. granulatus*, para el mismo tiempo de exposición.

En el caso de *P. vulgaris*, las larvas expuestas que sobrevivieron presentaron distintos tipos de atrofas, así como una importante disminución de la locomoción (Shealy y Sandifer, 1975). La disminución de la capacidad de natación es un efecto que también fue observado en las zoeas de *C. granulatus*. Luego de las primeras 48 horas de exposición, las larvas, aunque vivas, mostraron muy bajo nivel de actividad.

En postlarvas de *Penaeus setiferus* se ha observado que además de producir una elevada mortalidad a concentraciones de entre 13 y 21 ug/l (CL50 a 96 horas), el mercurio interfiere en procesos fisiológicos tales como la respiración y el crecimiento, cuando está presente en concentraciones superiores a 1 ug/l (Green *et al* 1976). De modo similar, se ha observado una importante disminución de la tasa de consumo de oxígeno en *Uca annulipes* expuesto a concentraciones de mercurio tan bajas como 0,3 ug/l (Uma Devi y Prabhakara Rao, 1989).

También para otros estadios del ciclo de vida de los crustáceos, tales como embriones (Mac Rae *et al*, 1991; Cahansky, 2001; Sánchez *et al*, 2001) y adultos (Uma Devi y Prabhakara Rao, 1989) el mercurio ha mostrado ser el metal pesado más tóxico.

La elevada toxicidad del mercurio estaría vinculada a su importante interferencia en la respiración celular (DeCoursey y Verserg, 1972; Mirkes *et al*, 1978; Uma Devi y Prabhakara Rao, 1989; Itow *et al*, 1998) y en los otros procesos mencionados en la Introducción de este trabajo.

Tales mecanismos de acción tóxica del mercurio, sumado a su naturaleza de metal «no fisiológico» y por lo tanto a la mayor dificultad de los organismos para detoxificarlo, produciría un incremento de su toxicidad al acumularse en el organismo.

Zinc

Con respecto al zinc, el nivel de toxicidad para la zoea I de *C. granulatus* es similar al obtenido para el mismo estadio de *Neopisesarma mederi*, *Nonosesarma batavicum* (Selvakumar *et al*, 1994) y *Cancer magister* (Martin *et al*, 1981) a las 96 horas de exposición, y similar a los valores de CL50 a las 48 horas para las zoeas I de *Portunus pelagicus*, *Portunus sanguinolentus* y *Charibdis feriatus* (Greenwood y Fielder, 1983), y para el juvenil I de *Mysidopsis bahia* (Cripe, 1994).

En términos generales, el nivel de toxicidad letal del zinc es un orden de magnitud menor respecto del mercurio, tanto para embriones y larvas (Bodar *et al*, 1989; Mac Rae y Pandey, 1991; Lavolpe, 2002) como para adultos de crustáceos (Uma Devi y Prabhakara Rao, 1989). Como se ha mencionado en la Introducción, dada la naturaleza fisiológica del zinc, los crustáceos poseen cierta capacidad de detoxificación que disminuiría su biodisponibilidad para las células (Dallinger y Rainbow, 1993; Harris y Santos, 2000).

Sin embargo, excedidos los límites de la capacidad de detoxificarlo, el zinc se transformaría en un metal altamente tóxico afectando, en crustáceos, procesos fisiológicos tales como la capacidad de crecimiento y metamorfosis, produciendo finalmente la muerte de los organismos (Mc Kenney y Neff, 1979).

Plomo

Respecto del plomo, es escasa la información sobre su toxicidad para larvas de crustáceos, por lo que el presente trabajo representa un aporte importante para los estudios de toxicidad comparada en estos organismos.

Los valores determinados en el presente estudio para la zoea I de *C. granulatus* son 5 veces mayores que los valores de CL50 a 96 hs para el mismo estadio larval de *Cancer magister* (Martín *et al*, 1981) y aproximadamente 1,8 veces mayor que el valor de CL 50 a 96 horas para las zoeas I de *Lithodes santolla* (Amín *et al*, 1998). Estas diferencias guardan una estrecha correlación con el tamaño de las larvas, siendo las de *C. magister* y *L. santolla* notoriamente mayores que las de *Chasmagnathus granulatus*.

El plomo es, del mismo modo que el mercurio, un metal «no fisiológico», y por lo tanto no es regulado efectivamente por los organismos acuáticos (Rainbow, 1998). Sin embargo, el estadio de zoea I de *C. granulatus* presenta una baja toxicidad en comparación con los otros metales ensayados (un nivel de toxicidad de un orden de magnitud menor respecto del zinc y de dos órdenes respecto del mercurio). Estas diferencias pueden deberse a una baja biodisponibilidad del plomo en los ambientes salinos, dado los complejos que forma este catión con los aniones de las sales presentes y disueltas en el agua salina (Rainbow, 1995).

Comparación de los valores de toxicidad de los metales: mercurio, zinc y plomo con otros metales ensayados para la misma especie

Si se incluyen en la escala de toxicidad decreciente de los metales ensayados en el presente trabajo, los valores de toxicidad (CL50 a las 96 horas) de cobre y cadmio realizados en el estadio de zoea I con idéntico protocolo experimental (López Greco *et al*, 2001), la escala decreciente de toxicidad sería la siguiente:

mercurio > cadmio > cobre > zinc > plomo

Este orden de toxicidad decreciente sería similar al reportado para los estadios larvales de otras especies de crustáceos (Martín *et al*, 1981; Greenwood y Fielder, 1982; Rodríguez y Establier, 1983; Mortimer y Miller, 1994, entre otros)

En el caso de embriones de crustáceos, diversos trabajos muestran que la escala de toxicidad relativa cambia en su orden, encontrándose en general el cadmio y en algunas especies el plomo, entre los metales pesados que causan menor toxicidad embrionaria.

En este caso, se ha postulado que las envolturas embrionarias se transforman en una eficiente «barrera» de protección embrionaria (Glas *et al*, 1997) donde los metales pesados, particularmente cadmio y zinc pueden quedar «secuestrados» por su afinidad a los componentes de las membranas, no quedando de este modo disponibles para el embrión en desarrollo (Michibata *et al*, 1986; Bodar *et al*, 1988).

