

El efecto de la interacción entre el cadmio, la salinidad y la temperatura sobre el desarrollo larval de *Mithrax verrucosus* Milne Edwards 1832 (Crustacea, Decapoda, Majidae).

Isabel Rengel de Zambrano^{1*}, Kiu Chung², Juan Bolaños³ y José Fermín⁴.

¹ Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela • ² Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela • ³ Instituto de Investigaciones Marinas, Universidad de Oriente, Boca de Río, Estado Nueva Esparta, Venezuela. • ⁴ Instituto Universitario Tecnológico, Cumaná, Venezuela.

Recibido: 27-04-93 Aceptado 07-06-93

Resumen

Se estudió el desarrollo larval del cangrejo marino *Mithrax verrucosus* Milne Edwards 1832, con el propósito de determinar el efecto de vanas combinaciones de temperatura, salinidad y cadmio sobre la frecuencia de muda y la duración de su vida larval. El diseño experimental fue un factorial de $5 \times 3 \times 3$, con salinidades de 20, 25, 30, 35 y 40 o/oo, temperaturas de 22, 26 y 30 °C y concentraciones de cadmio de 0, 50 y 150 µg/L. Se empleó la metodología superficie-respuesta para describir los efectos individuales e interactuantes de los tres factores sobre la frecuencia de muda y la duración del desarrollo larval. En presencia de cadmio se evidenció un significativo retardo en la duración de los estadios zoeales y megalopa para cada régimen de salinidad y temperatura. La tasa de desarrollo máxima o días mínimos de desarrollo para cada uno de los estadios (2zoea y 1 megalopa) se consiguieron a 31 o/oo y 28 °C (zoea 1); 34 o/oo y 30 °C (zoea 2); y 32 o/oo y 25 °C (megalopa). Al disminuir o incrementar estos óptimos, las larvas retardaron el tiempo de muda y permanecieron más tiempo en sus respectivos estadios;...

Palabras claves: cangrejo; marino; tropical; larvas; cadmio; superficie-respuesta.

Interaction effect of cadmium, salinity and temperature on the larval development of *Mithrax verrucosus* Milne Edwards 1832 (Crustacea, Decapoda, Majidae).

Abstract

The larval development of the marine crab *Mithrax verrucosus* Milne Edwards 1832 was studied to determine the effect of the combination of temperature, salinity and cadmium on the frequency of molting and larval cycle duration. Experimental design followed a $5 \times 3 \times 3$ factorial with temperatures of 22, 26 and 30 °C, salinities of 20, 25, 30, 35 and 40 o/oo and cadmium concentrations of 0, 50 y 150 µg/L. A response-surface methodology was used to describe individual and group effects of the three factors mentioned on the molting frequency and complete larval development. A significant decrease in the number of days was observed in the zoeal stages and the megalopa stage regarding the various

* Enviar correspondencia a: I. Rengel de Zambrano, Departamento de Biología, Universidad del Zulia, Apartado Postal 526, Maracaibo 4011, Venezuela

combination of salinity and temperature. The maximum and minimum rate of development for each phase (2 zoea and 1 megalopa) were found at 31 o/oo and 28 °C (zoea 1); 34 o/oo y 30 °C (zoea 2) and 32 o/oo and 25 °C (megalopa). Following variations in the optimum values obtained, the larvae exhibited larger developmental stages.

Keywords: marine; crab; tropical; larvae; cadmium; response-surface.

Introducción

En la actualidad existe un gran interés en estudiar los efectos de los metales pesados sobre los organismos marinos, ya que estos elementos han ido incrementándose peligrosamente a consecuencia del vertido extensivo de materiales de desecho y efluentes industriales y urbanos en zonas estuarinas, costeras y oceánicas (1). Entre los contaminantes inorgánicos que entran a estos ecosistemas, uno de los más peligrosos para la vida acuática es el cadmio y sus derivados, debido al daño que causan a larvas de crustáceos y a otros organismos marinos. Muchos estudios han demostrado la acumulación selectiva de los metales pesados en los organismos acuáticos y sus efectos tóxicos. Los trabajos recientes le dan mucha importancia a las respuestas bioquímicas y fisiológicas que exhiben los organismos por exposiciones subletales del metal, mientras que el significado ecológico potencial para las poblaciones ha sido menos investigado.

La temperatura y la salinidad son dos de los factores ecológicos más importantes en la vida de los organismos marinos y caracterizan de manera muy marcada las propiedades fisicoquímicas de un cuerpo de agua dado. Se ha demostrado la existencia de una verdadera interrelación entre la temperatura, la salinidad y las funciones biológicas. La relación termo-salina influye notablemente y de hecho puede modificar los efectos que produce la toxicidad de los metales pesados en los organismos marinos (2). El efecto sinérgico entre temperatura, salinidad y cadmio y/u otros metales pesados, al igual que su impacto en larvas, juveniles y adultos de crustáceos y otros organismos marinos y estuarinos están bien documentados en la literatura. No obstante, la mayoría de estos estudios se han realizado con especies de ambientes fríos o templados (3, 4, 5, 6-12).

Mithrax verrucosus es un cangrejo, que por sus características biológicas y ecológicas, ha sido considerado como susceptible a cultivos (13). En el presente trabajo se presenta el estudio sobre el efecto producido por el cadmio, la salinidad y la temperatura en la frecuencia de muda, y el período del desarrollo larval de esta especie. Además se determinaron las salinidades y temperaturas óptimas para el desarrollo de las larvas en sus diferentes estadios para la obtención de datos ecológicos importantes para cualquier plan futuro de maricultura con esta especie.

Material y Métodos

Se recolectaron hembras ovígeras de *Mithrax verrucosus* durante los meses comprendidos entre Enero y Junio de 1990, en fondos sublitorales rocosos de la punta "Las Cabeceras" en la Isla de Cubagua, Estado Nueva Esparta, Venezuela (Figura 1), mediante buceo autónomo a una profundidad de 1 a 3m aproximadamente. La salinidad y la temperatura del sitio de recolección fueron de 35 o/oo y 22 - 26 °C, respectivamente.

