

# 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

## Evaluation of Copper Effect on Juveniles of the Green Mussel *Perna viridis* by DNA Concentration and a RNA/DNA Ratio of Abductor Muscle

Vanessa Acosta y César Lodeiros

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

### RESUMEN

Juveniles de *Perna viridis* fueron expuestos a diferentes concentraciones de cobre (0,00; 0,05; 0,10; 0,20; 0,80; 1,20 y 3,40 mgCu L<sup>-1</sup>), durante un período de 96 h. Los efectos letales se determinaron cuantificando la supervivencia y los subletales estimando la concentración de ADN, así como el índice ARN/ADN. Las concentraciones de 0,8; 1,2 y 3,4 mgCu L<sup>-1</sup> provocaron niveles de mortalidad del 20, 80 y 100%, respectivamente. Se estimó una DL<sub>50</sub> de 0,61 mgCu L<sup>-1</sup> con límites inferior y superior de confiabilidad al 95% de 0,39 y 0,91 mgCu L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los niveles de ADN en el músculo abductor de los organismos expuestos a las diferentes concentraciones de cobre y al inicio del experimento no presentaron diferencias significativas. Al final del experimento, se determinó un aumento progresivo del índice de ARN/ADN de los juveniles expuestos al metal hasta la concentración de 0,1 mgCu L<sup>-1</sup>, probablemente como una respuesta metabólica relativa a la exposición del cobre, la cual activó la síntesis de proteínas. Por otra parte, se observó una disminución significativa del índice de ARN/ADN en los individuos sometidos a las concentraciones de 0,2 y 0,8 mgCu L<sup>-1</sup>, posiblemente producto de una respuesta a las altas concentraciones de cobre, conjuntamente con el estado de inanición establecido en el bioensayo. Los resultados sugieren que los niveles de ARN/ADN del tejido muscular, reflejaron un comportamiento relativo a una respuesta antitóxica.

**Palabras clave:** Bivalvos, *Perna viridis*, Venezuela, contaminación, condición fisiológica.

### ABSTRACT

In this study, juveniles individuals of the mussel *Perna viridis* were exposed to different concentrations of copper (0.00, 0.05, 0.10, 0.20, 0.80, 1.20 y 3.40 mgCu L<sup>-1</sup>), during a period of 96 h. The lethal effect was determined by measuring the survival rate and the sublethal effect by estimating the concentrations of DNA and RNA/DNA ratio. The 0.8, 1.2 y 3.4 mgCu L<sup>-1</sup> concentrations caused mortality rates of 20, 80 y 100%, respectively. The DL<sub>50</sub> was 0.61 mgCu L<sup>-1</sup> the upper and lower limits of confidence at 95% were 0.39 and 0.91 mgCu L<sup>-1</sup> respectively. At the beginning of the experiment, the DNA levels in adductor muscle, and after their exposition to the different copper concentrations, did not indicated a significant variation. At the end of the experiment, the RNA/DNA ratio increased in the juveniles exposed to a concentration of up to 0.1 mgCu L<sup>-1</sup>, probably as a metabolic response due to the exposition to copper which may have activated protein synthesis. In the mussels exposed to 0.20 mgCu L<sup>-1</sup> and 0.80 mgCu L<sup>-1</sup>, the RNA/DNA ratio decreased significantly, possibly because these higher levels of copper concentration caused them an advanced state of stress. Results suggest that RNA/DNA ratios of muscle tissue show a behavior relative to antitoxic response.

**Key words:** Bivalves, *Perna viridis*, Venezuela, contamination, physiological condition.

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado el interés por estudiar el efecto de la contaminación en el medio marino. Una serie de invertebrados y vertebrados han sido objeto de investigaciones relacionadas con el impacto ambiental producido por la presencia de metales pesados en los sistemas acuáticos, princi-



palmente en zonas templadas [3, 4, 23, 24]. Sin embargo, en regiones tropicales pocos estudios se han realizado al respecto y cada día se hace más imprescindible el empleo de especies acuáticas que permitan cuantificar el impacto ambiental producido por contaminantes en los ecosistemas marinos.