En el caso de *C. granulatus*, el orden de toxicidad embrionaria (Rodríguez y Medesani, 1994; López Greco *et al*, 2000; Zapata *et al*, 2001; Cahansky, 2001; Kesselman, 2002; Lavolpe, 2002) para los mismos metales ensayos en el estadio zoea I es el siguiente:

mercurio > cobre > zinc > plomo > cadmio

Si bien diversas observaciones de varios autores establecen una sensibilidad diferencial a contaminantes de los distintos estadios del ciclo de vida de organismos acuáticos, poco trabajos abordan la comparación entre estadios tempranos tan próximos como son los embriones y las larvas de crustáceos. Los resultados del presente trabajo, en comparación con resultados previos obtenidos en la especie estudiada, permite visualizar claramente una toxicidad diferencial de una serie de metales pesados ensayados por un lado en huevos desovados (embriones y envolturas embrionarias), y por otro lado en larvas de vida libre de *C. granulatus*, estadios todos que poseen un relevante significado ecotoxicológico, al constituir las primeras fases del ciclo de vida de muchos crustáceos.

De la sensibilidad diferencial se deriva la importancia de evaluar la toxicidad de un xenobiótico en más de un estadio del ciclo de vida y/o en diversos procesos fisiológicos, para poder tener una idea más acabada de los efectos letales y/o subletales que puede producir un contaminante.

Niveles máximos recomendados de los metales mercurio, zinc y plomo para la Bahía de Samborombón, considerando los valores de CL50 para el estadio zoea I de

C. granulatus.

A partir de los resultados de CL50 a las 96 hs de exposición, para los tres metales ensayados en la zoea I de *C. granulatus*, y considerando la aplicación de un factor de seguridad de 1/100 de acuerdo a Perkins (1976), los valores guía de los metales estudiados que no deberían excederse para garantizar la supervivencia del primer estadio larval de *C. granulata*, son los siguientes:

☞ **0, 16 ug/l para el mercurio**

☞ **2, 14 ug/l para el zinc**

☞ **29, 4 ug/l para el plomo**

Finalmente, dada la sensibilidad diferencial de la zoea I de *C. granulatus* a estos metales (y a cadmio y cobre previamente ensayados), y a lo sencillo de la realización de estos ensayos de toxicidad letal consideramos que este modelo podría ser utilizado como organismo test para la evaluación de toxicidad de otras sustancias químicas y efluentes.

Conclusiones

- ✍ Las larvas zoea I de *C. granulatus* presentan toxicidad diferencial a los tres metales ensayados.
- ✍ El orden decreciente de toxicidad de los metales ensayados es: **mercurio > zinc > plomo**
- ✍ Entre metales, la diferencia de toxicidad es de un orden de magnitud.
- ✍ Los valores de CL50 para los tres metales son similares en magnitud a los valores reportados para larvas y/o postlarvas de otras especies de crustáceos.
- ✍ Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con las *concentraciones máximas recomendadas para la protección de la vida acuática* por la Comisión Administradora del Río de la Plata (1990) para los metales mercurio (2ug/l) y zinc (30ug/l), se observó que teniendo en cuenta un factor de seguridad de 1/100, los valores obtenidos en este trabajo se encuentran *por debajo* de los recomendados por la Comisión.

Por tanto, considerando los roles de *C. granulatus* en el ecosistema, se propone en el presente trabajo una revisión, para los metales mercurio y zinc, de los niveles recomendados por la Comisión Administradora de la Plata (1990).

Bibliografía

- ✍ **American Public Health Association 1992.** American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewaters, 14th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- ✍ **Bas C. ; Spivak E. 2000.** Effect of salinity on embryos of two southwestern atlantic estuarine grapsid crab species cultured *in vitro*. Journal of Crustacean Biology, 20: 647-656.
- ✍ **Bertness M. ; Miller T.1984.** Fiddler crab regulation of *Spartina alterniflora* production on a new England salt marsh. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 83:211-237.
- ✍ **Blaxter J. 1969.** Development: Eggs and larvae. In *Fish Physiology III*(Hoar and Randall, Eds), pp.. 177-252. Academic Press, New York.
- ✍ **Bodar C. ; Zee A. ; Voogt P. ; Wynne H. ; Zandee D. 1988.** Toxicity of heavy metals to early life stages of *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 17: 333-338.
- ✍ **Boschi E. 1964.** Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense. Boletín del Instituto de Biología Marina (Mar del Plata), (164): 34pp.
- ✍ **Boschi E. 1988.** El ecosistema estuarial del Río de la Plata (Argentina y Uruguay). Anales del Instituto Ciencias del Mar y Limnología Universidad Nacional Autónoma de México, 15: 159-182.
- ✍ **Boschi E.; Scelzo M.; Goldstein B. 1967.** Desarrollo larval de dos especies de crustáceos decapodos en el laboratorio, *Pachycheles haigae* Rodríguez da Costa, (Porcellanidae) y *Chasmagnathus granulata* (Grapsidae). Boletín del Instituto de Biología Marina N° 12. Mar del Plata.
- ✍ **Bryan G. 1979.** Bioaccumulation of marine pollutants. Philosophical Trans. Royal Society of London 483-505.
- ✍ **Bryan G. 1976.** En: Lockwood (Ed) Effects of pollutants on aquatic organisms. Cambridge University Press, Cambridge. 7-34pp.
- ✍ **Cahansky A. 2001.** Efectos del Mercurio sobre el desarrollo embrionario y la eclosión larval de *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). Tesis de investigación para optar por el título de Licenciatura en Cs. Biológicas. 1-47.
- ✍ **Cargo D. 1958.** The migration of adult female blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbun, in Chicoteague bay and adjacent waters. Journal of Marine Research, 16: 180-191.
- ✍ **Comisión Administradora del Río de la Plata. 1990.** Estudio para la evaluación de la contaminación en el Río de la Plata. Informe de avance 1989. Argentine Hydrographic Navy Service, Buenos Aires, Argentina.
- ✍ **Cripe M 1994.** Comparative acute toxicities of several pesticides and metals to *Mysidopsis Bahía* and postlarval *Penaeus duorarum*. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 13, N 11: 1867-1872.
- ✍ **Dallinger R; Rainbow P.1993.** Ecotoxicology of metals in invertebrates. Lewis. SETAC, Florida, 461pp.
- ✍ **De Coursey P; Verserg W. 1972.** Effect of mercury on survival, metabolism and behaviour of larval *Uca pugilator* (Brachyura). Oikos 23:241-247.
- ✍ **Fingerman M; Devi M; Reddy P.1996.** Impact of heavy metals exposure on the nervous system and endocrine-mediated processes in crustaceans. Zoological studies, 35: 1-8.
- ✍ **Fingerman M ; Jackson N ; Nagabhushanam R. 1998.** Impact of heavy metals exposure on the nervous system and endocrine – mediated processes in crustaceans. Zoological Studies, 35:1-8.

