



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE CARIBE
CENTRO DE ESTUDIOS EN CIENCIAS DEL MAR
(CECIMAR)

**EFFECTO COMBINADO DE CAMBIOS DE SALINIDAD Y EXPOSICIÓN AL CADMIO SOBRE LAS
RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *Isognomon alatus* (Bivalvia: Isognomonidae).**

Juan Manuel Polo Osorio

Universidad Nacional de Colombia
Instituto de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR
Convenio Universidad Nacional de Colombia - INVEMAR
Santa Marta, D.T.C.H., Colombia
2014

**EFFECTO COMBINADO DE CAMBIOS DE SALINIDAD Y EXPOSICIÓN AL CADMIO SOBRE LAS
RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *Isognomon alatus* (Bivalvia: Isognomonidae).**

Juan Manuel Polo Osorio

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias – Biología

Director (a):

Ph.D. Nestor Hernando Campos

Línea de Investigación:

Biología Marina

Universidad Nacional de Colombia
Instituto de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR
Convenio Universidad Nacional de Colombia - INVEMAR
Santa Marta, D.T.C.H., Colombia
2014

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mis padres y hermanos un agradecimiento muy especial por apoyarme en todos los procesos de mi desarrollo personal y profesional.
- ❖ A mi tutor Néstor Campos por compartir sus conocimientos y por el apoyo durante este proceso de formación.
- ❖ Agradezco al INVEMAR por la financiación de esta investigación en el marco del Proyecto de Fortalecimiento de laboratorios de investigación marina de la nueva sede de INVEMAR auspiciado por Colciencias (Contrato RC 530-2012), y al programa de investigación de Calidad Ambiental Marina (CAM).
- ❖ Gracias a Carolina Jaramillo coordinadora académica y a mis compañeros del LAB_CAM, gracias por estar ahí y apoyarme en cada cosa que necesite durante mi presencia en el laboratorio.
- ❖ A los profesores del CECIMAR Arturo Acero y Sven Sea por sus clases y por ayudarme a estructurar el presente trabajo. Y también al profesor Eduardo Santa María por la estructuración final del trabajo.
- ❖ A Bibian Martínez por su amistad, apoyo incondicional y colaboración en el desarrollo de este trabajo de grado.
- ❖ A mis compañeros y amigos de la maestría Juan David, Mónica Almanza y Carlos Orozco por estar allí y alegrar la vida durante este proceso de formación, y a los nuevos amigos y colegas que encontré en INVEMAR.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	8
1.1 Efecto de la salinidad sobre los organismo marinos.....	9
1.2 Tasa de filtración de los bivalvos.....	10
1.3 Tasa de respiración.....	11
1.4 Tasa de excreción de amonio.....	12
1.5 Generalidades del <i>Isognomonalatus</i>	13
1.6 Contaminación por metales pesados.....	13
1.7 Generalidades del cadmio.....	15
2. METODOLOGÍA	17
2.1 Recolección preparación de los Organismos.....	17
2.2 Procedimiento para la evaluación de las respuestas fisiológicas.....	17
2.2.1 Tasa de consumo de oxígeno.....	18
2.2.2 Tasa de filtración	19
2.2.3 Tasa de excreción de amonio.....	20
2.3 Métodos para análisis de los datos.....	21
3. RESULTADOS	23
3.1 Tasa de Consumo de Oxígeno	23
3.1.1 Diferencias en el consumo de oxígeno entre los experimentos control.....	23

3.1.2	Efecto del choque salino en las tasas de consumo de oxígeno con aclimatación a 36.....	25
3.1.3	Efecto del choque salino en las tasas de consumo de oxígeno con aclimatación a 27	27
3.1.4	Efecto del choque salino en las tasas de consumo de oxígeno con aclimatación a 18.....	28
3.2	Tasa de Filtración.....	30
3.2.1	Diferencias en las tasas de filtración entre los experimentos control.....	30
3.2.2	Efecto del choque salino sobre la tasa de filtración con aclimatación a 36 ...	32
3.2.3	Efecto del choque salino sobre la tasa de filtración con aclimatación a 27	34
3.2.4	Efecto del choque salino sobre la tasa de filtración aclimatación a 18	35
3.3	Tasa de excreción de amonio.....	37
3.3.1	Diferencias en las tasas de excreción de amonio entre los experimentos control.....	37
3.3.2	Efecto del choque salino en la tasa de filtración aclimatación a 36.....	39
3.3.3	Efecto del choque salino en la tasa de filtración aclimatación a 27.....	41
3.3.4	Efecto del choque salino en la tasa de filtración aclimatación a 18.....	42
4.	DISCUSIÓN.....	47
	CONCLUSIONES.....	54
	REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS.....	55
	ANEXO A.....	62