Los metales pesados, por su carácter no biodegradables provocan un efecto negativo sobre los organismos. Se ha demostrado que estos elementos producen complejos con sustancias orgánicas que conducen a un desequilibrio metabólico que origina una reducción de la energía destinada para el crecimiento corporal [24]. Debido a ello, el estudio de los niveles de toxicidad, comportamiento y acumulación de los metales pesados en los tejidos de los bivalvos, particularmente en mejillones, ha ocupado un lugar preferencial en los estudios ecotoxicológicos. Estos organismos son capaces de bioacumular los metales biodisponibles en el medio ambiente, un buen ejemplo lo constituyen *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis*, los cuales han sido clásicamente utilizados en diversos estudios de contaminación en zonas templadas [2, 14, 19, 25].

Entre los metales pesados se encuentra el cobre, un micronutriente esencial que forma parte, principalmente, de los pigmentos respiratorios así como de muchas moléculas, particularmente metaloenzimas, como la ureasa, citocromo oxidasa, tiroxidasa y butil CoA deshidrogenasa [4, 27, 38]. No obstante, en elevadas concentraciones el cobre es considerado tóxico, ya que afecta las funciones básicas del organismo, llegando a provocar un desequilibrio metabólico que puede causar hasta la muerte [37]. En ambientes estuarinos y marinos está presente en cantidades suficientes, razón por la cual no se han reportado deficiencias en los organismos acuáticos, este metal proviene de usos agrícolas, domésticos e industriales, entre otros. Las descargas antropogénicas a los estuarios y áreas costeras es considerada la principal fuente de contaminación, por lo que tiene prioridad en los estudios de toxicidad [33].

Evaluar la respuesta fisiológica de un organismo acuático ante la presencia de metales pesados provee una información importante, ya que permite estimar el posible impacto ambiental que estos elementos pueden producir en los ecosistemas acuáticos.

Los cambios metabólicos que se producen dentro del organismo durante situaciones estresantes, han sido examinados mediante el contenido de ADN, ARN y la relación ARN/ADN, mostrando ser éste último un índice adecuado para establecer la condición fisiológica de los organismos en un momento dado [6, 7, 23, 26, 34]. En bivalvos marinos la relación ARN/ADN, ha sido utilizada para determinar el estado fisiológico del organismo [10, 12, 16, 20, 21, 39].

*Perna viridis* es una especie de bivalvo conocido como el mejillón verde, es originario del océano Indo-Pacífico que ha invadido gran parte de las costas del nororiente venezolano [1,17], debido probablemente a la resistencia que presenta a las variaciones ambientales [32], llegando a desplazar en algu-

nas áreas al mejillón marrón *Perna perna* [31]. Esta especie presenta un gran potencial como organismo cultivable [11, 13, 35] y también ha sido ampliamente utilizado como organismo bioindicador de contaminación en zonas tropicales del Océano Pacífico [1, 9, 15, 18], lo cual conlleva a considerarlo como un organismo modelo para ser utilizado en estudios ecotoxicológicos, con un carácter comparativo geográficamente extenso.

En el presente estudio se realizó una evaluación preliminar para estimar el efecto tóxico del cobre sobre juveniles del mejillón verde *P. viridis* durante un período de exposición de 96 h, evaluando la respuesta del organismo mediante la supervivencia, contenido de ADN y niveles de ARN/ADN, como índice de condición fisiológica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *P. viridis* fueron recolectados utilizando un equipo básico de buceo, en un banco natural ubicado en el morro de Chacopata, estado Sucre-Venezuela, la cual es una zona caracterizada por no presentar ningún aporte antropogénico. Los mejillones fueron trasladados en contenedores isotérmicos con agua de mar suficientemente aireada hasta la Estación Hidrobiológica de Turpialito, donde se mantuvieron en un tanque con agua de mar circulante, sin suministro de alimento, durante un período de aclimatación de 4 d.

