

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima Ciencias Biológicas, Oceanográficas y

Recursos Naturales



“DISEÑO DE UN BIOENSAYO TOXICOLÓGICO PARA BIOCONCENTRACIÓN DE CADMIO EN *Crassostrea gigas*”

PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO EN ACUACULTURA

Presentado por:

HENRY ALEJANDRO CRUZ MERA

GUAYAQUIL – ECUADOR

2015

AGRADECIMIENTO

Al Dios de Abraham, de Isaac, de Jacob (Israel) y padre de nuestro Señor y Salvador
Jesucristo.

A mi familia, al Blgo. Omar Alvarado y a la Dra. Ana Tirapé por su apoyo y
colaboración para la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

Para ustedes.... futura familia.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

DIRECTORA

Ph.D. Ana Jesenia Tirapé Bajaña

EVALUADORA

Ph.D. Katuska Paola Calle Delgado

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Proyecto Integrador me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”.

Henry Alejandro Cruz Mera

RESUMEN

El presente trabajo presenta un diseño experimental para medir la bioconcentración de cadmio en ostras *Crassostrea gigas* durante 96 horas, para realizar de esta prueba los organismos serán expuestos a dos concentraciones $C_a = 110 \mu\text{g/L}$ y $C_b = 220 \mu\text{g/L}$; un grupo tendrá suministro de alimento y otro no. Los resultados obtenidos permitirán determinar la capacidad de bioconcentración de estos organismos y verificar si los rangos alcanzados están dentro de los niveles permisibles para el consumo humano.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA.....	ii
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN.....	iii
DECLARACIÓN EXPRESA.....	iv
RESUMEN.....	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ABREVIATURAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
INFORMACIÓN GENERAL	4
1.1 Bioensayos toxicológicos.....	4
1.2 Material biológico.....	7
1.2.1 Anatomía.....	8
1.2.2 Hábitat y factores medioambientales.....	8

1.2.3	Distribución.....	9
1.2.4	Importancia económica.....	9
1.3	Cadmio.....	10
1.3.1	Fuentes.....	11
1.3.2	Usos y aplicaciones.....	11
1.3.3	Asimilación en bivalvos.....	12
CAPÍTULO II.....		15
MATERIALES Y MÉTODOS.....		15
2.1	Etapa de mantenimiento de organismos.....	15
2.2	Etapa experimental subletal.....	17
2.2.1	Preparación de las concentraciones.....	20
2.2.2	Suministro de alimento.....	21
2.3	Determinación de Cd.....	23
2.3.1	En el medio.....	23
2.3.2	En organismos completos.....	24
2.4	Factor de bioconcentración.....	25
2.5	Análisis de datos.....	26
CAPÍTULO III.....		27
RESULTADOS ESPERADOS.....		27

3.1. Etapa de mantenimiento y aclimatación de los organismos.....	27
3.2. Etapa experimental subletal	27
3.3. Parámetros fisicoquímicos	28
3.5. Concentraciones de Cd en el agua	28
3.6. Concentraciones de Cd en organismos y FBC	29
RECOMENDACIONES	30
ANEXOS.....	35
ANEXO I – CONTROL GENERAL DE FACTORES	36
ANEXO II – MONITOREO DE CADMIO EN EL MEDIO.....	38
ANEXO III – SECADO DE ORGANISMOS	39
BIBLIOGRAFÍA	41

ABREVIATURAS

Cd	Cadmio
CL₅₀	Concentración letal media
CE₅₀	Concentración efecto medio
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
ppt	Partes por millón
mg/L	Miligramos por litro
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
ng/L	Nanogramos por litro
µg/L	Microgramos por litro
µg Cd/gPS	Microgramos de cadmio por gramo de peso seco
mg/kg	Miligramos por kilo
cm	Centímetros
c/u	Por cada uno
cel/org	Células por organismo

O₂	Oxígeno
μm	Micras
ml	Mililitros
cel/ml	Células por mililitro
HNO₃	Ácido nítrico
min	Minutos
ppb	Parte por billón
FBC	Factor de Bioconcentración

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura # 1.- Ostra del Pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>).	7
Figura # 2.- Esquema del sistema experimental.....	18
Figura # 3.- Solución comercial de Cd.	21
Figura # 4.- <i>Tetraselmis sp.</i> (a) vista microscópica y (b) concentración congelado de algas.	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla # I.- Tipos de bioensayos según el flujo de la solución de prueba.	6
Tabla # II.- Rangos de tolerancia de factores medioambientales para el crecimiento de <i>Crassostrea gigas</i>	9
Tabla # III.- Concentraciones límites permisibles de metales (mg/kg) presentes en ostras para el consumo humano.....	14
Tabla # IV.- Volúmenes a tomar de la solución madre de Cd para alcanzar concentraciones C_a y C_b	20

INTRODUCCIÓN

“La liberación de sustancias tóxicas en ecosistemas acuáticos produce una variedad de respuestas complejas en los organismos, las cuales precisan ser evaluadas. Las técnicas de evaluación de los efectos tóxicos letales y subletales por contaminantes, son realizadas a través de la implementación de pruebas de toxicidad; conocidas como bioensayos” [1].

Para el desarrollo de un bioensayo es necesario efectuar su estandarización, que consiste; en establecer una metodología común de relación entre los parámetros de cultivo (aislamiento, mantenimiento o cultivo masivo de los organismos de interés) y los experimentales, que aseguren la reproducibilidad del experimento; permitiendo comparar los resultados generados [2].

Dentro de los agentes considerados tóxicos, se encuentran los metales pesados que se transfieren a través de la cadena alimenticia mediante procesos de bioconcentración,

bioacumulación y biomagnificación en organismos acuáticos, con alto grado de eficiencia hasta consumidores finales como el hombre; tales como el cadmio [3].

La fuente principal de entrada del cadmio a los ambientes acuáticos proviene del lavado de las tierras de uso agrícolas, suelos donde se han aplicado elevadas cantidades de fertilizantes o agroquímicos [4]; que por escorrentías van a dar a los cuerpos de aguas dulces y/o salobres. Además, la industria en general constituye otra fuente de contaminación debido a las descargas de aguas sin previo tratamiento aportando impurezas de cadmio provenientes de aleaciones con varios metales, entre ellos; cobre, plomo, aluminio, plata, níquel y compuestos empleados en la pigmentación fotográfica, cerámica y reactores nucleares [5].

Cuando el cadmio está presente en el ambiente en una forma biodisponible; se conoce que los organismos acuáticos lo bioacumulan. Los factores de bioconcentración reportados para los invertebrados se encuentran en un intervalo de 113 a 18,000; mientras que para los vertebrados, como es en el caso de los peces entre 3 a 2,213 [6]. Al respecto, una gran parte de estudios realizados corresponden en crustáceo y moluscos.

Los moluscos bivalvos se consideran buenos agentes de monitoreo para evaluar la contaminación de ambientes acuáticos; principalmente porque su alimentación la realizan por filtración de materia particulada (algas y sedimentos) presente en la

columna de agua, hábito que facilita la incorporación de metales en sus tejidos blandos [4].