RESUMEN

En este estudio, se evaluó el efecto combinado de los cambios de salinidad y la exposición al cadmio sobre las respuestas fisiológicas de *Isognomon alatus*. Se recolectaron 200 individuos que fueron trasladados al laboratorio, en el cual se aclimataron durante un mes a salinidades de 36, 27 y 18; posteriormente se realizaron dos experimentos. Los ejemplares fueron sometidos posteriormente a choques salinos cada uno con agua sin y con cadmio a salinidades de 36, 27 y 18, para un total de nueve pruebas por experimento; seis choques salinos y tres controles, (cada control es equivalente a la salinidad de aclimatación). Se evaluaron las diferencias entre las respuestas fisiológicas, con base en las tasas de filtración, respiración y de excreción de amonio, entre los controles y los grupos que recibieron el choque salino. Este experimento se repitió con los mismos individuos luego de un período de 15 días de recuperación a las salinidades de aclimatación, exponiéndolos esta vez a una concentración de 1 µg/2L de cloruro de cadmio. Las comparaciones entre los experimentos se realizaron mediante análisis no paramétricos. Para determinar diferencias debidas a los choques salinos se aplicaron pruebas a-priori de Kruskal-Wallis y cuando éstas fueron significativas, se utilizaron pruebas pareadas de Wilcoxon para muestras independientes, con el fin de determinar entre qué grupos existían las diferencias. Las respuestas frente a la exposición al cadmio se compararon mediante pruebas de Wilcoxon–Wilcoxon para muestras dependientes. No se determinaron diferencias entre las tasas de consumo de oxígeno de las ostras acondicionadas a salinidades de 36 y 27; mientras que éstas, si presentaron diferencias respecto a la salinidad de 18; la tasa de filtración no presentó diferencias significativas, mientras que la tasa de excreción de amonio se incrementó en la salinidad de aclimatación de 27, pero disminuyó en la salinidad de 18. El efecto del choque salino permitió comprobar que *I. alatus* presentó respuestas distintas ante los cambios súbitos de salinidad; la respuesta inicial de los organismos fue mecánica mediante el cierre de las valvas, ajustándose posteriormente a una estrategia que puede ser osmorreguladora (manteniendo sus fluidos a una concentración diferente a la del medio) u osmoconforme (permitiendo que sus fluidos lleguen a ser isosmóticos con el medio), dependiendo de la salinidad de aclimatación y de la intensidad del choque salino. En salinidades de aclimatación de 36, los descensos a 27 generaron que las ostras empezaran a osmorregular, mientras que en los descensos a 18 la respuesta fue osmoconforme. Los grupos aclimatados a la salinidad de 27 presentaron una estrategia osmorreguladora tanto en los incrementos a 36 como en los descensos a 18, indicando que las respuestas ante cambios súbitos de salinidad fueron más eficientes cuando estaban aclimatados a condiciones estuarinas. Los individuos aclimatados a bajas salinidades, mostraron un decaimiento en la actividad metabólica y cuando se incrementó la salinidad a condiciones de mayor tolerancia, los organismos respondieron de forma lenta manteniendo un consumo de oxígeno y tasa de filtración bajos, e incrementando su tasa de excreción de amonio. El efecto del cadmio generó un descenso en la actividad metabólica en las tres salinidades de aclimatación, principalmente en 18, observándose un efecto sinérgico y negativo en las ostras. Durante los choques salinos, se prolongó el tiempo de la respuesta mecánica, mediante el cierre de las valvas, que se confirma por las bajas tasas de filtración y consumo de oxígeno; asimismo, se observa que los organismos tienen una respuesta al estrés desdoblado proteínas para depurar el tóxico incrementando y un aumento en la excreción de amonio. El grupo aclimatado a una salinidad de 27 respondió de forma más eficiente ante el efecto del cadmio, observándose una mayor capacidad de tolerancia que en los experimentos aclimatados a salinidades de 36 y 18.