Los cangrejos se colocaron individualmente en acuarios de vidrios de 25L de capacidad, a una salinidad de 35 o/oo, temperatura de 22 - 24 °C, fotoperíodos de 12 h luz - 12 h oscuridad y pH de 8.0 - 8.2; en estas condiciones se logró la eclosión de los huevos o nacimiento de las larvas como zoea 1. Los cangrejos adultos se alimentaron con una dieta comecial (Trucharina, Marca Protinal) y algas macroscópicas marinas de la especie *Ulva fasciata*. Diariamente se extraía el alimento no consumido y los productos de desecho en cada uno de los acuarios y se reemplazaba la tercera parte del volumen del acuario por agua de mar manteniendo siempre las condiciones fisicoquímicas antes señaladas. Para prevenir la contaminación bacteriana, se agregaba al agua los antibióticos Estreptomycina y Quemicitina

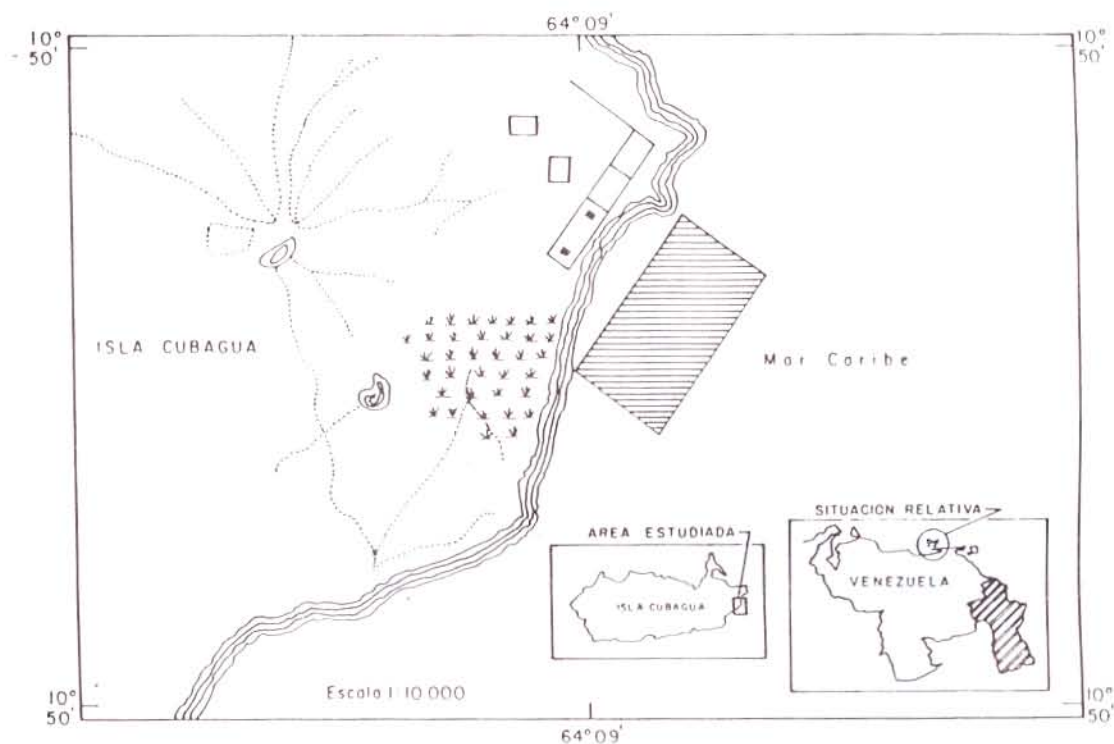


Figura 1. Ubicación del área de muestreo (Isla de Cubagua, Venezuela).

(cloranfenicol) (Pfizer-500 mg), diariamente y a una concentración de 25 µg/mL y 5 µg/mL, respectivamente. La primera etapa experimental se inició con las larvas en estadio de zoea 1. Se colocaron 10 larvas en recipientes de vidrio de 150 mL de capacidad, previamente acondicionados con 100 mL de agua a las salinidades experimentales. El diseño experimental usado para este estudio fue un factorial de $5 \times 3 \times 3$, con salinidades de 20, 25, 30, 35 y 40 o/oo, temperaturas de 22, 26 y 30 °C, y concentraciones nominales de cadmio de 0, 50 y 150 µg/L, preparadas a partir de una solución concentrada de 1000 mg/L de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck). Las temperaturas se lograron en cabinas especiales con termoreguladores Haak E52, leyéndose en termómetros con una apreciación de 0.1 °C. La salinidad se midió con un refractómetro de campo con apreciación de 1 o/oo (Golbert T/S American Optical Instruments Co.). Con el diseño factorial ($5 \times 3 \times 3$) se lograron 15 combinaciones para los tres niveles del contaminante. Cada factor de combinación se replicó tres veces, totalizando 135 experimentos.

A tal fin, se utilizaron 1350 larvas. El cadmio se agregó a los recipientes de cultivo después de un período corto de aclimatación de las larvas a cada régimen de temperatura y salinidad (2 horas). Diariamente, las larvas se transferían a soluciones de prueba frescas y alimentadas con nauplios recién oclosionados de *Artemia salina*. Las réplicas se controlaban cada 24 h; así mismo, la sobrevivencia, el estadio de desarrollo, el número de mudas y los días de su ocurrencia. Se hicieron análisis de regresión lineal múltiple con los datos de los días de duración del desarrollo larval, transformados en arcoseno de la raíz cuadrada, usando los tres factores (salinidad, temperatura, cadmio) en un modelo polinomial de segundo orden. Se generaron curvas de superficie-respuesta, a partir de ecuaciones de regresión separadas para cada nivel de un factor (cadmio) a un rango de niveles de temperatura y salinidad. La reducción canónica de estas ecuaciones finales produjo la localización y valor absoluto del mínimo período de desarrollo en el centro de cada

superficie (14,15). (Programa SAS para macro-computadoras).

Resultados y Discusión

Existe una extensa bibliografía acerca de los efectos de la salinidad y de la temperatura sobre las larvas de braquiuros en regiones templadas. Sin embargo, los estudios sobre los efectos de estas variables ambientales, combinadas con metales pesados, son menos numerosos. Las diferencias en especies, en el tipo de alimentación y en las condiciones ecológicas impuestas para un determinado desarrollo larval, dificultan la comparación con los resultados obtenidos en condiciones tropicales. La literatura actualizada, mayoritariamente describe desarrollos larvales a bajas temperaturas y en amplios límites de salinidades estuarinas.

