

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y

Recursos Naturales



“DISEÑO DE BIOENSAYO DE BIOMAGNIFICACIÓN DE COBRE EN LA
CADENA TRÓFICA DE LA *Thalassiosira pseudonana* Y *Potamocorbula*
amurensis”

PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del título de:

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentado por:

CRISTHIAN ALFREDO AYÓN PÉREZ

BIÓLOGA

Presentado por:

TERESA ALEJANDRA VILLAVICENCIO PÉREZ

Guayaquil – Ecuador

2015

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a mi familia por ser los pilares de mi vida, por apoyarme siempre que lo necesite. A mi hermana y hermano Zulay y Tyrone por sus palabras de aliento y regañarme en el momento oportuno, gracias por alentarme e inspirarme. A Marlon que es un hermano mayor para mí, gracias por tu apoyo y por estar pendiente.

A mi mamá y papá por estar prestos a las necesidades que se presentaron en el camino, por estar en todo momento conmigo, por enseñarme ser perseverante, paciente y tolerante.

A Cesar Reyes, que ha sido un compañero excepcional, por apoyarme, y decir las palabras correctas en el momento correcto.

A la Dra. Paola Calle Delgado por ser una excelente profesora, otorgándome la asesoría que necesitaba para realizar este proyecto.

Al Blgo. Omar Alvarado, que nos apoyó en este proceso de terminar el proyecto, con sus consejos oportunos y gran amistad.

A mis profesores Alba Calles Procel Ph.D., Cesar Bedoya Msc., Ecuador Marcillo Msc. y a Luis Flores Msc. que han sido una inspiración para mí, ya que con sus palabras de aliento y por sus enseñanzas a lo largo de la carrera, han ayudado de una de otra forma en la profesional que soy.

A mis compañeros de clase que han estado conmigo a lo largo de esta aventura llamada Biología, en especial a Emy Moina, Karla Párraga, Sergio Pincay, Lex Medina y a mi amado Cesar Reyes. Gracias a todos.

Teresa Alejandra Villavicencio Pérez.

Agradezco a Dios por dejarme seguir hasta el final en esta carrera que exige mucho esfuerzo en el cual mi familia fue uno de los apoyos de mayor importancia permitiéndome escribir estas palabras, en honor a ellos digo que todos los agradecimientos son insuficientes para expresar mi gratitud, pues su sacrificios son y fueron invaluable para hacer de mí una persona con una carrera profesional.

Agradezco a todos los profesionales académicos de mi facultad que de una u otra manera se involucraron en mi formación profesional y mi carácter.

Quiero mencionar mi gratitud a todos mis amigos y amigas de la universidad que estuvieron junto a mí compartiendo sonrisas, enojos, frustraciones y éxitos en esta aventura politécnica. Y quiero hacer una mención especial a mi compañera y amiga Teresa Villavicencio Pérez que me soporto, me animo y aunque a ratos teníamos

disgusto entre nosotros fue un apoyo incondicional durante la redacción de este documento. Gracias totales.

Cristhian Alfredo Ayón Pérez.

DEDICATORIA

Dedicada a Yndolfa Pérez B., Tyrone Villavicencio L., y a Zulay Villavicencio P. este logro es para ustedes.

Teresa Alejandra Villavicencio

Pérez

Dedica a la vida que utiliza cualquier método para enseñarnos a ser mejores.

Cristhian Alfredo Ayón Pérez

EVALUADOR

Katiuska Paola Calle Delgado, Ph.D.

DIRECTORA DEL PROYECTO INTEGRADOR

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de este Proyecto Integrador, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL".

(REGLAMENTO DE GRADUACIÓN DE LA ESPOL)

Cristhian Alfredo Ayón Pérez

Teresa Alejandra Villavicencio Pérez

RESUMEN

La contaminación por cobre se da por partículas liberadas por las diversas actividades humanas, entre ellas la minería en lugares no específicos, aumentando la concentración natural de este mineral en el medio representando un riesgo biológico a los organismos.

Se realizará un diseño de bioensayo que tiene el objetivo de medir la transferencia de cobre en una cadena trófica simple desde la *Thalassiosira pseudonana* a *Potamocorbula amurensis* el cual consistirá en realizar pruebas con concentraciones de 0.5 mg/l y 1.0 mg/l. Los organismos se encuentran en el Golfo de Guayaquil, donde el molusco *P. amurensis* está en grandes cantidades.

Esperando que la *Potamocorbula amurensis* biomagnifique el cobre por medio de la concentración de este mineral en la diatomea *Thalassiosira pseudonana* en un periodo de tiempo de 72 horas, sirviendo como un bioindicador.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	viii
ÍNDICE GENERAL.....	ix
ABREVIATURAS.....	xi
SIMBOLOGÍA.....	xiii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiv
INDICE DE TABLAS.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1.....	3
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	3
1.1 Metales Pesados.....	4
1.1.1 Problemas ocasionados por los metales pesados.....	5
1.1.2 Efectos de los metales pesados.....	6
1.2 Cobre (Cu).....	7
1.2.1 Importancia del cobre en el medio ambiente.....	9
1.3 Exposición de contaminantes a las algas y moluscos.....	10
1.4 <i>Thalassiosira pseudonana</i>	12
1.5 <i>Potamocorbula amurensis</i>	14
1.5.1 Relación con el diseño de bioensayo.....	18
1.6 Bioensayo.....	18

1.7	Tipos de Bioensayo	20
1.7.1	Bioensayo agudo	20
1.7.2	Bioensayo crónico	20
CAPÍTULO 2		21
2.	BIOENSAYO	21
2.1	Primera etapa <i>Thalassiosira pseudonana</i>	22
2.1.1	Selección y adecuación del sitio	22
2.1.2	Descripción de la metodología.....	23
2.1.3	Medición de cobre en <i>Thalassiosira pseudonana</i>	27
2.2	Segunda etapa <i>Potamocorbula amurensis</i>	28
2.2.1	Medición del cobre en la <i>Potamocorbula amurensis</i>	32
CAPÍTULO 3		33
3.	RESULTADOS ESPERADOS.....	33
BIBLIOGRAFÍA		35

ABREVIATURAS

HClO₄:	Ácido perclórico
HNO₃:	Ácido nítrico
Almejas/m²:	Almejas por metro cuadrado
BCF:	Bioconcentration and Bioaccumulation Factors
CENAIM:	Centro Nacional de Investigaciones Marinas
cm:	centímetro
Cu:	Cobre
Ed.:	Edición
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
ESPOL:	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FIMCBOR:	Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales
M:	Molaridad
Min:	Minuto
Mn²⁺:	Ion de manganeso
MP:	Metales pesados
<i>P. amurensis</i>:	<i>Potamocorbula amurensis</i>
ppb:	Parte por billón
ppm:	Parte por millón
<i>T. pseudonana</i>:	<i>Thalassiosira pseudonana</i>

ups: Unidades prácticas de salinidad
Vol.: Volumen
Zn²⁺: Ion de zinc

SIMBOLOGÍA

%:	Porcentaje
CO₂:	Dióxido de carbono
mm²:	Milímetro cuadrado
mm³:	Milímetro cúbico
±:	Más o menos
µg/g:	Microgramo sobre gramo
µm:	Micras de diámetro
cél/día:	Células por día
cél/ml:	Células por mililitro
Km:	Kilómetro
Lux:	Luminosidad
mg/l:	Miligramo por litro
ml:	Mililitro
mm:	Milímetro
No:	Número
°C:	Grados centígrados
pH:	Potencial de hidrógeno

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1.- Relación del crecimiento y la concentración de los metales esenciales y los no esenciales en organismos.....	5
Ilustración 2.- <i>Thalassiosira pseudonana</i> , vista electrónica..	12
Ilustración 3.- <i>Potamocorbula amurensis</i> . Especie invasora.	15
Ilustración 4.- <i>Potamocorbula amurensis</i>	16
Ilustración 5.- Envase con el concentrado de cobre (Cu) de la empresa Inorganic Ventures.	24
Ilustración 6.- Conteo de algas <i>Thalassiosira pseudonana</i>	27
Ilustración 7.- Representación del proceso del diseño de bioensayo de la <i>Thalassiosira pseudonana</i> y <i>Potamocorbula amurensis</i>	30

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla I.- Tabla de efectos y enfermedades producidas por metales pesados.....</u>	<u>7</u>
--	----------

INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país que dispone de muchos recursos minerales entre ellos el cobre, la explotación de este producto por medio de la minería generan desechos que se dispersan en el ambiente, llegando a alterar las concentraciones naturales del medio provocando contaminación.