Bivalvos sésiles como las ostras, son incapaces de evadir las condiciones desfavorables de un ambiente acuático y se conoce que bioacumulan contaminantes. Varios estudios han demostrado que estos organismos permiten estimar la cinética de bioacumulación a través del diseño de experimentos en laboratorio [7].

“Los efectos potenciales del cadmio y otros metales pesados sobre la salud de los organismos y de sus consumidores, así como los factores biológicos y fisicoquímicos de control son temas de interés para muchos investigadores” [8].

Por este motivo, el objetivo principal de este caso de estudio es, proponer un bioensayo toxicológico para determinar los niveles de bioconcentración de cadmio en el bivalvo *Crassostrea gigas*, ostra de alto interés comercial y de producción acuícola en el país [9].

En consecuencia, la estandarización de este bioensayo de toxicidad, nos permitirá evaluar el grado de afectación y bioconcentración alcanzada en los organismos vivos (*Crassostrea gigas*) por exposición a concentraciones subletales de cadmio; simulando en un laboratorio la posible contaminación de ambientes acuáticos naturales o de producción acuícola por este metal.

CAPÍTULO I

INFORMACIÓN GENERAL

1.1 Bioensayos toxicológicos

Según FAO citado por Reish en 1986, se entiende por bioensayo; *“una prueba en que; un tejido, organismo o grupo de organismos vivos se usan como reactivo para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa, cuya actividad se desconoce”* [10, 11].

Los bioensayos, de manera general, son herramientas de diagnóstico adecuadas para comprobar los efectos de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales definidas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de

inhibición como de magnificación, los cuales son evaluados por las reacciones que causen en los organismos, tales como muerte, crecimiento, cambios morfológicos, histológicos o fisiológicos [12].

La finalidad de todo bioensayo es, establecer los límites permisibles para diferentes sustancias o productos que se descargan a las aguas, porque los análisis físicos y químicos de estas no son suficientes para comprender la toxicidad de cualquier producto, ni para evaluar el potencial contaminador de cualquiera de ellos sobre la biota. Los resultados obtenidos de los bioensayos, facilitan el establecimiento de criterios de calidad diferentes usos del agua, y en algunos casos estos son adoptados como normas sociales en diferentes países [13].

Los bioensayos, también llamados pruebas de toxicidad, pueden ser definidos de acuerdo a:

- Su duración: corto, mediano o largo plazo.
- El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etcétera.

Los más utilizados en laboratorio son los de tipo agudos y crónicos, debido a los efectos directos de los contaminantes sobre los organismos acuáticos a evaluar.

Las pruebas agudas miden la concentración letales media (CL_{50}) de un contaminante en una especie en particular; el valor calculado corresponde a la concentración del contaminante en particular que causa la muerte del 50% de la población experimental en un lapso de tiempo determinado (entre 48 o 96 horas). En contraste, las pruebas crónicas estiman la concentración efecto media (CE_{50}) de la sustancia de prueba (contaminante) que causa un efecto al 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado [14].

Independiente del tipo de bioensayo a utilizar, existen variantes según el método utilizado para incorporar la concentración del contaminante (solución prueba) y su flujo en el medio al que están expuestos los organismos durante el tiempo de exposición, los cuales se resumen en el siguiente cuadro:

Tabla # I.- Tipos de bioensayos según el flujo de la solución de prueba.

Flujo Estático	Se lleva a cabo, sin el flujo continuo del medio de las diluciones sometidas al ensayo [10].	Sin renovación	Misma solución de prueba el tiempo de duración del ensayo.
		Con renovación	Adición fresca de la solución de prueba cada 24 horas.
Flujo Continuo	Circula continuamente una corriente de sustancia de prueba nueva en contacto con los individuos experimentales [14].		

Fuente: Autor.

Antes de la exposición al contaminante, los organismos deben estar en buenas condiciones de salud, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo, y se mantienen en condiciones ambientales constantes. Además se dispone de grupos de

control (que no se exponen al tóxico). Luego se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados; posteriormente se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos [10].

1.2 Material biológico

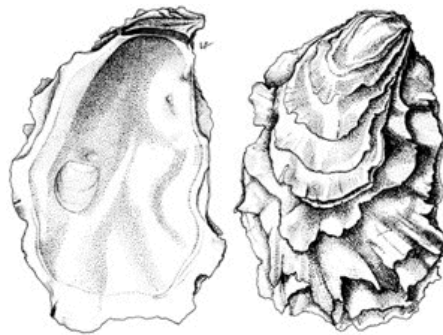


Figura # 1.- Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*).

Fuente: FAO, 2006 [15].

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Subclase: Pteriomorpha

Orden: Ostreoida

Familia: Ostreidae

Género: *Crassostrea*

Especie: *gigas*

N. común: Ostión japonés u ostra del Pacífico

Sistemática de la ostra del Pacífico.

Fuente: FAO, 2006 [15]

1.2.1 Anatomía

Concha pesada de forma variable e irregular, generalmente tienden a ser alargadas formada por dos valvas. La valva inferior o izquierda es cóncava con costillas grandes y fuertes, la cual se fija al sustrato; la valva derecha es plana con lamelas hacia los bordes (Figura # 1). La unión entre las dos valvas es llevada a cabo por un músculo aductor y a través de un ligamento situado en la parte posterior de la concha.

Presenta un color externo blanquecino opaco a amarillo cremoso con manchas púrpuras, el color interno es blanco ópalo a perlado regularmente con manchas parduscas [15].

1.2.2 Hábitat y factores medioambientales

En ambientes naturales, se la encuentra en estuarios, puertos y bahías de aguas tropicales y templadas. Se fija en cualquier tipo de sustrato duro en zonas protegidas y forma estructuras arrecifales en zona intermareal, es poco probable encontrarla en áreas lodosas y arenosas [16].

Los organismos adultos de *Crassostrea gigas* poseen una sorprendente capacidad para adaptarse a variaciones altas de los parámetros fisicoquímicos del agua, en especial aquellos que afectan a su distribución, como la temperatura y la salinidad. Las tolerancias a las condiciones medioambientales se resumen en la Tabla # II.

Tabla # II.- Rangos de tolerancia de factores medioambientales para el crecimiento de *Crassostrea gigas*.

Factor	Rango de Tolerancia	Rango Optimo
Temperatura	3-35 °C	11-34 °C
Salinidad	10-42 ppt	35 ppt
Alimento	1-55 mg/l de clorofila a	> 12 mg/l de clorofila a
Sedimentos en suspensión	0-100 mg/l	0-8 mg/l
Movimiento de agua	De estancamiento a fuerte oleaje	Flujos de marea pero sin fuerte acción de olas
Oxígeno disuelto	40-100%	> 70%
Ph	7,4-8,5	> 7,4

Fuente: Escuaderio, A. 2006 [17].

