

Incorporación, depuración y efecto del cadmio en el mejillón verde *Perna viridis* (L. 1758)
(Mollusca: Bivalvia)

Uptake, depuration and effect of cadmium on the green mussel *Perna viridis* (L. 1758)
(Mollusca: Bivalvia)

Noelis Narváez^{1*}
César Lodeiros^{1*}
Osmar Nusetti²
Mairin Lemus²
Alfonso N. Maeda-Martínez³

¹ Instituto Oceanográfico de Venezuela
Universidad de Oriente
Cumaná 6101, Venezuela

* E-mail: noelismarvaez@yahoo.es; clodeiro@sucre.udo.edu

² Departamento de Biología
Escuela de Ciencias
Universidad de Oriente
Cumaná 6101, Venezuela

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Mar Bermejo 195
Col. Playa Palo de Santa Rita
23090 La Paz, Baja California Sur, México

Recibido en diciembre de 2003; aceptado en octubre de 2004

Resumen

Se evaluó el efecto de una concentración subletal de cadmio ($0.04 \mu\text{g Cd L}^{-1}$) sobre la condición fisiológica de juveniles del mejillón verde *Perna viridis* (22.3 ± 2.33 mm de alto de la concha), recolectados en la localidad de Guayacán, Estado Sucre, Venezuela. Los organismos se expusieron a la concentración subletal durante 7 días, y después a un proceso de depuración de 52 días, en condiciones de laboratorio y en su medio natural (campo) mantenidos en cestas plásticas suspendidas de una línea madre (*long-line*). En ambas condiciones se midió la concentración de Cd en el tejido y se determinaron diferentes índices fisiológicos: consumo de oxígeno, excreción de amonio, proteínas totales, índice ARN/ADN y dimensión (alto), y masas secas de la concha y del tejido. Durante la exposición al metal en condiciones de laboratorio, no se observaron diferencias significativas en los índices utilizados; sin embargo, durante el proceso de depuración todos los parámetros de crecimiento, en general, aumentaron significativamente al final del experimento, en los organismos trasladados al medio natural. El índice ARN/ADN mostró gran variabilidad, lo que indica que éste no fue adecuado para evaluar el efecto del cadmio. Sin embargo, el contenido total de proteínas, la masa seca de los tejidos, el alto de la concha y, particularmente, el consumo de oxígeno y la excreción de amonio, mostraron ser índices apropiados para evaluar la condición fisiológica del mejillón expuesto a dosis subletales de cadmio.

Palabras clave: toxicología acuática, metal pesado, índices fisiológicos, contaminación marina, bivalvos.

Abstract

We evaluated the effect of a sublethal concentration of cadmium ($0.04 \mu\text{g Cd L}^{-1}$) on the physiological condition of the juvenile green mussel *Perna viridis* (22.3 ± 2.33 mm shell height), collected in Guayacán, Sucre State, Venezuela. The mussels were exposed to the sublethal concentration for 7 days, and were then depurated during 52 days simultaneously in the laboratory and in the field in plastic baskets suspended from a long line. In both conditions, the concentration of cadmium was measured and different physiological indices were determined: oxygen consumption, ammonia excretion, total protein content in tissues, RNA/DNA ratio, and height and mass of the shell and tissues. No significant differences in the physiological indices were obtained during the depuration process in the laboratory but, in general, all the indices tested increased during depuration in the field. The RNA/DNA index showed great variability, proving to be unsuitable to evaluate the toxic effect of cadmium; however,

total protein content, shell and tissue height and mass and, particularly, oxygen consumption and ammonia excretion rate proved to be suitable to evaluate the physiological condition of mussels exposed to sublethal concentrations of xenobiotics.

Key words: aquatic toxicology, heavy metals, physiological indices, marine contamination, bivalves.

Introducción

La selección de especies modelo como organismos estándares para monitorear y predecir la contaminación ambiental es fundamental para los estudios y programas de manejo preventivo de los ecosistemas. Los bivalvos han sido ampliamente utilizados para evaluar la calidad ambiental de los ecosistemas acuáticos ya que tienen la capacidad de bioacumular en sus tejidos los contaminantes presentes en el medio; además, su carácter sésil y filtrador los hace útiles como reveladores de los eventos que ocurren en las áreas donde habitan. Un buen ejemplo lo representan las ostras *Crassostrea virginica* y *C. gigas* (Scanes, 1996), y los mejillones de aguas templadas *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* y de aguas tropicales *Perna viridis* (Beaumont *et al.*, 1987; Pavicic *et al.*, 1994; Hoare *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 2002). No obstante, la distribución de los bancos naturales de estas especies se limitan a zonas zoogeográficas definidas y, por lo tanto, se hace necesario la selección de especies que se puedan utilizar como modelos con un carácter más universal. En este sentido, el mejillón verde *P. viridis*, una especie de importancia acuícola (Gallardo *et al.*, 1992; Tejera *et al.*, 2000; Manoj y Appukuttan, 2003) que ha sido ampliamente utilizada como organismo bioindicador de contaminación en zonas tropicales del Océano Indopacífico (Lowe, 1995; Chidambaran, 1996; Krishnakumar *et al.*, 1996), recientemente ha expandido su distribución hacia el Atlántico tropical (Agard *et al.*, 1992; Lodeiros *et al.*, 1999), lo cual permite considerarla como una especie con una distribución más amplia en los trópicos. En consecuencia, son de suma importancia los estudios sobre la respuesta fisiológica de esta especie a la contaminación presente en el ecosistema marino, como parte de los esfuerzos hacia la protección de la fauna acuática.

Se han empleado diversos índices fisiológicos para evaluar el estrés producido por contaminantes en los organismos acuáticos. Por ejemplo, Widdows (1985) sugiere evaluar el consumo de oxígeno, la excreción de amonio y medidas de crecimiento y reproducción, como parámetros de respuesta adecuados para analizar el impacto fisiológico de los contaminantes en organismos marinos. Otro índice utilizado ha sido la relación ARN/ADN, la cual permite establecer la condición fisiológica de los organismos en un momento dado (Pease, 1976; Buckley y Lough 1987; Bulow, 1987; Shcherban, 1992; Moss, 1994). Este índice ha sido propuesto recientemente para evaluar los efectos de contaminantes en moluscos bivalvos (Acosta, 2001; Acosta y Lodeiros, 2001); sin embargo, tiene la desventaja de que puede ser modificado por eventos biológicos, distintos al crecimiento somático, que demanden energía como es el caso de la reproducción (Lodeiros *et al.*, 1996).

Entre los contaminantes presentes en el medio ambiente marino, los metales pesados se caracterizan por ser altamente

Introduction

The selection of specific species as sentinel organisms to monitor and predict environmental pollution is essential for preventive management programs and studies of diverse ecosystems. Bivalves have been widely used to assess the environmental quality of aquatic ecosystems because they are able to bioaccumulate pollutants in their tissues, and their filtering and sessile nature allows them to be used as indicators of events that occur in the area they inhabit. A good example of these organisms are the oysters *Crassostrea virginica* and *C. gigas* (Scanes, 1996), and the mussels of temperate waters *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* and of tropical waters *Perna viridis* (Beaumont *et al.*, 1987; Pavicic *et al.*, 1994; Hoare *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 2002). The distribution of the natural banks of these species, however, is limited to defined zoogeographical areas and the selection of more universal species is necessary. In this sense, the green mussel *P. viridis*, an aquaculturally important species (Gallardo *et al.*, 1992; Tejera *et al.*, 2000; Manoj and Appukuttan, 2003) and widely used as a bioindicator of pollution in tropical zones of the Indo-Pacific Ocean (Lowe, 1995; Chidambaran, 1996; Krishnakumar *et al.*, 1996), has recently dispersed throughout the tropical Atlantic (Agard *et al.*, 1992; Lodeiros *et al.*, 1999) and could be considered a species with a wider distribution in the tropics. Consequently, studies on the physiological aspects of this species to determine contamination in the marine ecosystem are important as part of the efforts undertaken to protect aquatic fauna.