Palabras clave: *Cadmio; salinidad; Isognomon alatus; respuestas fisiológicas; tasa de filtración; tasa de excreción de amonio; tasa de respiración.*

ABSTRACT

In this study was evaluated the combined effect of salinity changes and cadmium exposure on the physiological responses of *Isognomon alatus*. 200 individuals of the species were taken to the laboratory where they were conditioned during one month at salinities of 36, 27 and 18; subsequently two experiments were executed, submitting them to salt shock with water with and without cadmium in of 36, 27 and 18, for a total of 9 tests for each experiment; 6 six saline shocks and three controls (each control is equivalent to the acclimation salinity). The differences between the physiological responses, based on filtration rate, respiration and ammonia excretion from the controls and the grow that received a saline shock were evaluated. This experiment was repeated with the same individuals, this time exposing them at 1 µg/L cadmium concentration. Comparisons between the experiments were performed using non-parametric analyzes. To determine differences due to salt shock, priori tests of Kruskal-Wallis were applied and when there were significant, paired Wilcoxon tests for independent samples were applied, in order to determine between which grow the differences existed. Responses to cadmium exposure were compared using Wilcoxon-Wilcoxon test for dependent samples. No differences were determined between oxygen consumption rate of oysters conditioned at salinities of 36 and 27; while they presented differences in salinity of 18 PSU; filtration rate was not significantly different, while ammonia excretion rate, increased in conditioning salinity of 27, but decreases at 18 salinity. Salt shock effect allowed to verify that *I. alatus* has different responses to sudden changes in salinity; the initial response of organisms is mechanical by the closure of the valves, then adjusting to a strategy that can be osmoregulatory or osmoconform, depending on the conditioning salinity and salt shock intensity. In conditioning salinities of 36, decline at 27 generated a osmoregulatory response, while decreases at 18 the response was osmoconform. The gro conditioned at 27 salinity presented an osmoregulatory strategy in increases at 36 and decreases at 18, indicating that responses to sudden changes in salinity are more efficient when they are put into estuarine conditions. Individuals conditioned at low salinity, show a decline in metabolic activity, and when the salinity increased to a greater tolerance condition, organisms respond in a slow way, maintaining a low oxygen consumption and filtration rate, and increasing their ammonium excretion rate. Cadmium effect generated a decrease in metabolic activity in the three conditioning salinities, mainly at 18, showing a synergistic and negative effect in oysters. During saline shocks, the mechanical response time is prolonged by the valves closure, which is confirmed by the low filtration rate and oxygen consumption; also, it is observed an attempting of the organism to purify the toxic by increasing ammonia excretion. The group conditioned at a salinity of 27 responded more efficiently to cadmium effect, showing a greater osmoregulatory capacity than in the experiments at salinities of 36 and 18.

Keywords: *Cadmium; salinity; Isognomon alatus; physiological responses; filtration rate, ammonia excretion rate; respiration rate.*

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El equilibrio del ecosistema marino se ha visto alterado en las últimas décadas por un marcado aumento de contaminantes, entre los que se destacan los metales pesados. La creciente industrialización y demás actividades antropogénicas, generan una gran cantidad de residuos que, sin un adecuado tratamiento, son vertidos en los ríos, y en últimas transportados al medio marino (Gamboa y Bonilla, 1983).

De acuerdo con los estudios del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR (Colombia), las aguas del litoral Caribe han sufrido un incremento en la contaminación por estos elementos, siendo las zonas más afectadas aquellas cercanas o donde se han ubicado los principales asentamientos humanos, como las ciudades de Cartagena, Barranquilla, Santa Marta, Coveñas, Tolú y Riohacha (INVEMAR, 2004). La contaminación marina en la costa Caribe colombiana, se deriva de múltiples fuentes, incluyendo el petróleo y sus derivados, minerales, contaminantes urbanos e industriales y contaminantes agrícolas. El dragado remueve los sedimentos contaminados y hace que éstos pasen a la columna de agua, los cuales son acumulados por organismos marinos tales como los bivalvos (Manjarrez *et al.*, 2008). Por otro lado las respuestas fisiológicas de algunos organismos marinos, como los bivalvos, también se ven afectadas directamente por factores ambientales tales como la salinidad, temperatura, pH entre otros. La salinidad se considera como uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento y sobrevivencia de los organismos acuáticos. Este es un factor ambiental que controla la distribución de las especies e influye en los procesos fisiológicos, como la tasa de filtración, respiración y excreción de amonio de los organismos marinos y estuarinos.

Los metales pesados son contaminantes que entran a los cuerpos de agua y se precipitan al sedimento, produciéndose un aumento progresivo de sus concentraciones en el tiempo y se bioacumulan en organismos que forman parte de esos ecosistemas (Sadiq, 1992). Estos elementos, en comparación con otros contaminantes, no son biodegradables y tienen un ciclo ecológico y geoquímico global en el cual las aguas naturales son una de las principales vías de transporte. Son críticos los efectos negativos que ellos ejercen, debido a que pueden causar graves daños a nivel celular, ser asimilados por el fitoplancton y organismos filtradores e incorporados a la cadena alimentaria provocando graves alteraciones ecológicas y biológicas, no solo al ecosistema, sino a los humanos (Gaad y Groffiths, 1987).