- ✂ **Glas P. ; Courtney L. ; Rayburn J. ; Fisher W. 1997.** Embryonic coat of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. Biological Bulletin, 192: 231-242.
- ✂ **Goyer R. 1981.** Lead. En: Disorders of mineral metabolism. Academic Press, New York, pp: 159-99.
- ✂ **Green F.; Anderson W. ; Petrocelli. S; Presley. B ; Slims. R. 1976.** Effects of Mercury on the survival, respiration and growth of postlarval white shrimp, *Penaeus setiferus*. Marine Biology 37:75-81.
- ✂ **Greenwood J. ; Fielder D. 1982.** Acute toxicity of zinc and cadmium to zoeae of three species of Portunid crabs (Crustacea Brachyura). Comparative Biochemistry and Physiology. Vol 75C. N° 1pp. 141-144.
- ✂ **Harris R. ; Santos M. 2000.** Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). Marine Biology 137: 691-703.
- ✂ **Hutchinson T.; Willians T.; Eales G.1994.** Toxicity of cadmium, hexavalent chromium and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegates*) and copepods (*Tisbe battagliai*). Marine Environmental Research 38: 275-290.
- ✂ **Ireland M. ; Richards K. ; Gwynn I. 1979.** The localization of lead in the skin of light-and dark-adpoted *Xenopus laevis*. Histochemistry 65: 31-34.
- ✂ **Iribarne O. ; Bortolus A.; Botto F.1997.** Between-habitat dirrences in burrow characteristics and tophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnayus granulata*. Marine Ecology Progress Series, 155:137-145.
- ✂ **Itow T.; Igarashi T.; Botton M.; y Loveland R. 1998.** Heavy metals inhibit limb regeneration in horseshoe crab larvae. Archives of environmental contamination and toxicology 35:457-463.
- ✂ **Keselman D. 2002.** Efectos del plomo sobre la embriogénesis y la eclosión larval de *Chasmagnatus granulata* (Decapoda, Brachyura). Tesis de investigación presentada para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas. 1-89.
- ✂ **Lasta C. ; Cassia M.1989.** Bahía de Samborombón ¿zona de desove y cría de peces?. Resúmenes del Primer Congreso de Ciencias del Mar, Pto Madryn, Octubre 1989, 39pp..
- ✂ **Lavalpe M. 2002.** Efectos del Zinc sobre la embriogénesis y la eclosión larval de *C. granulata* (Decápoda Brachyura). Tesis de investigación para optar al título de Licenciado en Ciencias Biológicas. 1-62.
- ✂ **López Greco L ; Sánchez M.; Nicoloso G.; Medesani D. ; Rodríguez E. 2001.** Toxicity of Cadmium and Copper on Larval and Juvenile stages of estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura Grapsidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 41, 333-338.
- ✂ **López Greco L. ; Bolaños J.; Rodríguez E. ; Hernández G. 2000.** Survival and Molting of the Pea Crab Larvae *Tuniotheres moseri* Rathbun 1918 (Brachyura, Pinnotheridae) exposed to copper. Environmental Contamination and Toxicology. 40: 505-510.
- ✂ **López Greco. L ; Sanchez M. ; Nicoloso G. ; Medesani D. ; Rodríguez E. 2001.** Toxicity od Cadmium and Cooper on Larval and Juvenile stages of the estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). Environmental Contamination and Toxicology. 41: 333-338.
- ✂ **López Greco L. ; Stella V. ; Rodríguez E. 1997.** Size at the onset of the sexual maturity in *Chasmagnatus granulata* (Decapoda, Brachyura). Nauplius, 5: 65-75.
- ✂ **López Greco L.; Rodríguez E.1999.** Anual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnatus granulata* (Brachyura, Grapsidae). Cahiers de Biologie Marine 40:155-164
- ✂ **MacRae T. ; Pendeey A.1991.** Effects of metals on early life stages of the brine shrimp, *Artemia*: a developmental toxicity assay. Archives of Environmental Toxicology 20:247-252.
- ✂ **Martín M.; Osborn K.; Billig P. ; Glickstein N. 1981.** Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. Marine Pollution Bulletin, Vol 2: 305-308.
- ✂ **Mayer F. ; Versteeg D. ; McKee M. ; Folmar L. ; Graney R. ; McCume D. ; Rattner B.1992.** Physiological and nonspecific biomarkers. En: Hugget RJ, Kimerle, R.A, Mehrle, P.M, Bergman HL, (Eds), Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress. Lewis, Boca Raton, FL, Usa. 1-13pp.
- ✂ **Mc Kenney C. ; Neff J. 1979.** Individual effects and interactions of salinity, temperature, and zinc on larval developmental duration Through Metamorphosis. Marine Biology 52: 177-188.
- ✂ **Menni R.1983.** Los peces en el medio marino. Editado por Estudio Sigma S.R.L, Buenos Aires, 169 pp.
- ✂ **Mertz W.1981.** The essential trace elements. Science 213:1332-1338.
- ✂ **Michibata H.; Sahara S. ; Kojima. M.1986.** Effects of calcium and magnesium ions on the toxicity of cadmium to the edgg of the teleost, *Orizias latipes*. Environmental Research 40: 110-114.
- ✂ **Mirkes D.; Vernberg W. ; Decoursey P.1978.** Effects of cadmium and mercury on the behavioral responses and developmental of *Eurypanopeus depressus* larvae. Marine Biology 47: 143-147.