Different physiological indices have been used to determine the stress produced by pollutants in aquatic organisms; for example, Widdows (1985) suggests assessing oxygen consumption, ammonia excretion and reproduction and growth measurements as suitable responses to analyze the physiological impact of contaminants on marine organisms. Another index used to establish the physiological condition of organisms at a given moment is the RNA/DNA ratio (Pease, 1976; Buckley and Lough 1987; Bulow, 1987; Shcherban, 1992; Moss, 1994). This index has recently been proposed to evaluate the effects of pollutants on bivalve molluscs (Acosta, 2001; Acosta and Lodeiros, 2001); however, one disadvantage is that it can be modified by energy-requiring biological events other than somatic growth, such as reproduction (Lodeiros *et al.*, 1996).

Among the contaminants that occur in the marine environment, heavy metals are characterized by being very persistent and pose a threat to organisms because they are toxic in small concentrations (Adriano, 1986; Sadiq, 1992). Cadmium is a non-essential element for the normal functioning of organisms and anthropogenic sources are mainly responsible for its presence in the marine environment. In the present work we

persistentes, y su peligrosidad para los organismos radica en ser tóxicos a pequeñas concentraciones (Adriano, 1986; Sadiq, 1992). Dentro de los metales, el cadmio es un elemento no esencial para el funcionamiento normal de los organismos y su presencia en el medio ambiente marino corresponde en su mayor parte a fuentes antropogénicas. En el presente trabajo se estudió el proceso de incorporación de cadmio en el tejido de *P. viridis*, y se evaluó el proceso de depuración de este metal, comparativamente en el laboratorio y en el mar, a través de índices fisiológicos.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo con ejemplares juveniles de *P. viridis* recolectados de la zona de Guayacán, ubicada en la parte norte de la Península de Araya, Estado Sucre, Venezuela (fig. 1). Los ejemplares fueron mantenidos en el laboratorio ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, salinidad de 36‰ y una saturación de oxígeno $>90\%$) durante siete días, con recambios de agua diarios y alimentación *ad libitum* con la microalga *Dunaliella salina*. Entre estos organismos se seleccionó un grupo de 1200 mejillones de talla homogénea (22.3 ± 2.33 mm de alto de la concha), los cuales se utilizaron para el bioensayo de exposición al metal (incorporación) durante otros siete días. Se colocaron 120 mejillones por acuario de 6 L de capacidad y se establecieron cuatro réplicas, tanto para el grupo control (no expuesto) como para el grupo expuesto al metal. Este último contenía una dosis subletal de $0.04 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ en forma de Cl_2Cd . Antes del ensayo de incorporación se determinó la dosis subletal mediante el análisis de supervivencia del mejillón ante la exposición a diferentes concentraciones de cadmio (0.00, 0.2, 2, 20, 40 y $100 \mu\text{g Cd L}^{-1}$) y por triplicado por un período de 96 h. La concentración subletal fue seleccionada tomando como referencia la concentración por debajo del límite inferior de confiabilidad al 95% del LC_{50} , la cual garantiza la supervivencia de los organismos.

Las condiciones experimentales durante el bioensayo fueron las mismas descritas en el proceso de aclimatación, pero sin recambio de agua y sin alimentación.

Después del bioensayo de incorporación, se llevó a cabo el proceso de depuración, durante 52 días. Para ello, los mejillones de cada una de las réplicas se dividieron en dos grupos de 60 ejemplares cada uno. Uno de los grupos fue trasladado a la localidad de Turpialito, donde fueron mantenidos en cestas plásticas suspendidas de una línea madre (*long-line*) a una profundidad de 4 m. El otro grupo se mantuvo en el laboratorio, bajo las condiciones antes descritas y con recambios de agua y alimentación diaria con la microalga *D. salina* (3000 cél mL^{-1}). Para determinar el estado fisiológico de los organismos, se tomaron cinco ejemplares de cada grupo y réplicas al primer, tercer y séptimo día del bioensayo de incorporación y a los 3, 10 y 52 días de depuración.

En ambos estudios se determinó el consumo de oxígeno y la excreción de amonio de los organismos durante 1 h, en un

studied the incorporation of cadmium in the tissue of *P. viridis* and used physiological indices to evaluate the depuration process of this metal both in the laboratory and in the field.

Materials and methods

Juvenile specimens of *P. viridis* were collected from the area of Guayacán, located in the northern part of the Araya peninsula, in the state of Sucre, Venezuela (fig. 1). The specimens were kept in the laboratory for seven days ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, salinity 36‰ and oxygen saturation $>90\%$), with daily water exchange and fed *ad libitum* with the microalga *Dunaliella salina*. Of these organisms, 1200 mussels of homogeneous size (22.3 ± 2.33 mm shell height) were selected and used in the metal exposure (uptake) bioassay during another seven days. We placed 120 mussels in 6-L tanks and established four replicas for both the cadmium-exposed group and the unexposed control group. The former group was exposed to a sublethal dose of $0.04 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ in the form of Cl_2Cd . Prior to the bioassay, the sublethal dose was determined by analyzing the organisms' survival on exposure to different concentrations of cadmium (0.00, 0.2, 2, 20, 40 and $100 \mu\text{g Cd L}^{-1}$), in triplicate, for a period of 96 h. The sublethal concentration was chosen taking as reference the concentration below the 95% lower confidence limit of LC_{50} , which guarantees the survival of the organisms.

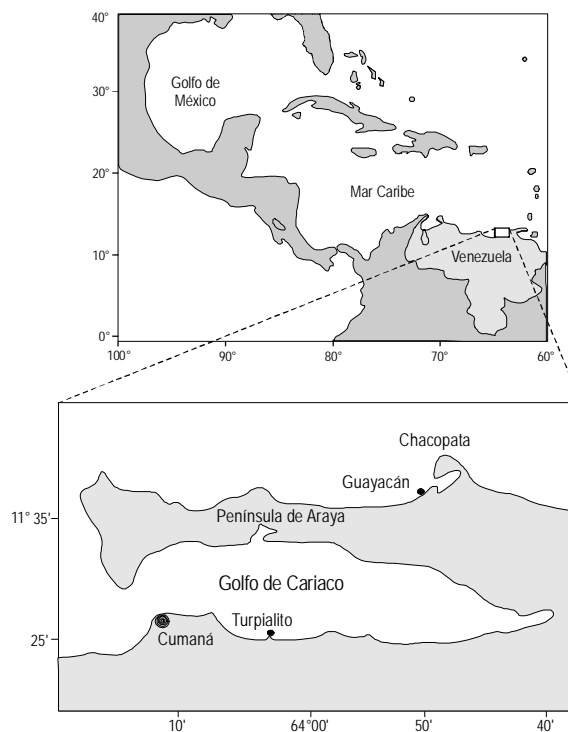


Figura 1. Ubicación geográfica de las áreas de colecta (Guayacán) y de cultivo (Turpialito) del mejillón *Perna viridis*.

Figure 1. Geographic location of the areas from where the mussel *Perna viridis* was collected (Guayacán) and cultured (Turpialito).

respirómetro de 200 mL, con agua previamente aireada por 1 h. La concentración de oxígeno se determinó por el método de Winkler y la concentración de amonio según Solorzano (1969). A cada uno de los cinco individuos utilizados para estos análisis se les determinaron la concentración de proteínas totales, el índice ARN/ADN, las masas secas de la concha y del tejido, el alto de la concha y la concentración del metal en el tejido. Las proteínas totales se determinaron mediante la técnica colorimétrica de Biuret. La concentración de ácidos nucleicos se determinó según la técnica de fluorescencia de Canino y Calderone (1995), la masa seca del tejido blando al igual que la de la concha fue estimada deshidratándolos a 60°C durante 48 h. El incremento en la talla de la concha se determinó usando un vernier digital Mitutoyo de 0.01 mm de precisión. Para la determinación del cadmio se siguió la metodología de Leonard (1971). Para ello las muestras secas fueron digeridas con una mezcla de ácido nítrico (HNO₃) y perclórico (HClO₄) (3:1) en baño María a 60°C por 4 h, filtradas con papel Whatman No. 42 y aforadas hasta 25 mL con agua deionizada. Posteriormente se determinó la concentración del metal por espectrofotometría de absorción atómica, usando un espectrofotómetro con llama de aire-acetileno y corrector de fondo de deuterio (Perkin Elmer; modelo 3110), a una longitud de onda de 229 nm, tomándose el promedio de tres lecturas. Para las curvas de calibración se utilizó un estándar de cadmio de 1000 ppm marca Fixanal y la precisión del método fue verificada utilizando el estándar de referencia de tejido NIST Oyster Tissue 1566a.