1.2.3 Distribución

Debido al rápido crecimiento y a su gran tolerancia a las condiciones ambientales, la ostra del Pacífico ha sido elegida para el cultivo en diversas regiones del mundo. Como especie nativa, es originaria de Japón, en donde se le ha cultivado durante siglos, después fue introducida en el resto del mundo, en particular en las costas occidentales de los Estados Unidos a partir de la década de los 20, y en Francia desde 1966. Así también como en otros países de oriente, como: Filipinas, Malasia, Israel, Rumania, Ucrania y en el occidente en Belice, Puerto Rico, Costa Rica, Ecuador y Brasil [15].

1.2.4 Importancia económica

La ostra del Pacífico es la principal especie de ostra cultivada a nivel mundial, representando el 98% de la producción total de ostras; los principales países productores son: Japón, China, Francia, Estados Unidos y México [18]. Sin embargo

los Estados Unidos es el principal importador de ostras, en especial de *Crassostrea gigas* provenientes de China y Japón; seguido de Francia, Bélgica y Canadá.

En el Ecuador, los primeros desoves y producción de semilla se dieron en los años 90 a cargo del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), logrando cerrar el ciclo y estableciendo un protocolo para su producción en camaroneras o en mar abierto. Bajo la metodología de mantenimiento y maduración de reproductores el CENAIM consta con producciones propias para la comercialización de 500 ostras adultas por mes y hasta de 500 mil semillas bajo pedido de forma bi-mensual [19].

Además, hoy en día, *“el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP), a través de la Subsecretaría de Acuicultura, ejecuta proyectos de Maricultura y Piscicultura para el fomento acuícola en el Ecuador; dentro de estos, se contempla la producción de cultivos acuícolas marinos como la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*; en ambientes estuarinos y mar abierto para el desarrollo de comunidades costeras del país”* [9].

1.3 Cadmio

Uno de los mayores agentes tóxicos asociado a contaminación ambiental e industrial es el cadmio, puesto que reúne las características más temidas de un tóxico;

como lo son: efectos adversos para el hombre y el medio ambiente, bioacumulable, persistente en el medio ambiente y viaja grandes distancias con el viento y en los cursos de agua [20].

El cadmio está presente en el grupo II de la tabla periódica con número atómico de 48 y signo Cd, es un metal maleable y dúctil; en la mayoría de los compuestos que forma exhibe el estado de oxidación +2. Se obtiene como subproducto del tratamiento metalúrgico del zinc y del plomo, a partir de sulfuro de cadmio; en el proceso hay formación de óxido de cadmio, compuesto muy tóxico.

1.3.1 Fuentes

En forma natural, el Cd está presente en diferentes tipos de rocas, en el sedimento marino y en el agua de mar y ríos, como resultado de las erupciones volcánicas y de los incendios forestales. Sin embargo, las actividades antropogénicas han superado en gran medida el aporte de estas fuentes naturales, introduciendo en el medio marino grandes cantidades de este metal proveniente de la contaminación de suelos agrícolas, efluentes residuales industriales, desechos de la minería y vertederos domésticos [21].

1.3.2 Usos y aplicaciones

Entre los principales usos y aplicaciones que se le atribuyen al Cd, tenemos: pigmento en pinturas, esmaltes, plásticos, textiles, vidrios, tintas de impresión,

caucho, lacas en aleación con cobre, aluminio y plata. Así también en la producción de pilas de cadmio-níquel, estabilizador de termoplásticos (PVC); en fotografía, litografía y procesos de grabado. Empleado como endurecedor de ruedas y llantas de automóvil, en la fabricación de células solares fotoeléctricas y controles de reactores nucleares.

Los usos tan diversos y su larga vida media no permiten el reciclaje, por lo que se acumula progresivamente en el ambiente.

1.3.3 Asimilación en bivalvos

La concentración del cadmio (Cd) en ambientes acuáticos varía entre órdenes de magnitud de $\eta\text{g/L}$ a $\mu\text{g/L}$ y se distribuye en dos fracciones, una disuelta y otra particulada; la fracción más biodisponible es la disuelta, ya que corresponde a iones libres y a complejos con ligandos inorgánicos. Sin embargo, indiferente de la fracción que esté presente en el agua, los organismos filtradores pueden asimilar más del 50% del metal del medio acuático [22].

Estudios señalan que las concentraciones altas de fitoplancton y metales en el ambiente, son propicias para el aumento de la tasa de asimilación de metales en los bivalvos; debido a que las microalgas exhiben mecanismos para la remoción de los metales que están disueltos en el agua incrementando de la fracción particulada disponible [23]. En consecuencia, se espera que los mayores niveles de acumulación

de metales pesados en organismos bivalvos se lleve a cabo durante la temporada invernal; etapa donde los aportes de nutrientes y metales en la zona fótica incrementan considerablemente y los afloramientos de fitoplancton son mayores [24].

Sin embargo, ***“la bioacumulación de metales en bivalvos depende de las propiedades físico-químicas de los elementos en cuestión, así como de las necesidades metabólicas de los organismos y la disponibilidad de éstos en la columna de agua y/o alimentos”*** [25].

En el bivalvo *Mytelus edulis* la tasa de retención de metales es de 1 a 3% por día y con una eficiencia de asimilación de la fracción particulada entre 47 a 82% para Cd [26]. En la especie *Crassostrea virginica* se reportaron niveles alcanzados por exposición a 160 µg/L de cadmio durante una semana; observándose en el manto una concentración de 25,4 µg Cd/g peso seco y en la glándula digestiva 52,0 µg Cd/g peso seco después del tiempo de exposición [27].

Considerables proporciones de Cd y otros metales bioacumulables en bivalvos destinados para la alimentación humana, pueden representar serios riesgos para la salud. En consecuencia, existen normas sanitarias de varios países que estipulan límites permisibles de metales presentes en ostras destinadas para el consumo, los cuales se resumen en la Tabla # III. Además de estipular los límites permisibles de

metales; entidades gubernamentales de ciertos países regulan la producción global de ostras, incluyendo: el cultivo, captura y comercialización; así también de legislar que tipo de ostra puede ser cultivada o capturada en zonas certificadas; con el fin de garantizar su calidad y evitar problemas de salud pública por motivos de contaminación acuática.

Tabla # III.- Concentraciones límites permisibles de metales (mg/kg) presentes en ostras para el consumo humano.

Metal	Límite Permisible			
	MÉXICO	USA	EU	ESPAÑA
Cd	0,5	4,0	2,0	1,0
Pb	1,0	1,7	3,0	3,0-1,5
As	2,0-4,0	86,0	n.s.	4,0
Hg	1,0	1,0	1,0	0,5
Cr	n.s.	13,0	n.s.	-
Ni	n.s.	80,0	n.s.	-
Cu	-	-	-	20

Fuente: Lango-Reynoso, F. *et al*, 2010 [28].
(n.s.: no estándar, -: no registra)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Etapa de mantenimiento de organismos

Debido a que la ostra *Crassostrea gigas* es una especie introducida al país, no se encuentra disponible en bancos naturales para su recolección; en consecuencia, los organismos adultos pueden ser adquiridos a través de la compra directa al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) o en los establecimientos de ostricultura que se encuentran en la costa de la provincia de Santa Elena, entre ellos: la Cooperativa de Producción, Extracción de Pesca y Acuicultura Artesanal “Puerto Real Alto” de la parroquia Chanduy o en la Asociación de pescadores “El Palmar” de la parroquia Colonche, entidades que se encargan del cultivo, engorde y comercialización del bivalvo.