- ✂ **Mortimer M. ; Miller G.1994.** Suceptibility of larval and juvenile instars of the sando crab, *Portunus pelagicus* (L), to sea water contaminated by chromium, nikel or copper. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 45: 1107-1121.
- ✂ **Muschi A. ; Quan S. ; Li S. 1996.** Acute toxicity of copper, cadmium and copper-cadmium mixture to the larvae of shrimp *Penaeus monodon*. Pakistan Journal of Science Research 39:68-71.
- ✂ **Nagabhushanam R.; Reddy P.; Fingermen M.1998.** Heavy metals pollution: Use of marine crustaceans as biological indicators. En Recent advances in marine biotechnology. Volumen 2. Fingerman. M; Nagabhushanam. R; Mary-Frances Thompson (Eds), 313pp.
- ✂ **Nieboer E. ; Richardson D. 1980.** The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of the metals ions. Environmental Pollution. (B) 1:3-26.
- ✂ **Pérez –Coll C. ; Herkovitz J. 1990.** Stage dependent susceptibility to lead in *Bufo arenarum* embryos. Environmental Pollution 63: 239-245.
- ✂ **Rainbow P.1988.** The significance of trace metal concentrations in decapods. Symposia Zoologica Society of London., 59: 291-313.
- ✂ **Rainbow P.1993.** The significance of trace metals concentrations in marine invertebrates. En: Ecotoxicology of metals in invertebrates. Dallinger (Eds). R; Rainbow.P.S.. Lewis,3-23pp..
- ✂ **Rainbow P.1997.** Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. Estuarine, coastal and shelf science, 44: 169-175.
- ✂ **Reddy P. ; Figerman M. 1995.** Effect of cadmium chloride on physiological color changes of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Ecotoxicology and Environmental Safety 31: 69-75.
- ✂ **Reddy P.; Shea R.; Tuberty.; Fingerman M. 1997.** Effects of cadmium and mercury on ovarian maturation in the Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*. Ecotoxicology and Environmental Safety 37: 62-65.
- ✂ **Revera.1991.** Influence of heavy metals on the reproduction and embryonic developmental of freshwater pulmonates (Gastropoda; Mollusca) and Cladocerans (Crustacea; Arthropoda). Comparative Biochemistry and Physiology 100: 215-219.
- ✂ **Rodríguez A. ; Establier R.1983.** Toxicidad del Hg^{2+} , CH_3Hg^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} sobre larvas y postlarvas del langostino, *Penaeus kerathurus* (Forskal, 1775). Investigaciones Pesqueras 47: 339-344.
- ✂ **Rodríguez E.1991.** Efectos letales y subletales de dos plaguicidas sobre las especies *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (cangrejal bonaerense). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 219 pp.
- ✂ **Rodríguez E.; Pisanó A. 1993.** Effects of parathion and 2-4 D to egg incubation and larvae hatching in *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). Comparative Biochemistry Physiology 104 C:71-78.
- ✂ **Rodríguez E. ; Medesani D. 1994.** Pathological lesions in larvae hatched from ovigerous females of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura) exposed to cadmium. Experientia 50: 975-977.
- ✂ **Rodríguez E.; Monserrat J. ; Medesani D. ; Bigi R. ; Rodríguez Moreno P. ; Lopez Greco L. ; Stella V. ; Cervino C. ; Ausaldo M. 1998.** Efectos Letales y Subletales de plaguicidas y metales pesados en cangrejos de estuario. Revisión de una década de investigaciones. Museo Argentino. Cs. Naturales Bernardino Rivadavia e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales. 150: 1-17.
- ✂ **Rodríguez E. ; Medesani D.; Bigi R.; Stella V.; López Greco L.; Moreno P.; Monserrat J. ; Pellerano G. ; Ansaldo M. 2001.** Acute and chronic effects of cadmium on blood homeostasis of an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, and the modifying effect of salinity. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 34: 509-518.
- ✂ **Rossi J.1982.** Aspectos Hidrológicos del Arroyo San Clemente. Revista del Museo de la Plata. Tomo XII, sección Zoología N° 132, 29-38.
- ✂ **Saigusa M. 2000.** Hatching of an estuarine crab, *Sesarma haematocheir*: from disappearance of the inner (E3) layer to rupture of the egg case. Journal of Experimental Zoology, 287: 510-523.
- ✂ **Sánchez M. ; López Greco L. ; Rodríguez E. 2000.** «Anormalidades morfológicas en larvas de *Chasmagnathus granulata* expuesta a distintas concentraciones de mercurio». Resúmenes de las «IV Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar», Pto. Madryn, Argentina. Septiembre 2000.
- ✂ **Sastry A.1983.** Ecological aspects of reproduction. The Biology of Crustacea, D. Bliss (Eds), Academic Press, N.Y. Vol. 8 pp 179-269.
- ✂ **Seiple W. 1979.** Distribution, Habitat Preferences and Breeding Periods in the Crustaceans *Sesarma cinereum* and *S. reticulatum* (Brachyura: Decapoda: Grapsidae), Marine Biology, 52: 77-86.
- ✂ **Selvakumar S. ; Ajmal Khan S. ; Kumaraguru A.1996.** Acute toxicity of some heavy metals, pesticides and water soluble fractions of diesel oil to the larvae of some brachyuran crabs. Journal of Environmental Biology 17:221-226.