Hay evidencias definitivas acerca de la alteración de los tiempos de las diferentes mudas o, alternativamente, de la duración de los respectivos eventos y del tiempo total para el desarrollo completo de *Mithrax verrucosus* causados por los efectos individuales e interactivos de la temperatura, salinidad y del cadmio. El tiempo requerido para alcanzar cada una de las tres mudas, para el cambio morfológico de zoea 1 a zoea 2, zoea 2 a megalopa (post-larva) y megalopa a cangrejo 1, estuvo influenciado por la temperatura y por la salinidad. En concentraciones de 50 y 150 $\mu\text{g/L}$, el cadmio afectó notablemente la frecuencia de muda en todas las combinaciones de temperatura y salinidad (Figuras 2 - 4). Para la primera zoea, la frecuencia de muda y los días de duración del desarrollo fueron más tardíos a bajas salinidades y temperaturas. La temperatura y su interacción con la salinidad afectaron significativamente el desarrollo, en relación al número de muda y al tiempo requerido para que las zoea 1 se transformaran en zoea 2 (Ca. a temperaturas de 30 °C y salinidades más altas). La máxima tasa de desarrollo o menor tiempo requerido (2,6 días) se registró a 31 o/oo de salinidad y 28 °C. Este mismo tiempo se puede lograr en aguas con temperaturas óptimas que varían desde 26 y 30 °C, y salinidades entre 28 y 36 o/oo. Fuera de estos límites óptimos, los días de duración de las larvas como zoea 1 se van pro-

longando (Figura 5a). La reducción canónica de las ecuaciones de regresión para la duración del desarrollo a las concentraciones de cadmio de 50 y 150 $\mu\text{g/L}$ demuestra que el máximo tiempo, correspondiente a una tasa baja de desarrollo para la muda de las zoea 1, se incrementó desde 5,6 días (en ausencia de cadmio) a 6,4 y 7,3 días en la presencia de 50 y 150 $\mu\text{g/L}$ de cadmio. El amplio rango de temperatura y salinidad para la máxima tasa de desarrollo de las zoea 1 en ausencia de cadmio se redujo cuando la concentración de cadmio se incrementó; de tal manera, que con 150 μg de Cd/L este máximo no existió por el hecho de que el contorno de la curva superficie-respuesta se desplazó y se presentó dentro de un estrecho límite de salinidades (Ca. entre 20 y 22 o/oo) y temperaturas altas (Ca. por encima de los 29 °C) (Figuras 5b y 5c). Las salinidades y temperaturas óptimas para el tiempo de duración de las larvas como zoea 2 (5,1 días) fueron diferentes a las requeridas para la transformación larval de las zoea 1. La salinidad óptima fue más elevada (34 o/oo) y más baja la temperatura óptima (26 °C), pero la salinidad se presentó con un rango más estrecho, interpretándose que la frecuencia de muda de las zoea 2 para su transformación a megalopa fue más afectada por la salinidad que por la temperatura. Existe por supuesto un rango óptimo para esos días de duración, salinidades está entre 31 y 37 o/oo y temperaturas entre 24 y 29 °C. Fuera de este rango, los días de duración del desarrollo se van alargando progresivamente y se hacen más dependientes de la salinidad que de la temperatura, excepto para temperaturas bajas, donde el período de duración se extiende dramáticamente, prolongándose el desarrollo en 5 días más con respecto al tiempo requerido para la próxima muda, en condiciones óptimas de salinidad y temperatura (Figura 6a).

Cuando la concentración de cadmio se elevó a 50 $\mu\text{g/L}$, los rangos de temperatura y de salinidad se estrecharon un poco y se ubicaron entre 25 a 30 °C, y 34 y 40 o/oo (medias 39 o/oo y 28 °C). Este período mínimo absoluto para la transformación de las zoea 2 a megalopa se incrementó en 6,3 días, en relación a los 5,1 días observado para esa misma transformación en ausencia de cadmio. Por debajo de 30 °C de temperatura y con un rango de salinidad entre 27 y 40 o/oo,