El cobre es un oligoelemento encontrado en la corteza terrestre de forma natural en rocas y minerales [1]. Es un elemento esencial para procariotas y eucariotas [1]. En el agua el cobre debe estar en una concentración de < 1300 ppb y en el sedimento en $2 - 250$ ppm, cerca de mineras los valores del cobre se llegan a encontrar en 17000 ppm [2]

El cobre ayuda a la actividad enzimática de todos los organismos vivos, en niños de 1 a 3 años de edad la concentración de cobre debe ser de 340 $\mu\text{g}/\text{día}$, personas adultas (>18 años) de 900 $\mu\text{g}/\text{día}$ [2] dosis superiores a estos tienen efectos tóxicos en el organismo. La deficiencia de cobre ocasiona la enfermedad de Menkes y la sobrecarga ocasiona la enfermedad de Wilson [2].

El problema de todos los metales pesados es la acumulación que no se puede degradar biológicamente ni químicamente en el organismo.

La acumulación de metales se da por diferentes vías como la alimentación, el medio y el contacto directo.

Cuando la concentración de un elemento contaminante aumenta y se transfiere a otro organismo de nivel trófico superior se lo denomina biomagnificación.

Conociendo que en Ecuador la actividad minera de extracción de cobre es activo queremos diseñar un bioensayo que ayude a medir la concentración de cobre en dos organismos por transferencia de una cadena trófica simple del alga *Thalassiosira pseudonana* a el molusco *Potamocorbula amurensis*.

El diseño constara de dos etapas en el cual la primera consistirá suministrar cobre en dos concentraciones: 0.5 mg/l y 1.0 mg/l a la *Thalassiosira pseudonana* por 3 días para luego en la segunda etapa alimentar a la *Potamocorbula amurensis* con dicha alga en un período de 72 horas.

CAPÍTULO 1

1. INFORMACIÓN GENERAL

La contaminación de metales pesados consiste en una concentración excesiva de metales que no se puede degradar de manera biológica ni química provocando una alteración en el medio y metabólica en organismos [3]. Esta concentración aumenta por las diversas actividades humanas, entre ellas la minería de metales como oro, cobre, aluminio etc.

La contaminación de metales pesados produce un cambio en la alcalinidad del suelo degradándolos y volviéndolo menos productivos. También afectan a los cultivos en el agua y fauna [4]. Algunos metales pesados afectan al sistema nervioso especialmente a las neuronas como el plomo, el arsénico tiene afectación sobre las mitocondrias, con el tiempo la contaminación con cadmio puede producir una insuficiencia renal [4].

Un efecto de la contaminación de metales pesados es la bioacumulación de metales como el cobre en los organismos. Las formas de acumular cobre en el organismo pueden ser por el aire, agua e ingestión de alimentos [5], cuando sobrepasan los niveles donde ya no es saludable para el organismo provocan una serie de enfermedades como es la Enfermedad de Wilson, Cirrosis en la infancia e Idiopática Toxicosis de cobre [5].

1.1 Metales Pesados

Los metales pesados se encuentran de forma natural en el medio ambiente (corteza terrestre), y son necesarios en mínimas cantidades para el desarrollo de la vida [6]. El cobre y el hierro permiten el buen funcionamiento del sistema enzimático en todos los organismos vivos (humanos, organismos acuáticos, terrestres entre otros) [7].

Los metales se clasifican en esenciales y no esenciales según requerimiento y hábitat de cada especie, se presentan los siguientes elementos considerados macronutrientes, donde están el sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg) y calcio (Ca) pero estos están considerados para el hombre, mientras que para otros organismos están los oligoelementos como son el cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), hierro (Fe), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), selenio (Se), y zinc (Zn), estos últimos metales esenciales deben estar en bajas concentraciones porque el aumento así sea mínimo se

convierte en tóxico teniendo efectos que perjudiquen la salud humana y demás organismos [8].

Dentro la clasificación de los metales no esenciales son cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) en concentraciones bajas es tóxico y sus efectos en elevadas concentraciones serían fatales provocando la muerte del organismo [8].

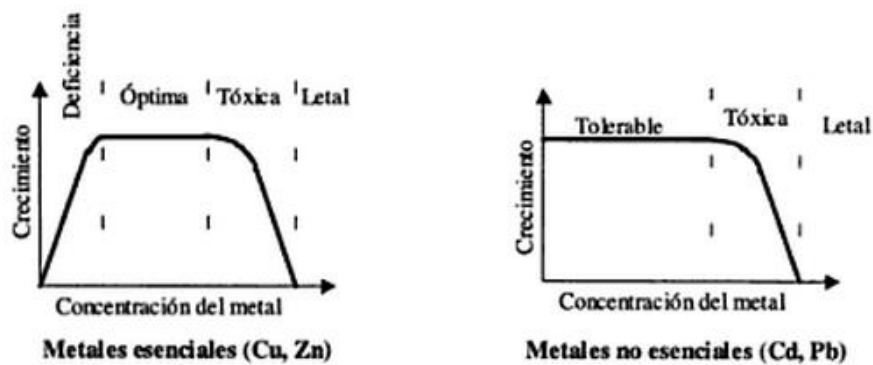


Ilustración 1.- Relación del crecimiento y la concentración de los metales esenciales y los no esenciales en organismos. Tomado de Forstner y Whittman, 1981 [9].

1.1.1 Problemas ocasionados por los metales pesados

El problema de los metales pesados es su gran capacidad de bioacumulación, tanto en el ambiente como en los organismos vivos [6], [7].

La exposición prolongada a los metales pesados resultan ser tóxicos para el ecosistema y para el humano, comúnmente está relacionado a la calidad de vida

humana y es clasificada en aguda y crónica [6], [7]. Los metales pesados se depositan en sedimentos marinos, lagos, o estuarios [6], [7].

Los principales medios de exposición y por ende acumulación de metales pesados en organismos se da por diferentes vías, ya sea por aire (inhalación), contacto con la piel (exposición) y por la ingesta de alimentos [1].

Los metales pesados tienen mayor afinidad en los tejidos blandos de los bivalvos [10]. Los organismos acuáticos sirven como indicadores de la presencia de metales pesados [1]

Uno de los organismos que indican la calidad de medios acuáticos son los moluscos, viven enterrados al sedimento, y se alimentan por filtración.

1.1.2 Efectos de los metales pesados

Los efectos de los metales pesados dependerán del tiempo de exposición, la concentración y el lugar de exposición en el organismo. Tenemos los siguientes metales comúnmente conocidos según los efectos que ocasionan en el organismo.