Antes del proceso de incorporación se tomó una muestra, la cual fue denominada "grupo inicial" y se le determinaron todos los parámetros antes señalados.

Durante los estudios se estimó la supervivencia mediante la respuesta (actividad valvar) ante un estímulo mecánico con una varilla de vidrio.

En el experimento de campo se registró la temperatura continuamente con un termógrafo electrónico (Saelog, Vemco Ltd., Halifax), y semanalmente se tomaron muestras de agua con una botella Niskin de 2 L, para determinar la biomasa fitoplanctónica estimada por clorofila *a* y el seston (orgánico e inorgánico), según las recomendaciones de Strickland y Parsons (1972), la salinidad con un refractómetro y el oxígeno disuelto (método Winkler) según las especificaciones descritas en Senior (1996).

Los tratamientos se evaluaron mediante la observación correlativa de las curvas obtenidas, contrastando las medias de los parámetros de los índices fisiológicos y de crecimiento a través de un ANOVA de una vía, utilizando la prueba *a posteriori* de Duncan, en los casos donde existieron diferencias significativas ($P < 0.05$). Estos análisis se aplicaron para corroborar las diferencias encontradas en los gráficos, dependiendo del análisis de correlatividad de las curvas, sea en cada punto de muestreo para todos los tratamientos o entre muestreos durante el tiempo de estudio.

The experimental conditions during the bioassay were the same as those described for the acclimation process, but without the water exchange and food.

After the uptake bioassay, the depuration process began and lasted 52 days. For this, mussels from each replica were divided into two groups of 60 specimens each. One of the groups was transported to the locality of Turpialito, where the specimens were placed in plastic baskets and suspended from a long-line at 4 m depth. The other group remained in the laboratory, under the previously described conditions, with daily water exchange and feeding with *D. salina* (3000 cells mL⁻¹). To determine the physiological state of the organisms, five specimens from each group and replica were removed on the first, third and seventh day of the uptake bioassay and after 3, 10 and 52 days of depuration.

In both experiments, oxygen consumption and ammonia excretion were determined for 1 h, in a 200-mL respirometer, with water previously aerated for 1 h. Oxygen concentration was determined by the Winkler method and ammonia concentration according to Solorzano (1969). The following were determined in each of the five individuals used for these analyses: total proteins, RNA/DNA index, shell and tissue dry mass, shell height and tissue metal concentration. Total proteins were determined using the Biuret colorimetric method. The concentration of nucleic acids was determined according to Canino and Calderone's (1995) fluorescence technique. The dry mass of the tissues and shell was estimated by dehydrating at 60°C for 48 h. Shell size increase was determined using a digital Mitutoyo vernier caliper of 0.01 mm precision. Cadmium was determined following Leonard's (1971) method: the dry samples were digested with a mixture (3:1) of nitric acid (HNO₃) and perchloric acid (HClO₄) in a water bath at 60°C for 4 h, filtered through No. 42 Whatman paper and gauged to 25 mL with deionized water. The concentration of cadmium was then determined using atomic absorption spectrophotometry with air-acetylene flame and a deuterium background corrector (Perkin Elmer, model 3110), at a wavelength of 229 nm, taking the mean of three readings. For the calibration curves a Fixanal cadmium standard of 1000 ppm was used and the accuracy of the method was verified using NIST SRM 1566a Oyster Tissue.

Prior to the uptake process, a sample of mussels called "initial group" was taken, for which all the previously indicated parameters were determined.

During the experiments, survival was estimated by the response (valve activity) to a mechanical stimulus with a glass rod.

In the field experiment, continuous temperature recordings were obtained with an electronic thermograph (Saelog, Vemco Ltd., Halifax). Weekly water samples were taken with a 2-L Niskin bottle to determine phytoplankton biomass, estimated as chlorophyll *a*, and seston (organic and inorganic), according to the recommendations of Strickland and Parsons (1972). Salinity was measured with a refractometer and dissolved

Resultados

En el presente estudio no se registraron organismos muertos. Al inicio del experimento los organismos presentaron una concentración de cadmio de $1.91 \pm 0.43 \mu\text{g Cd g}^{-1}$. Durante la fase de exposición al metal se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la concentración, hasta alcanzar un valor medio de $10.84 \pm 1.15 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ a los siete días de exposición. Esta concentración fue unas cinco veces superior a la determinada en los organismos del grupo inicial (fig. 2), y cuyos valores se mantuvieron sin cambios ($P > 0.05$) a lo largo del experimento. En la fase de depuración, la concentración de cadmio disminuyó en los mejillones mantenidos en el laboratorio ($1.86 \pm 0.123 \mu\text{g Cd g}^{-1}$), llegando, al final del experimento, a alcanzar valores similares a los del grupo inicial. Un efecto similar fue observado en los organismos depurados en el medio natural, pero la tasa de depuración fue más rápida, alcanzando concentraciones incluso menores ($0.34 \pm 0.22 \mu\text{g Cd g}^{-1}$) que las del grupo inicial en solamente tres días (día 10).

Los parámetros alto y masa seca de la concha, consumo de oxígeno y excreción de amonio no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos desarrollados en

oxygen (Winkler method) following the specifications of Senior (1996).

The treatments were evaluated by correlative observation of the curves obtained, contrasting the parameter means of the growth and physiological indices through one-way ANOVA and using Duncan's *a posteriori* test when significant differences ($P < 0.05$) were found. These analyses were applied to corroborate differences found in the plots, depending on the correlativity analysis of the curves, either at each sampling point for all the treatments or among treatments during the study period.

Results

There were not dead organisms found in this study. At the beginning of the experiment, the organisms had a cadmium concentration of $1.91 \pm 0.43 \mu\text{g Cd g}^{-1}$. After seven days of exposure to the metal, the concentration had increased significantly ($P < 0.05$) to $10.84 \pm 1.15 \mu\text{g Cd g}^{-1}$. This value was five times higher than that determined in the organisms of the initial group (fig. 2), whose values remained unchanged ($P > 0.05$) throughout the experiment. In the depuration phase, cadmium concentration in the laboratory-maintained mussels decreased ($1.86 \pm 0.123 \mu\text{g Cd g}^{-1}$) and by the end of the experiment the values were similar to those of the initial group. A similar effect was observed in the field-treated organisms, but the rate of depuration was faster, reaching values even lower ($0.34 \pm 0.22 \mu\text{g Cd g}^{-1}$) than those of the initial group in only three days (by day 10).

Shell height and mass, oxygen consumption and ammonia excretion were not significantly different in any of the laboratory treatments. On the other hand, in the field, these parameters were found to increase significantly ($P < 0.05$) until the end of the experiment, the organisms not exposed to cadmium reaching significantly ($P < 0.05$) higher values than those previously exposed to the metal (figs. 3, 4).

On the first day of the metal-exposure phase, there was a ~50% loss in tissue dry weight and a decrease in protein content in both the cadmium-exposed and unexposed organisms, relative to the organisms from the initial group. During the depuration process in the laboratory, in the organisms previously exposed to cadmium there was a decrease in dry tissue mass, particularly in the first 10 days of depuration, but protein content remained stable until the end of the experiment, whereas the organisms not exposed to cadmium maintained their dry mass. During depuration in the field, a progressive increase in dry tissue mass and protein content was observed in both treatments, reaching similar mean values ($P > 0.05$; fig. 3) by the end of the study.