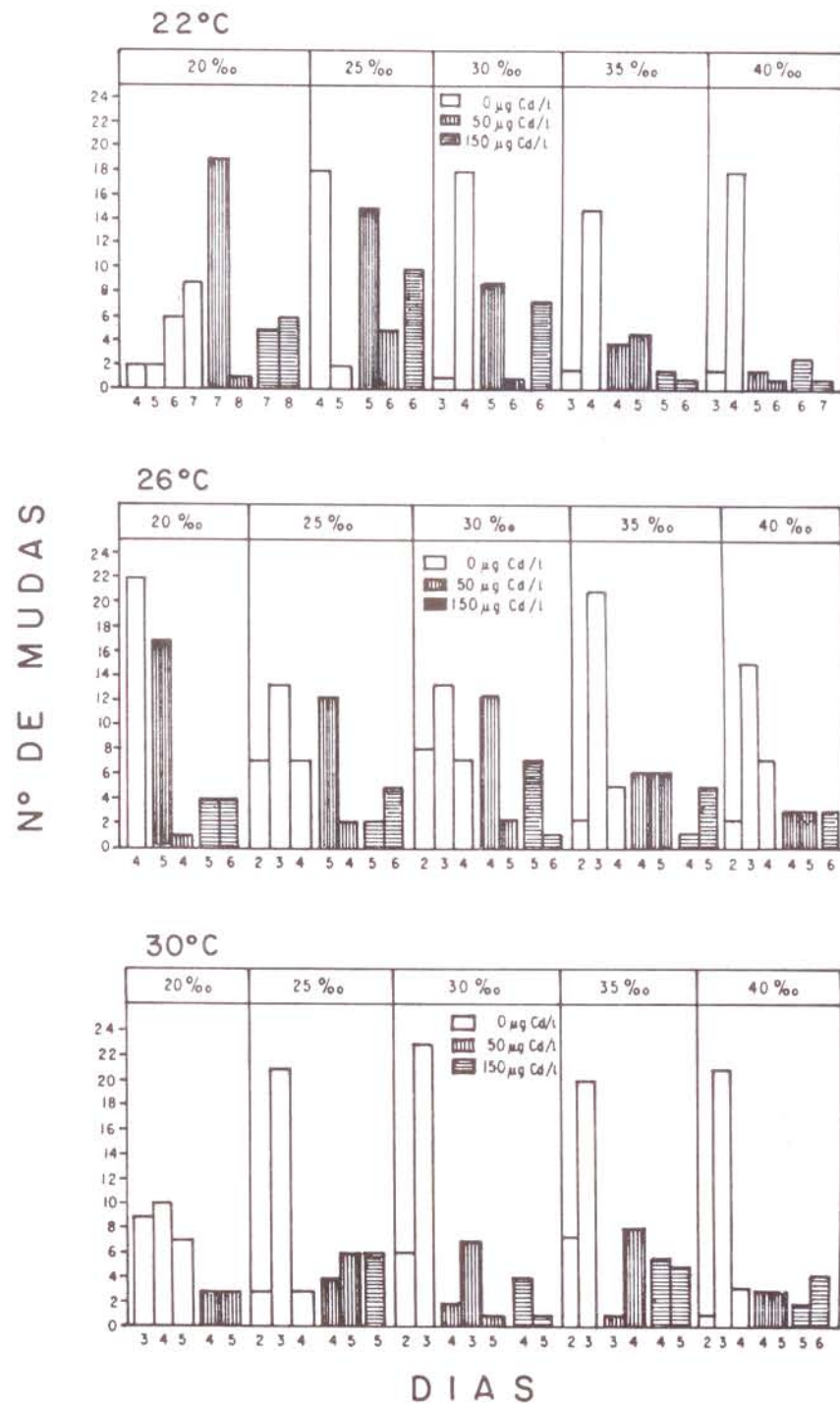


Figura 2. *Mithrax verrucosus*. Comparación del tiempo de la primera muda para zoea 2 a diferentes combinaciones de salinidad, temperatura y concentraciones de cadmio.

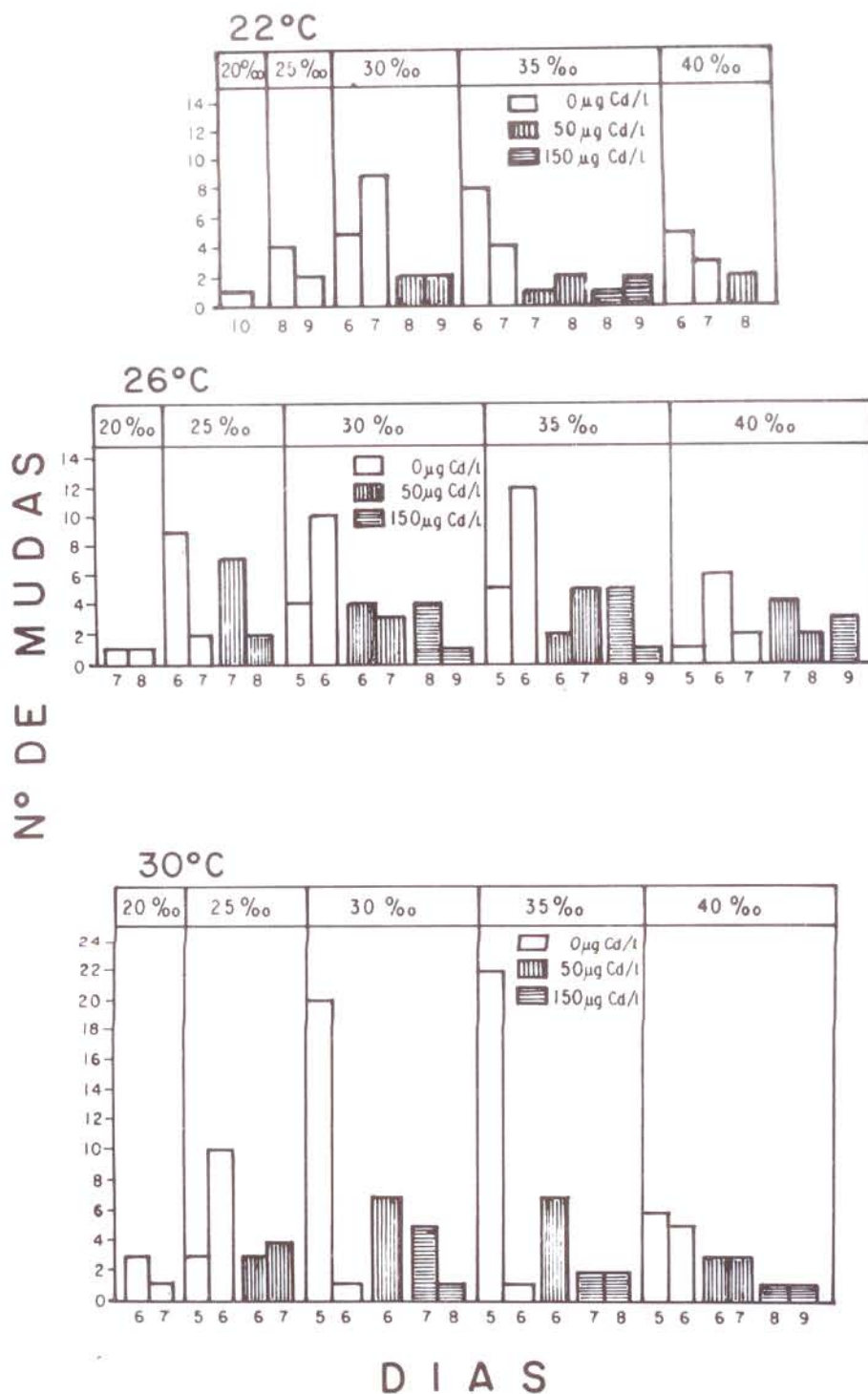


Figura 3. *Mithrax verrucosus*. Comparación del tiempo de la segunda muda para megalopa a diferentes combinaciones de salinidad, temperatura y concentraciones de cadmio.