Para la realización del bioensayo se requerirán 90 organismos vivos de tallas mayores a 7 cm de largo, que tengan el mismo tiempo de cultivo (12-14 meses); para así, obtener ostras adultas con parámetros morfométricos (largo, ancho, alto y peso) lo más homogéneos posible. Se recomienda adquirir un 20% más del total de organismos requeridos para el bioensayo (118-120 ostras en total), considerando mortalidades en la etapa de mantenimiento y/o aclimatación.

El traslado de las ostras del lugar de adquisición hasta el laboratorio donde se ejecutará el bioensayo, se lo realizará en el interior de fundas plásticas dobles (utilizadas para el transporte de larvas de camarón) con agua de mar del sitio de aprovisionamiento de los organismos, evitando así el choque osmótico y térmico por variaciones de salinidad y/o temperatura respectivamente. Evitar variaciones de estos parámetros durante el transporte hacia el laboratorio, ya sea por adición de agua salobre por derrames en los contenedores o por exponer al sol el material de transporte durante el viaje. Se recomienda colocar 15 ostras por funda, correctamente amarrada por el extremo abierto; dentro de gavetas plásticas y tapadas con plástico negro.

Una vez que los organismos lleguen al laboratorio, deberán ser lavados y separados de epibiontes o suciedad adheridas a las valvas con un cepillo de plástico y acción mecánica de corriente de agua destilada; para después ser colocados en acuarios con agua de mar filtrada.

En esta etapa empieza el proceso de aclimatación de los organismos, la cual se la realizará por 72 horas sin suministro de alimento (algas) con aireación permanente a temperatura de 25°C y salinidad de 35 ppt; parámetros medioambientales óptimos contemplados en la Tabla # II, que deberán ser monitoreados cada 6 horas junto con el pH y registrados en la bitácora Control General de Factores (Anexo I).

Los organismos serán colocados dentro del sistema experimental (5 ostras/acuario) antes de ser sometidos al bioensayo, se realizará extracción diaria de heces con recambios del 15% del volumen total de cada acuario. Así, previo de iniciar la etapa de experimentación, las ostras estarán adecuadamente aclimatadas dentro del sistema evitando mortalidades por manipulación (se considerará la muerte de un organismo, cuando presente la apertura permanente de las valvas).

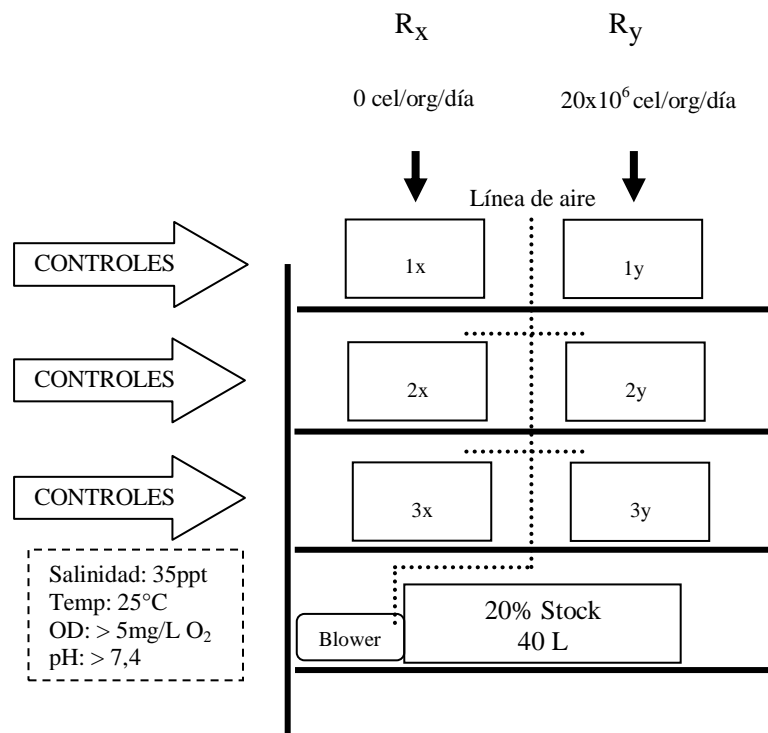
2.2 Etapa experimental subletal

El bioensayo se llevará a cabo con los mismos parámetros y factores presentados en la etapa de mantenimiento, con la variación de: 1) adición de dos concentraciones subletales de Cd, 2) suministro de alimento (algas) para cada concentración empleada y 3) recambios diarios del 100% del medio por acuario.

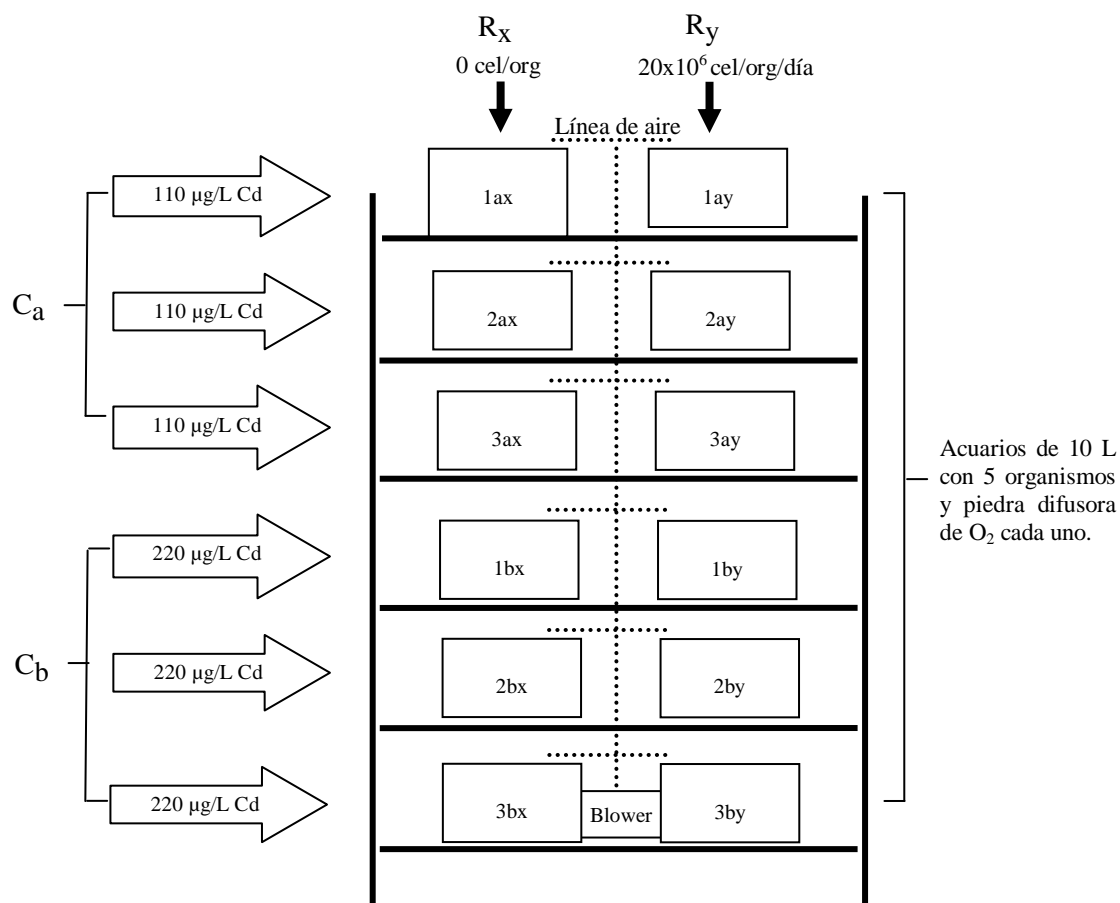
El sistema empleado será de flujo estático con renovación del 100% del medio cada 24 horas y constará: con 18 acuarios de vidrio de 10 L de capacidad cada uno, en los cuales se colocarán 5 organismos, más un acuario de 40 L para tener en stock el 20%