The RNA/DNA index showed significant differences ($P < 0.05$) between the cadmium-exposed and unexposed groups only on the third day of exposure to the metal, the higher value corresponding to the latter group (3.21 ± 0.535). After the uptake process, the mean values of this index for the organisms maintained in the laboratory increased until day 10, after which no significant changes ($P > 0.05$) were observed until the end

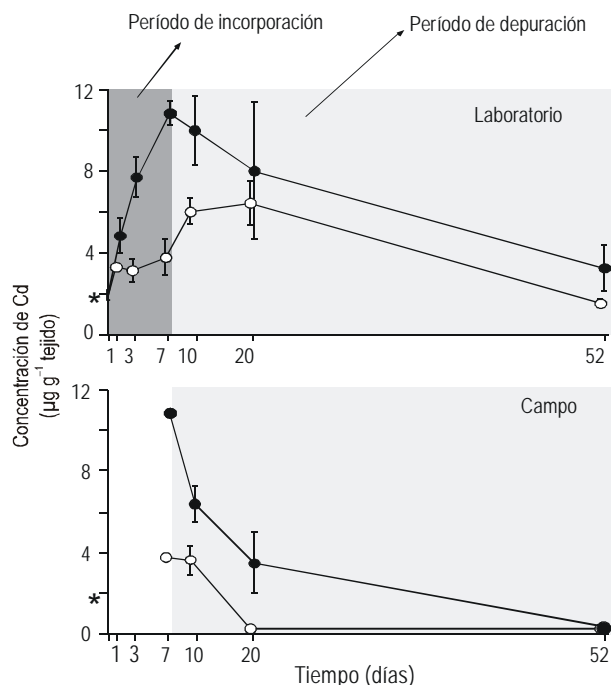


Figura 2. Concentración de cadmio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido seco) en el mejillón *Perna viridis* durante y después de la exposición a este metal. Organismos expuestos (\bullet) y no expuestos (\circ) a elevadas concentraciones de Cd. * Valor inicial de los organismos en su banco natural. Las líneas verticales en cada uno de los muestreos representan el error estándar con respecto a la media.

Figure 2. Cadmium concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry tissue) in the mussel *Perna viridis* during and after exposure to the metal. Organisms exposed (\bullet) and not exposed (\circ) to high Cd concentrations. * Initial value of the organisms in their natural bank. The vertical lines for each sampling represent the standard error relative to the mean.

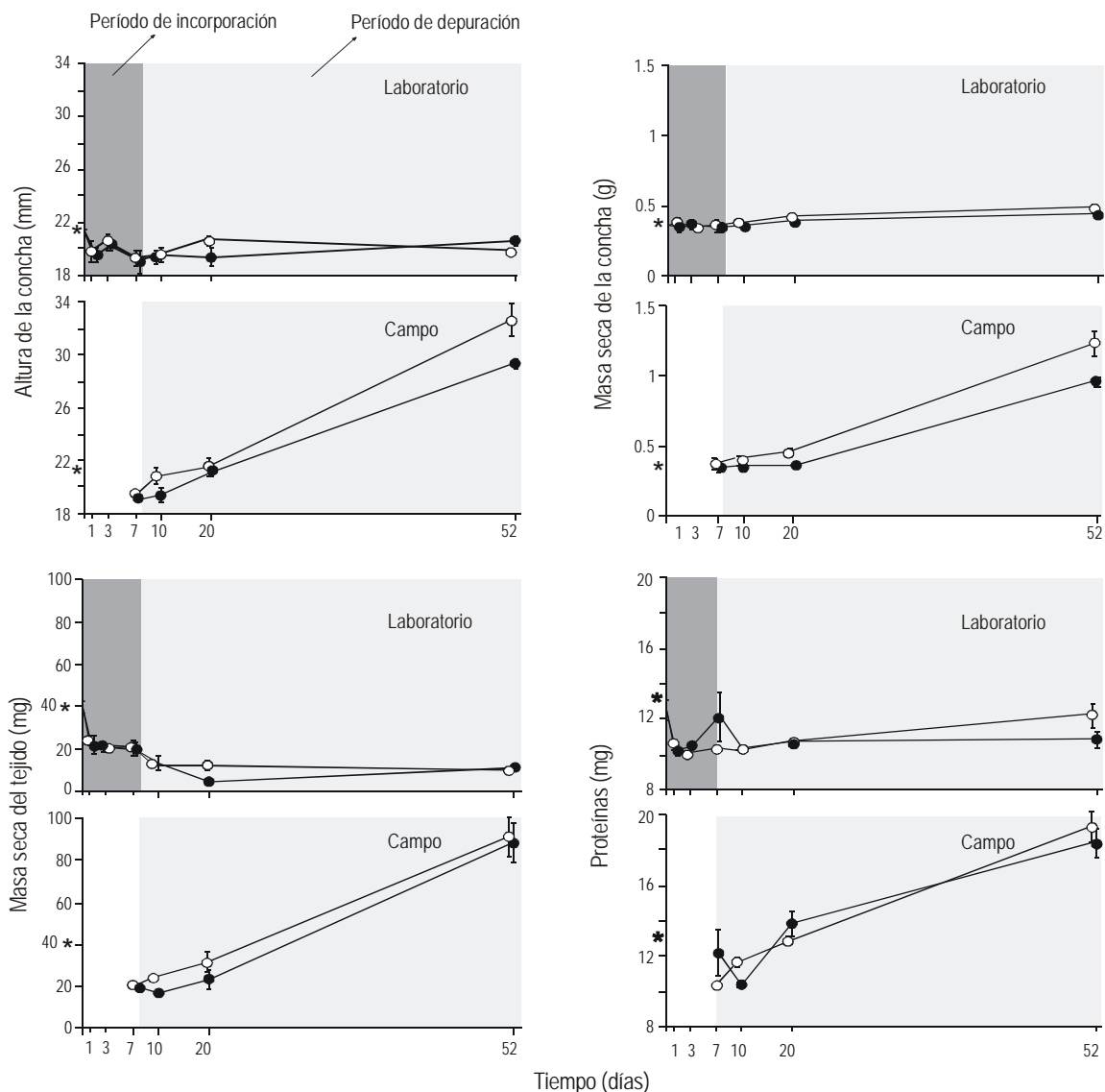


Figura 3. Longitud de la concha (mm), masas secas de la concha (g) y el tejido (mg) y proteínas totales (mg) en el mejillón *Perna viridis* durante y después de la exposición al cadmio. Tratamientos con exposición (●) y sin exposición (○) al Cd. * Valores de los parámetros en los organismos en su banco natural. Las líneas verticales en cada uno de los muestreos representan el error estándar con respecto a la media.
Figure 3. Shell length (mm), dry mass of the shell (g) and of the tissue (mg), and total proteins (mg) in the mussel *Perna viridis* during and after exposure to cadmium. Treatments exposed (●) and not exposed (○) to Cd. * Values of each parameter for the organisms in their natural bank. The vertical lines for each sampling represent the standard error relative to the mean.

el laboratorio; no obstante, los organismos que fueron llevados al medio natural mostraron incrementos significativos ($P < 0.05$) hasta el final del experimento, alcanzando los organismos no expuestos al cadmio valores medios significativamente ($P < 0.05$) superiores a los alcanzados por los organismos previamente expuestos al cadmio (figs. 3, 4).

Al primer día de la fase de exposición al metal se observó una pérdida de aproximadamente 50% de la masa seca del tejido, así como una disminución en el contenido de proteínas, tanto en los organismos no expuestos, como en los expuestos al metal, con respecto a los organismos del grupo inicial. Posteriormente, durante el proceso de depuración, se observó una disminución en la masa seca del tejido de los organismos

of the experiment. In the field-depurated organisms, the index tended to decrease in both treatments after 52 days of depuration (fig. 4). The dispersion indices relative to the mean were notably lower for the field organisms than for those maintained in the laboratory.