Tabla I.- Tabla de efectos y enfermedades producidas por metales pesados.
Fuente [47]

Metal pesado	Descripción de efectos y enfermedades	Órgano o sistema afectado
Mercurio (Hg)	Iritación de vías respiratoria produce enfermedades como Bronquitis, Neumonía. En situaciones crónicas a bajas dosis produce debilidad, baja de peso, sabor metálico, insomnio e indigestión	Sistema respiratorio
Cadmio (Cd)	Cancerígeno, daños renales, nauseas, vómitos. Disminuye la actividad pulmonar produciendo enfisema y cáncer pulmonar.	Riñones, Pulmones
Plomo (Pb)	Trastornos del sueño, dolores musculares, impotencia, trastornos de conducta, dolores óseos, enfermedad renal, impotencia sexual, delirio, esterilidad, hipertensión arterial, estreñimiento agudo, ósea, problemas de cáncer y muerte.	Sistema circulatorio, cerebro, estructura ósea, músculos.
Cromo (Cr)	Causa dermatitis, aumento de sensibilidad de la piel, afectación de las mucosas.	Dérmicos
Cobre (Cu)	Anemia, daño en el hígado, riñón, irritación del estómago e intestino.	Hígado, riñón
Arsénico (Ar)	La anemia aplásica es una afectación común de este metal. El hígado puede dilatarse más la obstrucción de conductos biliares conducen a una ictericia	Eritrocitos, hígado
Plata (Pb)	Pigmentación azulada o negra de los tejidos corporales, daño en las corneas si tiene contacto con los ojos. En cantidades altas puede causar somnolencia, inconsciencia, coma o muerte. En tiempos de exposición prolonga puede causar dermatitis alérgica.	Ojos, piel

1.2 Cobre (Cu)

El cobre es un oligoelemento encontrado en la corteza terrestre como en las rocas y minerales [1]. Es un micronutriente esencial para el desarrollo metabólico en procariotas y eucariotas. Existen enzimas que contienen cobre para la catálisis redox o el transporte de dioxígeno [1].

El cobre está clasificado como un metal esencial que se une a las metaloenzimas y proteínas estructurales, se estima que el requerimiento de cobre en un adulto es de 1 a 5 mg/día [11].

El cobre es un metal de transición que posee tres estados de oxidación: el cero (Cu^0 , cobre sólido), el plus uno (Cu (I) ion cuproso) este es inestable (por lo que se transforma en Cu (II)), y el plus dos (Cu (II) ión cúprico) [1], [2]. También se presenta el Cu (III) en escasas ocasiones, estos estados de oxidación afectan o benefician los sistemas biológicos por la transferencia de electrones [2]. Posee dos isotopos estables el Cu^{63} y Cu^{65} con abundancia relativa de 69,2 y 30,8% respectivamente [2].

Cuando el estado del ion libre Cu^{2+} esta hidratado es tóxico para el fitoplancton ya que inhibe los sitios de captación de los demás micronutrientes esenciales como el Zn^{2+} y el Mn^{2+} , porque el ion de cobre compite con el sitio catalítico del Mn^{2+} y este ya no pueda ayudar para óptimo crecimiento del fitoplancton, por esta razón a elevadas concentración llega ser tóxico en organismos estuarinos [12].

Una investigación presentada por Buck et al. [12] en la bahía de San Francisco, California se pudo observar y comprobar este tipo de anomalía gracias a la acumulación de cobre en organismos acuáticos [12].

El cobre se asocia con el arsénico cuando este está en su forma de sulfuros, haciendo que este aumente de 40 ug/g a 100-2500 ug/g [13].

1.2.1 Importancia del cobre en el medio ambiente

El cobre es importante en el ambiente por ser un elemento esencial que sirve para los sistemas biológicos se desarrollen de forma completa, pero al aumentar sus niveles normales llega ser tóxico inhibiendo el desarrollo o crecimiento [1], [12]. El cobre debe estar en una forma soluble para ser utilizado en el sistema biológico. Hay elementos tóxicos que son altamente insolubles como es en el caso del aluminio, o son poco comunes o raros en el medio como el Osmio [1].

La forma iónica que el cobre adquiera, dependerá del pH, suelo, el tipo de sedimento, su potencial redox, la dureza del agua [1].

El cobre tiene diferentes formas inorgánicas que se dividen en Cu^{2+} y Cu^1 del cual Cu^{2+} es el más tóxico en la suma de todas las formas de cobre (Cu^{2+} , Cu^1 y Cu total) [12].

En el ambiente marino el cobre se acopla a otros elementos esenciales presentes en el medio, formando aleaciones que favorecen en rangos tolerables el desarrollo, mientras que lo contrario desfavorece su crecimiento provocando la muerte de los organismos.

Los microorganismos son, generalmente, rápidamente afectados por las descargas de metales pesados en el ambiente; los contaminantes ejercen directamente su efecto sobre ellos, alterando a su vez la comunidad a la que pertenecen [14].

1.3 Exposición de contaminantes a las algas y moluscos.

Los organismos acuáticos especialmente las especies planctónicas como las algas y especies filtradoras como los bivalvos están más expuestos a los metales pesados disueltos en agua, lo que produce una captación de los metales al ingerir partículas sedimentarias y la absorción de aguas relacionadas a los sedimentos [15].

Debido a la capacidad de algunos organismos marinos y estuarinos, como las algas y los moluscos bivalvos para concentrar metales trazas, se recomienda utilizar estos organismos para determinar las concentraciones de estos metales [16].

La contaminación por metales pesados en algas tiene efectos tóxicos irreversibles que afectan gravemente a la estructura externa e interna del alga, entre los cuales podemos destacar la pérdida de la impermeabilidad lo que ocasiona una serie de eventos que involucran la pérdida de nutrientes, pérdida de almacenamiento de carbono fotosintético, falla en la actividad enzimática, deformidades en su estructura, pérdida de partes fundamentales para su movilidad (flagelos), pérdida de la pigmentación y el último de los casos la muerte del microorganismo. Existen algas que pueden soportar la exposición de los metales mediante adaptación de la pared celular que evita la absorción de los iones tóxicos, esto le permite mantenerse en medios donde existe contaminación [17].

Los moluscos pueden ser seleccionados como organismos de control y bioindicadores, por su desarrollada capacidad para acumular una variedad de sustancias químicas como metales pesados y compuestos orgánicos [18].

Estos organismos son ampliamente utilizados en programas internacionales de contaminación [10].

Un bioindicador ideal es aquel que reúne ciertas características:

- Abundantes.
- Fácil de identificar
- Fácil de muestrear durante todo el año
- Aclimatable a condiciones experimentales
- Estáticos

Características que reúnen los moluscos bivalvos. Además de la opción de evaluar posibles riesgos para la salud derivados del consumo de la especie de bivalvo estudiado [19].

1.4 *Thalassiosira pseudonana*

Thalassiosira pseudonana.

Reino: Chromalveolata

Phylum: Heterokontophyta

Clase: Coscinodiscophyceae

Orden: *Thalassiosirales*

Familia: *Thalassiosiraceae*

Género: *Thalassiosira*

Especie: *Thalassiosira pseudonana* (Cleve, 1873).

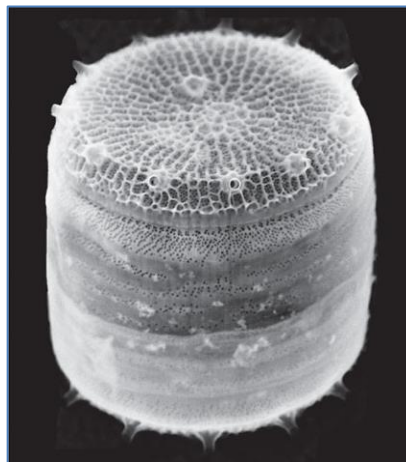


Ilustración 2.- *Thalassiosira pseudonana*, vista electrónica. Fuente: (Möhler & Hoose, 2011). Atmospheric science: Ocean Algae and atmospheric ice. Nature Geoscience [20].

Las diatomeas planctónicas representan uno de los principales grupos autotróficos en ecosistemas marinos y fuente importante de alimento para sustento de la acuicultura. Por su fotoadaptación, las diatomeas tienen la mayor producción de nutrientes en la zona eufótica, debido a que obtienen la energía necesaria proveniente de la luz [21], [22].

Tienen la capacidad de capturar el CO₂, controlar la producción de carbono orgánico entre otros macronutrientes [23]. Diatomeas del género *Thalassiosira* son frecuentemente utilizadas como alimento de moluscos debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados [24].