Los estudios sobre la toxicidad de los metales pesados en organismos acuáticos, y su efecto sobre especies en particular, son importantes porque generan información que contribuye a predecir los efectos adversos sobre la biota de ecosistemas acuáticos (Chung, 1978; Allen *et al.*, 1989), a entender sus mecanismos de respuesta y además de ser una herramienta para evaluar el estado de salud de los organismos en un ecosistema (Lemus *et al.*, 2012). Dicho lo anterior, es muy importante entender las respuestas fisiológicas de un organismo ante una situación de estrés, ya que a medida que es capaz de responder funcionalmente a cambios en el ambiente, también debe serlo el ecosistema; y un

acercamiento ecofisiológico permite entender la presencia de una especie en un lugar con determinadas características (Vernberg, 1983).

En esta investigación se propuso evaluar en el laboratorio, el efecto combinado de la salinidad y la exposición al cadmio, sobre las respuestas fisiológicas del bivalvo del litoral *Isognomon alatus*. Los resultados servirán como caso de estudio en el entendimiento de la relación entre los procesos ecofisiológicos normales y los patrones de distribución de las especies, en conjunción con situaciones de estrés producidas por contaminantes.

1.1 Efecto de la salinidad sobre los organismos marinos

La salinidad es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento y sobrevivencia de los organismos acuáticos. Es un factor ambiental que controla la distribución de las especies e influye en los procesos fisiológicos de los organismos marinos y estuarinos; a pesar de que la diferencia de salinidad tiene implicaciones fisiológicas muy diversas, generalmente se piensa sobre todo en los efectos osmóticos; la capacidad de sobrevivir en diferentes medios osmóticos se desarrolló en los grupos animales más avanzados por la evolución de un medio interno estable, que actúa amortiguando los rigores del medio externo sobre los tejidos internos. Por ello la capacidad de mantener un medio interno adecuado frente a un estrés osmótico (acción que perturba el equilibrio iónico y osmótico del animal) ha tenido un papel muy importante en la evolución. De hecho, la distribución geográfica de los animales está determinada por los factores ambientales, entre los cuales la naturaleza osmótica del medio es uno de los más importantes (Morillo y Belandria, 2006)

La osmoregulación es un mecanismo importante de adaptación al medio ambiente de las especies acuáticas marinas. La importancia energética de la osmoregulación ha sido estimada convencionalmente, por el consumo de oxígeno. Esta se ve afectada por los cambios de salinidad, no sólo en los bivalvos, sino también, en una gran variedad de organismos acuáticos como crustáceos y peces. La osmoregulación de los fluidos corporales de un organismo se define como la regulación de la concentración de las sales y fluidos a través de membranas permeables, cuando están en concentraciones diferentes de la de los medios externos, manteniéndolos al mismo nivel por diferencia de gradiente de la presión osmótica (Robertson, 1960; Mantel y Farmer, 1983).

La capacidad de osmorregular está directamente relacionada con la distribución de los organismos acuáticos, con los ciclos de vida y con su comportamiento reproductivo. En peces que migran regularmente entre el agua de mar y dulce (como el salmón y la anguila), el epitelio branquial cambia para adaptarse a la salinidad ambiental. La adaptación fisiológica de las branquias supone la síntesis o la destrucción de componentes moleculares de los sistemas de transporte epiteliales, y cambios de la morfología y número de células del cloro. La regulación osmótica está mediada por hormonas, que afectan a la diferenciación celular y al metabolismo; asimismo, la hormona esteroide cortisol y la hormona del crecimiento estimulan los cambios de la estructura branquial asociados a la transición

del agua dulce a la marina, mientras que la prolactina estimula los cambios de la estructura branquial que acompañan el paso inverso (Hill, 1976; Jobling, 1995).

Las especies eurihalinas pueden mantener sus fluidos a una concentración diferente a la del medio (osmoreguladores), o permitir que sus fluidos lleguen a ser isosmóticos con el medio (osmoconformes). La osmoregulación representa un costo energético adicional que puede actuar de dos maneras generales: 1) mantenerse hipertónicos al medio diluido, y prácticamente isotónicos al ambiente concentrado; 2) mantenerse hipotónicos a altas salinidades e hipertónicos a baja salinidad como ocurre en los teleósteos eurihalinos y camarones (Randall *et al.*, 1998; Hochachka y Somero, 1978; Hill, 1978).