The variation of environmental factors during the study period is shown in figure 5. Temperature varied between 23°C and 25°C in July, increasing at the end of the month and reaching high values of 26–27°C in August. High values of more than 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ were recorded for phytoplankton biomass (estimated as chlorophyll *a*) in early July, while lower values, generally $<1 \mu\text{g L}^{-1}$, were obtained in August. High particulate matter content (12–15 mg) was mainly recorded at the end of

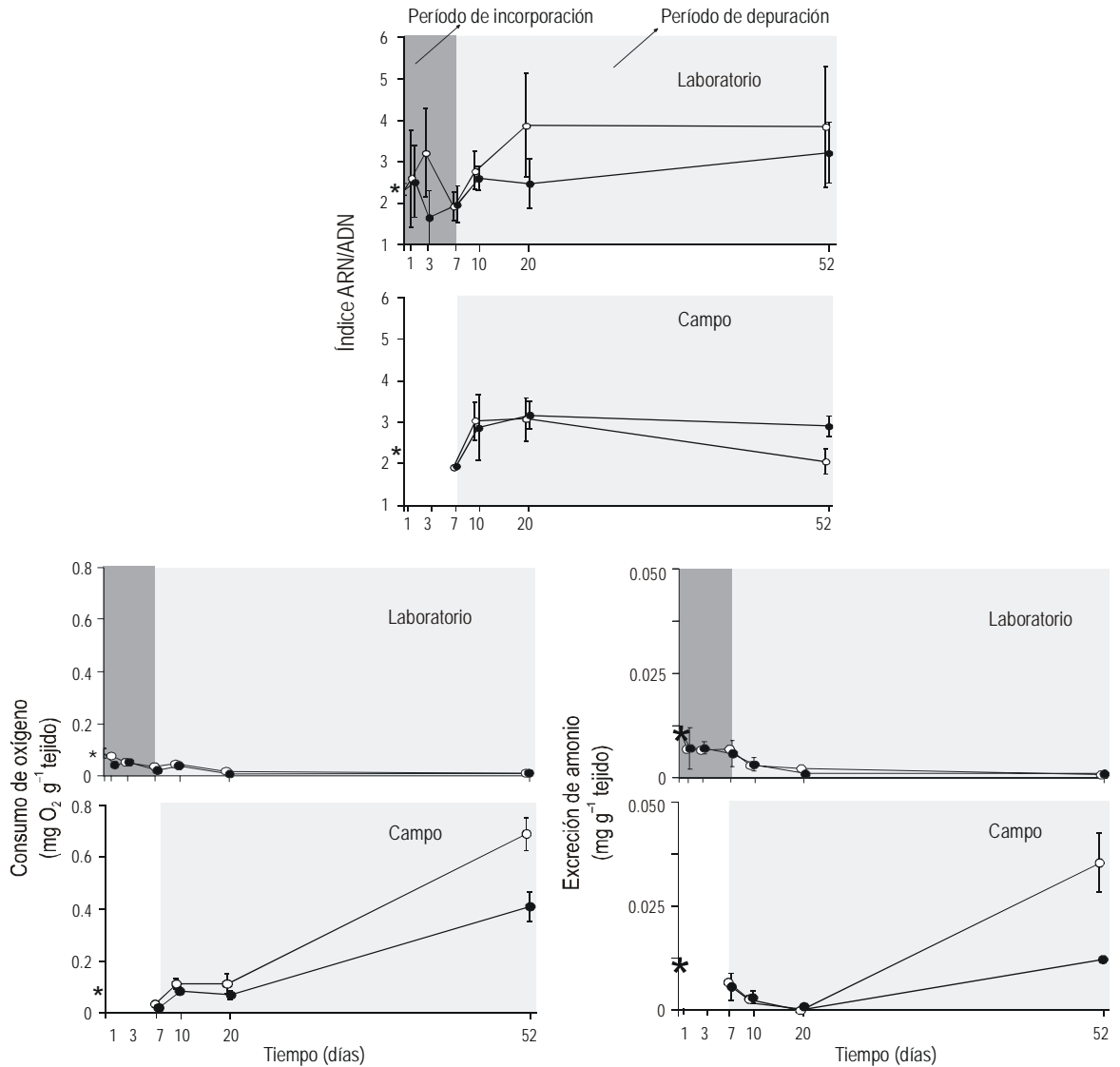


Figura 4. Consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1}$ de tejido), excreción de amonio ($\text{mg NH}_4 \text{ g}^{-1}$ de tejido) e índice de ARN/ADN en el mejillón *Perna viridis* durante y después de la exposición al cadmio. Tratamientos con exposición (\bullet) y sin exposición (\circ) al Cd. * Valores de cada uno de los parámetros en los organismos en su banco natural. Las líneas verticales en cada uno de los muestreos representan el error estándar con respecto a la media.

Figure 4. Oxygen consumption ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1}$ of tissue), ammonia excretion ($\text{mg NH}_4 \text{ g}^{-1}$ of tissue) and RNA/DNA index for the mussel *Perna viridis* during and after exposure to cadmium. Treatments exposed (\bullet) and not exposed (\circ) to Cd. * Values of each parameter for the organisms in their natural bank. The vertical lines for each sampling represent the standard error relative to the mean.

expuestos previamente al cadmio que se mantuvieron en el laboratorio, particularmente durante los primeros 10 días de depuración, mientras que su contenido de proteínas se mantuvo estable hasta el final del experimento. Los organismos no expuestos al cadmio mantuvieron su masa seca durante el periodo de depuración en el laboratorio. En aquellos organismos que fueron trasladados al mar se observó un incremento progresivo de la masa seca del tejido y del contenido de proteínas en ambos tratamientos, alcanzando al final del estudio valores medios iguales ($P > 0.05$; fig. 3).

El índice ARN/ADN mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el grupo no expuesto y el expuesto, solamente

August, with 15–43% of organic seston; values did not vary much in July (6–9 mg), though the organic seston values were higher, from 24% to 42% of total seston. Neither oxygen concentration nor salinity showed relevant variations during the study period, the former generally ranging from 5.5 to 7.0 mg L^{-1} and the latter from 36‰ to 38‰, respectively.

Discussion

A correlation between the metal incorporation process and the time of exposure was determined in this study, with more than four times the initial concentration of cadmium being

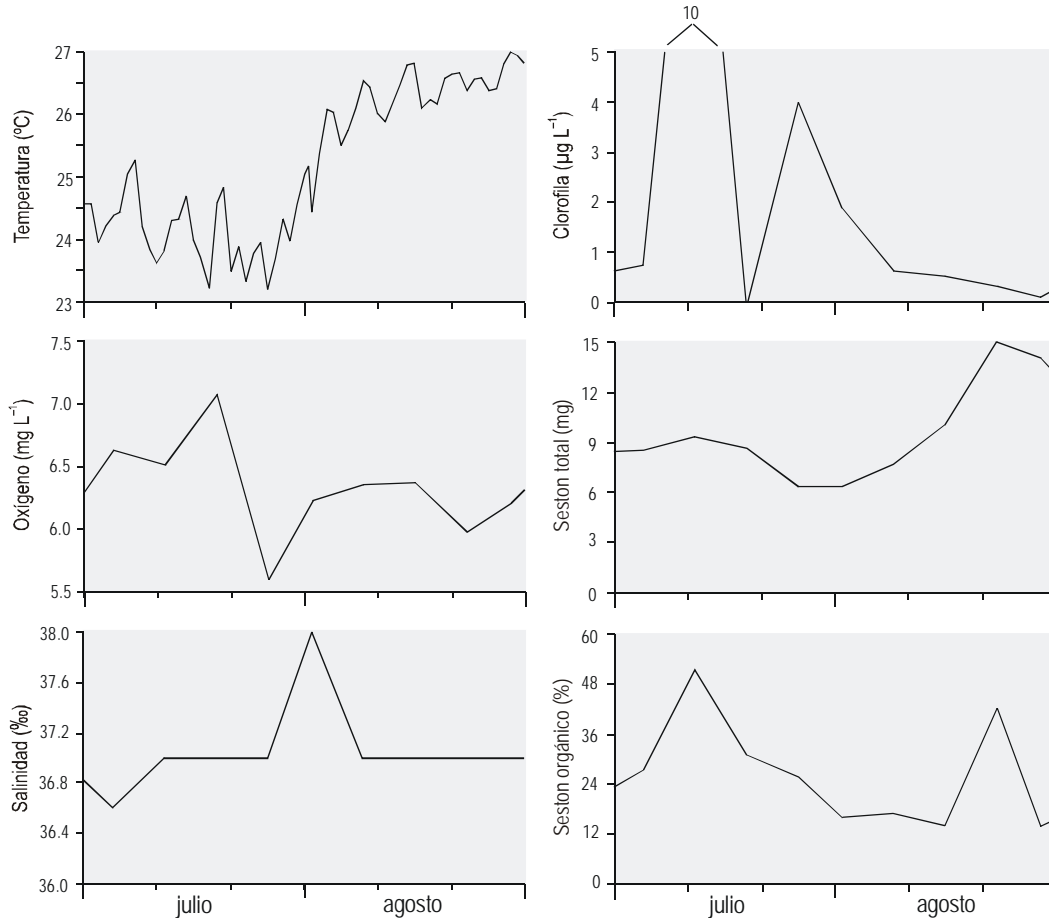


Figura 5. Variaciones de temperatura (°C), concentración de oxígeno (mg L⁻¹), salinidad (‰), y abundancia fitoplanctónica estimada por clorofila *a* (µg L⁻¹) y del seston total (mg) y su fracción orgánica (%), durante el período de depuración en Turpialito, Golfo de Cariaco, Venezuela.