El porcentaje de lípidos en la *Thalassiosira pseudonana* es 24, el peso orgánico es de 22 $\mu\text{g } 10^{-6}$ células y de volumen celular medio $45\mu\text{m}^3$ [25].

Thalassiosira pseudonana es un fitoplancton, eucariota, fotoautótrofo, su tamaño es desde 2 hasta 15 micras de diámetro (μm) [26], su forma es céntrica, se encuentra en la base de la cadena trófica, es de origen marino. Este forma colonias pero también puede estar en forma individual. Ha sido utilizado como alimento vivo en la producción de camarones, moluscos, y peces. La tasa de crecimiento y su composición bioquímica es influenciada por los factores naturales del ecosistema tales como son la irradiancia y la disponibilidad de nutrientes [27]. Por sus características es considerado como alimento ya que tiene un rango amplio de salinidad siendo el crecimiento óptimo en 35ppt [28], con temperaturas de 22°C [27], [28], en relación a luminosidad se tienen dos clases para observar mejor crecimiento:

fotoperiodo (intercalado de luz y oscuridad) y luz continua (no existen variación de luz) para tener un crecimiento óptimo donde en el fotoperiodo se tiene $453,000 \pm 89,000$ cél/ml y $555,000 \pm 137,000$ cél/ml [28].

Esta especie de diatomea ha sido ampliamente estudiada en su biología, genética, ecología entre otros. Es la primera diatomea en conocerse su genoma completo y sirve de guía para el resto de diatomeas.

Es considerada también para pruebas de toxicidad por cumplir los requerimientos necesarios como son: crecer en un corto período de tiempo en grande densidades, facilidad de manejo, tener un alto contenido nutricional para los organismos a cultivar o a suministrar, mantener la pureza y ser relativamente económicos los cultivos [8].

La *Thalassiosira pseudonana* está registrada en el Golfo de Guayaquil por Jiménez [29] aunque anteriormente era conocida como *Cyclotella nana*.

1.5 *Potamocorbula amurensis*

Potamocorbula amurensis

Reino: Animalia

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Orden: Myoida

Familia: Corbulidae

Género: *Potamocorbula*

Especie: *Potamocorbula amurensis* (Schrenck, 1861).

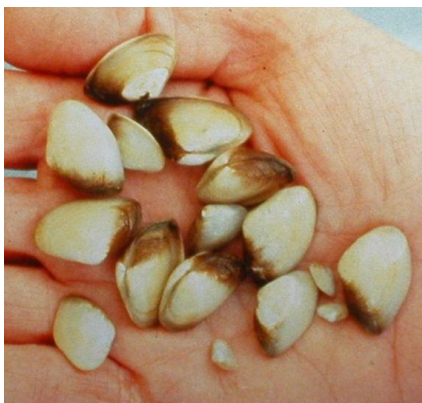


Ilustración 3.- *Potamocorbula amurensis*. Especie invasora. Fuente: ISSG, 2005. En línea 30 de marzo del 2015 [30].

Los bivalvos son filtradores herbívoros en el que su dieta consiste de fitoplancton, materia orgánica muerta y detritus, son organismos bentónicos distribuidos en ecosistemas costeros. Por su tipo de alimentación los lleva ser bioindicadores por su exposición a los metales presentes en sedimento y agua, ya que los metales se fijan en los tejidos de estos organismos (bioacumulación) [31], [32]. Para conocer los efectos de contaminantes en los organismos marinos, los moluscos son un modelo perfecto porque se hace un análisis al tejido y se podrá tener un valor cuantitativo [33].

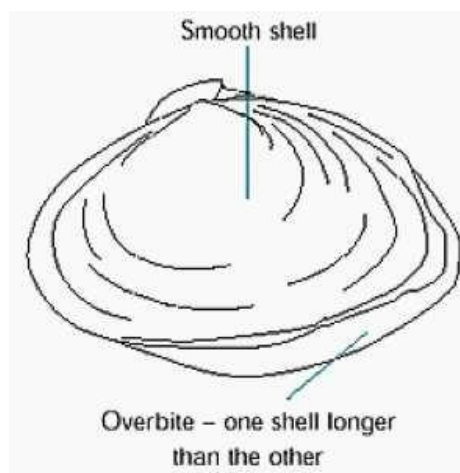


Ilustración 4.- *Potamocorbula amurensis*. Foto del Ministerio de Pesquerías de New Zelanda. Tomado de ISSG, 2005. [En línea, 10 de abril] [30].

La *Potamocorbula amurensis* o “almeja china”, es un bivalvo de concha blanca con variación de colores beige y amarillo, sus valvas son de superficie lisa y delgada, pero cuando alcanzan la edad adulta se vuelve un poco rugoso, una concha es más larga que la otra [30]. La longitud que alcanza este organismo es de 2-3 cm, es bentónica, para conseguir alimento se entierra en el sedimento marino [30].

Soporta variaciones bruscas en la salinidad, también puede habitar en aguas dulces, siendo la salinidad en el desove de este organismo es de 5 a 25 ups, tanto así que puede los espermatozoides del *P. amurensis* soportar un aumento en la salinidad de 10 ups. Con horas de nacidos los organismos pueden soportar rangos de salinidad de 10 a 30 ups, y pasado las 24 horas de haber eclosionado una salinidad de 2 a 30 ups [30]. En relación a la temperatura estos moluscos pueden estar tanto en aguas tropicales (25 – 27°C) como frías (15 - 20°C), son propios de la submareal pero

existen registros encontrarse en la zona intermareal lo que ha ayudado a adaptarse a cualquier ecosistema acuático. Así mismo, se los ha reportado en casi todo tipo de sedimentos desde fangoso a arenoso [30].

La almeja china es altamente filtradora de fitoplancton y zooplancton a pesar de su tamaño, consume una gran variedad de diatomeas y copépodos [30], en algunos casos la tasa de filtración excede los blooms de fitoplancton y disminuyen la concentración en los cuerpos de agua [34]. Byeong-gweon et al. [32] indica que no existen estudios donde se precisa la cantidad consumida de *T. pseudonana* consumida por *P. amurensis*. Blacio et al. [35] describen que la especie *Agropeccen circularis* consume 80000 cel/ml en su etapa juvenil que guarda relación con las condiciones del clima, ubicación, parámetros de salinidad y temperatura con la *P. amurensis*. El señor Jimmy Velazco Jefe de campo de la camaronera BISTEFANA ha observado que existen poblaciones de la almeja china en la camaroneras del sector Puerto Morro donde hay una densidad de 100000 cel/ml de fitoplancton en total.

El *Potamocorbula amurensis* desova en todo el año, existe un registro en [32] que desova en primavera y otoño, pueden producir 45.000 a 220.000 ovocitos viables aunque esto dependerá del tamaño de la hembra [30].

Es nativa de China, Korea y Japón, esta especie es considerada invasora pero debido a su tamaño no es consumida por humanos y por ende no es de interés comercial, se presume que ha llegado a diferentes países como Estados Unidos por aguas lastre [30].

1.5.1 Relación con el diseño de bioensayo

Las especies invasoras son un gran problema a nivel mundial, por su gran capacidad de adaptación. Ecuador ha sido afectado por especies invasoras provenientes de aguas lastre descargadas por buques que atraviesan el océano. Un estudio presentado por Torres [38] indican las especies que han ingresado al Ecuador por esta modalidad, entre ellas está registrada la *Potamocorbula amurensis*. Esta especie se la encuentra en las camaroneras en el Golfo de Guayaquil y está ocasionando problemas, por el consumo del recurso destinado a los cultivos de larvas de camarón, en los cascos de las embarcaciones y por su alto crecimiento poblacional.