En casos extremos de cambio de salinidad hay solo una distinción marginal entre osmoreguladores y osmoconformes, ya que la respuesta adaptativa, por ejemplo, en el camarón carideo *Palaemonetes varians*, la permeabilidad permanece aparentemente constante en un medio de 120%, 70% y 20% de agua de mar, medio en el cual, el organismo es hipotónico, isotónico e hipertónico, respectivamente. Este tipo de respuesta señala una capacidad osmoreguladora alta, en la cual, la presión osmótica de los fluidos puede mantenerse constante dentro de un rango de salinidad amplio, y representa una ventaja adaptativa para enfrentar las fluctuaciones ambientales en un medio tan dinámico como el estuarino (Hochachka y Somero, 1978, Newell, 1976; Barber *et al.*, 1983).

1.2 Tasa de filtración de los bivalvos

En los moluscos bivalvos, el crecimiento está directamente relacionado con la tasa de filtración, la tasa de bombeo, la concentración de alimento, las condiciones fisicoquímicas del medio, así como la capacidad de retención y asimilación de nutrientes (Walne, 1985). La tasa de filtración se define como el volumen de agua filtrada, libre de partículas, por unidad de tiempo. A menudo se le confunde con la tasa de bombeo, que es el volumen de agua que fluye a través de las branquias por unidad de tiempo. Cabe señalar que la tasa de bombeo se mide por métodos directos, en los que se cuantifica el agua expulsada por el organismo, mientras que la tasa de filtración es determinada por métodos indirectos que miden la disminución de la concentración de partículas suspendidas en un volumen conocido por unidad de tiempo. La tasa de filtración está directamente relacionada con la temperatura, talla del organismo, concentración del alimento, ritmo de las mareas, velocidad de la corriente y la salinidad (Schulte, 1975).

Otros autores afirman que la tasa de alimentación de los bivalvos se compone de la tasa de ingestión, que se define como el número de partículas en un volumen de agua por unidad de tiempo y de la tasa de aclaramiento, que es el volumen de agua removido totalmente de partículas por unidad de tiempo. Estas tasas de filtración se ven afectadas por factores intrínsecos como lo son la edad, la talla, estado reproductivo, nivel de actividad, condición fisiológica e información genética, y por factores extrínsecos como la concentración y calidad del alimento, temperatura, tensión de oxígeno y

salinidad entre otros (Bayne, 1976; Silva, 1986; Shumway, 1991). La estimación de la tasa de alimentación en bivalvos se puede realizar de manera directa e indirecta. Directamente separando el sifón exhalante e inhalante y midiendo el flujo de agua a través de ellos, e indirectamente por la determinación de la tasa de remoción de partículas (Bayne, 1976).

1.3 Tasa de respiración

Como respiración se entiende el proceso de intercambio de gases, en el que el oxígeno es tomado y se libera el CO₂. En este proceso suceden los siguientes pasos: 1) un intercambio de gases entre los fluidos corporales y el medio externo; 2) el transporte de gases en el organismo; 3) la asimilación y liberación de gases por y desde la célula y 4) procesos de oxidación final (fosforilación en las cadenas respiratorias). El intercambio gaseoso sucede a través de la solución del gas en el agua (O₂) o el paso de la solución a la forma gaseosa (CO₂); en los dos casos el agua es necesaria para el intercambio gaseoso; el cual ocurre de forma diferente dependiendo si el epitelio respiratorio se encuentra dispuesto hacia afuera (branquias) o hacia dentro (pulmones y tráquea). En el primer caso, no existe peligro de sequedad y se pueden utilizar concentraciones muy bajas de oxígeno, mientras que en el segundo, se pueden soportar peligros por sequedad pero se requieren concentraciones de oxígeno elevadas. Para organismos acuáticos el suministro de oxígeno es más problemático que la liberación del CO₂, a causa de la alta solubilidad del segundo en el agua. El consumo de oxígeno de un animal puede ser tomado como medida de la intensidad metabólica, la cual, depende de la especie y varía con las condiciones del medio (temperatura, salinidad, tensión de oxígeno, grado de adaptación a los factores ambientales), así como también de los diferentes factores internos (Hanke *et al.*, 1977).

Los bivalvos presentan branquias muy desarrolladas y transformadas en relación con las branquias primitivas, esto se debe a que no solo cumplen una función respiratoria, sino que además son importantes para filtrar y extraer las partículas alimentarias que se encuentran en suspensión en el agua. Esta evolución de la branquia hacia un órgano filtrador llevó a la forma de la lamelibranquia en "W".

Por otro lado, en los estuarios es común registrar disminuciones importantes del oxígeno disuelto relacionado con descargas de materia orgánica, por estratificación y al incremento de la temperatura. En un medio que presenta una concentración fluctuante de oxígeno los organismos deben de ser capaces de tomar la cantidad necesaria para cubrir su requerimiento metabólico independiente al medio, o tolerar la disminución de la actividad cuando la concentración decae drásticamente. Otro mecanismo paralelo, lo adiciona el origen evolutivo del metabolismo en un ambiente anaerobio, lo cual permite que la mayoría de los organismos aerobios puedan realizar la fermentación como vía metabólica bajo una situación con déficit de oxígeno y con un requerimiento energético de normal a elevado (Herreid, 1980; Hochachka, 1986).

