

BIOCUMULACIÓN Y EFECTO DEL CADMIO EN JUVENILES DEL MEJILLÓN VERDE *Perna viridis* (L. 1758) (MYTILOIDA: MYTILIDAE)

BIOCUMULACIÓN AND EFFECT OF CADMIUM IN JUVENILES THE GREEN MUSSEL *Perna viridis* (L. 1758) (MYTILOIDA: MYTILIDAE)

VANESSA ACOSTA ¹, CÉSAR LODEIROS ², OSMAR NUSETTI ¹, MAIRÍN LEMUS ¹

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, ¹Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, ²Instituto Oceanográfico de Venezuela, Departamento de Biología Pesquera, Cumaná Venezuela.
E-mail: vanessaacosta@yahoo.com

RESUMEN

Se evaluó la capacidad de bioacumulación de cadmio en juveniles del mejillón verde *Perna viridis* con longitud antero-posterior promedio ($12,67 \pm 3,02$ mm) expuestos durante un periodo de 8 días a dos concentraciones subletales de cloruro de cadmio (50 y 80 $\mu\text{gCd/L}$) y su inmediato efecto sobre el índice ARN/ADN. Los niveles de cadmio se cuantificaron en la totalidad de los tejidos y en la concha, usando un espectrofotómetro de absorción atómica con llama de aire-acetileno. El índice de ARN/ADN fue cuantificado en el músculo abductor. A los dos días del experimento, los mejillones presentaron el mayor nivel de acumulación de Cd en los tejidos, proporcional a las concentraciones experimentales, para luego mantener los niveles en los tejidos sin cambios durante el experimento. Los organismos en el tratamiento control mantuvieron una cantidad de cadmio constante durante todo el estudio. La acumulación en la concha fue continua e igualmente proporcional a la concentración de los tratamientos. El índice ARN/ADN presentó descenso en ambos tratamientos, mientras que los organismos del grupo control mostraron los mayores niveles y sin cambios significativos a lo largo del experimento. Los resultados mostraron una inmediata incorporación del Cd en los organismos durante las primeras 48 h, con posterior regulación del metal, lo cual generó posiblemente un gasto metabólico asociado al proceso de contrarrestar el efecto tóxico, conllevando a una disminución del índice ARN/ADN. *Perna viridis* es una especie capaz de regular niveles tolerables de cadmio, respondiendo con mecanismos eficaces de regulación que le permiten aclimatarse a zonas contaminadas. La acumulación continua de Cd en la concha, sugiere a este compartimiento como indicador de contaminación por este metal en sistemas acuáticos.

PALABRAS CLAVE: Metales pesados, acumulación, relación, ARN/ADN.

ABSTRACT

We evaluated the potential for bioaccumulation of Cadmium in juveniles of the green-lipped mussel *Perna viridis* (with average antero-posterior length 12.67 ± 3.02 mm) exposed to two sublethal concentrations of cadmium chloride (50 and 80 $\mu\text{gCd/L}$) and the immediate effect on the RNA/DNA ratio during an exposure period of 8 days. Cadmium levels were quantified in all tissues and the shell, using an atomic absorption spectrophotometer with air-acetylene flame. The ratio RNA/DNA was quantified in the abductor muscle. After two days of the experiment, the mussels showed the highest accumulation of Cd in tissues, which was proportional to the experimental concentrations, and then the levels in tissues remained unchanged during the rest of the experiment. Organisms in the control treatment maintained a constant amount of cadmium throughout the study. The accumulation in the shell was continuous and proportional to the concentration of the treatments. The ratio RNA/DNA showed a decline in both treatments, while organisms in the control group showed the highest levels and without significant changes throughout the experiment. Results showed an immediate incorporation of Cd in organisms, during the first 48 hours of exposure, with subsequent regulation of the metal, generating possibly a metabolic cost to counteract the toxic effect, leading to a decrease in RNA/ DNA ratio. *Perna viridis* is a species capable of regulating tolerable levels of cadmium, responding with effective regulatory mechanisms that allow it to acclimate to contaminated areas. The continuous accumulation of Cd in the shell suggests that this compartment can be used as an indicator of pollution for this metal in aquatic systems.