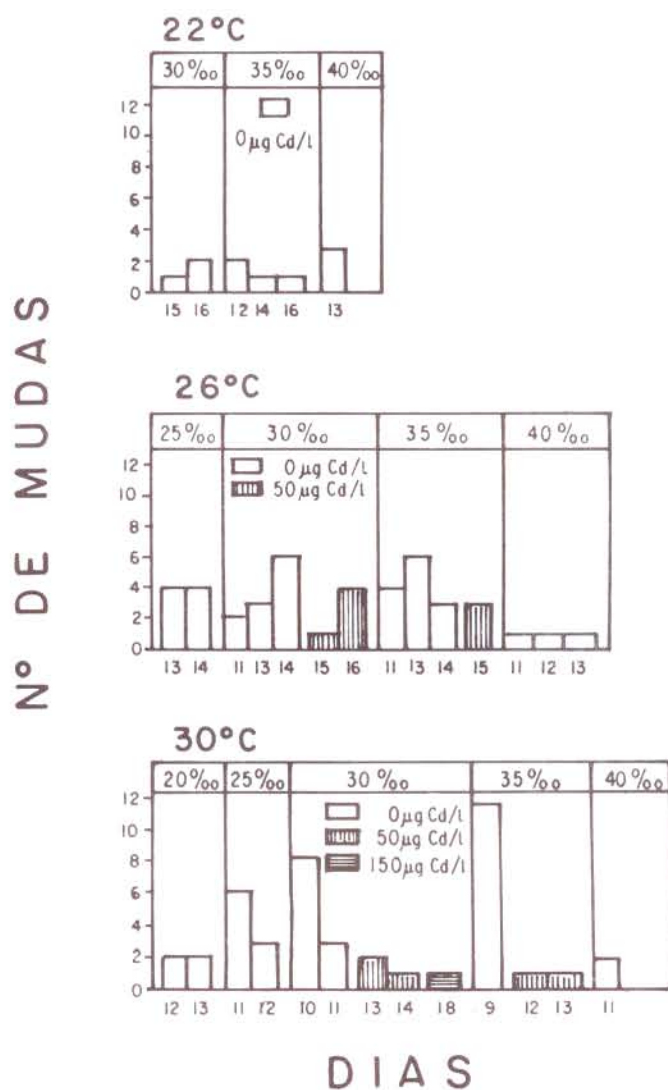


Figura 4. *Mithrax verrucosus*. Comparación del tiempo de la tercera muda para cangrejo I a diferentes combinaciones de salinidad, temperatura y concentraciones de cadmio.

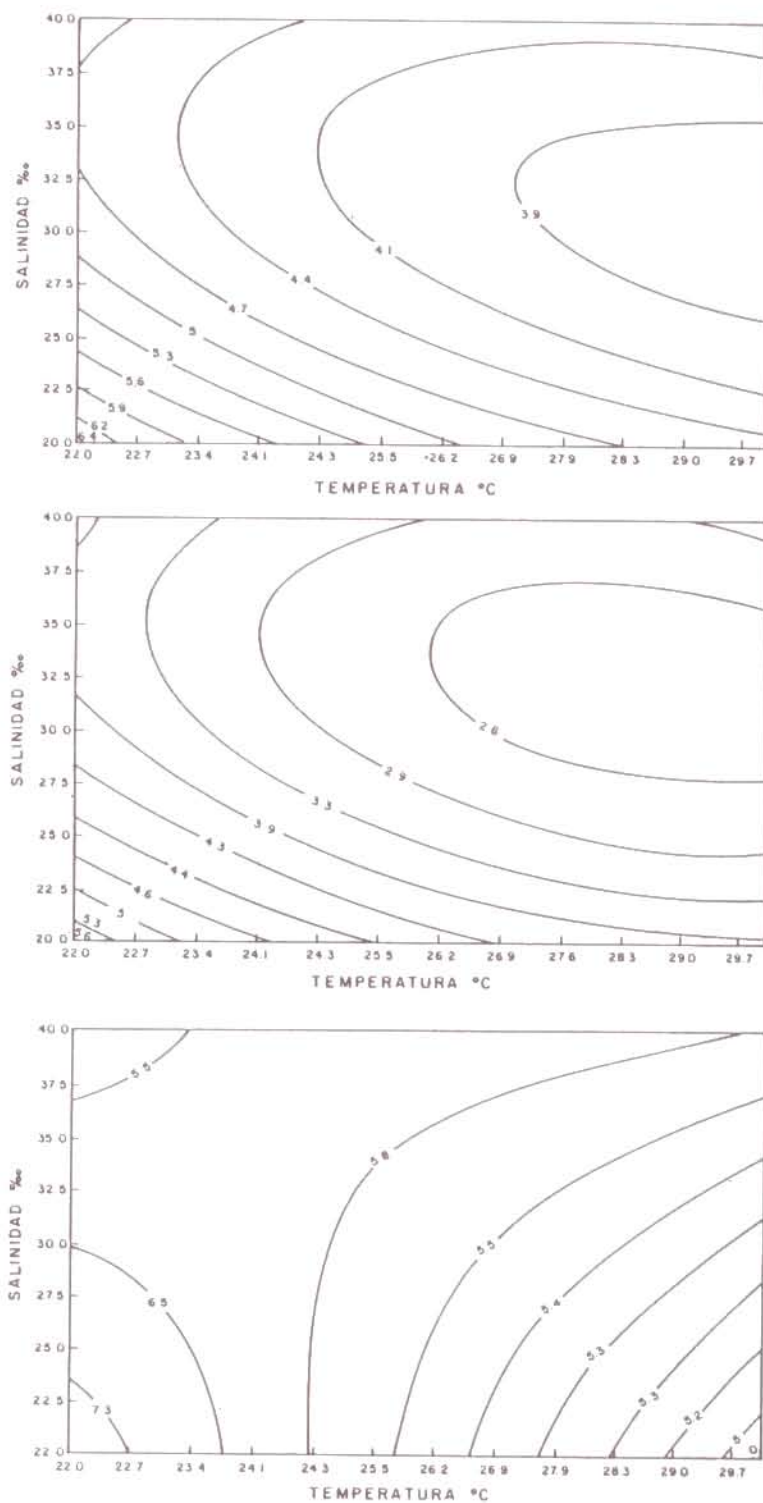


Figura 5. *Mithrax verrucosus*. Diagramas de superficie-respuesta que muestran la predicción de los días de duración del primer estadio zoeal bajo 45 combinaciones de salinidad, temperatura y cadmio, (A) 0.00 µg de Cd²⁺; (B) 50 µg de Cd²⁺/L; (C) 150 µg de Cd²⁺/L.

el período de duración de las zoea se alargó en 2,2 días con respecto a la máxima tasa de desarrollo en condiciones definidas. Por debajo de 27 o/oo, y para cualquier temperatura entre 22 y 30 °C, no fue posible la sobrevivencia de las zoea 2 y, por lo tanto, no se registró el tiempo de duración de este estadio (Figura 6b).

Las bajas salinidades en combinación con niveles incrementados de cadmio son fatales para las larvas de *M. verrucosus*. Esta situación puede explicarse en función de dos argumentos.