La *Potamocorbula amurensis* no es de interés comercial y no es consumida por el hombre por su tamaño (2 – 3 cm), es considerada en este diseño de bioensayo por su disponibilidad en medios estuarinos, por ser filtrador y se alimenta de *Thalassiosira pseudonana* (ambas reportadas en el Golfo de Guayaquil). Su fácil obtención y al encontrarse en lugares donde existe la actividad humana y ser resistente a cualquier circunstancias podemos usarlo como bioindicador en el sector Puerto Morro de biomagnificación de cobre.

1.6 Bioensayo

Los bioensayos de toxicidad sirven como herramientas para conocer los efectos físicos y químicos en organismos de estudio en condiciones controladas y parámetros medidos. Los efectos dependerán del organismo, puede inhibir o

acumular los contaminantes que se quiera aplicar y las reacciones variara como es el crecimiento, cambio fisiológico, genético e incluso la muerte del individuo [39].

Las pruebas de toxicidad permiten medir el efecto de un tóxico en un organismo en particular para tener una noción de lo que sucede en el ecosistema. Los bioensayos sirven para tener parámetros de calidad ambiental [40].

El bioensayo de bioacumulación es el poder determinar la capacidad de un organismo para acumular un contaminante suministrado en el medio en un determinado tiempo, con el objetivo de conocer sus efectos en el individuo. Cuando se utiliza el mismo organismo como alimento, esta pasa de un nivel trófico a otro, esto se llama bioensayo de transferencia trófica. Este tipo de experimentos es para conocer el efecto que tiene los contaminantes que se encuentran en el ambiente por causas naturales o androgénicas, cuando estos valores son intermedios causan crecimiento tardío, enfermedades, y otras patologías, mientras que en valores altos causan la muerte del individuo. Los bioensayos de bioacumulación y de transferencia trófica sirven para evaluar las sustancias que a través del tiempo pueden aumentar su concentración en los organismos vivos e inclusive biomagnificarse [41].

Los bioensayos tienen como objetivo dar un diagnóstico de los posibles impactos de las diversas sustancias y energías en el ambiente usando parámetros de calidad en el agua y sedimento, y dar un criterio real de su estado [42].

1.7 Tipos de Bioensayo

Los diferentes tipos de bioensayos son pruebas en relación al tiempo para poder observar y medir el efecto de un contaminante en organismos, estos se dividen en bioensayos agudos y crónicos.

1.7.1 Bioensayo agudo

El tipo de bioensayo agudo trata de un tiempo de exposición corto el que comprenderá un rango generalmente de 24 a 96 horas donde el punto final del bioensayo es la mortalidad y se utilizara para evaluar concentraciones letales [43].

1.7.2 Bioensayo crónico

En cambio en bioensayo crónico generalmente es realizado en un rango mayor de 96 horas, donde los factores dependerán de una exposición continua y repetida. Con el objetivo de poder medir evaluar efectos subletales, conocer los efectos ocasionados por los contaminantes empleados a los organismos, observando y analizando su toxicidad por el tiempo de exposición prolongada y consecutiva y la acumulación de este tóxico en el organismo.

CAPÍTULO 2

2. BIOENSAYO

Para el desarrollo de esta investigación se realizarán bioensayos de bioacumulación de cobre en *Thalassiosira pseudonana* y bioensayo de transmisión de cobre en *Potamocorbula amurensis* en condiciones estáticas sin renovación de agua con dos organismos de niveles tróficos diferentes [33].

Parte de la metodología que se aplicará esta referenciada en el trabajo de investigación de Abalde et al. [14]. Este trabajo guarda similitud en sus características fisiológica y niveles tróficos con el trabajo de investigación de referencia.

Este bioensayo se realizará en dos etapas para un mejor desarrollo en la cual la primera estará relacionada con la medición de cobre bioacumulado en las algas *Thalassiosira pseudonana* y su respectivo proceso. Las algas serán obtenidas de un cultivo de *Thalassiosira pseudonana* en **CENAIM** (Centro Nacional de

Investigaciones Marinas) que se recibirá con las mismas condiciones de la planificación del bioensayo. La segunda etapa se relaciona con la medición de cobre biomagnificado en bivalvos los *Potamocorbula amurensis* y sus respectivos procesos.

2.1 Primera etapa *Thalassiosira pseudonana*

2.1.1 Selección y adecuación del sitio

La especie designada a utilizar será la *Thalassiosira pseudonana*, para la selección del sitio se deberá tomar en cuenta un espacio físico que estará protegido contra la filtración de polvo e invasión de posibles animales, buscando un lugar donde se puedan mantener parámetros de temperatura y luminosidad constantes para no afectar los resultados durante el proceso.

Las condiciones del lugar donde se trabajarán deberán incluir valores de 2000 - 4000 lux que equivaldría a 40 watts obtenidas de una fuente de lámparas fluorescentes con un foto período de 12 horas (aplicación de luz cada 12 horas) manteniendo una temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ con una concentración de 35 ppt de salinidad [44].

En el siguiente bioensayo antes de que se realice cualquier procedimiento los materiales deben tener un tratamiento de desinfección para evitar cualquier factor que altere la ejecución del mismo y la lectura objetivo de análisis.

Los materiales que se utilizarán para el cultivo de las algas deben ser previamente lavados con ácido nítrico al 10% y luego esterilizado en el auto clave.

El agua que se utilizará para el bioensayo y el mantenimiento de las especies tendrá una concentración de 35 ppt de salinidad que deberá ser tratada con filtros mecánicos de 0.45 μm y carbón activado, para finalizar la preparación de los materiales a utilizar en el proceso se realizará la esterilización con autoclave a 212°C durante un tiempo de 10 minutos [14].

2.1.2 Descripción de la metodología

El futuro bioensayo trabajará con datos y valores de concentración de cobre que tienen referencia de estudios y bioensayos anteriormente realizados en el trabajo de investigación por Abalde et al. [14]. Estos valores fueron escogidos por ser concentraciones donde el cobre tiende a tener un valor constante en la bioacumulación a nivel celular intracelular [14].

Se realizará dos tratamientos de concentración cobre de 0.5 mg/l y 1.0 mg/l con 10 réplicas cada uno, teniendo como resultado 10 pruebas con 0.5 mg/l, 10 pruebas con 1.0 mg/l en total 20 recipientes con cultivos de algas. Estos contenedores serán de plástico con una capacidad de 5 litros con una concentración de 25×10^4 células por mililitro (cél/ml) en cada recipiente, este valor de concentración de algas se seleccionará del trabajo de investigación de Abalde et al. [14].

El cultivo de algas se deberá lavar con agua de mar tratada y desinfectada para eliminar los restos del medio enriquecido con Guillard F/2 con el fin de que todo el cobre añadido aparezca en forma de ion libre [14].

Luego de eliminar los restos del medio de cultivo se procederá a verificar que la concentración de algas inicial sea la correcta con un valor de 250,000 cél/ml, para esto se utilizará el método de conteo de la cámara Neubauer.

Para obtener la concentración de cobre en los cultivos de algas se tomará en cuenta la concentración de ion de cobre que viene establecida en la casa comercial donde se adquiera. Y realizar el respectivo cálculo de concentraciones y volúmenes. Para demostración de la aplicación de la fórmula, se tomará como ejemplo a la casa comercial de “Inorganic Ventures” con una concentración de 1000 µg/ml.

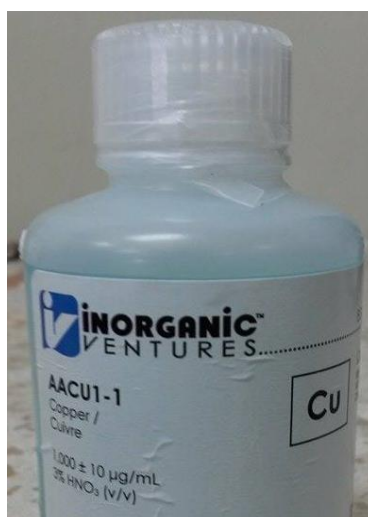


Ilustración 5.- Envase con el concentrado de cobre (Cu) de la empresa Inorganic Ventures.