KEY WORDS: Heavy metals, mussels, accumulation, RNA/DNA.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los metales pesados constituyen un serio problema a nivel mundial ya que pueden ser bioacumulados por diferentes organismos acuáticos, lo que les permite ingresar a cualquier nivel de la cadena trófica; en consecuencia, su estudio y evaluación es

de importancia en la preservación de los ecosistemas acuáticos (Bustamante *et al.* 2000). Un grupo de organismos que ampliamente han sido utilizados para estimar el grado y efecto de los metales pesados en los ecosistemas marinos, son los moluscos bivalvos debido a la capacidad que tienen de tolerar, acumular y depurar altas concentraciones de contaminantes (Pan y Wang

2008, Voets *et al.* 2009). Un buen ejemplo lo representan los mejillones de aguas templadas *Mytilus edulis*, subtropicales *Mytilus galloprovincialis* y tropicales *Perna viridis* (Gutiérrez-Galindo y Muñoz-Barbosa 2003, Yap *et al.* 2006, Rojas *et al.* 2009).

De los metales pesados, el cadmio constituye uno de los elementos más biotóxicos para la vida acuática, debido a que no es esencial para el funcionamiento normal de los organismos. Se ha demostrado que su presencia en los bivalvos produce alteraciones fisiológicas y metabólicas, afectando procesos de transcripción y síntesis del ARN, transporte a través de la membrana plasmática, funciones mitocondriales, así como la estabilidad lisosómica (Vargas y Barracco 2001, Cheung *et al.* 2001, Zapata *et al.* 2012)

Una manera de conocer y evaluar la influencia de agentes contaminantes en bivalvos que conlleven a la evaluación de procesos fisiológicos relativos a la síntesis de proteínas, mediante pruebas de laboratorio, es la relación del ARN con respecto al ADN, ya que es utilizada como respuesta inmediata del crecimiento en un momento determinado (Acosta y Lodeiros 2001, Wang 2002, Anton *et al.* 2008). La relación ARN/ADN ha tenido aplicación en estudios sobre la biología del crecimiento de los organismos acuáticos bajo condiciones controladas o en ambientes naturales (Belmar *et al.* 2008) y más recientemente ha sido empleada como herramienta para determinar en organismos el grado de perturbación causado por la presencia de xenobióticos en el ambiente. Por lo que es empleada para evaluar áreas afectadas por la presencia de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos (Wo *et al.* 1999, Wang 2002, Tsangaris *et al.* 2010).

Perna viridis es un organismo que presenta relevancia muy significativa, tanto como recurso pesquero como por acuicultura (Manoj y Appukuttan 2003, Lodeiros *et al.* 1999, Acosta *et al.* 2009), ha sido utilizado como bioindicador de contaminación en zonas tropicales del Océano Indopacífico (Krishnakumar *et al.* 1996, Rajagopal 2006). En la actualidad, la especie se ha expandido por el Atlántico tropical (Agard *et al.* 1992, Lodeiros *et al.* 1999), lo cual permite considerarla de amplia distribución zoogeográfica. Estas características, junto con la elevada abundancia que presenta durante todo el año, la importancia socioeconómica, y los conocimientos que se tienen sobre su biología y principalmente sobre la ecotoxicología (Acosta y Lodeiros 2001, Rojas *et al.* 2002, Narváez *et al.* 2005, Rojas *et al.* 2009, Lémus 2010), han permitido considerarla como