Para evaluar el efecto del cobre, se escogieron individuos de menor talla ( $13 \pm 3$  mm), con la finalidad de evitar una variabilidad en la respuesta entre el índice de ARN/ADN y la talla del bivalvo [16]. Antes de realizar el bioensayo se tomaron al azar 12 ejemplares, en función de mostrar la condición fisiológica en la cual se encontraban los mejillones en su habitat natural (grupo inicial). Durante el bioensayo, se utilizaron contenedores de vidrio de 4 litros de capacidad, los cuales fueron llenados hasta 3 litros con agua de mar filtrada y esterilizada con luz ultravioleta. En cada contenedor se colocaron 5 ejemplares de *P. viridis*, sometiéndolos por triplicado a diferentes concentraciones de cobre (0,05; 0,10; 0,20; 0,80; 1,20 y 3,40 mgCu L<sup>-1</sup>) preparadas a partir de una solución patrón de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), durante un período de exposición de 96 h. De igual manera se estableció un tratamiento o grupo control sin exposición al cobre. Los organismos se mantuvieron bajo condiciones controladas a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinidad de  $36 \pm$ , pH de  $7,9 \pm 2$  y una saturación de oxígeno > 90%.

Continuamente se realizó un monitoreo con la finalidad de observar la existencia de organismos muertos, en dicho caso eran extraídos inmediatamente. El criterio de mortalidad fue establecido como la falta de respuesta al estímulo mecánico, producido por la apertura y cierre de las valvas, por contacto con una varilla plástica. Una vez transcurridas las 96 h, se cuantificaron los organismos sobrevivientes, los cuales fueron identificados y posteriormente congelados.



El contenido de ADN e índice de ARN/ADN, fueron medidos en 30 mg de masa húmeda del músculo abductor y se determinó mediante la técnica de fluorescencia [8].

En función de evaluar la dosis letal al 50% (DL<sub>50</sub>), se aplicó el método "Logit" utilizando un programa suministrado por los protocolos estándares para bioensayos de toxicidad [30].

Para determinar si existieron diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas en las variables de supervivencia, determinaron contenido de ADN y relación ARN/ADN, se aplicó el análisis noparamétrico de Kruskal-Wallis. En los casos donde se determinaron diferencias significativas (P<0,05), se aplicó la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples según las recomendaciones de Zar [41].

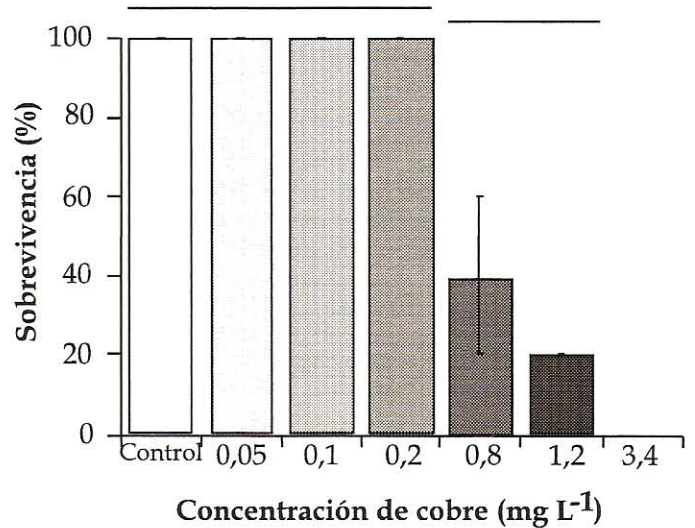
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los juveniles de *P. viridis* expuestos a las concentraciones de 0 (control), 0,05; 0,1 y 0,2 mgCu L<sup>-1</sup> sobrevivieron durante las 96 h del bioensayo; en contraste con los juveniles expuestos a 0,8 y 1,2 mgCu L<sup>-1</sup>, en donde se obtuvo un 40 y 20% de supervivencia FIG. 1. En la concentración de 3,4 mgCu L<sup>-1</sup>, se presentó una mortalidad total de los juveniles, la cual aconteció antes de las 48 h. El análisis de los datos por el método "logit" mostraron una dosis letal al 50% de mortalidad (DL<sub>50</sub>) de 0,61 mgCu L<sup>-1</sup> con límites inferior y superior de confiabilidad al 95% de 0,39 y 0,91 mgCu L<sup>-1</sup>, respectivamente.