Cálculo de Concentraciones y Volúmenes en *Thalassiosira pseudonana*

C_1 = Concentración inicial.

V_1 = Volumen inicial.

C_2 = Concentración final.

V_2 = Volumen final.

Cálculo de ion de cobre a utilizar para concentración de 0.5mg/l.

1) Fórmula General

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

2) Despejar el volumen V_1 de la contracción de Cu (C_1)

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

3) Reemplazando valores

$$V_1 = \frac{0,5 \text{ mg/L } 5L}{1000 \text{ } \mu\text{g/ml}}$$

4) Volumen a añadir del frasco de ion Cu $V = 2.5 \text{ ml}$

Como resultado tenemos que necesitamos 2,5 mililitros de la solución de ion cobre para la medición de bioacumulación de cobre en *Thalassiosira pseudonana* en una concentración de 0.5mg/l.

Cálculo de cobre a utilizar para concentración de 1.0 mg/l.

- 1) Fórmula General $C_1 V_1 = C_2 V_2$
- 2) Despejar el volumen V_1 de la contracción de Cu (C_1)
$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$
- 3) Reemplazando valores $V_1 = \frac{1.0mg/L \cdot 5L}{1000\mu g/ml}$
- 4) Volumen a añadir del frasco de ion Cu $V = 5,0 ml$

En este resultado tenemos que necesitaremos 5,0 mililitros de la solución de ion cobre para la medición de bioacumulación de cobre en *Thalassiosira pseudonana* en una concentración de 1.0mg/l.

Estos valores dependerán del producto que se vaya a conseguir en las diversas casas comerciales porque pueden variar la concentración de presentación comercial.

Este bioensayo es de tipo crónico. Los cultivos de algas medidos e inoculados con su respectiva concentración de cobre, deberán esperar 72 horas hasta medir el cobre bioacumulado, luego proceder a medir la concentración de algas final con el método de la cámara de Neubauer [14].

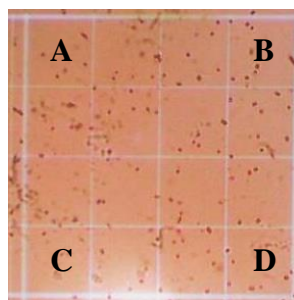


Ilustración 6.- Conteo de algas *Thalassiosira pseudonana*. Tomada de los autores.

2.1.3 Medición de cobre en *Thalassiosira pseudonana*

Para la medición de cobre en la *Thalassiosira pseudonana* debemos esperar 72 horas de exposición con las diferentes concentraciones. Se medirá el cobre total del alga y el cobre intracelular, para esto utilizaremos el método de espectrofotometría de absorción atómica en ambos tipos de mediciones.

Se tomará dos muestras y una de ellas se filtrará con esteres de celulosa que tengan diámetros en sus poros un valor de $0.45 \mu\text{m}$, estos filtros se digieren con 1 ml de HNO_3 15 M y 0.5 ml de HClO_4 al 72%, el producto digerido se diluye con 5 ml de agua filtrada y se procede a medir con una espectrofotómetro de absorbancia atómica, se analizará y se anotarán los datos obtenidos.

En el método de medición de cobre intracelular se procede con la centrifugación de células a 1000 rpm por 10 minutos [17] y se resuspenden en una solución que será previamente preparada de EDTA al 0.02M en agua filtrada de mar para eliminar todo el cobre adsorbido en la superficie celular de la *Thalassiosira pseudonana*, después

de 20 minutos de la resuspensión de vuelven a centrifugar y se digieren con el mismo método para medir cobre total retirado que se indicó anteriormente. El cobre absorbido en la capa superficial celular se la calcula por diferencia matemática entre el cobre total retirado y el cobre intracelular [14].

Mediante el cálculo de la diferencia entre el cobre total (medido al final del proceso de las 72 horas) y el cobre inicial de las algas se determinará la cantidad de cobre en las *Thalassiosira pseudonana*. Para calcular la bioacumulación simple de cobre en las algas será mediante cálculo del “Factor de bioacumulación” el cual aplica la siguiente fórmula que es tomada de Walker et al. [45]:

$$\text{BCF} = \frac{\text{concentración de los químicos en el organismo}}{\text{concentración en el medio ambiente}}$$

2.2 Segunda etapa *Potamocorbula amurensis*

El bivalvo *Potamocorbula amurensis* será recolectado de una de las camaroneras del sector del “Puerto el Morro” que tiene condiciones climáticas tropicales, el estado del agua entre 28- 31 °C de temperatura y 40 ppt de salinidad. El transporte se realizará en una tina de plástico de 1000 litros de capacidad, con tanque de oxígeno para lograr la mayor sobrevivencia de animales durante el estrés de la transportación hacia el lugar de la prueba. Se obtendrán 400 ejemplares vivos en estado adulto que aclimatarán por una semana en el laboratorio.

Para el proceso de aclimatación se utilizara 40 recipientes de plásticos de 5000 ml de capacidad, cada contenedor será llenado con 2 litros de agua de mar a 35 ppt de salinidad con una temperatura ambiente de 25°C sembrada con 10 individuos en cada contenedor para la aclimatación. Durante la aclimatación se irá eliminando los individuos que no sobrevivan o no sean viables para la medición de biomagnificación de cobre.

Se debe medir la “concentración basal” de cobre en el bivalvo antes de iniciar el proceso de bioensayo y anotar los resultados de la cantidad de cobre inicial.

Byeong-Gweon et al. [32] indica que actualmente no hay datos registrados de tasas de ingestión o tasas de alimentación del *Potamocorbula amurensis*. En Blacio et al. [35] la especie *Agropecten circularis* es un bivalvo que se encuentra en Ecuador y que durante su estadio juvenil consume un concentración de 80000 cél/ml del algas en su alimentación.

Por otra parte según visitas y observaciones realizadas en las camaroneras del sector del Puerto el Morro se encuentra a la *P. amurensis* en piscinas que tienen una densidad de algas superiores a 100,000 cél/ml.

Según las experiencias personales y la información académica adquirida durante los años de estudios se propondrá una dieta para la alimentación de 2 litros del cultivo de algas con una concentración de 25×10^4 cél/ml por cada réplica, con la finalidad de

tener un margen de seguridad alimentaria que no ponga en riesgo el bioensayo durante todo el proceso.

Para evitar añadir 2 litros del medio de cultivo de algas a los recipientes que contienen las *P. amurensis* se procederá a realizar una centrifugación a los dos litros de cultivo de algas esta centrifugación es descrita por Barrera [36] que consiste en utilizar una centrifuga Solbart a 1000 rpm por un periodo de tiempo de 10 minutos y colocar lo centrifugado a los recipientes que contienen los *P. amurensis* [36] (Ilustración 7).