En primer lugar, es conocido que a bajas salinidades el cadmio se encuentra en mayor proporción en forma iónica, aumentando su toxicidad. Adicionalmente, las larvas a bajas salinidades están sometidas a un "stress" fisiológico, y tratan de lograr una regulación hiperosmótica(16); el cadmio adicionado constituye otro factor de "stress", fatal para las larvas. Concentraciones de cadmio reportadas como tóxicas para organismos marinos, son generalmente más altas que las probadas en estos experimentos, en los cuales la salinidad y el cadmio interactúan sinérgicamente en combinación con la temperatura y afectan el desarrollo larval de *M. verrucosus*. Efectos similares de interacción con el zinc. Se observaron en larvas del camarón *Palaemonetes pugio* (17).

Las temperaturas altas (26 a 30 °C) acortan del período de desarrollo, compensando el efecto de las bajas salinidades; esto es opuesto al efecto que logran las bajas temperaturas y salinidades. El tiempo que las megalopa permanecieron en este estadio para transformarse a cangrejo 1 también fue afectado por la salinidad y el cadmio, más que por la temperatura. El tiempo mínimo que se requirió para la próxima muda fue de 11,3 días a 32 o/oo de salinidad y 25 °C de temperatura, con rangos óptimos de 27 a 38 o/oo de salinidad, y 22 a 30 °C de temperatura. Se aprecia que la duración de este último estadio fue afectado considerablemente por la salinidad. Se nota que dentro del límite de salinidad mencionado, el tiempo mínimo de desarrollo, 11,3 días, se alcanzó a un rango de temperatura mucho más amplio. En los extremos de bajas y altas temperaturas, sin embargo, el desarrollo completo de las larvas dentro de ese período de días, fue más

dependiente de un límite más estrecho de salinidad. El período de duración de las larvas como megalopa se prolongó progresivamente y a partir, aproximadamente, de 26 °C hasta 22 °C y de 20 o/oo a 25 o/oo de salinidad no fue posible la sobrevivencia de las postlarvas; por lo tanto, no se observaron días de duración del desarrollo. La máxima prolongación de los días, 13,6 días, se observó por debajo y por encima de 27 °C y 27 o/oo de salinidad (Figura 7a). A la concentración de 50 µg/L de Cd se observó un evidente retraso en los días de duración de las postlarvas. El mínimo período absoluto para el desarrollo larval fue de 13,5 días. Los límites de salinidad y temperatura fueron más estrechos que los observados para las megalopa en ensayos controles. La influencia muy marcada de la salinidad se manifestó en el estrecho rango de salinidad que requirieron las postlarvas para poder efectuar la muda a primer cangrejo, en comparación con el amplio intervalo de temperatura. Esto se observó por debajo de 29 o/oo y por encima de 34 o/oo de salinidad. A 37 o/oo de salinidad no se observó una tasa de desarrollo para este último estadio para cualquier temperatura entre 22 y 30 °C (Figura 7b). Estos óptimos difirieron un poco de los encontrados para los tiempos de duración de los estadios de zoea, pero los tiempos requeridos para sus respectivas transformaciones a un próximo estadio se enmarcaron entre 31 y 34 o/oo de salinidad y 26 y 29 °C de temperatura. Comparando las condiciones óptimas de temperatura y salinidad para la mejor sobrevivencia de las larvas con la de los tiempos de duración, se pudo comprobar que las megalopas requirieran para su sobrevivencia de menores salinidades un tanto y de incrementadas temperaturas. Así, las larvas en su medio natural parecen ser capaces de seleccionar la mejor combinación que las conduzca a la muda en el menor tiempo. Además, la sobrevivencia y el tiempo de duración fueron observados en límites similares, por lo que es factible suponer que hubo una selección de temperatura y salinidad.

La duración de los estadios de zoea y de postlarva en *M. verrucosus* se prolongó progresivamente a concentraciones de cadmio de 50 y 150 µg/L. Las condiciones de temperatura y salinidad catalogadas como óptimas para las tasas de