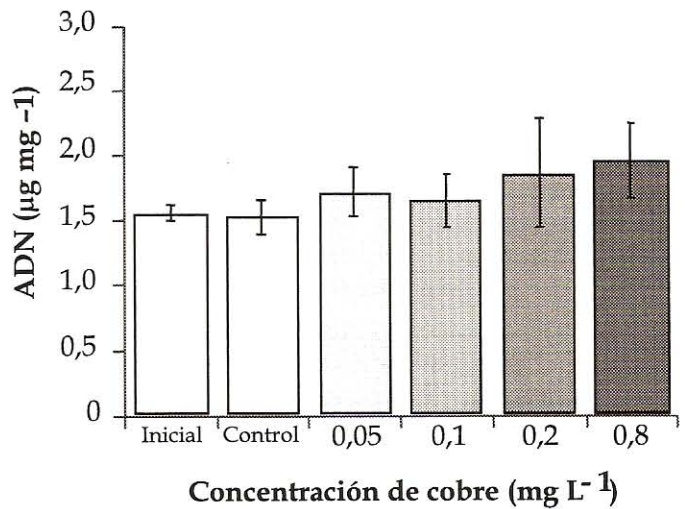
Los niveles de ADN en el músculo abductor de los organismos sobrevivientes expuestos a las diferentes concentraciones de cobre y al inicio del experimento no presentaron ninguna variación significativa (P>0,261) FIG. 2. Estos resultados sugieren que en el transcurso del bioensayo no se presentó un proceso de división celular. Esta condición de no-crecimiento, concuerda con las condiciones experimentales, donde no hubo suministro de alimento en el período de aclimatación (120 h) y durante las 96 h de experimentación.

En contraste con la concentración de ADN, el índice de ARN/ADN de los juveniles fue dependiente de los tratamientos empleados (P<0,001) FIG. 3. Esto, lógicamente, se debió a una variabilidad en los niveles de ARN. El mayor índice se determinó en los individuos al inicio de la experimentación (P>0,05), lo cual sugiere la mejor condición de los individuos al comienzo del experimento.

Al final del bioensayo, el índice ARN/ADN mostró un aumento progresivo en el intervalo de 0,05 a 0,1 mgCu L<sup>-1</sup>, concentraciones donde todos los individuos presentaron un 100% de Supervivencia. Posteriormente el índice disminuyó significativamente (P<0,05) en los ejemplares expuestos a las concentraciones de 0,2 y 0,8 mgCu L<sup>-1</sup>, así como en los organismos no expuestos al cobre (grupo control). La no existencia de diferencias en los niveles de ADN, sugiere que la variabilidad



**FIGURA 1. PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA EN JUVENILES DE *PERNA VIRIDIS* SOMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE. LA DEGRADACIÓN DEL NEGRO SE PRESENTA EN RELACIÓN A LA CONCENTRACIÓN DEL COBRE. LAS LÍNEAS VERTICALES INDICAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA EN CADA TRATAMIENTO. LAS LÍNEAS HORIZONTALES INDICAN LA FORMACIÓN DE GRUPOS SIGNIFICATIVAMENTE IGUALES (P>0,05).**



**FIGURA 2. CONCENTRACIÓN DE ADN EN JUVENILES DE *PERNA VIRIDIS* ANTES Y DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE. LA DEGRADACIÓN DEL NEGRO SE PRESENTA EN RELACIÓN A LA CONCENTRACIÓN DEL COBRE. LAS LÍNEAS VERTICALES INDICAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA EN CADA TRATAMIENTO.**

significativa (P<0,05) del índice de ARN/ADN, es producto de procesos metabólicos no relacionados con el crecimiento somático. En este sentido, el aumento progresivo del índice en los juveniles expuestos al cobre desde la concentración 0



(control) hasta  $0,1 \text{ mgCu L}^{-1}$ , puede ser explicado por un aumento de la síntesis de proteínas como respuesta al incremento del metal en concentraciones no estresantes. Esta hipótesis se ve apoyada por la sobrevivencia total de los organismos a dichas concentraciones. Una hipótesis alternativa es una posible estrategia de respuesta metabólica relativa a la exposición del cobre, activando sustancias antitóxicas tales como la formación de complejos proteicos (metalotioninas), para atrapar el excedente de metal presente dentro del organismo [24, 36].

Un hallazgo, que concuerda con nuestros resultados, es el obtenido en investigaciones realizadas por Yang y Thompson [40], en donde reportan que la exposición de *Perna viridis* a bajas concentraciones de cadmio, zinc y cobre durante 96 h, activan enzimas denominadas proteínas transportadoras de metales como una función de contribuir a la homeóstasis de estos metales en el metabolismo de varios tejidos de la especie, incluyendo el músculo. Estudios de activación enzimática relativos a la síntesis de proteínas y con especial referencia a la formación de metalotioninas en concentraciones subletales de cobre en el mejillón verde *P. viridis*, deben ser realizados para verificar las hipótesis antes señaladas.