una de las especies más representativas para estudios ecotoxicológicos en las costas de Venezuela y el Caribe (Lodeiros 2011). En vista de ello, las evaluaciones referentes a sus repuestas ante agentes contaminantes, son de gran importancia. El presente estudio muestra la acumulación del cadmio en concentraciones subletales en juveniles del mejillón verde *Perna viridis* y su efecto sobre la condición fisiológica utilizando el índice ARN/ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *Perna viridis* fueron recolectados de un banco natural de la localidad de La Esmeralda (10°40'35"N; 63°30'50"W), ubicado en la costa norte del golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. Los organismos fueron trasladados en contenedores isotérmicos con agua de mar suficientemente aireada hasta el laboratorio donde se aclimataron sin suministro de alimento durante 96 h a temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidad de 35 ± 1 psu, pH $7,8 \pm 2$ y saturación de oxígeno del agua $> 90\%$.

Para el experimento se utilizaron nueve acuarios de 40 L de capacidad, llenados con 20 L de agua de mar filtrada (1 μm) y tratada con luz ultravioleta. Se utilizaron 50 organismos juveniles de tallas homogéneas ($12,67 \pm 3,02$ mm; longitud dorso-ventral) por cada acuario. Tres réplicas de estos acuarios, fueron utilizados para cada uno de los siguientes tratamientos: exposición de 0 (control), 50 y 80 $\mu\text{gCd/L}$ en forma de cloruro de cadmio (CdCl_2) durante 8 días. Durante el periodo experimental, cada 24 horas, se realizaron recambios del 50% de agua en los acuarios con el fin de mantener constantes las concentraciones del metal y conservar la calidad del agua. Posteriormente se realizaron mediciones en el agua con la ayuda de un analizador de iones para registrar la cantidad de cadmio y luego se procedió a añadir la solución patrón hasta completar los niveles experimentales iniciales. Cada dos días, una vez iniciada la experiencia, se tomaron 10 ejemplares al azar en cada réplica, e inmediatamente se congelaron a -40°C para su análisis posterior.

La cuantificación de cadmio se realizó en todo el tejido blando y en la concha, mediante un tratamiento previo de deshidratación en una estufa a $70^\circ\text{C}/48\text{h}$ hasta obtener peso constante. Una vez deshidratados, el tejido y la concha se pulverizaron y luego se pesó 1 g de tejido seco de las muestras. La digestión del tejido, se realizó siguiendo las recomendaciones descritas en Bebiano y Machado (1997) con algunas modificaciones: las muestras

se colocaron en matraces de 100 mL y se les agregó 5 mL de una solución constituida por ácido nítrico y perclórico (3:1); mientras que las conchas fueron digeridas con 5 mL de ácido nítrico, más 5 mL de agua desionizada, ambas muestras fueron calentadas por separado a 100°C/4h. Posteriormente se procedió al filtrado de las muestras, diluyéndolas en agua desionizada y filtrando en papel Whatman N° 40, hasta alcanzar un volumen de 25 mL en matraces aforados. La concentración del metal se determinó usando espectrofotómetro de absorción atómica con llama de aire-acetileno y corrector de fondo de deuterio (Perkin Elmer, modelo 3110), a una longitud de onda de 229 nm, tomando el promedio de tres lecturas. Para las curvas de calibración se utilizó un estándar de cadmio de 1000 ppm marca Fixanal. La precisión del método fue verificada utilizando el estándar de referencia de tejido NIST Oyster tissue 1566a.

El índice de ARN/ADN fue cuantificado en el músculo abductor a partir de una muestra de unos 80 mg de los organismos de cada réplica de tratamiento, siguiendo la metodología establecida por Canino y Calderone (1995). El tejido fue macerado en viales Eppendorf de 1,5 mL, hasta formar un homogeneizado. A cada vial se añadió 100 mL de solución de sarcosina (1%), mezclando en un agitador eléctrico por 30 min. Se dejó reposar y se mezcló nuevamente otros 30 min. Luego se agregó 900 mL de buffer (TRIS-EDTA), se mezcló, y se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min. A cada muestra y por duplicado, se colocó 10 mL del sobrenadante en tubos de borosilicato (12x75 mm), añadiendo 400 mL del buffer. Para la determinación del ARN se añadió 500 mL de la solución de bromuro de etidio y para el ADN 500 mL de reactivo de Hoechst. Las lecturas, tanto para el ARN como para el ADN, se realizaron a longitudes de onda de 490 nm. Para estimar por extrapolación, las concentraciones de los ácidos nucleicos, se establecieron curvas patrones tanto para el ARN y ADN. Para esto se tomaron 200 mL de la solución estándar de ADN y de ARN, por separado, y se colocaron en tubos de borosilicato, el cual contenía previamente 300 mL de solución buffer (TRIS-EDTA), a partir del cual se realizaron diluciones seriadas de 250 mL.