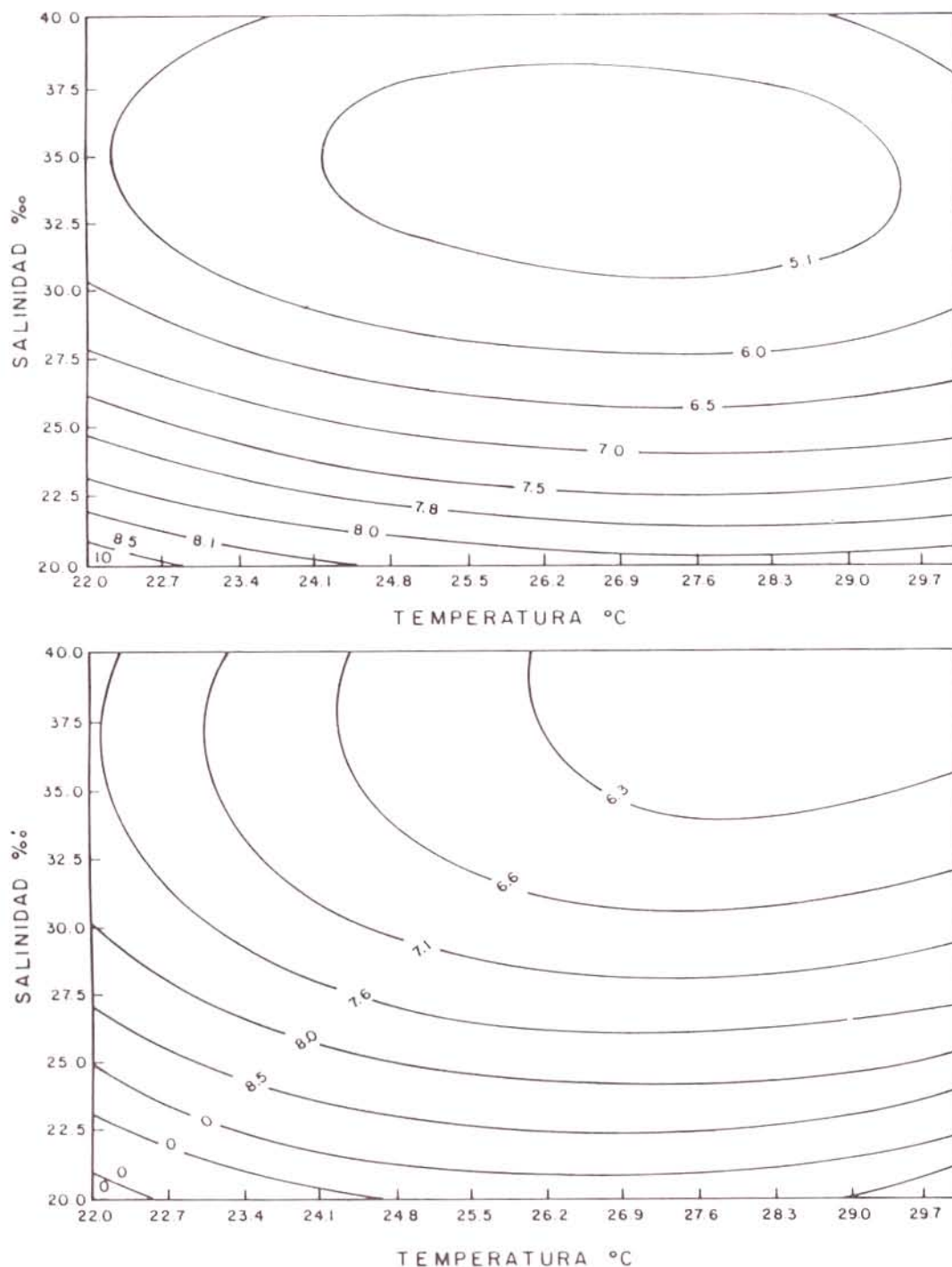


Figura 6. *Mithrax verrucosus*. Diagramas de superficie-respuesta que muestran la predicción de los días de duración del segundo estadio zoeal bajo 45 combinaciones de salinidad, temperatura y cadmio. (A) 0.00 µg de Cd²⁺; (B) 50 µg de Cd²⁺/L; (C) 150 µg de Cd²⁺/L.

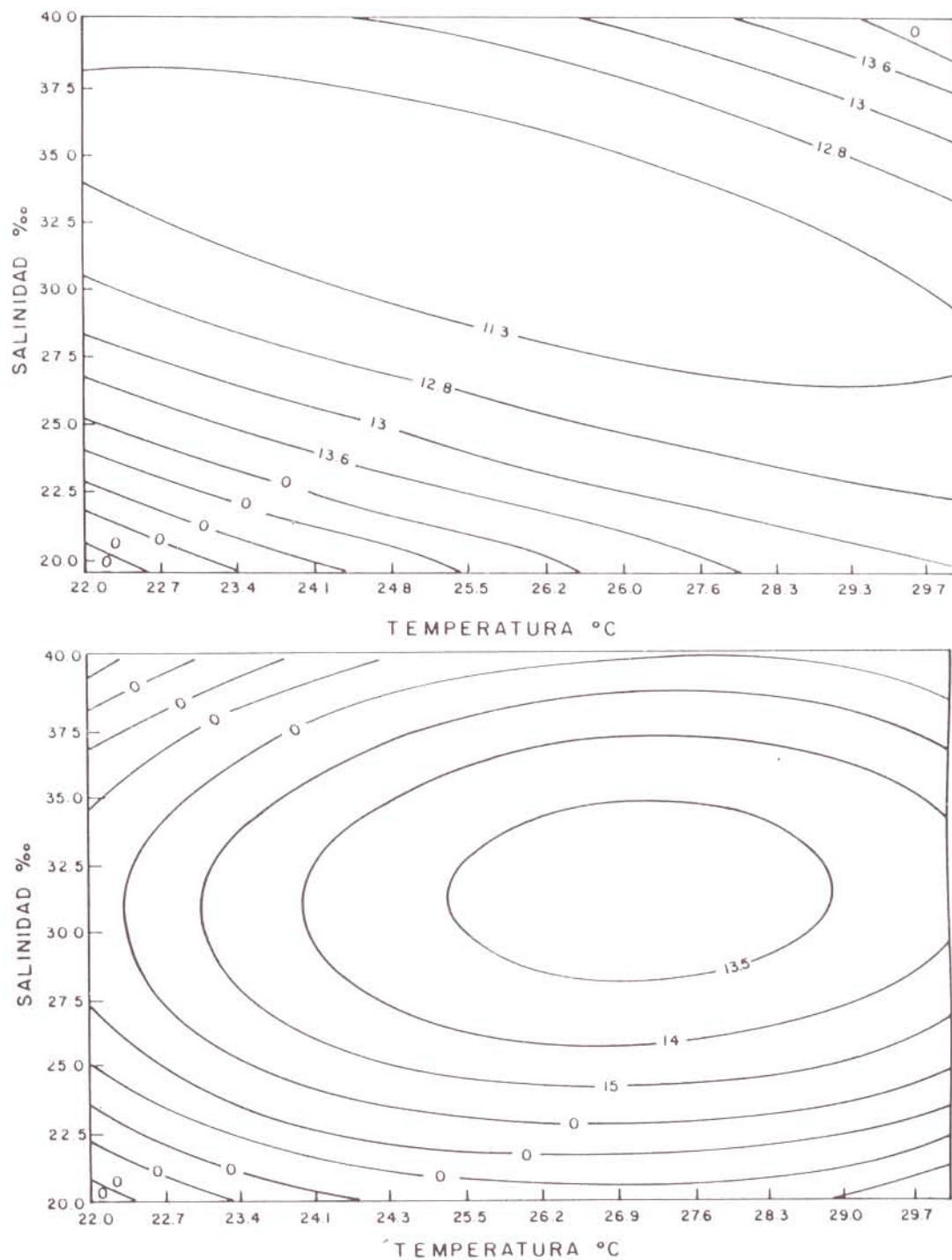


Figura 7. *Mithrax verrucosus*. Diagramas de superficie-respuesta que muestran la predicción de los días totales de duración del desarrollo larval bajo 45 combinaciones de salinidad, temperatura y cadmio. (A) 0.00 µg de Cd^{+2} ; (B) 50 µg de Cd^{+2} /L; (C) 150 µg de Cd^{+2} /L.

desarrollo estuvieron restringidas por las exposiciones a concentraciones subletales de cadmio y a salinidades y temperaturas fuera del rango óptimo. Las exposiciones al cadmio prolongan el periodo de desarrollo de una metamorfosis normal. Exposiciones subletales con zinc entre 0.25 y 1.00 mg/L retardaron la duración del desarrollo larval de *Palaemonetes pugio* (17). Las tasas de desarrollo de las zoeas y megalopas de *Rithropanopeus harrisi* fueron más retardadas por mercurio a bajas salinidades (18). Esto pueda interpretarse como un patrón de repuesta de las larvas de decápodos a cualquier "stress" ambiental. La alta afinidad que los metales pesados poseen por enzimas y otras proteínas sugieren que el retardo en la metamorfosis en *M. verrucosus* inducida por el cadmio, puede reflejar una modificación o alteración de las hormonas controlantes o inhibición de enzimas involucradas en los procesos de muda, morfogénesis y/o metamorfosis.