Un hecho contrario a lo acontecido en las concentraciones de hasta  $0,1 \text{ mgCu L}^{-1}$ , es el no aumento significativo del índice de ARN/ADN en los individuos expuestos a las concentraciones de  $0,2$  y  $0,8 \text{ mgCu L}^{-1}$  con respecto al grupo control. En este caso los individuos sobrevivientes a dichas concentraciones posiblemente presentaron un estado de estrés avanzado, producido por dichas concentraciones (letales), conjuntamente con el estado de inanición establecido durante el bioensayo, lo cual pudo generar una mayor disminución de la capacidad metabólica del organismo, afectando el proceso de síntesis de proteínas y por ende la disminución del índice de ARN/ADN. En este sentido, Bracho y col. [3], demostraron que el crecimiento instantáneo medido a través del índice ARN/ADN en *Perna viridis*, es afectado por el estado de inanición.

Es evidente que el cobre a concentraciones elevadas actúa como un agente estresante de *Perna viridis*, ya que la  $DL_{50}$  fue establecida en  $0,67 \text{ mgCu L}^{-1}$ , considerándose dosis subletales concentraciones menores de  $0,1 \text{ mgCu L}^{-1}$ , las cuales inducen al aumento de la síntesis de proteínas, probablemente para producir proteínas tipo metalotioninas, con la finalidad de mantener la homeóstasis del bivalvo.

Aunque los resultados permiten concluir que los niveles de ARN/ADN del tejido muscular de los juveniles de *P. viridis*, reflejaron un comportamiento relativo a una respuesta antitóxica en las diferentes concentraciones de cobre en el medio; es importante plantear estudios similares en los diferentes tejidos del bivalvo, en función de entender mejor la actividad metabólica del organismo ante la presencia de xenobióticos. En este sentido, se recomienda que dicho estudio se determine utilizando además de los índices de ARN/ADN, otros índices bioquímicos como la actividad de enzimas reguladoras en los procesos claves del metabolismo.

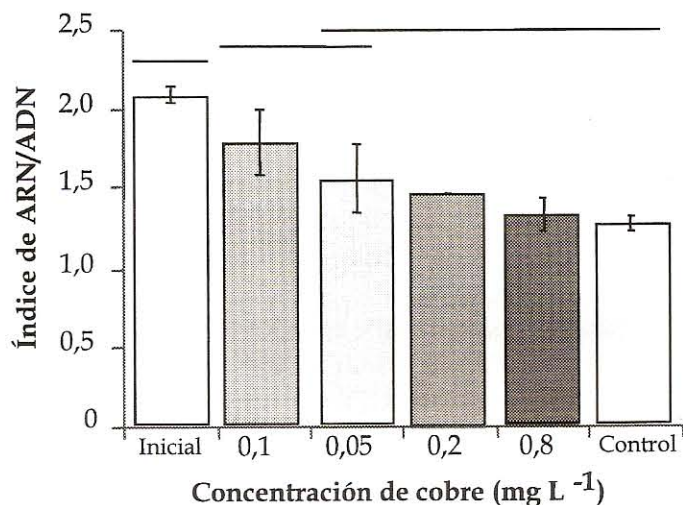


FIGURA 3. RELACIÓN DEL ÍNDICE DE ADN/ARN EN JUVENILES DE *PERNA VIRIDIS* ANTES Y DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE. LA DEGRADACIÓN DEL NEGRO SE PRESENTA EN RELACIÓN A LA CONCENTRACIÓN DEL COBRE. LAS LÍNEAS VERTICALES INDICAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA EN CADA TRATAMIENTO. LAS LÍNEAS HORIZONTALES INDICAN LA FORMACIÓN DE GRUPOS SIGNIFICATIVAMENTE IGUALES ( $P=0,05$ ). EN ESTA FIGURA LOS TRATAMIENTOS (CONCENTRACIONES) SE ORDENARON EN FUNCIÓN DE LOS NIVELES DEL ÍNDICE OBTENIDOS DE MAYOR A MENOR, PARA LA VISUALIZACIÓN DE LOS GRUPOS SIGNIFICATIVOS.