Figure 5. Variation of temperature (°C), oxygen concentration (mg L⁻¹), salinity (‰), phytoplankton abundance estimated as chlorophyll *a* (µg L⁻¹), and total seston (mg) and its organic fraction (%), during the depuration process at Turpialito, Gulf of Cariaco, Venezuela.

al tercer día de exposición al metal, siendo mayor el valor alcanzado por los no expuestos (3.21 ± 0.535). Después del proceso de incorporación, en los organismos que se mantuvieron en el laboratorio se observó un aumento en los valores medios de este índice hasta los 10 días, para luego mantenerse sin cambios significativos ($P > 0.05$) hasta el final del experimento. En los organismos depurados en el campo se observó en este índice una tendencia a disminuir con ambos tratamientos a los 52 días de depuración (fig. 4). En estos organismos los índices de dispersión con respecto a la media fueron notablemente menores que los de los organismos mantenidos en el laboratorio.

En la figura 5 se muestra la variación de los factores ambientales durante el periodo de estudio. La temperatura varió entre 23°C y 25°C en el mes de julio, excepto hacia finales de éste cuando aumenta para alcanzar temperaturas altas (26–27°C) en el mes de agosto. Contrariamente, la biomasa fitoplanctónica, estimada por la clorofila *a*, a principios de julio mostró valores altos, alcanzando niveles superiores a 4 µg L⁻¹, mientras que durante el mes de agosto se mantuvo en

incorporated at the end of the uptake bioassay. Nevertheless, all organisms survived the process, indicating that they were not severely affected by exposure to this metal and reaffirming the sublethal nature of the concentration used. This hypothesis is supported by the lack of significant differences in the physiological indices used (growth, proteins, oxygen consumption, ammonia excretion, RNA/DNA) between the cadmium-exposed and unexposed organisms in this experiment.

Cadmium uptake in *P. viridis* was very fast. On the first day of exposure, the metal had already been incorporated in the tissue in a proportion notably higher than initially recorded, probably due to the filtration capacity of bivalves, particularly mytilids. Phillips and Rainbow (1993) indicate that *Mytilus* species accumulate metals in concentrations considerably higher than those found in the environment.

The depuration process was also characterized by being fast, especially in those organisms transferred to the field, which were able to significantly reduce the concentration of cadmium in the tissue in just three days. The period of time for

valores bajos, generalmente $<1 \mu\text{g L}^{-1}$. Principalmente a finales del mes de agosto se registró un periodo con alto contenido de material particulado (12–15 mg), con un 15–43% de seston orgánico, mientras que durante el mes de julio éste se mantuvo sin grandes cambios, oscilando sus valores entre 6 y 9 mg, aunque con valores más elevados de seston orgánico, generalmente de 24% a 42% del seston total. Ni la concentración de oxígeno ni la salinidad mostraron variaciones relevantes durante toda la experimentación. El oxígeno generalmente se mantuvo entre 5.5 y 7.0 mg L⁻¹ y la salinidad entre 36‰ y 38‰.

Discusión

En el presente trabajo se determinó una correlación en el proceso de incorporación del cadmio con respecto al tiempo de exposición, incorporando hacia el final del periodo de incorporación más de cuatro veces la concentración inicial. No obstante, todos los organismos sobrevivieron a dicho proceso, lo cual indica que la incorporación del metal no llegó a un estado de afección severo, reafirmando el carácter subletal de la concentración utilizada. Esta hipótesis es soportada por la ausencia de diferencias significativas en los índices fisiológicos utilizados (crecimiento, proteínas, consumo de oxígeno, excreción de amonio, ARN/ADN) entre los organismos expuestos al cadmio en el experimento y los no expuestos.

La incorporación del cadmio en *P. viridis* fue muy rápida. Al primer día de exposición ya se había producido la incorporación de metal en el tejido de los organismos, en una proporción notablemente superior a la registrada inicialmente. Esto probablemente se debió a la gran capacidad de filtración que poseen los bivalvos, particularmente los mitílidos. Phillips y Rainbow (1993) indican que especies del género *Mytilus* acumulan metales en concentraciones considerablemente superiores a las encontradas en el ambiente.

Al igual que la incorporación, el proceso depurativo se caracterizó por ser rápido, sobretodo en los organismos que fueron trasladados al campo, los cuales lograron disminuir significativamente la concentración de metal en el tejido en tan sólo tres días. El tiempo de depuración de los metales por los organismos puede ser considerado corto (10 días para el Cu; Viarengo *et al.*, 1985), intermedio (32 días para As; Ünlü y Fowler, 1979) o prolongado (>120 días para el Cd en los mejillones *M. edulis* y *M. galloprovincialis*; Borchardt, 1983; Viarengo *et al.*, 1985). En la presente investigación, la concentración de cadmio en el tejido de *P. viridis* disminuyó, en un tiempo menor a 52 días, a niveles inferiores a los que traían del medio donde fueron recolectados. Las diferencias encontradas entre los estudios podrían deberse a la concentración utilizada y al tiempo de exposición, así como a la diferenciación en cuanto a la especie y a una mayor capacidad de depuración en el medio natural que en el laboratorio.

En la fase de depuración, a pesar de que los organismos en condiciones de laboratorio fueron alimentados diariamente, no

the depuration of metals can be considered short (10 days for Cu; Viarengo *et al.*, 1985), intermediate (32 days for As; Ünlü and Fowler, 1979) or prolonged (>120 days for Cd in the mussels *M. edulis* and *M. galloprovincialis*; Borchardt, 1983; Viarengo *et al.*, 1985). In this study, cadmium concentration in the tissue of *P. viridis* specimens decreased in less than 52 days to levels below those they originally had from the environment where they were collected. The differences found among studies could be due to the concentration and exposure time used, as well as differences regarding the species and greater depuration capacity in the natural environment than in the laboratory.

In the depuration phase, even though the organisms kept under laboratory conditions were fed daily, no growth was recorded. They sustained similar tissue mass and respiration (oxygen consumption) and excretion (ammonia production) rates, indicating that energy obtained from the food was enough to maintain the basic metabolism but with limited anabolic capability. In contrast, the mussels in the natural environment presented growth and an increase in the physiological indices studied, as a result of surplus energy for the organism's growth.

During the metal exposure and depuration processes, no significant differences were found for the RNA/DNA index between the mussel juveniles maintained in the laboratory or with each one of the treatments, showing high variability as a result of the high dispersion indices. On the other hand, the mean values of this index for the field organisms in each treatment showed dispersion values of a lower magnitude and even the organisms previously exposed to cadmium showed higher RNA/DNA indices at the end of the experiment, indicating greater metabolic activity for growth, contrary to the growth shown by both the tissue and shell of the bivalve. Compared with the rest of the physiological indices, these results show that the RNA/DNA index is not suitable for use in the analysis of physiological processes in evaluations involving different physiological states of the organisms and exogenous effects, both environmental and generated by pollutants. In a similar energy availability and channeling scenario, Lodeiros *et al.* (1996) and Villegas (2000) suggest caution in the use of the RNA/DNA index when physiological processes, such as reproduction, are involved that may affect the channeling of energy to somatic growth when not enough food is available to generate the necessary energy for both physiological processes (somatic growth and reproduction).

There were no significant variations in oxygen concentration and salinity throughout the experiment (5.5–7.0 mg L⁻¹ and 36–38‰, respectively), and the significant influence of these factors was discarded because of the low annual variability in the study area (Lodeiros and Himmelman, 1994, 2000). Likewise, there was no positive correlation between phytoplankton abundance and growth of the species; however, the highest total seston concentrations and temperatures were recorded in August, coinciding with the highest growth rates of the field-treated organisms. This could signal these factors as

se observó crecimiento alguno, manteniéndose tanto la masa de los tejidos como las capacidades de respiración (consumo de oxígeno) y de excreción (producción de amonio) en valores similares. Esto sugiere que la energía suministrada a través del alimento fue suficiente para soportar el metabolismo básico, aunque con una capacidad anabólica limitada. En contraste, los mejillones mantenidos en el medio natural mostraron crecimiento y aumento en los índices fisiológicos estudiados, como resultado del excedente energético para el crecimiento del organismo.