de ostras para sustitución por mortalidad en la etapa de aclimatación, como se muestra en el siguiente diagrama.

Figura # 2.- Esquema del sistema experimental



(a) Acuarios (10 L con 5 ostras c/u) controles por triplicado para cada ración (R_x y R_y) de algas diarias a suministrar.



(b) Acuarios por triplicado para cada concentración de Cd (C_a y C_b) empleada durante la etapa experimental.

Fuente: Autor

Los acuarios estarán etiquetados según: el número de réplica (1,2 o 3), la ración diaria de alimento suministrado (x o y) y la concentración de Cd (a o b) expuesta, para mayor control y seguimiento por acuario en el registro de la bitácora general.

Para efectuar los recambios tanto para el grupo control como los experimentales, durante la etapa de aclimatación y el bioensayo; se requerirán 1000 L agua de mar filtrada a $0,2 \mu\text{m}$; volumen que puede ser adquirido en el CENAIM.

2.2.1 Preparación de las concentraciones

Las concentraciones subletales de Cd a utilizar son: $C_a = 110 \mu\text{g/L}$ y $C_b = 220 \mu\text{g/L}$; que se encuentran dentro del range finder calculado y realizado por Barreira [29] en un bioensayo de efectos letales en *Crassostrea virginica* y guardan relación con pruebas realizadas en la misma especie por varios investigadores anteriormente. Las concentraciones empleadas serán alcanzadas a partir de una solución madre comercial de Cd (1 g/L) de 100 ml aprox. (Figura # 3), agregando el volumen correspondiente de esta solución a cada acuario según la ecuación:

$$C_i * V_{i(a,b)} = C_{f(a,b)} * V_f$$

C_i = Concentración inicial = $1 \times 10^6 \mu\text{g/L}$ (1g/L)

C_{fa} = Concentración final a = $110 \mu\text{g/L}$

C_{fb} = Concentración final b = $220 \mu\text{g/L}$

V_{ia} = Volumen inicial a

V_{ib} = Volumen inicial b

V_f = Volumen final = 10 L

Para alcanzar las concentraciones deseadas, se deberá tomar de la solución madre las cantidades V_{ia} y V_{ib} de la Tabla # IV y adicionar en los acuarios de 10 L.

Tabla # IV.- Volúmenes a tomar de la solución madre de Cd para alcanzar concentraciones C_a y C_b .

Concentración		Volumen	
C_{fa}	110 $\mu\text{g/L}$	1,1 ml*	V_{ia}
C_{fb}	220 $\mu\text{g/L}$	2,2 ml*	V_{ib}

Fuente: Autor

* multiplicada por 1000 para convertir de L a ml.



Figura # 3.- Solución comercial de Cd.

Fuente: Instrumentación Científica Técnica, S.L. [30].

Las concentraciones a utilizar tendrán réplicas por triplicado, se consignará con un grupo de control general también por triplicado (Figura # 2); cada vez que se realicen los recambios diarios del 100% del medio, se añadirá solución fresca de Cd para alcanzar las concentraciones requeridas por réplica.

2.2.2 Suministro de alimento

Para la alimentación de los organismos, se suministrará por grupo: $R_x = 0$ millones de células/ostra/día (sin alimentar) y $R_y = 20$ millones de células/ostra/día, ración que cumple con los requerimiento diarios en ostras adultas [29]; para determinar si la presencia de fitoplancton induce a una asimilación mayor de Cd en los bivalvos según lo planteado por Campbell *et al.* [23]. El suministro de algas será a partir de un concentrado de 500 ml de *Tetraselmis sp.* a 5×10^6 cel/ml (Figura 4), el cual será adquirido en el CENAIM.

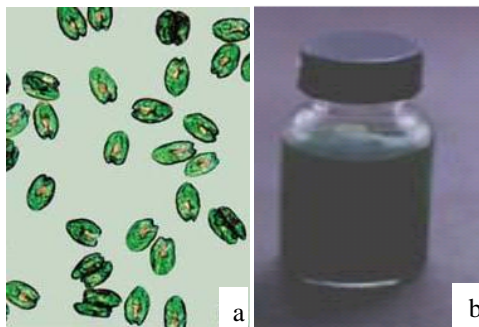


Figura # 4.- *Tetraselmis sp.* (a) vista microscópica y (b) concentración congelado de algas.

Fuente: (a) FAO, 2006 [15] y (b) Barreira, 2006 [29].

Para proporcionar las 20×10^6 células/ostra/día al grupo de acuarios que se va a alimentar, se colocará del concentrado de algas (5×10^6 cel/ml) 4 ml diarios por cada organismo vivo dentro de los acuario; después de realizar el recambio del medio en la etapa experimental.

Se presentan dos alternativas a seguir para la alimentación de los organismos, podrían ser:

- a) Inmediatamente después de agregar las concentraciones de Cd para la renovación del medio; adicionar la cantidad de algas requeridas por acuario por un tiempo determinado (1 a 2 horas), seguido de otro recambio del 100%.
- b) Antes de realizar el recambio de las 24 horas, adicionar con dos horas de anticipación el requerimiento de algas por ostra.

Esta metodología para la alimentación de los organismos, permitirá que la concentración de Cd presente en el medio no presente variaciones significativas, debido a la posible captación del metal por las algas que no sean filtradas por las ostras.

2.3 Determinación de Cd

Para la determinación de las concentraciones de Cd, se usará el método de espectrofotometría de absorción atómica, tanto para la medición de Cd en el medio (agua de los acuarios), así también en el tejido de las ostras. Para ambas muestras, se detalla a continuación la metodología a seguir.

2.3.1 En el medio

Con el fin de determinar, si las concentraciones de Cd a usar son estables durante cada recambio del medio; se procederá a tomar una muestra de agua a las 12 y 24 horas después de haber realizado el recambio en cada acuario expuesto a Cd en la etapa de experimentación (se seleccionarán 2 acuarios al azar por día para realizar esta prueba).