Se aplicó análisis de varianza de una vía. En los casos donde se determinaron diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba a posteriori de Sheffé, siguiendo las recomendaciones establecidas en Zar (1984).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ejemplares expuestos a las concentraciones

experimentales de 50 $\mu\text{gCd/L}$ y 80 $\mu\text{gCd/L}$ sobrevivieron en el transcurso del bioensayo, reafirmando a estas concentraciones como dosis subletales. Durante los dos primeros días de exposición, los organismos mostraron valores de cadmio significativamente diferentes ($p < 0,05$), la acumulación en los tejidos fue proporcional a los niveles presentes en el medio (49 \pm 10,33 $\mu\text{gCd/g}$ y 74 \pm 20,16 $\mu\text{gCd/g}$, respectivamente). En el grupo control los valores se mantuvieron constantes (8 \pm 2,03 $\mu\text{gCd/g}$) durante todo el estudio (Fig. 1).

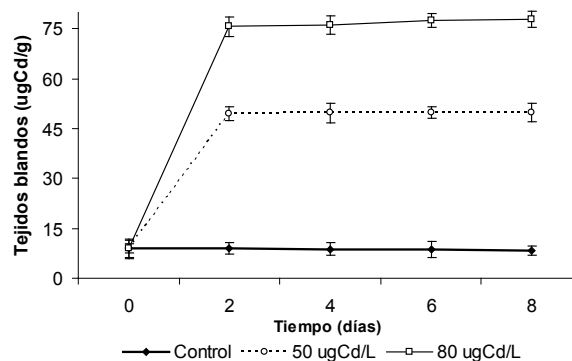


Figura 1. Bioacumulación de cadmio en los tejidos blandos de juveniles del mejillón verde *P. viridis* expuestos a dos concentraciones subletales de cadmio (50 $\mu\text{gCd/L}$ y 80 $\mu\text{gCd/L}$), durante 8 días de exposición.

Después de transcurridas las 48 h de exposición, no se evidenciaron cambios significativos en el proceso de acumulación del metal (67-72 $\mu\text{gCd/L}$ para 80 $\mu\text{gCd/L}$ y 49-50 $\mu\text{gCd/g}$ para 50 $\mu\text{gCd/g}$, respectivamente). Estos resultados sugieren que en menos de 48 h los mejillones acumularon de manera eficiente el cadmio en el medio, para luego activar mecanismos de control. De esta manera, se considera que el umbral de acumulación en esta especie podría ser dependiente del tiempo y de los intervalos de las concentraciones del metal. La condición de inanición pudo condicionar al bivalvo a activar rápidos procesos metabólicos rápidos para el mantenimiento basal. En este sentido, se debería diseñar estudios que incorporen esquemas experimentales con y sin alimentación de los organismos para comparar dichas respuestas.

Se ha demostrado que los organismos pueden presentar tres estrategias principales para eludir la acción tóxica del cadmio: 1) reducción de la entrada de metal, 2) aumento de la excreción y 3) secuestro del metal dentro de los tejidos en forma no tóxica (Yang y Thompson 1996, Nicholson y Lam 2005, Rojas *et al.* 2009). En nuestro estudio, *P. viridis* posiblemente empleó una combinación de las estrategias anteriores, con la finalidad de regular

la concentración del metal en sus tejidos. De acuerdo con los resultados obtenidos, esta especie presentó un comportamiento de organismo regulador y no como un acumulador de cadmio, ya que mantuvo un equilibrio entre la acumulación y la eliminación (caso contrario a lo observado en la concha).