Durante los procesos de exposición y depuración del metal, en general, no se observaron diferencias significativas en el índice ARN/ADN entre los juveniles del mejillón mantenidos en el laboratorio ni con cada uno de los tratamientos, mostrando una gran variabilidad revelada por sus altos índices de dispersión. Sin embargo, en los organismos que fueron llevados al campo, los valores medios de este índice, para cada uno de los tratamientos, mostraron valores de dispersión de menor magnitud. Inclusive los organismos previamente expuestos al cadmio, al final del experimento, mostraron índices de ARN/ADN mayores, lo que sugiere una mayor actividad metabólica para el crecimiento, contraria al crecimiento observado tanto por en el tejido como en la concha del bivalvo. Estos resultados, comparados con el resto de los índices fisiológicos estudiados, muestran que el índice ARN/ADN no es adecuado para el análisis de procesos fisiológicos en evaluaciones que involucren diversos estados fisiológicos de los organismos con efectos exógenos tanto ambientales como generados por contaminantes. En un escenario de disponibilidad y canalización energética similar, Lodeiros *et al.* (1996) y Villegas (2000) sugieren precaución en la utilización del índice de ARN/ADN cuando se involucran procesos fisiológicos como la reproducción, que pudieran disminuir la canalización de energía al crecimiento somático, sobretodo cuando la disponibilidad de alimento no es suficiente para generar la energía necesaria para los dos procesos fisiológicos (crecimiento somático y reproductivo).

Ni la concentración de oxígeno ni la salinidad mostraron variaciones relevantes durante todo la experimentación (entre 5.5 y 7.0 mg L⁻¹ y 36‰ y 38‰, respectivamente), descartándose una influencia significativa de estos factores debido a su reducida variabilidad anual en la zona de estudio (Lodeiros y Himmelman, 1994, 2000). Tampoco se observó una correlación positiva entre la abundancia fitoplanctónica y el crecimiento de la especie. Sin embargo, para el periodo de agosto se registraron las mayores concentraciones del seston total y las temperaturas más elevadas, coincidiendo con las mayores tasas de crecimiento en los organismos que fueron llevados al ambiente natural, lo que podría indicar que estos factores son posibles moduladores del crecimiento de *P. viridis* en condiciones de cultivo en el Golfo de Cariaco.

Es importante señalar que al final del experimento no se observaron diferencias significativas en el valor medio alcanzado por la masa seca del tejido entre tratamientos; sin embargo, la concha presentó tanto longitudes como masas

posible moduladores del crecimiento de *P. viridis* under culture conditions in the Gulf of Cariaco.

It is important to note that at the end of the experiment no significant differences were observed in the mean value for the dry tissue mass among the treatments; however, the shell of the organisms exposed to cadmium was significantly smaller in length and mass than that of the unexposed organisms. This could suggest that the shell but not the tissue may have been affected. Villegas (2000) reported reduced shell regeneration for *Pinctada imbricata* specimens previously exposed to a sublethal dose of cadmium relative to a control group. The metal probably induces antitoxic, protection mechanisms that reduce the speed of shell deposition. The organisms thus distribute the accumulated energy so that the basic physiological processes are guaranteed.

In general, an organism responds to stress by using the energy reserves. This can be measured in terms of carbohydrate, lipid and protein use, but it is necessary to employ more sensitive indices (Widdows, 1985). Oxygen consumption and ammonia excretion are indices that can be used to measure the physiological condition of individuals, as indicated in studies on different species (Sivaramakrishna *et al.*, 1991; Sobral and Widdows, 1997). In this study, neither oxygen consumption nor the rate of ammonia excretion showed significant differences; however, at the end of the experiment the organisms treated in the field presented a significant increase in oxygen consumption and ammonia excretion rate, both expressed as proportional values (milligrams of oxygen or ammonia relative to dry tissue mass), with higher values for the unexposed organisms than for those exposed to cadmium. This suggests that during the exposure to cadmium a chronic effect occurred that was detected by the respiratory and excretion rates. The presence of the metal could have affected the mitochondrial metabolic capacity, joining specific enzymes, and this probably led to a reduction in the energy conversion efficiency, uncoupling the oxidative phosphorylation and causing oxidative stress (Di Giulio *et al.*, 1995). Once the concentration of cadmium had decreased in the organisms, the mitochondrial activity was reestablished, producing an increase in the oxygen consumption rate at the end of the experiment. Consequently, an increase in oxygen consumption (greater metabolism) would generate the increased ammonia excretion observed. Further studies on enzymatic activity, with particular reference to the mitochondrial level, analyzing catabolic processes relative to ammonia excretion, are recommended to verify the hypothesis proposed.

Of all the physiological indices considered in this study, only the RNA/DNA ratio proved unsuitable to evaluate the toxic effect of cadmium on *P. viridis*. Total proteins, tissue dry mass, shell height and, in particular, oxygen consumption and ammonia excretion were found suitable to evaluate the physiological condition of *P. viridis* exposed to sublethal concentrations of xenobiotics.

significativamente menores en los organismos expuestos al cadmio que las alcanzadas por los organismos no expuestos al metal. Esto podría sugerir que el efecto pudo haberse dado a nivel de la concha y no en el tejido. Villegas (2000) reportó una menor regeneración de la concha en ejemplares de *Pinctada imbricata* expuestos previamente a una dosis subletal de cadmio con respecto al grupo control. Probablemente, el metal induce procesos de protección, antitóxicos, lo cual deriva en la reducción de la velocidad de regeneración de la concha. En este sentido, los organismos distribuyen la energía acumulada de tal manera que se garanticen los procesos fisiológicos básicos.

En general, la respuesta de un organismo ante el estrés es la utilización de sus reservas energéticas, la cual puede ser medida en términos de utilización de carbohidratos, lípidos y proteínas; sin embargo, es necesario emplear para ello índices más sensibles (Widdows, 1985). El consumo de oxígeno y la excreción de amonio son índices que permiten medir la condición fisiológica de los individuos, tal y como lo señalan estudios realizados en diferentes especies y condiciones (Sivaramakrishna *et al.*, 1991; Sobral y Widdows, 1997). En el presente estudio, tanto el consumo de oxígeno como la tasa de excreción de amonio en condiciones de laboratorio no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, los organismos que fueron llevados al medio natural mostraron, al final del ensayo, un aumento significativo en el consumo de oxígeno y en la tasa de excreción de amonio, ambos expresados como valores proporcionales (miligramos de oxígeno o amonio en relación con la masa seca del tejido), manteniéndose los valores medidos en los organismos no contaminados por encima de los de los organismos expuestos al metal. Esto sugiere que durante la exposición al cadmio se generó un efecto crónico que fue detectado a través de la tasa respiratoria y de la excreción. La presencia del metal, en principio, pudo haber afectado la capacidad metabólica mitocondrial, uniéndose a enzimas específicas. De esta manera se generó una probable reducción en la eficiencia de conversión de energía, desacoplando la fosforilación oxidativa, causando estrés oxidativo (Di Giulio *et al.*, 1995). Una vez que los organismos habían disminuido la concentración del metal, la actividad mitocondrial pudo reestablecerse, produciéndose un aumento en la tasa de consumo de oxígeno al final del experimento. En consecuencia, del aumento del consumo de oxígeno (mayor metabolismo) se generaría el aumento de la excreción de amonio observado. En este sentido, para verificar esta hipótesis se sugiere un estudio de la actividad enzimática con especial énfasis a nivel mitocondrial, analizando particularmente procesos catabólicos relativos a la excreción de amonio.

De todos los índices fisiológicos considerados en este estudio, la relación ARN/ADN fue la que no demostró ser un índice adecuado para evaluar el efecto tóxico de metales del cadmio en *P. viridis* en un análisis de efectos subletales causados por la exposición a xenobióticos. Sin embargo, la determinación de proteínas totales, masa seca de los tejidos, alto de la concha y particularmente el consumo de oxígeno y

Acknowledgements

This research was supported by the National Fund for Science, Technology and Innovation (FONACIT) of Venezuela, the Research Council of Universidad de Oriente and CIBNOR of Mexico. We thank the collaboration of the Department of Oceanography and Marine Biology of the Venezuelan Oceanographic Institute for the assistance in the determination of the analysis, as well as to C. Graziani for his logistic support for the development of this research.