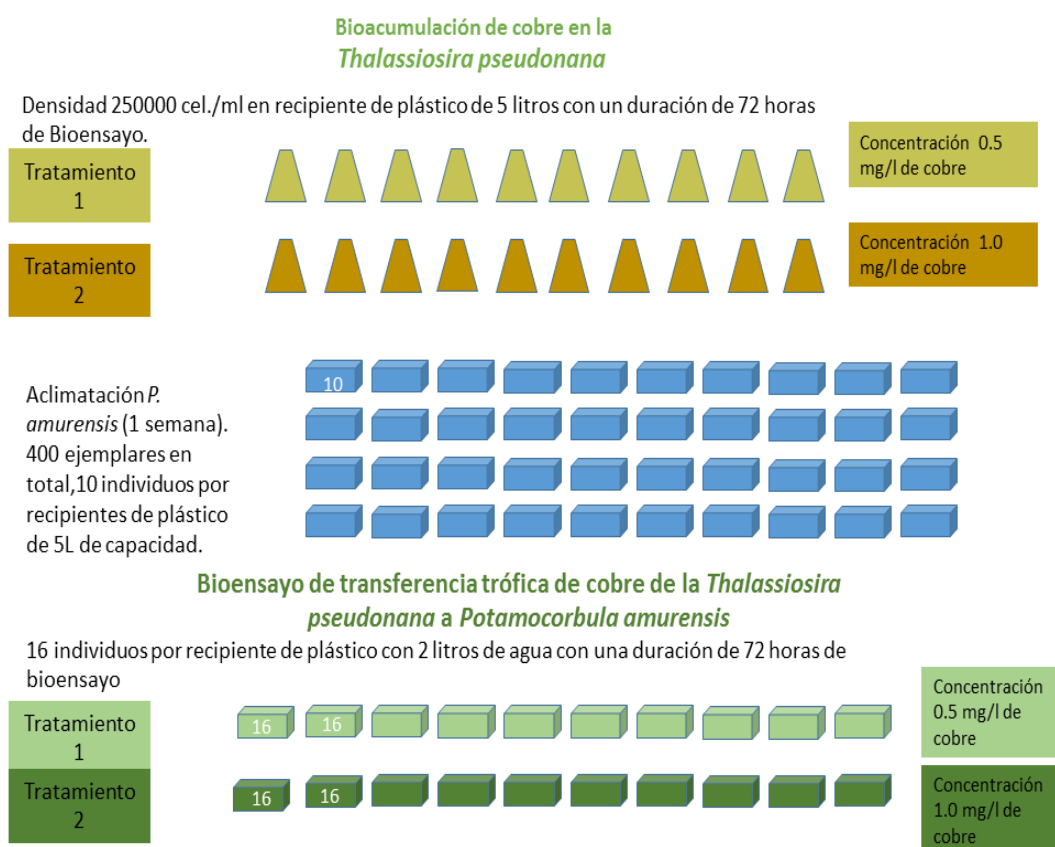


Ilustración 7.- Representación del proceso del diseño de bioensayo de la *Thalassiosira pseudonana* y *Potamocorbula amurensis*.

Después de la semana de aclimatación se estandarizará la población inicial a 320 individuos que se repartirá de la siguiente manera:

- 10 recipientes de plástico de 5L con 16 individuos en cada uno (primer tratamiento y sus réplicas).
- 10 recipientes de plástico de 5L con 16 individuos en cada uno (segundo tratamiento y sus réplicas).

En total serán 320 individuos repartidos en los 20 recipientes de los tratamientos 1 y 2 que se usarán. Para el bioensayo con la *Potamocorbula amurensis* se realizarán 2 tratamientos uno con el cultivo de algas que tendrá una concentración de cobre de 0,5 mg/l y otro tratamiento con el cultivo de 1.0 mg/l de concentración de cobre. Esta fase tendrá un tiempo de exposición de 72 horas con una dieta de alimentación cada 12 horas.

Cada 12 horas se analizarán 10 organismos de bivalvos en el tratamiento 1 y 10 organismos en el tratamiento 2, siendo un total 20 individuos entre los dos tratamientos. Luego de las 72 horas se tendrán 120 individuos (60 en el T1 y 60 en el T2) para analizar la evolución del cobre (si se estará biomagnificando), dando como resultado 100 organismos repartidos en las 10 peceras del tratamiento 1 y 100 más repartidos en las peceras del tratamiento 2. Con los resultados obtenidos se calculará una curva de concentración de cobre en los organismos durante las 72 horas del bioensayo.

2.2.1 Medición del cobre en la *Potamocorbula amurensis*

Según Mero [43] para la preparación de muestras de *Potamocorbula amurensis* para la lectura del cobre se realizará un procedimiento que consiste en lavar las muestras de organismos con agua destilada, de esta manera se debe eliminar todo el material adherido a las conchas que hubiere, se separa el tejido blando de las conchas y se lo coloca en cápsulas de porcelana. Se procede a la eliminación de humedad por medio de una estufa a temperatura de 60 a 80°C, hasta obtener peso constante, por un período de 24 a 48 horas, luego se procederá a pulverizar las muestras y se las almacena en frascos plásticos hasta su respectivo análisis químico. Para el análisis químico los tejidos serán sometidos a digestión ácida, adicionando 5ml de ácido nítrico (HNO₃) a 1 gramo del tejido seco pulverizado en un vaso de precipitación tapado con un vidrio reloj, por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de digestión, las muestras serán sometidas a calor y disminución del líquido (ácido), el extracto se filtrará en papel Whatman No. 40 y se completa al volumen a 50 ml con agua destilada [43]. Para la lectura del cobre en la *Potamocorbula amurensis* se utilizara el método descrito por PerkinElmer [44].

Para calcular la biomagnificación de un compuesto en este caso el cobre se empleará el Factor de Biomagnificación utilizado por Calle et al. [46] donde:

$$\text{FBM} = \frac{\text{cobre total del molusco}}{\text{cobre total del alga}}$$

Donde se establece que existe biomagnificación (transferencia a nivel trófico) cuando los valores del compuesto (cobre) son >1.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS ESPERADOS

Se espera que este diseño de bioensayo sirva como protocolo para pruebas eco-toxicológicas de transferencias trófica de cobre, donde se espera comprobar la presencia de cobre transferido en los organismos *Thalassiosira pseudonana* y *Potamocorbula amurensis* especies que habitan en el litoral de Ecuador.

Se tiene la expectativa que la aclimatación sea adecuada para dar una población necesaria en la medición de cobre realizando el protocolo descrito y que los resultados de la medición tenga valores del cobre cercanos o similares al trabajo de investigación de Abalde et al. [14] sin afectación o incidencia de algún parámetro dentro del bioensayo.

Se espera que la *P. amurensis* y la *T. pseudonana* aumente la concentración de cobre suministrado por el cultivo de algas de las diferentes concentraciones de cobre sin afectar su metabolismo o estado biológico. Se espera que la “almeja china” pueda ser

utilizada como bioindicador de biomagnificación de cobre en moluscos bivalvos en el Ecuador.

Mediante el uso de los Factores de bioacumulación y biomagnificación se pueda comprobar la asimilación del cobre en los organismos seleccionados.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Flemming, C. & Trevors, J. (1989). Copper Toxicity and Chemistry in the Environment: A Review. Kluwer Academic Publishers. *Water, Air, and Soil Pollution* 44: 143-158.
- [2]. Olivares, M., Castillo, C., Arredondo, M. & Uauy, R. (2010). Cobre y Zinc en Nutrición Humana. En Gil, A. (Edición 2), *Tratado de Nutrición, Tomo 3 Nutrición Humana en el estado de salud*. (pp. 977-990). Editorial: Médica Panamericana.
- [3]. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente del Gobierno de España. Metales pesados. En línea, 27 de abril del 2015. Recuperado de http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/metales_pesados.aspx
- [4]. ErosteGUI, C. (2009). Contaminación por metales pesados. Entrevista por Romero, K. *Revista Científica Ciencia Médica* 12 (1) Cochabamba.

- [5]. Goyer, R. & Clarkson, T. (2001). Toxic Effects of Metals. En Casarett & Doulls, *Toxicology The basic Science of Poison*. 6ta Edition. Pag. 812, 840-841.
- [6]. Yuh-Shan, Ho & Mohammad, E. (2009). Metal Research Trends in the Environmental Field. En Lawrence K. Wang et al (2009 Taylor & Francis Group). HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT (pp. 1).
- [7]. Howard, H. (2002). HUMAN HEALTH AND HEAVY METALS EXPOSURE. En McCally Michael (ed, 2002 MIT press) Life Support: The Environment and Human Health (Capítulo 4). Massachussetts – Estados Unidos.
- [8]. Díaz-Báez M., Bustos, M. & Espinoza, A. (2004). *Pruebas de Toxicidad Acuática: Fundamentos y Métodos*. Bogotá-Colombia. Primera Edición. Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos.
- [9]. Imagen: Relación del crecimiento y la concentración de los metales esenciales y los no esenciales en organismos. Tomado de Forstner, U. & Wittmann, G. (1981). Metal Pollution in the Aquatic Environment. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. 66 (2), 277.
- [10]. Gil, M., Torres, A., Harvey, M. & Esteves J. (2006). Metales pesados en organismos Marinos de la zona costera de la Patagonia Argentina continental. *Biología Marina y Oceanografía* 41(2): 167-176.
- [11]. WHO (World Health Organization). 1996. Guidelines for drinking-water quality. Volume 2. Health criteria and other supporting information.