1.4 Tasa de excreción de amonio

El conocimiento del contenido de amonio en agua marina es de valor considerable para el estudio del ciclo del nitrógeno en los océanos. El amonio en el mar proviene principalmente de las excreciones de los animales marinos y la descomposición de compuestos orgánicos nitrogenados, provenientes a su vez de organismos muertos. Diversos organismos fitoplanctónicos utilizan el amonio y lo convierten nuevamente en compuestos orgánicos nitrogenados, o puede ser oxidado por acción química, fotoquímica o bacteriana a nitrito, y luego a nitrato (Riley, 1953). En muchas investigaciones la tasa de excreción de amonio ha sido evaluada para indicar cómo es el funcionamiento y utilización de la proteína dietética y su eficiencia, bajo diversas condiciones medioambientales (Mantel y Farmer, 1983).

Es importante evaluar la excreción de amonio, ya que este proceso interviene en los procesos de osmoregulación, principalmente en dos aspectos, como un constituyente de aminoácidos libres para regulación osmótica intracelular (Bishop *et al.*, 1980) y como un ión de intercambio para la regulación del Na⁺ en la hemolinfa (Mangum *et al.*, 1976; Pressley *et al.*, 1981). También porque ayuda a determinar cómo responden los organismos a variaciones en el ambiente como los son los cambios de temperatura, salinidad, pH entre otros.

El estudio de la tasa de excreción de amonio debido a la respuesta al choque a diferentes salinidades puede dar información sobre las características del metabolismo del nitrógeno. El catabolismo de las proteínas lleva a la formación del amonio, compuesto que representa del 60 a 90% del total del nitrógeno excretado en numerosas especies de bivalvos. Las pérdidas de energía asociadas con la excreción de amonio, representan un bajo porcentaje del total de energía absorbida (1-10% en bivalvos mitílidos), lo que ha llevado a que estas pérdidas sean ignoradas o en algunos casos estimadas por diferencia dentro de los estudios de balance energético. Sin embargo muchas veces ha sido evidente que los estudios de la excreción de amonio pueden representar un componente significativo del total de energía absorbida, especialmente cuando se encuentra en procesos de reproducción o deficiencia energética (Navarro, 2001).

1.5 Generalidades sobre la especie *Isognomon alatus*

Es un bivalvo distribuido a lo largo del Caribe, desde la Florida hasta Trinidad y Tobago, en lagunas costeras y aéreas protegidas especialmente, como fauna asociada a raíces de *Rhizophora mangle*, rompeolas, en grietas o rocas expuestas a corrientes de agua. Alcanza, tallas de hasta 76-90 mm y llega a ser adulto a los seis meses, con un ciclo de vida que sobrepasa el año (Siung, 1980). Es considerada una de las especies monitoras para los estudios de bioacumulación de contaminantes, para valorar su respuesta frente a los cambios en los ambientes costeros, por su resistencia a las variaciones de salinidad, temperatura y pH, y por ser abundante en las aéreas costeras del Caribe,

favorecidas estas condiciones por ser un organismo sésil y con facilidad para efectuar monitoreos y la tolerancia a los metales pesados entre otros (Campos 1988; Ismail, 2006).

Existen pocos estudios disponibles relacionados con la capacidad de *Isognomon alatus* de asimilar y depurar metales pesados bajo condiciones de campo y de laboratorio; también hay pocos estudios relacionados con las respuestas fisiológicas de la especie frente a estos contaminantes. Uno de los trabajos que se han realizado para Colombia, se llevó a cabo en la Ciénaga Grande de Santa Marta, la Bahía de Cartagena y Bahía Chengue, en el que se demostró la capacidad de *I. alatus* para bioacumular metales pesados, como cadmio y cobre; en este estudio se determinó que existen niveles altos y bajos de estos elementos, y se observó, que las concentraciones medidas, fueron lo suficientemente altas para estas zonas, para satisfacer fines de vigilancia sin aparente detrimento de esta especie (Campos, 1988). Estudios recientes demuestran la capacidad de *Isognomon alatus* para acumular cobre en laboratorio, para evaluar su potencial de acumulación hasta el punto límite de asimilación. Las ostras fueron sometidas a concentraciones de cobre de 3 mg/L y 6 mg/L. Los resultados de éste experimento determinaron que *I. alatus* tiene capacidad de acumulación alta con efectos letales posteriores, frente a una exposición constante de este metal (Romero, 2010).