- ✂ **Shealy M. Jr. ; Sandifer P.1975.** Effects of mercury on survival and development of the larval grass shrimp *Palaemonetes vulgaris*. *Marine Biology* 33: 7-16.
- ✂ **Simkiss K. 1981.** Calcium, pyrophosphatate and cellular pollution. *Trends biochemical. Sci.* 6 (4): iii-v.
- ✂ **Uma Devi ; Prabhakara Rao, 1989.** Heavy metal toxicity to fiddler crabs, *Uca annulipes* Latrelle and *Uca triangularis* (Milne Edwards): Respiration on exposure to copper, mercury, cadmium and zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43: 165-172.
- ✂ **Valle B. ; Ulmer D.1972.** Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochemistry* 41: 91-129.
- ✂ **Van Leeuwen C. ; Grifioen P. ; Vergouw W. ; Maas-Diepeveen J. 1985.** Differences in susceptibility og early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. *Aquatic Toxicology* 7: 59-78.
- ✂ **Verrengia Guerrero N. ; Kesten E. 1998.** En: *Ecotoxicología. Monitoreo ambiental y biológico en zonas costeras del Rio de La Plata: relevancia de los contaminantes cadmio y plomo.* Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia e Instituto Nacional de Investigaciones de las Ciencias Naturales. Nueva Serie N 147: 1-12.
- ✂ **Viarengo A.; Nott J.1993.** Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104C:355-372.
- ✂ **Villar C.; Stripeikis J.; Tudino M.; D´Huicque L.; Troccoli O.; Bonetto C.1999 a.** Trace metal concentration in coastal marshes of the lower Paraná river and the Rio de la Plata estuary. *Hydrobiology*, 397:187-195.
- ✂ **Williams R. 1981 .** Physico-chemical aspects of inorganic element transfer trough membranes. *Philosophal Transactions of the Royal Society* 294: 57-74.
- ✂ **Williams R. 1981 .** Nature selections of the chemical elements. *Pollution Royal Society (B)* 213: 97-361.
- ✂ **Wolcott T ; Wolcott L. 1982.** Larval loss and spawning behaviour in the land crab *Gecarcinus laterails* (Freminville). *Journal of Crustacean Biology* 2: 477-485.
- ✂ **Zapata V. ; López Greco L. ; Rodríguez E. 2001.** Effect of copper on hatching and development of larvae of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). *Environmental Toxicology Chemical* 20:1579-1583.

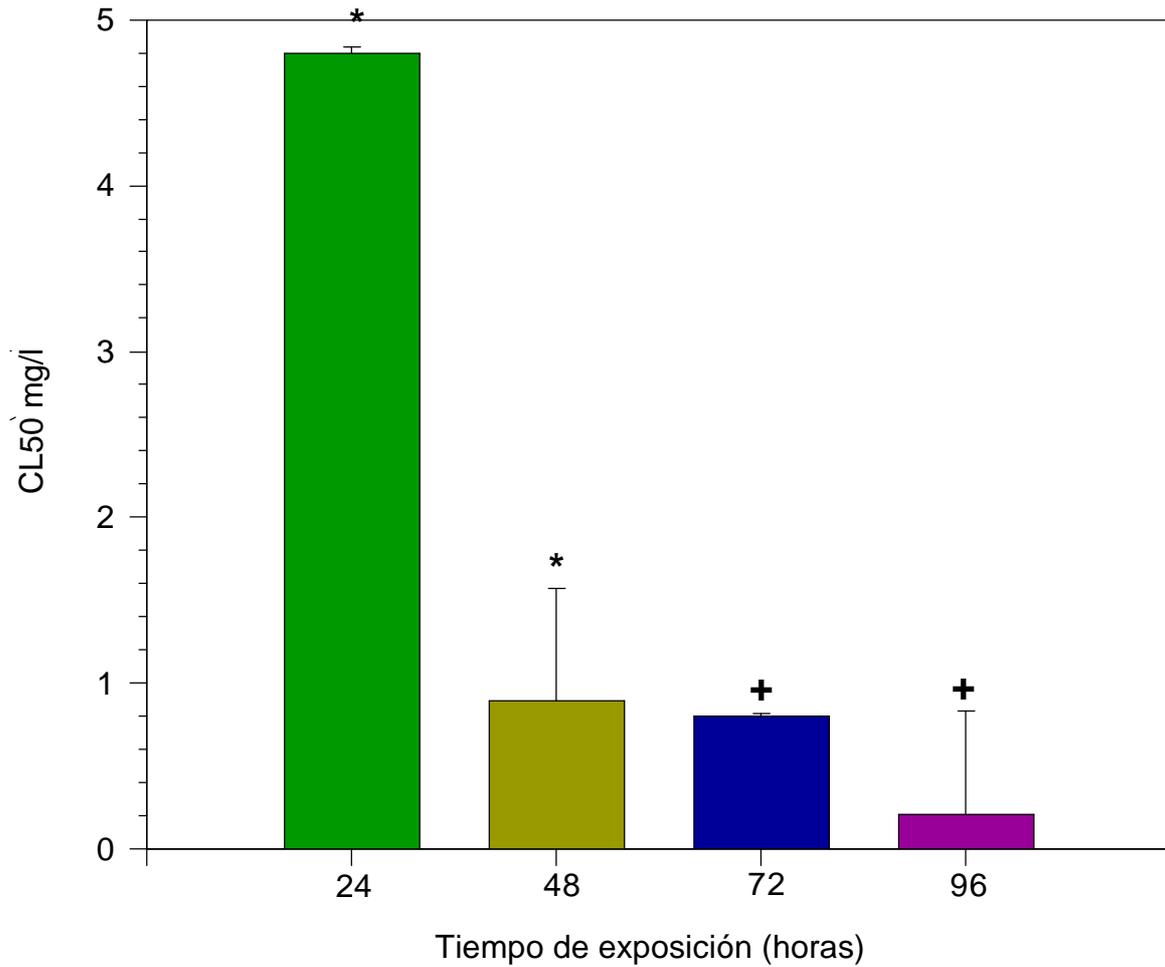


Figura 6: Valores de CL50 obtenidos a partir de los bioensayos de exposición a zinc para la zoea I de *C. granulatus* en función del tiempo de exposición. Signos iguales indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