El grupo experimental no expuesto (control), presentó valores de $8,24 \pm 1,47 \mu\text{gCd/g}$, sugiriendo que los organismos experimentales provenientes de la zona de La Esmeralda tenían acumulado cadmio en sus tejidos (Fig. 1). La presencia del Cd en la zona nororiental de Venezuela está principalmente relacionada con la descomposición de la materia orgánica y liberación del metal al medio, producto del fenómeno de surgencia costera que se presenta anualmente (Müller-Karger *et al.* 1989, Acosta y Lodeiros 2004, Lemus *et al.* 2010). En este sentido, el cadmio muestra un comportamiento biogeoquímico muy similar al de los nutrientes, por lo tanto este metal, parece estar controlado por el ciclo de nutrientes en la columna de agua, esta característica hace que las aguas de surgencia constituyan la principal fuente de este metal en la zona, haciéndose biodisponible (Acosta y Lodeiros 2004). De esta manera es posible que los organismos establecidos en el nororiente de Venezuela, puedan contener cierta cantidad de cadmio en sus tejidos debido a procesos naturales y antrópicos.

La adsorción de cadmio en la concha presentó un ligero incremento en ambas concentraciones hasta finalizada la experiencia (Fig. 2). A $80 \mu\text{gCd/L}$ los niveles fueron significativamente más elevados ($p < 0,05$), sugiriendo incorporación continua del metal en la concha. La explicación es que las conchas están hechas de aragonita, una forma de carbonato de calcio que cambia sus átomos de calcio a favor de los metales pesados, bloqueándolos en una forma sólida. Estos resultados concuerdan con los reportados por White y Rainbow (1985), Phillips y Rainbow (1997) y Acosta y Lodeiros (2004), quienes señalan que la adherencia de los metales en la concha es constante con respecto a la concentración del medio, proporcionándole a este compartimiento ventajas para determinar niveles de metales en función de monitorear procesos de contaminación por metales pesados.

El índice de condición fisiológica ARN/ADN presentó diferencias significativas ($p < 0,05$), con un descenso progresivo de este índice en los tratamientos con las mayores concentraciones experimentales en relación al tiempo de exposición (Fig. 3). En el grupo control se registraron los mayores niveles de ARN/ADN ($15,1 \pm 4,86$), seguido de los organismos expuestos a 50

$\mu\text{gCd/L}$ ($12,1 \pm 2,45$) y el menor índice de condición se obtuvo a $80 \mu\text{gCd/L}$ ($3,6 \pm 2,34$). Los mejillones no expuestos al cadmio presentaron los niveles mayores de ARN/ADN, acompañado por síntesis de proteínas, sugiriendo mejor condición fisiológica con respecto a los organismos expuestos. En este sentido, se ha demostrado que *P. viridis* expuesto a concentraciones bajas de cadmio activa enzimas transportadoras de metales como respuesta que ayuda a contribuir con la homeostasis del metal dentro del músculo (Yang y Thompson 1996).

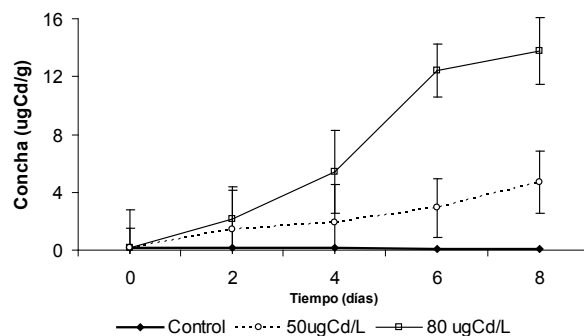


Figura 2. Biocumulación de cadmio en la concha de juveniles del mejillón verde *P. viridis* expuestos a dos concentraciones subletales de cadmio ($50 \mu\text{gCd/L}$ y $80 \mu\text{gCd/L}$), durante 8 días de exposición.