- [12]. Buck, K., Ross, J., Russell, A. & Bruland, K. (2006). A Review of Total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environmental Research (Impact Factor: 3.95)*. 09/2007; 105(1):5-19.
- [13]. Ziemacki, G., Viviano G. & Merli, F. (1989). Heavy Metals: Sources and Environmental Presence. *Ann, Ist, Super. Sanità*. Vol. 25, N. 3, pp. 531-536.
- [14]. Abalde, J., Cid, A., Torres, E. & Herrero, C. (1995). Bioacumulación de cobre en la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 5, 31-38.
- [15]. Salomons, W., Kerdijk, H., Van Pagee, H., Klomp, R. & Schreur, A. (1988). Behaviour and Impact Assessment of Heavy Metals in Estuarine and Coastal Zones. En: U. Seeliger, L. De Lacerda, S. Patchineelam (Eds) *Metals in Coastal Environments of Latin America*.
- [16]. Lobban C., Harrison, P. & Ducan, M. (1985). The Physiological Ecology of Seaweeds. Cambridge University Press. New York. 242p
- [17]. Peña, E., Palacios, M. & Ospina-Álvarez, N. (2005). Algas como indicadoras de contaminación. 1er Edición. Editorial: Víctor Hugo Dueñas. Universidad del Valle. Calí-Colombia.
- [18]. Kimbrough, K., Johnson, W., Lauenstein, G., Christensen, J. & Apeti, D. (2008). An Assessment of two decades of contaminants monitoring in the nation's coastal zone. *Silver Spring*, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS.
- [19]. Phillips, D. & Rainbow, P. (1993). Biomonitoring of trace aquatic contaminants. 1era Edition. New York – EEUU. *Chapman & Hall*.

- [20]. Imagen *Thalassiosira pseudonana*: Möhler, O. & Hoose, C. (2011). Atmospheric science: Ocean algae and atmospheric ice. *Nature Geoscience* (4), 76-77.
- [21]. Nelson, D., Tréguer, P., Brzezinski, M., Leynaert, A. & Quéguiner, B. (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycle*, Vol. 9 (3), 359-372.
- [22]. Sakshaug, E., Demers, S. & Yentsch, C. (1987). *Thalassiosira oceanica* and *T. pseudonana*: Two different photoadaptational responses. *Marine Ecology-Progress Series*, Vol.41:275-282.
- [23]. Ashworth, A., Coesel, S., Lee, A., Armbrust, E., Orellana, M. & Baliga, N. (2013). Genome-Wide diel growth state transitions in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *PNAS*, 110 (18), 7518-7523.
- [24]. Kiatmetha, P., Siangdang, W., Bunnag, B., Senapin, S. & Withyachumnarnkul, B. (2010). “Enhancement of survival and metamorphosis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*”. *Aquaculture International*, 19 (4), 599-609.
- [25]. Helm, M. & Bourne, N. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero (Manual Técnico), FAO. Roma.
- [26]. Eggen, M. (2012). *Uptake and biological response to zinc by Diatom Thalassiosira pseudonana*. [Tesis de Grado]. Norwegian University of Science and Technology.

- [27]. Vásquez-Suárez, A., Guevara, M., González, M., Cortez, R. & Arredondo-Vega, B. (2013). Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (*Thalassiosirales: Thalassiosiraceae*) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. *Revista de Biología Trópic*, Vol.61, (3). 1003-1013
- [28]. López, J., García, N., Jiménez, L. & Huerta, N. (2009). Crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades. *BIOTecnia*, Vol.XI, (No.1), 11-18.
- [29]. Jiménez, R. (1983). Diatomeas y Silicoflagelados del Fitoplancton del Golfo de Guayaquil. Acta Oceanográfica del Pacífico, 2da Edición. INOCAR-Ecuador, 2 (2). 194-281.
- [30]. Invasive Species Specialist Group (ISSG). (2005). *Potamocorbula amurensis* (mollusc). [en línea, 10 de abril del 2015]. Recuperado de <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=136>
- [31]. Sánchez i Gargallo, M. (1993). *Biología de las algas*. En Castello, F. (1era Edición), *Acuicultura Marina: Fundamentos biológicos y Tecnología de la producción* (pag. 109-114). Barcelona-España. Universitat de Barcelona.
- [32]. Byeong-gweon L., Jung-suk L. & Samuel L. (2006). “Comparison of selenium bioaccumulation in the clams *Corbicula fluminea* and *Potamocorbula amurensis*: a bioenergetic modeling approach”. *Marine Ecology Progress Series*, 175, 177-189.

- [33]. Brown, C. & Luoma, S. (1995). Use of the euryhaline bivalve *Potamocorbula amurensis* as a biosentinel species to assess trace metal contamination in San Francisco Bay. *Marine Ecology Progress Series*, 124, 129-142.
- [34]. Chang, J. & Torres, G. (2012). “Estrategias preventivas a especies invasoras acuáticas en el interior del golfo de Guayaquil en el 2011”. *Administración Ambiental*. Universidad de Guayaquil. 229p.
- [35]. Blacio, E., Lombeida, P. & Alvarez, R. (2002). “Técnicas usadas en el cultivo de Scallops (*Argopecten circularis*)”. *Congreso Iberoamericano de Acuicultura*. 502-509.
- [36]. Barreira, G. (2006). Toxicidad del cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la laguna de Mandinga, Veracruz-México. [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa-México.
- [37]. Torres, G. (2012). Estrategias ambientales relativas a especies invasoras en el Golfo de Guayaquil. SENESCYT. Pag. 9-229.
- [38]. Castillo, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua. Estandarización intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA-México.
- [39]. Ramírez, P. & Mendoza, A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. 1er Edición, Secretaría de Medio Ambiente y recursos naturales Instituto Nacional de Ecología (SEMARNAT). Editorial D.R. D.F. - México.

- [40]. Market, B. (2007). Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21 (1), 77-82.
- [41]. Calero, L. & Zambrano, M. (1997). “Ensayos preliminares para determinar concentraciones admisibles de algunos compuestos tóxicos en aguas marinas o estuarinas”. *Boletín Científico*. Vol. 6: 123-130.
- [42]. Camelo, E. (2011). Toxicología Ambiental. [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional Abierta y a Distancia-UNAD. Bogotá-Colombia.
- [43]. Mero, M. (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. Guayaquil-Ecuador.
- [44]. Manual Perkin Elmer Atomic Absorption Spectroscopy. Methods for water and wastewater Ed. 21.
- [45]. Walker, C., Sibly, R., Hopkin, S. & Peakall, D. (2012). The fate of Metals and Radioactive Isotopes in Contaminated Ecosystems. En Walker, C., Sibly, R., Hopkin, S. & Peakall, D. *Principles of Ecotoxicology. Fourth edition, CRC Press*. Pag 49-50.
- [46]. Calle, P., Alvarado, O., Monserrate, L., Cevallos, J., Calle N. & Alava, J. (2015). Mercury accumulation in sediments and seabird feathers from the Antarctic Peninsula. *Mar. Poll. Bull.* 91 (2015) 410–417.

[47]. Pérez, R. (2011). Efecto de los metales pesados en el medio ambiente y la salud humana. Departamento de Geología. Universidad de Pinar del Río "Hermanos Saíz Montes de Oca". Pinar Del Río. Cuba.