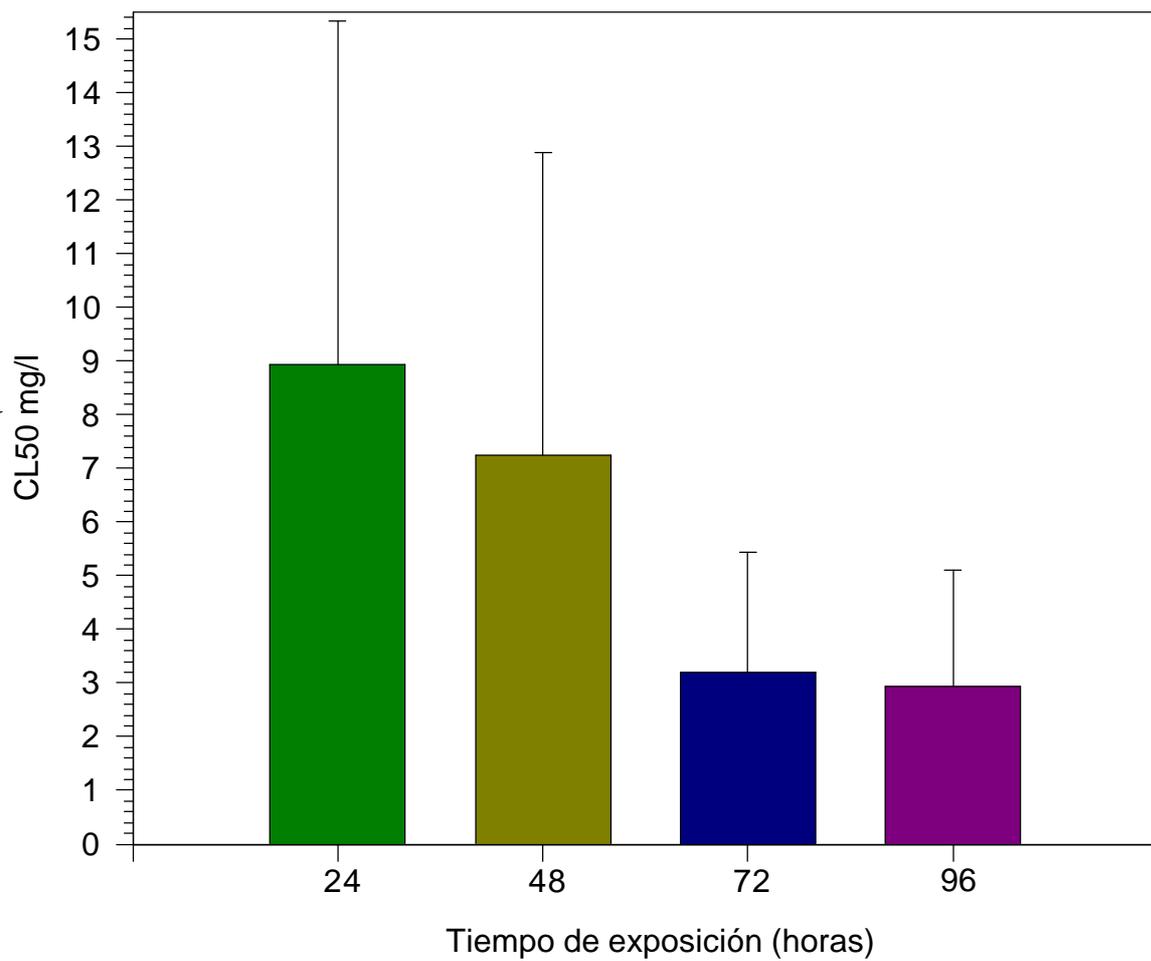


Figura 7: Valores de CL50 obtenidos de los bioensayos de exposición a plomo para zoea I de la *C. granulatus* en función del tiempo de exposición. Signos iguales indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

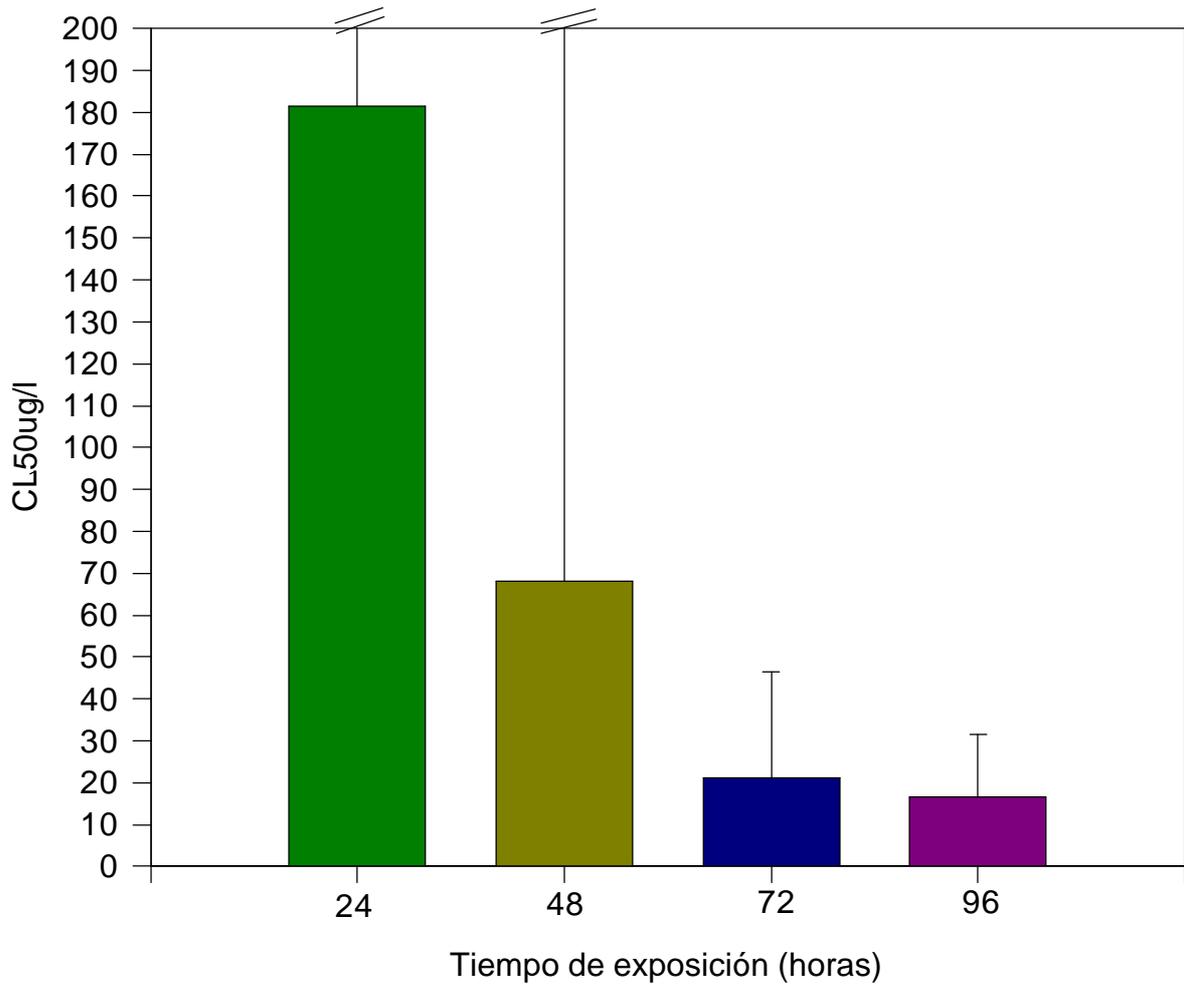


Figura 8: Valores de CL50 obtenidos de los bioensayos de exposición a mercurio para la zoea I de *C. granulatus* en función del tiempo de exposición. Signos iguales indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