Se tomarán 45 ml de agua de los acuarios en vasos de precipitación y se adicionará 5ml de ácido nítrico (HNO_3) al 65%, con el fin de digerir toda materia orgánica que pueda interferir con la lectura del metal; tapar después de 5 min y llevar a un horno microondas durante 10 min a 80% de la potencia del aparato [29] y dejar enfriar para realizar la lectura en el espectrofotómetro. En caso de no realizar de forma inmediata

la lectura, etiquetar según el acuario al que pertenece la muestra y refrigerar a 5 °C para su posterior lectura.

Las de concentraciones de Cd presentes en la muestra serán medidas por espectrofotometría absorción atómica de horno de grafito por ser concentraciones bajas (ppb), los datos por muestra serán registrados en la hoja de Monitoreo de Cd en el medio (Anexo II).

Una vez obtenido los datos de las lecturas, se procederá a determinar la media y la variación de las concentraciones de Cd empleadas (C_a y C_b) en el medio, durante la exposición de los organismos; resultado que nos servirá para realizar el factor de bioconcentración (Sección 2.4).

2.3.2 En organismos completos

Al cabo de las 96 horas de la etapa experimental; todos los organismos vivos que quedaren en el sistema serán extraídos completamente de entre sus valvas, como muestra de tejido final para determinar la concentración de Cd por ostra. Se procederán a pesar utilizando una balanza analítica en capsulas de porcelana (debidamente etiquetada según la concentración de Cd expuesta, réplica y acuario de procedencia del organismo) para cada organismo; posteriormente se someterán las muestras a secado total a 70 °C en el interior de una estufa durante el tiempo necesario hasta alcanzar peso constante [31] (Anexo III).

Después, se trituran las muestras secas en un molino hasta obtener un polvo homogéneo, para ser llevadas a proceso de digestión; la digestión podrá ser realizada por método EPA y las lecturas se realizarán por absorción atómica de flama de aire-acetileno. Se considerará los valores medios con sus respectivas desviaciones estándar de las concentraciones de Cd medidas de los organismos por réplicas para el desarrollo de los resultados.

Para la calibración del equipo a usar, se deberá contar con la curva estándar para el elemento a partir de las soluciones estándar (0,03; 0,06; 0,1; 0,3 mg/L), y luego realizar las lecturas del blanco y de las muestras de agua y organismos. Las unidades de absorbancia deberán ser comprobadas de tal manera que se cumplan con la curva, lo cual se verificará con las concentraciones de control [32].

2.4 Factor de bioconcentración

Una vez obtenidos los resultados promedios de las concentraciones de Cd en el medio y en los organismos, por concentración de exposición ($C_a = 110 \mu\text{g/L}$ y $C_b = 220 \mu\text{g/L}$) y por la ración diaria de alimento ($R_x = 0 \text{ cel/org/día}$ y $R_y = 20 \times 10^6 \text{ cel/org/día}$), se calculará el factor de bioconcentración [29] a partir de la siguiente ecuación; para cada variable presentada en el bioensayo.

$$\mathbf{FBC}_{(ax, ay, bx \text{ y } by)} = \mathbf{Ct} / \mathbf{Ca}$$

FBC= Factor de bioconcentración

Ct= Concentración en organismo = $\mu\text{g/gPS}$

Ca= Concentración en el agua = $\mu\text{g/L}$

2.5 Análisis de datos

En primera instancia, se realizará un análisis de varianza de los datos obtenidos en el bioensayo para confirmar las hipótesis planteadas (la bioconcentración en los organismos es proporcional a las dos concentraciones de cadmio expuesta y al suministro de alimento dado) a través del programa IBM - SPSS Statistics. En caso de que se obtengan varianzas homogéneas, independencia de los errores, distribución normal de los residuos; se empleará para el análisis de los datos, el método paramétrico ANOVA para cada tratamiento; caso contrario se aplicará un método no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis, la prueba de rangos de Steel Many o la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con el ajuste de Bonferroni) [12].

CAPÍTULO III

RESULTADOS ESPERADOS

3.1. Etapa de mantenimiento y aclimatación de los organismos

El tiempo de mantenimiento de 72 horas sea conveniente, esperando mortalidades no mayores al 20% de los organismos requeridos para el bioensayo (90 ostras).

3.2. Etapa experimental subletal

La mortalidad presente durante la etapa experimental sea mínima, para que el número de la muestra (organismos) por tratamiento al final del bioensayo, sea significativa para realizar el análisis estadístico.

3.3. Parámetros fisicoquímicos

Se espera que las fluctuaciones de estos parámetros durante la etapa de mantenimiento y experimental sean mínimas con desviaciones estándar máximas de $\pm 0,7$ unidades por parámetro, encontrándose dentro del rango de tolerancia para los organismos.

3.4. Concentraciones subletales empleadas (110 y 220 $\mu\text{g/L}$)

Pretendemos que las concentraciones de exposición sean subletales para *Crassostrea gigas*, ya que fueron calculadas y empleadas en *Crassostrea virginica* por Barreira (2006); organismos del mismo género. Estas concentraciones a emplear, están entre el rango utilizado por Frazier, 1979 (160 $\mu\text{g/L}$) [27] y Guzmán-García *et al.*, 2007 (100 $\mu\text{g/L}$) [25] en bioensayos similares.

Además, guardan relación con el límite máximo permisible de cadmio (0,2 mg/L) para la descarga en un cuerpo de agua marina según TULSMA [33].

3.5. Concentraciones de Cd en el agua

Las 2 concentraciones de Cd empleadas para exposición no tengan variaciones significativas durante el recambio del medio por día (12 y 24 horas). Se espera una ligera variación de las concentraciones empleadas en los acuarios donde se suministrará alimento (algas).

3.6. Concentraciones de Cd en organismos y FBC

Los organismos incorporen el metal en cantidades proporcionales a las concentraciones de exposición empleadas en el medio (C_a y C_b); más aun en los acuarios donde se administró algas, esperando una asimilación mayor del metal.

RECOMENDACIONES

I. Controles de calidad:

Para contar con resultados confiables y reproducibles durante la prueba de toxicidad, se deberán utilizar métodos aprobados y estandarizados que garanticen la exactitud de los datos obtenidos. En consecuencia, a continuación se detallan algunos procedimientos de control de calidad y actividades obligatorias a realizar durante el bioensayo.

- c) Se deberá utilizar equipos que cuenten con un programa de mantenimiento y calibración periódica para realizar las mediciones de parámetros fisicoquímicos.
- d) Para la calibración de los equipos que requieran soluciones de referencia (espectrofotómetro), la solución patrón debe ser previamente valorada con referencia a una solución o reactivos certificados.
- e) El tóxico de referencia (Cd), deberá seleccionarse de una solución o compuesto soluble con un porcentaje de pureza $\geq 99\%$.

- f) El material biológico (ostras) empleado para el bioensayo deberán pasar por un control de calidad el momento de su adquisición; que su origen sea de un mismo lote de producción, se deberán evitar ostras con malformaciones, de diferentes días de cultivo, con exceso de epibiontes adheridos, variabilidad alta de talla, entre otras.