En Venezuela, República Dominicana y Puerto Rico, *I. alatus* se denomina ostra plana de árbol y se utiliza como biomonitor de la contaminación. Allí se encontró que la depuración de Cu en *I. alatus* fue un proceso rápido, lográndose un 50% en semanas a un mes, en el campo y experimentos de laboratorio. Los autores determinaron también un incremento significativo en la concentración de cobre en éstas después de la exposición por cinco meses a efluentes de granjas de cerdos en Malasia. Los estudios anteriores muestran que *I. alatus* tiene una gran capacidad de acumulación y de depuración, y se podría utilizar como un organismo centinela apropiado para los programas de vigilancia (Saed *et al.*, 2004).

1.6 Contaminación por metales pesados

Los metales pesados son uno de los principales contaminantes y más tóxicos para los ecosistemas acuáticos; dado que son elementos no biodegradables, y tienden a acumularse en los tejidos de animales y vegetales acuáticos y permanecen en ellos por largos períodos, desencadenando procesos de bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación. La bioacumulación se refiere al aumento de una sustancia en los tejidos de un organismo a partir del ambiente, por el cual organismos que viven en un medio que contiene concentraciones relativamente bajas de una sustancia química pueden llegar a acumular en sus tejidos y alcanzar concentraciones considerablemente más altas que las existentes en su medio, con el consiguiente perjuicio para la salud de los organismos (Manjarrez *et al.*, 2008).

A partir de grandes accidentes ambientales ocurridos con metales pesados en la década de 1950-1960 (enfermedad de Minamata con el mercurio o de la enfermedad Itai-Itai por cadmio, entre otras),

se inició en los años 1970 una investigación creciente sobre la evaluación de la contaminación por estos metales y otras sustancias. Esto permitió desarrollar sistemas de obtención de información y monitoreo ambiental tanto sobre compartimentos abióticos como sobre organismos y permitió profundizar en estudios sobre procesos de bioacumulación, efectos de contaminantes sobre organismos y la relación de contaminantes en sedimentos y organismos (Manjarrez *et al.*, 2008). Los invertebrados acuáticos acumulan metales pesados en diferentes concentraciones en sus tejidos, que pueden ser o no esenciales para su metabolismo. Además los invertebrados acuáticos viviendo en un hábitat determinado, podrían tener diferentes concentraciones de estos metales pesados (Hare, 1992; Phillips y Rainbow, 1994), incluso en especies de un mismo género (Moore y Rainbow, 1987; Rainbow, 1998).

Klerks y Weis (1987) hicieron una revisión de la persistencia de poblaciones de moluscos en aguas contaminadas, identificaron tres estrategias: tolerancia, aclimatación y adaptación. Estas pueden desarrollarse durante exposición a concentraciones subletales desde el momento que se produce la fecundación y por lo tanto las poblaciones pueden haber desarrollado resistencia genética por medio de selección natural de individuos con resistencias diferenciales. Esta tolerancia se manifiesta en la composición de las comunidades, en los ecosistemas contaminados. Diferentes especies manifiestan diferentes respuestas para cada tipo de contaminante. En términos generales, la bioacumulación y biomagnificación se dan cuando los contaminantes no interfieren con procesos vitales o las concentraciones son lo suficientemente bajas como para permitir la tolerancia, aclimatación o adaptación del organismo. Asimismo, la bioacumulación depende de la biodisponibilidad (esto es, en forma soluble asimilable) del contaminante condicionada por: 1) la movilización de los metales en las aguas intersticiales y su especiación química; 2) la transformación (p.ej. metilación) de metales como As, Hg, Pb y Sn; 3) el control ejercido por los componentes de los sedimentos (p.ej. óxido de hierro y materia orgánica); 4) la competencia entre metales, como Cu, Ag, Zn y Cd por posiciones de ingreso en los organismos, y 5) los efectos de la bioperturbación, salinidad, coeficiente de redox y pH.

Los metales pesados se han asociado con una serie de modificaciones y adaptaciones fisiológicas en los moluscos, lo que les permite su tolerancia y bioacumulación selectiva, tanto entre especies como entre los diferentes tejidos. El incremento en la tolerancia a los metales pesados se asocia con la inducción de proteínas afines a los metales (Roesijadi, 1986), modificando la naturaleza y contenido de éstas en los tejidos, conjuntamente a un incremento en metalotioneína, el agente de enlace (Lewis, 1990).