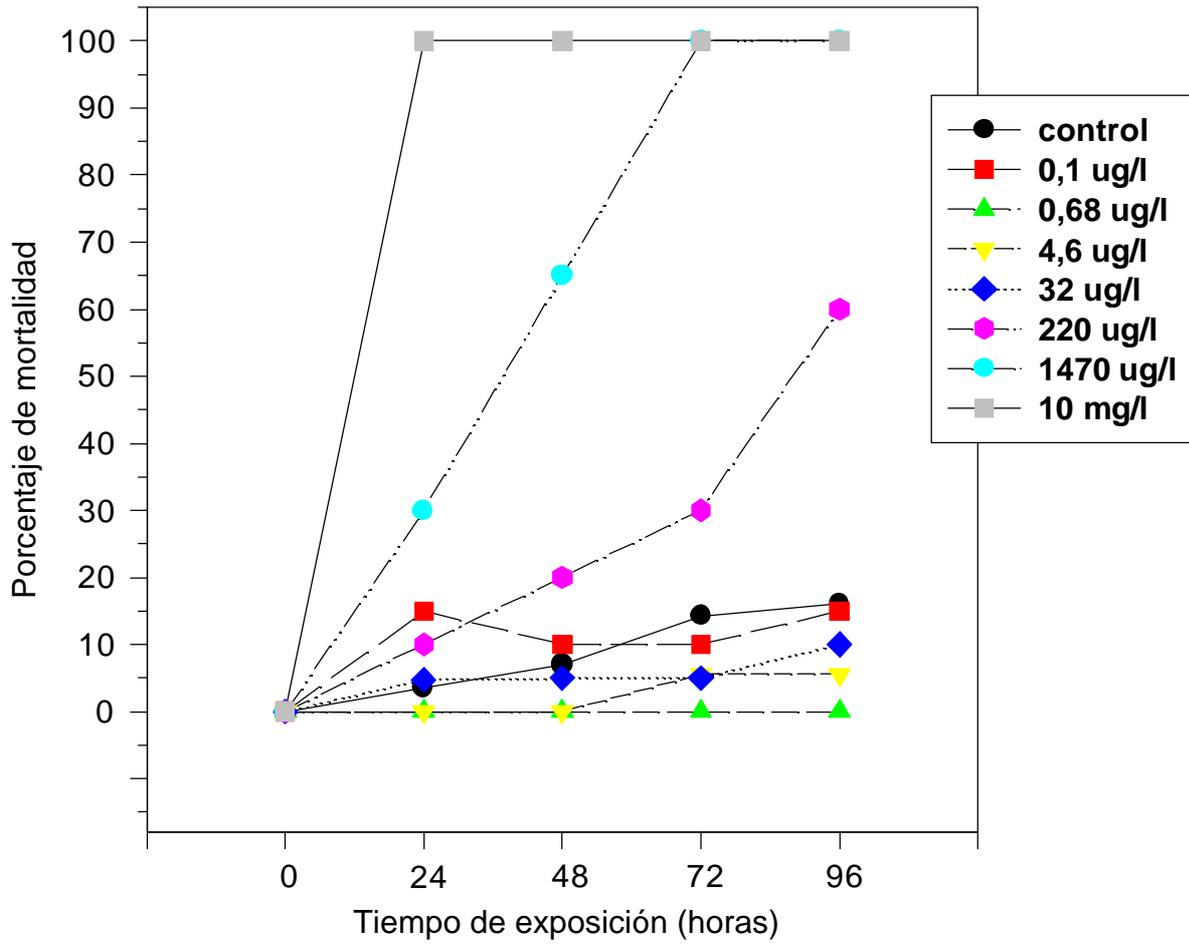


Figura 9: Porcentaje de mortalidad en función del tiempo de exposición de la zoea I de *C. granulatus* a zinc.