#### AGRADECIMIENTO

La investigación fue financiada parcialmente por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente y el Dpto. de Biología Pesquera del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente. Se agradece la colaboración técnica de la Estación Hidrobiológica de Turpialito.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGARD, J.; KISHORE, R.; BAYNE, B. *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) first records of the Indo-Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. *Caribb. Mar. Stud.* 3:59-60. 1992.
- [2] BEAUMONT, A.; TSERPES, G.; BUDD, M. 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. 1987.
- [3] BRACHO, M.; SEGNINI, M.; VIÑOLES, I.; CHUNG, K. 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, 18 -24 julio.** 83 pp. 1999.
- [4] BRYAN, G. Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms. En: Locwood, A.P.M. (ed.) **Effect of pollutants on aquatic organisms.** Cambridge University Press, Cambridge, 7-34. 1976.
- [5] BRYAN, G. Heavy metals contamination in the sea. En: Johnson, R. (ed.) **Marine Pollution.** Academic Press, London, 185 - 302. 1976.
- [6] BUCKLEY, L.; LOUGH, R. Recent growth, biochemical composition, and prey field of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) on Georges Banks. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 44:14-25. 1987.
- [7] BULOW, E. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. En: R.C. Summerfelt y G.E. Hall. P. (eds) **The Age and Growth of Fish.** 45-71. London: The Iowa State University, Chapman and Hall. 1987.
- [8] CANINO, M.; CALDERONE, E. Modifications and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid contents of fish larvae. **Fish. Bull.** 93:158-165. 1995.
- [9] CHIDAMBARAN, N. The green mussel *Perna viridis* as indicator of cadmium pollution. **J. Environ. Biol.** 17 (1):5-10. 1996.
- [10] FRANTZIS, A.; GRÈMARE, A.; VETION, G. Taux de croissance et rapports ARN-ADN chez le bivalve dépositif *Abra ovata* nourri à partir de différents détritiques. **Act. Oceanolog.** 16 (3):303-313. 1993.
- [11] GALLARDO, W.; SAMONTE, G.; ORTEGA, R. Raft culture of green mussel, *Perna viridis* in Sapin Bay, Philippines. **J. Shellfish Res.** 11:195-196. 1992.
- [12] GÓMEZ, J.; SEGNINI, M.; FUENTES, M. Efecto del cobre sobre la condición fisiológica de *Lima scabra*, medida por la razón ARN/ADN. **Scientia (Panamá).** 13 (1): 27-34. 1998.
- [13] HANAFI, H.; HASSA, I.; NAFIAH, M.; RAJAMANICKAM, L. Present status of aquaculture practices and potential areas for their development in South Johore, Malaysia. **Procc. Asean US. Technical Workshop on integrated tropical coastal zone management.** Univ. of Singapore, 65-73. 1991.
- [14] HOARE, K.; DAVENPORT, J.; BEAUMONT, A. Effects of exposure and previous to copper on growth of *Mytilus edulis* juveniles. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 120 (1-3): 1-3. 1995.
- [15] KRISHNAKUMAR, P.; ASOKAN, P.; PILLAI, V. Physiological and cellular responses to copper and mercury in the green mussel *Perna viridis*. **Aquatic Toxicol.** 18 (3):163-174. 1996.
- [16] LODEIROS, C.; FERNÁNDEZ, R.; BONMATI, A.; HIMMELMAN, J.; CHUNG, K. Relation of RNA/DNA ratios to growth for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* (L.) in suspended culture. **Mar. Biol.** 126:245-251. 1996.
- [17] LODEIROS, C.; MARÍN, B.; PRIETO, A. **Catálogo de moluscos de las costas nororientales de Venezuela.** Clase Bivalvia. Ediciones APUDONS, Cumaná-Venezuela. 103pp. 1999.
- [18] LOWE, D. Lysosomal membrane impairment in blood cells of *Perna viridis*: An in vitro marker of contaminant induce damage. **Res. Bull. Phuket. Mar. Biol. Cent.** 60:79 - 82. 1995.
- [19] MARTIN, M.; OSBORN, K.; BILLING, P.; GLICKSTEIN, N. Toxicity of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* and cancer magister. **Pollut. Bull.** 12 (9): 305-308. 1981.
- [20] MARTÍNEZ, G.; TORRES, M.; URIBE, E.; DÍAZ, M.; PÉREZ, H. Biochemical composition broodstock and early juvenile chilean scallops, *Argopecten purpuratus* Lamarck, held in two different environments. **J. Shellfish. Res.** 11 (2):307-313. 1992.
- [21] MAYRAND, E.; PELLEIN-MASSICOTTE, J.; VINCENT, B. Small scale variability of biochemical indices of growth in *Mya arenaria* (L.) **J. Shellfish. Res.** 13 (1):199-205. 1994.
- [22] MORENO, J.; CASTELLOTE, M.; QUERALT, J. Effects in vitro of copper and zinc on hepatic citocromo P-450 activities. **Comp. Biochem. Physiol.** 93:355-357. 1989.
- [23] MOSS, S. Use of nucleic acids as indicators of growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*. **Mar. Biol.** 120:359-367. 1994.
- [24] MOUNT, D.; STEPHAN, C.A method for establishing acceptable toxicant limits for fish-malathion and the butoxyethanol ester of 2,4-D Trans. **Amfish. Soc.** 96:185-193. 1997.
- [25] PAVIC, J.; SMODIS, B.; SKREBLIN, M.; KREAR, L.; STEGAR, P. 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. 1994.
- [26] PEASE, A. Studies of relationship of RNA/DNA ratios and the of protein synthesis to growth in the oyster *Crassostrea virginica*. **Fisheries and Marine Service. Technical Report N° 622.** pp, 78. 1976.
- [27] PHILLIPS, D. Trace metals in bivalve molluscs from Thailand. **Mar. Environ. Res.** 15:215-234. 1985.
- [28] PHILLIPS, D. **Quantitative aquatic biological indicators.** Applied Science Publishers Ltd, London. 1997.