English translation by Christine Harris.

excreción de amonio, mostraron ser índices apropiados apropiados para evaluar la condición fisiológica de *P. viridis* expuesto a concentraciones subletales de xenobióticos.

Agradecimientos

La investigación fue financieramente soportada por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) de Venezuela, el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente y el CIBNOR, de México. Se agradece la colaboración del Departamento de Oceanografía y de Biología Marina del Instituto Oceanográfico de Venezuela por la asistencia en la determinación de los análisis, de igual manera a C. Graziani por el apoyo logístico para el desarrollo de la investigación.

Referencias

- Acosta, V. (2001). Estado fisiológico de poblaciones del guacuco *Tivela mactroides* Born, 1778 (Bivalvia: Veneridae) en dos ambientes con diferente grado de contaminación. Tesis de maestría, Postgrado en Ciencias Marinas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 54 pp.
- Acosta, V. y Lodeiros, C. (2001). Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles del mejillón verde *Perna viridis* mediante la concentración de ADN, y relación ARN/ADN en el músculo abductor. *Rev. Científica-LUZ*, 11(6): 485–490.
- Adriano, D. (1986). *Trace Elements in the Terrestrial Environment*. Springer Verlag, New York, 533 pp.
- Agard, J., Kishore, R. and Bayne, B. (1992). *Perna viridis* (Linnaeus 1758) first record of the Indo-Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. *Caribb. Mar. Stud.*, 3: 59–60.
- Beaumont, A., Tserpes, G. and Budd, M. (1987). Some effects of copper on the veliger larvae of the mussel *Mytilus edulis* and the scallops *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia). *Mar. Environ. Res.*, 21(4): 299–309.
- Borchardt, T. (1983). Influence of food quality on the kinetics of cadmium uptake and loss via food and seawater in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 76: 67–76.
- Buckley, L. and Lough, R. (1987). Recent growth, biochemical composition, and prey field of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) on Georges Bank. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44: 14–25.
- Bulow, E. (1987). RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. In: R.C. Summerfelt and G.E. Hall. P. (eds.), *The Age and*

- Growth of Fish. Iowa State Univ., Chapman and Hall, London, pp. 45–71.
- Canino, M. and Calderone, E. (1995). Modifications and comparison of two fluometric techniques for determining nucleic on contents of fish larvae. *Fish. Bull.*, 93: 15–165.
- Chidambaran, N. (1996). The green mussel *Perna viridis* as indicator of cadmium pollution. *J. Environ. Biol.*, 17(1): 5–10.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sander, B.M. and Vamled, P.A. (1995). Biochemical, mechanism. In: G.M. Rand (ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. 2nd ed. Taylor and Francis, Washington DC. pp. 523–561.
- Gallardo, W., Samonte, G. and Ortega, R. (1992). Raft culture of green mussel *Perna viridis* in Sapin Bay, Phillipines. *J. Shellfish Res.*, 11: 195–196.
- Hoare, K., Davenport, J. and Beaumont, A. (1995). Effects of exposure and previous exposure to copper on growth of veliger larvae and survivorship of *Mytilus edulis* juveniles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 120: 1–3.
- Krishnakumar, P., Asokan, P. and Pillai, V. (1996). Physiological and cellular responses to copper and mercury in the green mussel *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.*, 18(3): 163–173.
- Leonard, N. (1971). The determination of copper in fish tissues by atomic absorption spectrophotometry. In: S. Slavin (ed.), *Atomic Absorption Newsletter*. Perkin-Elmer Corp., USA, pp. 84–85.
- Lodeiros, C. and Himmelman, J.H. (1994). Relations among environmental conditions and growth in the tropical scallop *Euvola (Pecten) ziczac* (L.) in suspended culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela. *Aquaculture*, 119: 345–358.
- Lodeiros, C. and Himmelman, J.H. (2000). Identification of environmental factors affecting growth and survival of the tropical scallop *Euvola (Pecten) ziczac* in suspended culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela. *Aquaculture*, 182: 91–114.
- Lodeiros, C., Fernández, R.I., Bonmatí, A., Himmelman, J.H. and Chung, S.K. (1996). Relation of RNA/DNA ratios to growth for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* in suspended culture. *Mar. Biol.*, 126: 245–251.
- Lodeiros, C., Marín, N. y Prieto, A. (1999). Catálogo de Moluscos de las Costas Nororientales de Venezuela. Clase Bivalvia. Ed. APUDONS, Cumaná, Venezuela, 103 pp.
- Lowe, D. (1995). Lysosomal membrane impairment in blood cells of *Perna viridis*: An *in vitro* marker of contaminant induced damage. *Res. Bull. Phuket Mar. Biol. Cent.*, 60: 79–82.
- Manoj, R. and Appukuttan, K. (2003). Effect of temperature on the development, growth, survival and settlement of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). *Aquacult. Res.*, 34: 1037–1045.
- Moss, S. (1994). Use of nucleic acids as indicators of growth in juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.*, 120: 359–367.
- Pavicic, J., Smodis, B., Skreblin, M., Krear, L. and Stegnar, P. (1994). Embryo-larval tolerance stages of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. 2. Stage-specific in fluctuations in sensitivity toward Zn and Cd and their bioaccumulation into veliger larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109(1): 37–46.
- Pease, A. (1976). Studies of relationship of RNA/DNA ratios and protein synthesis to growth in the oyster *Crassostrea virginica*. Fisheries and Marine Service. Tech. Rep. No. 622, 78 pp.
- Phillips, D. and Rainbow, P. (1993). Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. Elsevier Applied Science, London. pp. 89.
- Rojas-Astudillo, L., Chang, I., Agarrad, J., Bekele, I. and Hubbard, R. (2002). Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oyster (*Crassostrea* sp.) from Trinidad and Venezuela. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 410–415.
- Sadiq, M. (1992). Toxic Metal Chemistry in Marine Environments. Marcel Dekker, New York, 390 pp.
- Scanes, P. (1996). Oyster Watch: Monitoring trace metal and organochlorine concentrations in Sydney's coastal water. *Mar. Pollut. Bull.*, 33(7–12): 226–238.
- Senior, W. (1996). Guía práctica de análisis químico de aguas naturales y de mar. Manual elaborado para el curso de Crucero Oceanográfico, de la Maestría en Ciencias Marinas. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente. Cumaná, 36 pp.
- Scherban, S. (1992). Relationship between the RNA/DNA ratio, relative protein content, and weight of mussels in experiment. *J. Hydrobiol.*, 28: 69–74.
- Sivaramakrishna, B., Radhakrishnaiah, K. and Sureh, A. (1991). Assessment of mercury by the changes in oxygen consumption and ion level in the freshwater snail, *Pila globosa*, and the mussel *Lamellidens marginalis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 913–920.
- Sobral, P. and Widdows, J. (1997). Effects of copper exposure on the scope of growth of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Mar. Pollut. Bull.*, 34(12): 992–1000.
- Solorzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 14: 799–801.
- Strickland, J. and Parsons T. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd ed. Bull. Fish. Res. Board Canada, Ottawa, 310 pp.
- Tejera, E., Oñate, I., Núñez, M. y Lodeiros C. (2000). Crecimiento inicial del mejillón marrón *Perna perna* y verde *Perna viridis* bajo condiciones de cultivo suspendido en el Golfo de Cariaco, Venezuela. *Bol. Cent. Invest. Biol.*, 34(2): 81–304.
- Ünlü, M.Y. and Fowler, S.W. (1979). Factors affecting flux of arsenic through the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.*, 51: 209–219.
- Viarengo, A., Palmero, S., Zanichchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R. and Orunesu, M. (1985). Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Mar. Environ. Res.*, 16: 23–36.
- Villegas, L. (2000). Efecto tóxico del cadmio en la ostra perla *Pinctada imbricata* Röding, 1798 (Mollusca: Bivalvia). Tesis de maestría, Postgrado en Ciencias Marinas. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 50 pp.
- Widdows, J. (1985). Physiological responses to pollution. *Mar. Pollut. Bull.*, 16(4): 129–134.