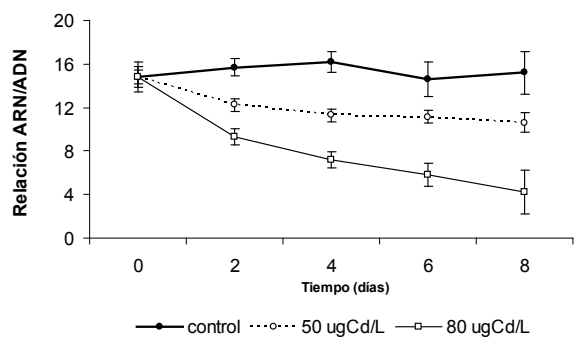


Figura 3. Índice ARN/ADN en el músculo abductor de juveniles del mejillón verde *P. viridis* expuestos a dos concentraciones subletales de cadmio ($50 \mu\text{gCd/L}$ y $80 \mu\text{gCd/L}$), durante 8 días de exposición.

En los mejillones expuestos se observó una disminución inmediata del índice, posiblemente relacionada con la rápida acumulación del metal en las primeras 48 h, aunado al estado de inanición en la cual se encontraban los organismos. Con relación al estado de inanición, Viñoles *et al.* (2000), encontraron que el índice ARN/ADN en el tejido muscular de *P. viridis* responde lentamente en presencia de estrés alimentario; sin embargo, esta especie es capaz de utilizar la energía en forma de glucógeno, contenida en el tejido muscular, para mantener un comportamiento de ajuste energético, mostrando adaptación al estrés, resultando en un uso

muy lento o disminuido de la energía de reserva, hecho que se ve reflejado en los niveles constantes de ARN/ADN hasta el final de la experiencia.

A 80 µgCd/L, se produjo un estado de estrés avanzado, que se evidenció en la condición fisiológica del organismo, reflejado en su índice ARN/ADN. Este índice tendió a disminuir progresivamente durante todo el período experimental, respuesta que pudo estar asociada con la cantidad de cadmio acumulada durante los dos primeros días. No obstante, los valores menores de ARN/ADN pudieron estar asociados con la baja capacidad de síntesis de proteínas que son las que activan los mecanismos de detoxificación y biotransformación del metal. Al comparar los resultados obtenidos en las concentraciones de ARN y de los valores del cociente ARN/ADN en *Donax denticulatus* expuestos a dosis subletales de cadmio, se evidenció disminución de ambos parámetros, asociados con el aumento de la concentración del metal al que fueron expuestos, posiblemente como consecuencia del efecto tóxico del mismo (Anton *et al.* 2008). El índice ARN/ADN ha sido considerado como indicativo del estado de la condición fisiológica en bivalvos y otros organismos (Gómez *et al.* 1998, Bracho *et al.* 1999, Becker *et al.* 2005).