II. Material de a emplear:

- g) Los acuarios deberán ser de vidrio, en ningún de los casos utilizar de plástico, el cual puede absorber el Cd presente en las diluciones.
- h) Los tubos de ensayo para la digestión de la muestra de agua deberán ser con tapa rosca, de vidrio reforzado o revestidos en el interior con teflón.

III. Transporte y Mantenimiento de organismos:

- a) El transporte sea directo y lo más corto posible para evitar estrés y/o mortalidades de los organismos.
- b) Para cuando lleguen los organismos al laboratorio, es necesario que el sistema experimental esté debidamente estructurado, con los volúmenes de agua correspondientes por acuario, con los parámetros óptimos establecidos en la Tabla # 2 y el sistema de aireación en perfecto funcionamiento.

IV. Esquema experimental:

- a) Para controlar la temperatura de 25°C en los acuarios, se lo realizará a través de la temperatura ambiente del cuarto temperado por medio de un aire acondicionado.
- b) Los acuarios serán etiquetados y colocados al azar en la conformación del sistema (disposición diferente a la Figura # 2), con la finalidad de minimizar los efectos de las variables externas (temperatura, luminosidad, entre otras) que puedan alterar los resultados por réplica.

V. Preparación de Concentraciones de Cd:

- a) En caso de que no se emplee la solución comercial de Cd (1g/L) expuesta en este estudio, se puede acceder a cualquier otra (preparada en laboratorio o de origen comercial) a diferente concentración de solución (ppt, ppm, ppb, etc...) siempre que se realicen los cálculos oportunos para obtener las concentraciones de exposición (110 y 220 µg/L) deseadas descritas en el bioensayo.

VI. Suministro de Alimento:

- a) De igual forma que en la solución madre de Cd, el concentrado de algas utilizado puede estar a una concentración (cel/ml) diferente; con la condición que se cumpla con la ración diaria a suministrar de 20×10^6 cel/org/día haciendo los cálculos respectivos.

- b) En intervalos de 6 horas (después de tomar los parámetros fisicoquímicos) suspender durante media hora la aireación para facilitar la ingesta de las algas por las ostras.

VII. Recambios de agua:

- a) Considerar que el volumen de agua filtrada en total a emplear es de aprox. 1T (1000 L), debido a los altos recambios en la etapa experimental. En consecuencia, planificar con antelación el suministro y transporte de agua antes de iniciar el bioensayo.
- b) Los recambios diarios del 100%, tienen el fin de garantizar que no exista la acumulación de las concentraciones de Cd y de algas por encima de lo establecido diariamente en el medio durante el bioensayo.
- c) Se deberá tener a disposición 180 L diarios de agua filtrada con los parámetros establecidos en el sistema (35ppt, 25°C, > 5mg/L O₂ y pH > 7,4) previo a realizar los recambios en la etapa experimental.

VIII. Lavado de material:

- a) Los materiales empleados como: acuarios, frascos, recipientes y materiales en general que tendrán contacto con las soluciones de Cd; deberán ser lavadas con detergente neutro y agua corriente, para luego pasar por una solución de ácido nítrico al 5% y enjuague con agua destilada.

IX. Depósito de desechos:

- a) Los volúmenes de agua que contengan Cd (producto de los recambios en la etapa experimental), se depositarán en baldes de 20 L y se precipitarán con 0,1 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) [25]; ya que se encuentra por encima del límite permisible (0,02 mg/L) según el TULSMA [33], para la descarga directa al sistema de alcantarillado público o a un cuerpo de agua dulce. Una vez realizado el tratamiento, el sobrenadante se desechará por el drenaje y el precipitado se recolectará en una poma general para su almacenaje y disposición final como desecho peligroso.

X. Proceso de digestión de los organismos:

- a) En caso de que no se procesaren todas las muestras en el mismo día, los organismos serán procesados por grupos y congelados previo a la etapa de deshidratación.

XI. Espectrofotometría de absorción atómica:

- a) Según el equipo que se vaya a usar para la medición de las concentraciones de Cd; se deberá realizar el protocolo del fabricante para la preparación de las muestras antes de realizar las lecturas.

ANEXOS

ANEXO I – CONTROL GENERAL DE FACTORES

Control General de Factores					
Etapa	Mantenimiento / Experimental		Acua	“etiqueta”	
			Alim	sin / con	
			[Cd]	110 μgL^{-1} / 220 μgL^{-1}	
Horas	Factor	Lectura	Horas	Factor	Lectura
0	OD		6	OD	
	% Saturación OD			% Saturación OD	
	Salinidad			Salinidad	
	Temperatura			Temperatura	
	Ph			pH	
	Mortalidad			Mortalidad	
Horas	Factor	Lectura	Horas	Factor	Lectura
12	OD		18	OD	
	% Saturación OD			% Saturación OD	
	Salinidad			Salinidad	
	Temperatura			Temperatura	
	pH			pH	
	Mortalidad			Mortalidad	
Horas	Factor	Lectura	Horas	Factor	Lectura
24	OD		30	OD	
	% Saturación OD			% Saturación OD	
	Salinidad			Salinidad	
	Temperatura			Temperatura	
	pH			pH	
	Mortalidad			Mortalidad	
Horas	Factor	Lectura	Horas	Factor	Lectura
36	OD		42	OD	
	% Saturación OD			% Saturación OD	
	Salinidad			Salinidad	
	Temperatura			Temperatura	
	pH			pH	
	Mortalidad			Mortalidad	
Horas	Factor	Lectura	Horas	Factor	Lectura
48	OD		54	OD	
	% Saturación OD			% Saturación OD	
	Salinidad			Salinidad	
	Temperatura			Temperatura	
	pH			pH	
	Mortalidad			Mortalidad	

Control General de Factores					
Etapa	Mantenimiento / Experimental		Acua	“etiqueta”	
			Alimt	sin / con	
			[Cd]	110 μgL^{-1} / 220 μgL^{-1}	
Horas	Factor	Lectura	Horas	Factor	Lectura
60	OD		66	OD	
	% Saturación OD			% Saturación OD	
	Salinidad			Salinidad	
	Temperatura			Temperatura	
	pH			pH	
	Mortalidad			Mortalidad	
Horas	Factor	Lectura	Horas	Factor	Lectura
72	OD		78	OD	
	% Saturación OD			% Saturación OD	
	Salinidad			Salinidad	
	Temperatura			Temperatura	
	pH			pH	
	Mortalidad			Mortalidad	
Horas	Factor	Lectura	Horas	Factor	Lectura
84	OD		90	OD	
	% Saturación OD			% Saturación OD	
	Salinidad			Salinidad	
	Temperatura			Temperatura	
	pH			pH	
	Mortalidad			Mortalidad	
Horas	Factor	Lectura			
96	OD				
	% Saturación OD				
	Salinidad				
	Temperatura				
	pH				
	Mortalidad				