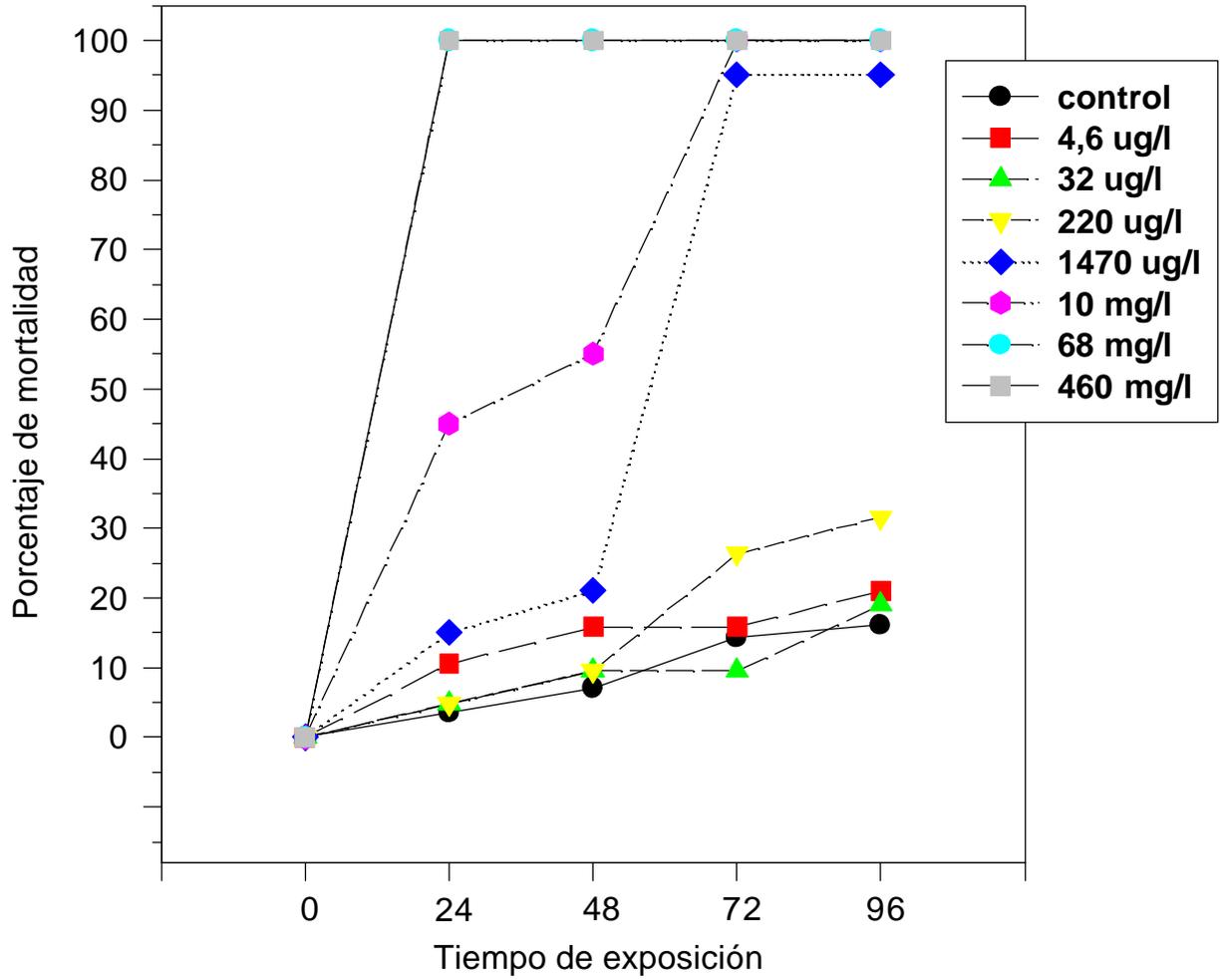


Figura 10: Porcentaje de mortalidad en función del tiempo de exposición de la zoea I de *C. granulatus* a plomo.

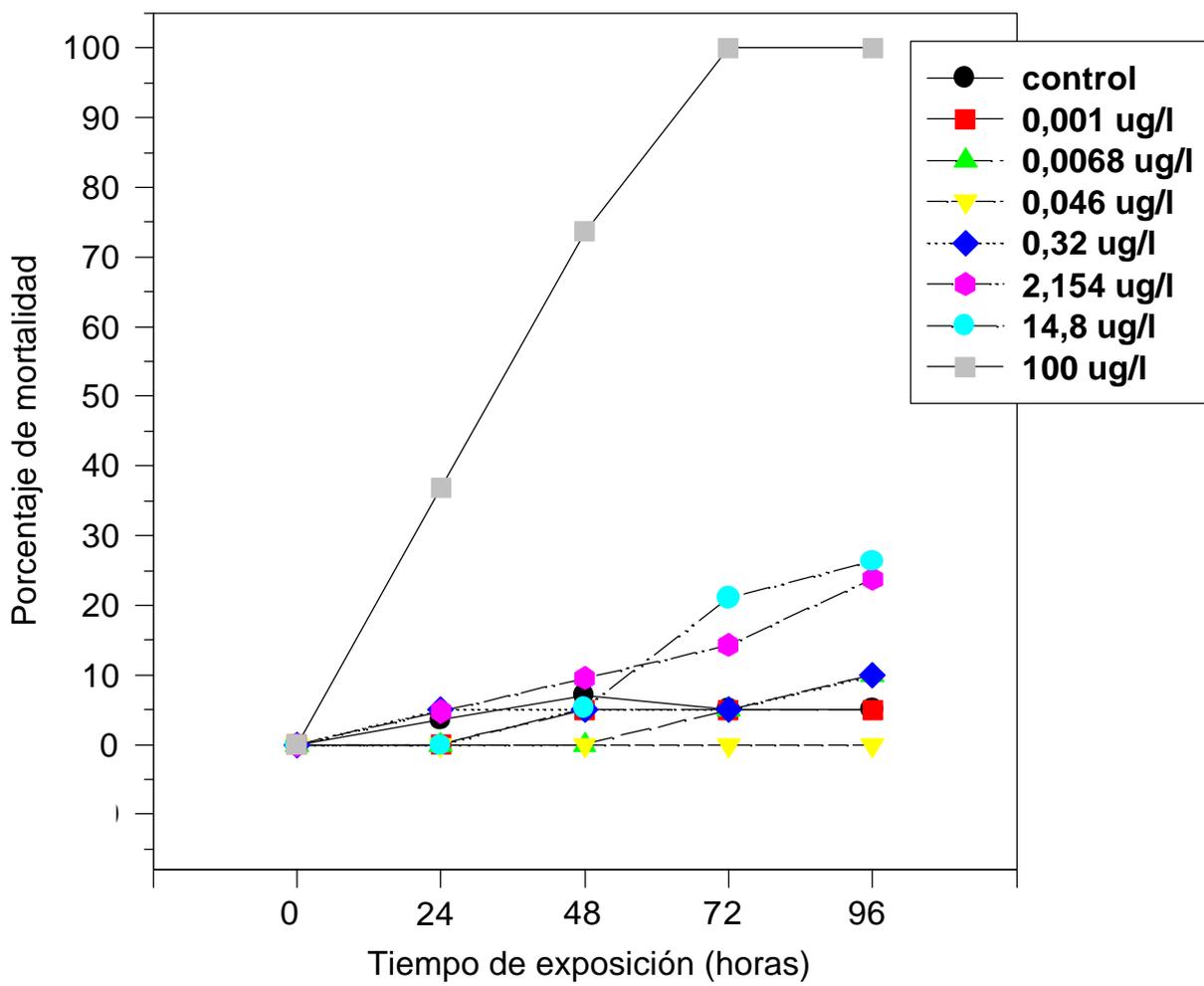


Figura 11: Porcentaje de mortalidad en función del tiempo de exposición de la zoea I de *C. granulatus* a mercurio