- [29] REYES, R. Las metaloproteínas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos: **Interciencia**. 24 (6): 366-371. 1999.
- [30] RODRÍGUEZ, J.; ESCLAPÉS, M. **Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas** (INTEVEP-PDVESA). Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. Petróleos de Venezuela, 56 pp. 1995.
- [31] RYLANDER, K.; PÉREZ, J.; GÓMEZ, J. Status of the green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Mytilidae), in north-eastern Venezuela. **Caribb. Mar. Stud.** 5:86-87. 1996.
- [32] SEGNINI, M.; CHUNG, K.; PÉREZ, J. Salinity and temperature tolerances of the green and brown mussels, *Perna viridis* and *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). **Rev. Biol. Trop.** 46 (5):121-125. 1998.
- [33] SADIQ, M. **Toxic metal chemistry in marine environments**. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 390 pp. 1992.
- [34] SHCHERBAN, S. Relationship between the RNA/DNA ratio, relative protein content, and dry weight of mussels in a short experiment. **Hydrobiol. J.** 28:69-74. 1992.
- [35] SREENIVASAN, P.; THANGAVELU, R.; POOVANNAN, P. Biology of the green mussel *Perna viridis* (Linnaeus) cultured in Mutukadu Lagoon, Madras. **Indian J. Fish.** 36:149-155. 1989.
- [36] VIARENGO, A.; PERTICA, M.; PALMERO, S.; ZANICCHI.; ORUNESU, M. Synthesis of Cu-binding proteins in different tissues of mussels exposed to the metal. **Mar. Poll. Bull.** 12 (10):347-350. 1981.
- [37] VIARENGO, A. Biochemical effects of trace metals. **Mar. Pollut. Bull.** 16 (4): 153-158. 1985.
- [38] WHITE, S.; RAINBOW, R. On the metabolic requirements for copper and zinc in mollusc and crustacean. **Mar. Environ. Res.** 16:215-229. 1985.
- [39] WRIGHT, D.; HETZEL, E. Use of RNA/DNA ratio as indicator of nutritional stress in the American oyster *Crassostrea virginica*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 25:199-206. 1985.
- [40] YANG, M.; THOMPSON, J. Binding of endogenous copper and zinc to cadmium-induced metal-binding proteins various tissues of *Perna viridis*. **Environ. Contam. Toxicol.** 30 (2): 267-273. 1996.
- [41] ZAR, J. **Biostatistical Analysis**. 2nd edition. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 120 pp. 1984.