ANEXO II – MONITOREO DE CADMIO EN EL MEDIO

Monitoreo de Cd en el medio									
Ca = 110 µg/L					Cb = 220 µg/L				
Acuario réplica	Día	Horas	[Cd]sin algas	[Cd]con algas	Acuario	Día	Horas	[Cd]sin algas	[Cd]con algas
		12					12		
		24					24		
		12					12		
		24					24		
		12					12		
		24					24		
		12					12		
		24					25		
		12					12		
		24					25		
		12					12		
		24					25		

ANEXO III – SECADO DE ORGANISMOS

Secado de Organismos					
Acuario	Org.	Peso (Cápsula y Muestra)	Peso a las 12 h	Peso a las 18 h	Peso a las 24 h
1ax	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
2ax	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
3ax	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
1ay	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
2ay	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
3ay	1				
	2				
	3				
	4				
	5				

Secado de Organismos					
Acuario	Org.	Peso (Vaso y Muestra)	Peso a las 12 h	Peso a las 18 h	Peso a las 24 h
1bx	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
2bx	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
3bx	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
1by	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
2by	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
3by	1				
	2				
	3				
	4				
	5				

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Larrain, A. 1995. Criterios toxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parametros de control: Importancia de los Bioensayos de Toxicidad. Revista científica y Tecnologia del Mar. Cona. 39-47 p.
- [2] Silva, J.; Fuentealba, C.; Bay-Schimith, E. & Larrain, A. 2007. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un toxico de referencia. Chile. Guyana 71(2): 135-141 p.
- [3] Spacie, A. y L. Hamelink. 1985. Bioaccumulation. Fundamentals of Aquatic toxicology. Hemisphere publishing Corporation. USA. 495-546 p.
- [4] United Nations Enviroment Programme (UNEP) 1985. Regional seas: GESAMP: cadmium, lead and tin in the marine environment. UNEP regional Seas Report and Studies N 56 GESAMP Report and Studies. UNEP, Paris. 22: 1-62 p.
- [5] Guzmán, G. 2001. Toxicocinética de cadmio y daño histopatológico en ostión *Crassostrea virginica* en condiciones de ayuno y alimentación. Mexico.
- [6] USPHS. 1997. Toxicological profile for cadmium in CDROM. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

- [7] Cruz-Rodríguez, A.L. & Fu-Lin, E.C. 2002. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* 60: 157-168.
- [8] Roesijadi, G.; L. Brubacher; M. Unger y R. S. Anderse. 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen. *Comp. Bioche. Physiol. Pharmacol. Toxicol & Endocrinology*. 2: 171-176 p.
- [9] Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) 2014. MAGAP siembra ostra del Pacífico en Santa Elena. Recuperado el 5 de Febrero de 2015, de <http://www.viceministerioap.gob.ec/subpesca1978-magap-siembra-ostra-del-pacifico-en-santa-elena.htm>.
- [10] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 1981. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. 4ta Parte. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO, Doc. Tec. Pesca. (164): 34 p.
- [11] Reish, D. J. 1986. Manual of methods in aquatic environment research. Part. 10. Short term bioassays. FAO. Fish. Tech. Paper. (247): 62 pp.
- [12] Castillo Morales, Gabriela. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA. México.
- [13] Sprague, J. B. 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish I. Bioassay methods for acute toxicity. *Wat. Res. Pergamon Press. U. K. Vol. 3. pp: 793-821*

- [14] Esclapés, M. 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. PDVSA. INTEVEP. 213 p.
- [15] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme. Recuperado el 04 de Febrero de 2015, de http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es.
- [16] Nehring, S. 2011. NOBANIS. Invasive Alien Species Fact Sheet *Crassostrea gigas*. Fecha de actualización: 14 de marzo de 2011. http://www.nobanis.org/files/fact_sheets/Crassostrea%20gigas.pdf.
- [17] Escudeiro, A. 2006. Crecimiento y reproducción de la ostra rizada *Crassostrea gigas* cultivada en zona intermareal y en batea en Galicia. España.
- [18] Bermúdez, P. 2006. Cultivo suspendido de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*. Guía Técnica. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero – FONDEPES. Chile
- [19] CENAIM. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas. Diversificación. Recuperado el 02 de marzo del 2015 de <http://www.cenaim.espol.edu.ec/node/95>.
- [20] Brigden, K.; I. Labunska; R. Stringer; P. Johnson; D. Santillo y J. Ashton. 2000. Perfiles toxicológicos para contaminantes clave: Cadmio. Argentina. Green Peace. Nota Técnica: 11-14 p.
- [21] GESAMP. 1985. Cadmium, lead and tin in the marine environment. UNEP Regional Seas. Reports and Studies. 56-90 p.

- [22] Wang, W.X. & N.S. Fisher. 1998. Accumulation of trace elements in a marine copepod. *Limnology & Oceanography* 43 (2): 273-283 p.
- [23] Campbell A.J., Humayun M. and Weisberg M.K. 2002. Siderophile element constraints on the formation of metal in the metal-rich chondrites Bencubbin, Weatherford, and Gujba. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 647-660 p.
- [24] Vidal, G.B. 2009. Identificación de las variables que intervienen en la acumulación de cadmio en los moluscos filtradores. Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile.
- [25] Guzmán-García, X.; Martínez-López, A.; Rodríguez-Medina, L.; González-Márquez, H. y Vázquez-Botello, A. 2007. Cambios tisulares en el ostión *Crassostrea virginica* por exposición y depuración al cadmio. *Hidrobiológica* 17 (1 Suplemento): 41-48.
- [26] Wang, W.X.; Fisher, N.S. & Louma, S.N. 1996. Kinetic determination of trace elements bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*. 140: 91-113 p.
- [27] Frazier, J. 1979. Bioaccumulation of Cadmium in Marine Organisms. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 28. pp, 75-79 p.
- [28] Lango-Reinoso, F.; Landeros-Sánchez, C. and Castañeda-Chávez, M. 2010. Bioaccumulation of cadmium (Cd), lead (Pb) and arsenic (As) in *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), from Tamiahua lagoon system, Veracruz-México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 26 (3) 201-210 p.

- [29] Barreira, Guadalupe. 2006. Toxicidad del cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la laguna de Mandinga, Veracruz-Mexico. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- [30] Instrumentación Científica Técnica, S.L. 2015. Catálogo. Soluciones estándar para control de calidad analítica, MERCK. Recuperado el 15 de abril de 2015 de <http://www.ictsl.net/productos/instrumental/0000009f3a132c45c.html>.
- [31] Castillo, Isabel; Acosta, Vanesa; Martínez, Gregorio y Núñez Maximiano. 2005. Niveles de metales pesados en gónadas y músculo aductor del mejillón marrón, *Perna perna*, cultivado en la ensenada de Turpialito, Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. *Zootecnia Tropical* 23(2):141-154 p.
- [32] Mero Valarezo, Mariuxi. 2010. Determinación de metales pesados (Cd y Pb) en moluscos bivalvos de interés comercial de cuatro esteros del golfo de Guayaquil. Tesis de Maestría. Universidad de Guayaquil. Ecuador.
- [33] TULSMA. 2002. Texto Unificado de Legislación Secundaria Medio Ambiental. Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua. Libro VI, Anexo 1.