Perna viridis es una especie capaz de regular niveles tolerables de cadmio, respondiendo con eficaces mecanismos de regulación, que les permiten acondicionarse a zonas que puedan estar contaminadas por este metal, siendo la relación ARN/ADN, un índice de respuesta inmediata, que permite conocer la condición fisiológica en la cual se encuentra el organismo en un momento determinado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA V, LODEIROS C. 2001. Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles del mejillón verde *Perna viridis* mediante la concentración de ADN y la relación ARN/ADN en el músculo abductor. Rev. Cient. FCV-LUZ. XI (6):485-490.
- ACOSTA V, LODEIROS C. 2004. Metales pesados en la almeja *Tivela mactroides* (Born, 1778. Bivalvia: Veneridae) en localidades costeras con diferentes grados de contaminación en Venezuela. Cienc. Mar. 30(2):323-333.
- ACOSTA V, GLEM M, URBANO T, NATERA Y, HIMMELMAN J, REY-MÉNDEZ M, LODEIROS C. 2009. Differential growth of the mussels *Perna perna* and *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) in suspended culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela. J. World Aquac. Soc. 40(2):226-235.
- AGARD J, LISHORE R, BAYNE B. 1992 *Perna viridis* (Linnaeus 1758) first records of the Indo-Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. Caribb. Mar. Stud. 3:59-60.
- ANTON Y, LÉMUS M, CHUNG K. 2008. Índice ARN/ADN como indicador de la condición fisiológica en ejemplares de *Donax denticulatus* expuestos a dosis subletales de cadmio. Saber. 20(1, 2, 3):149-154.
- BEBIANO N, MACHADO L. 1997. Concentration of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the South Coast of Portugal. Mar. Pollu. Bull. 34(8):666-671.
- BECKER C, BREPOHL D, FEUCHTMAYR H, ZOLLNER E, SOMMER F, CLEMMESSEN C, SOMMER U, BOERSMA M. 2005. Impacts of copepods on marine seston and resulting effects on *Calanus finmarchicus* RNA/DNA ratios in mesocosm experiments. Mar. Biol. 146(3):531-541.
- BELMAR D, LEMUS M, ARMAS J, ZAPATA C. 2008. Efectos de los efluentes del central azucarero de Cumanacoa sobre la condición fisiológica y biomarcadores de contaminación en el gasterópodo *Pomacea glauca* (Linné, 1758). Rev. Invest. Mar. 29(1):33-38.
- BRACHO M, SEGNINI M, VIÑOLES I, CHUNG K. 2000. Efecto de la alimentación sobre la condición fisiológica del mejillón verde *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca: Mytilidae) medido por la relación ARN/ADN. Reunión 29 Asociación Laboratorios Marinos del Caribe. Cumaná, Venezuela. 83 pp.
- BUSTAMANTE P, GRIGIONI S, BOUCHER-RODONI R, CAURANT F, MIRAMAND P. 2000 Bioaccumulation of 12 Trace Elements in the Tissues of the Nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. Mar. Pollu. Bull. 40:688-696.
- CANINO M, CALDERONE E. 1995. Modifications and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acids and contents of fish larvae. Fish. Bull. 93:15-65.
- CHEUNG C, ZHENG G, LI A, RICHARDSON B, LAM P. 2001.

- Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52:189–203.
- GÓMEZ J, SEGNINI M, FUENTES M. 1998. Efecto del cobre sobre la condición fisiológica de *Lima scabra*, medida por la razón ARN/ADN. *Scientia (Panamá)*. 13(1):27-34.
- GUTIÉRREZ-GALINDO E, MUÑOZ-BARBOSA A. 2003. Variabilidad geográfica de la concentración de Hg, Co, Fe y Ni en mejillones *Mytilus californianus* (Conrad, 1837) de la costa de Baja California. *Cienc. Mar.* 29(1):21-34.
- KRISHNAKUMAR P, ASOKAN P, PILLAI V. 1996. Physiological and cellular responses to copper and mercury in the green mussel *Perna viridis*. *Aquatic Toxicol.* 18(3):163-1734.
- LEMUS M, LAURENT C, ACAGUA A, CABRERA M, APONTE A, CHUNG K. 2010. Variación estacional de metales pesados en *Perna viridis*, de la localidad de Guayacán, península de Araya, estado Sucre, Venezuela. *The Biologist (Lima)*. 8:126-138.
- LODEIROS C. 2011. Selección de especies de moluscos bivalvos en el nororiente de Venezuela para ser utilizados en bioensayos de toxicidad. X Congreso SETAC 2011, Cumaná, Venezuela. p 32.
- LODEIROS C, MARÍN B, PRIETO A. 1999. Catálogo de moluscos del nororiente de Venezuela. Clase Bivalvia. Edición APUDONS. 109 pp.
- MANOJ R, APPUKUTTAN K. 2003. Effect of temperature on the development, growth, survival and settlement of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). *Aquac. Res.* 34:1037-1045.
- MÜLLER-KARGER F, McCLAIN C, FISHER T, ESAIAS W, VARELA R. 1989. Pigment distribution in the Caribbean Sea: observations from space. *Prog. Oceanogr.* 23:23-64.
- NARVÁEZ N, LODEIROS C, NUSETTI O, LEMUS M, MAEDA-MARTÍNEZ A. 2005. Incorporación, depuración y efecto del cadmio en el mejillón verde *Perna viridis* (L.1758) (Mollusca: Bivalvia). *Cienc. Mar.* 31:91-102.
- NICHOLSON S, LAM P. 2005. Pollution monitoring in southeast Asia using biomarkers in the mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environ. Int.* 31:121-132.
- PAN K, WANG W. 2008. The subcellular fate of cadmium and zinc in the scallop *Chlamys nobilis* during waterborne and dietary metal exposure. *Aquatic Toxicol.* 90:253-260.
- PHILLIPS D, RAINBOW P. 1997. Trace metal accumulation in marine invertebrates: Marine Biology or Marine Chemistry. *J. Mar. Biol. Ass.* 77:195-210.
- RAJAGOPAL S, VENUGOPALAN V, VAN DER VELDE G, JENNER H. 2006. Greening of the coasts: a review of the *Perna viridis* Success Story. 40:273-297.
- ROJAS L, CHANG Y, AGARD J, BEKELE I, HUBBARD R. 2002. Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oysters from Trinidad and Venezuela. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:410–415.
- ROJAS N, LEMUS M, ROJAS L, MARTÍNEZ G, RAMOS Y, CHUNG K. 2009. Contenido de mercurio en *Perna viridis* al norte del estado Sucre, Venezuela. *Cienc. Mar.* 25:91-99.
- TSANGARIS C, KORMAS K, STROGYLOUDI E, HATZIANESTIS I, NEOFITOU C, ANDRAL B, GALGANI F. 2010. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 15:369-378.
- VARGAS F, BARRACCO M. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Maeda, A. (ed). pp. 127-146.
- VIÑOLES I, SEGNINI M, BRACHO M, CHUNG K. 2000. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo de *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae), según el coeficiente ARN/ADN. *Rev. Biol. Trop.* 48(I):159-170.
- VOETS J, STEEN R, BLUST R, BERVOETS L. 2009. Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations. *Aquatic Toxicol.* 93:53-60.
- WANG W. 2002. Interactions of trace metals and different

- marine food chains. Mar. Ecol. Prog. Ser. 243:295-309.
- WO K, LAM P, WU R. 1999. A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on a marine gastropod *Nassarius festivus*. Mar. Pollut. Bull. 39:165-173.
- WHITE S, RAINBOW R. 1985. On the metabolic requirements for copper and zinc in mollusk and crustacean. Mar. Environ. Res.16:215-229.
- YANG M, THOMPSON J. 1996. Binding of endogenous copper and zinc to cadmium-induced metal-binding proteins various tissues of *Perna viridis*. Environ. Contam. Toxicol. 30(2):267-273.
- YAP C, ISMAIL A, EDWARD F, TAN S, SIRAJ S. 2006. Use of different soft tissues of *Perna viridis* as biomonitors of bioavailability and contamination by heavy metals (Cd, Cu, Fe, Pb, Ni, and Zn) in a semi-enclosed intertidal water, the Johore Straits. Environ. Toxicol. Chem. 88:683-695.
- ZAPATA-VÍVENES E, ROJAS DE ASTUDILLO L, SÁNCHEZ G, BARRETO G. 2012. Heavy metals and related biomarkers in *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) collected on the coast of Sucre State, Venezuela Cienc. Mar. 38(3):517-528.
- ZAR J.1984. Biostatistical analysis. (2 ed). Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 120 pp.