Estos niveles de cadmio, responsables de reducir la viabilidad de las larvas aún en condiciones óptimas de temperatura y salinidad, incrementan las tasas de mortalidad. En ambientes costeros contaminados con concentraciones similares de cadmio, u otro metal, probablemente las larvas prolongarían su metamorfosis y se reduciría su sobrevivencia. Se ha manifestado que el incremento en mortalidad de las larvas por efectos de metales pesados puede traer implicaciones ecológicas en sus ambientes naturales, tales como reducción del número de larvas disponibles para repoblar las comunidades, para colonizar nuevos habitats para la especie, o para reestablecer poblaciones adultas vecinas (17). El cadmio limita aquellos amplios rangos de salinidad y temperatura, dentro de los cuales las larvas expuestas pueden cumplir su ciclo de desarrollo. La prolongación del desarrollo larval en *M. verrucosus* inducida por el cadmio a concentraciones de 150 µg/L es cercana a los 7 días, en condiciones óptimas de salinidad y temperatura. La prolongación de la vida larval, por efecto de concentraciones muy bajas de metales pesados, puede incrementar la fase pelágica en el ciclo de vida de las especies, a periodos durante los cuales la predación puede ejercer una fuerte influencia sobre las especies. La predación de las larvas podría reducir el número provechoso para el

reclutamiento dentro de las poblaciones bénticas o para la dispersión y establecimiento de nuevas poblaciones en ambientes menos severos (17).

La salinidad y temperaturas óptimas para cada uno de los estadios larvales de *M. verrucosus*, los cuales los condujeron al desarrollo de una metamorfosis normal se obtuvieron a: 31 o/oo y 28 °C (zoea 1); 34 o/oo y 30 °C (zoea 2) y 32 o/oo y 25 °C (megalopa). Las larvas expuestas a concentraciones de 50 µg/L y 150 µg/L, aún dentro de estos límites óptimos de temperatura y salinidad, redujeron su sobrevivencia y alargaron su periodo larval.

Referencias Bibliográficas

1. CALABRESE A., THURBERG F., GOULD E.: Effects of cadmium, mercury and silver on marine animals. *Marine Fisheries Review* 39:5-11, 1977.
2. HUTCHISON V.H.: Factors influencing the thermal tolerance of individual organisms in: *Thermal Ecology*. p10-25 Esch GW & RS Mac McFarlane, eds., Tennessee, 1976.
3. DENTON G.R., BURDON-JONES C.: Influence of temperature and salinity on the uptake, distribution and depuration of mercury, cadmium and lead by the black lip Oyster *Cassostrea echinata*. *Marine Biology* 64:317-326, 1981.
4. HUTCHESON M. S.: The effect of temperature and salinity on cadmium uptake by the blue crab *Callinectes sapidus*. *Chesapeake Science* 15:237-241, 1974.
5. JACKIME E., MORRISON G., STEELE R.: Effects of environmental factors on radiocadmium uptake by four species of marine bivalves. *Marine Ecology* 15: 237-241, 1977.
6. O'HARA J.: Cadmium uptake by fiddler crabs exposed to temperature and salinity stress. *J Fish Res Board Canada* 30: 846-848, 1973 (a).
7. O'HARA J.: The influence of temperature and salinity on the toxicity of cadmium to the fiddler crab *Uca pugilator*. *Fishery Bull* 71: 149-153, 1973(b).
8. SULLIVAN J. K.: Effects of salinity and temperature on the acute toxicity of cadmium to the estuarine crab *Paragrapsus ganimerdii* (Milne Edwards). *Aust J Mar Freshwater Res* 28: 739-743, 1977.

9. THEEDE H., SCHULZ N., FISCHER H.: Temperature and salinity effects on the acute toxicity of cadmium to *Laomedea loveni* (Hydrozoa). *Marine Ecology* 1: 13-19, 1979.
10. VERNBERG W., VERNBERG J.: The synergistic effects of temperature, salinity and mercury on survival and metabolism of the adult fiddler crab *Uca pugilator*. *Fishery Bull* 70: 415-420, 1972.
11. WATKINS B., SIMKISS K.: The effect of oscillating temperatures of the metal ion metabolism of *Mytilus edulis*. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* 68: 93-100, 1988.
12. WRIGHT D. A.: The effect of salinity on cadmium uptake by the tissues of the shore crab *Carcinus maenas*. *J Exp Biol* 67: 137-146, 1977.
13. BOLANOS J.: Desarrollo larval de *Mithrax verrucosus* Milne Edwards 1832 (Crustacea, Decapoda, Majidae) p122, Tesis de Grado, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela, 1980.
14. COCHRAN W.G., COX G.M.: Experimental Designs en: A wiley publication in applied stadistic. p57-67 John Wiley & Son., eds. New York.
15. ALDERDICE D. F.: Factor combination response of marine poikilotherms to enviromental factor acting in concert en: *Marine Ecology*, vol 1, p1659-1722 Kinne, eds. Wiley Intercience, London, 1972.
16. JONES W.: Synergistic effects of salinity, temperature and heavy metals on mortality and osmoregulation in marine and estuarine isopods (Crustacea). *Marine Biology* 15: 237-241, 1977.
17. MCKENNEY C. I., NEFF J. M.: Individual effects and interactions of salinity, temperature and zinc on larval development of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. I. Survival and developmental duration through metamorphosis. *Marine Biology* 52: 177-188. 1979.
18. MCKSENNY C. I. JR., COSTLOW J. D.: Interaction of temperature, salinity and mercury on larval development of the xanthid crab, *Rithropanopeus harrisi* (Gould). *J Am Soc Zoology* 17: 92-98, 1977.