Es bien conocida la capacidad de los bivalvos para sobrevivir en la zona intermareal, la cual, está sujeta a frecuentes periodos de desecación, cambios de salinidad, temperatura y fuertes cargas de sedimentos. Cuando uno de estos factores se vuelve intolerable, los bivalvos lo sobrellevan cerrando sus valvas y modificando su proceso respiratorio hacia la vía anaeróbica, lo que resulta en un incremento del ácido láctico en la hemolinfa y la modificación de la acidez del líquido intervalvar (Galtsoff, 1964). Se ha demostrado un proceso fisiológico similar con la disminución en la tasa de captación de oxígeno y reducción en las tasas de filtración por exceso de cobre en el ambiente (Lewis, 1990). La tasa de filtración está asociada con una menor actividad ciliar en respuesta al incremento en los niveles de contaminantes (Abel, 1976; Almeida *et al.*, 2003). Las respuestas en el comportamiento

pueden también ser una manifestación de cambios fisiológicos inducidos por los contaminantes, ya sea en forma directa como el caso del DDT y sus derivados, que en *Dreissena polymorpha* inducen a un adelanto en el desove (Binelli *et al.*, 2001), o indirectamente, cuando modifican los niveles de serotonina y dopamina que tienen un efecto sobre el tono muscular y el ciclo reproductivo (Almeida *et al.*, 2003).

1.7 Generalidades del cadmio

Entre los metales pesados, el cadmio ha adquirido una gran importancia toxicológica por estar asociado directamente a la actividad humana. A partir de la mitad del siglo pasado, la producción y el uso de cadmio al nivel industrial, se ha incrementado rápidamente, y su eliminación se ha convertido en un problema serio para el ambiente. El uso más habitual de este metal es en la industria, para la estabilización de algunos plásticos y en la fabricación de baterías (USPHS, 1997).

Lemus *et al.*, (2012) señalan que el cadmio tiene diferentes efectos subletales en el bivalvo *Perna viridis*, como el aumento en la síntesis de metalotioninas (MT) y el grupo sulfidril (GSH) en el hepatopáncreas en individuos expuestos a una concentración 1 mg/L de Cd, con resultados similares para la cavidad del manto. Las MT del musculo, branquias y resto de tejidos no fueron afectadas durante la exposición al metal, a excepción del incremento de esta proteína en las branquias a la dosis de 1 mg/L de Cd. En este mismo experimento el consumo de oxígeno disminuyó en función de la concentración del cadmio. Este metal activó la síntesis de MT y de GSH, particularmente en el hepatopáncreas y en el manto, para compensar o contrarrestar el daño causado por el Cd.

Otros estudios como el de Larsson *et al.* (1981) señalan que el cadmio tiene diferentes efectos subletales en peces teleósteos, como fracturas y deformidad vertebral, daños testiculares, desarrollo defectuoso de óvulos, reducción del consumo de oxígeno por los tejidos branquiales, cambios patológicos en los tejidos renal e intestinal, efectos hematológicos y disturbios en el metabolismo de carbohidratos. Muchos de los efectos tóxicos en humanos (lesiones en huesos y lesiones renales, anemia e hiperglicemia) son muy parecidos a los efectos del cadmio en otros mamíferos.

El efecto tóxico de los metales en su forma iónica ha sido descrito para el cadmio (Theede y Scholz, 1982; Campos, 1987). La toxicidad del cadmio es muy compleja, ya que presenta múltiples posibilidades de formar macromoléculas, por ejemplo remplazando otros metales, que desempeñan un papel muy importante en la actividad enzimática o reaccionan con grupos biológicos activos como los grupos carboxil, fenilosil, sulfidril, disulfito y fosfato. Cada uno de los metales presenta diferente grado de afinidad con diferentes grupos químicos, por ejemplo Hg, Cd y Ag reaccionan en especial con los grupos sulfidril (SH-), el Pb también lo hace con los fosfatos. En el caso del grupo SH- se ha identificado que desempeña un papel importante por la formación de proteínas capaces de atrapar metales. La gran afinidad del cadmio por el grupo sulfidril conduce a la formación, tanto en el

hombre, como en los animales, de proteínas de cadenas cortas, con un alto contenido de cisteína (Friberg *et al.*, 1976).

De forma natural, grandes cantidades de cadmio son liberadas al ambiente, más o menos 25.000 t/año. La mitad de éste es liberado en los ríos a través de la descomposición de rocas y la otra es liberada al aire a través de fuegos forestales y volcanes. El resto es liberado por las actividades humanas, como es la manufacturación de baterías y aleaciones entre otros. Las aguas residuales con cadmio procedentes de las industrias terminan mayoritariamente en el suelo. Las causas de estas corrientes de residuos son por ejemplo la producción de zinc, minerales de fosfato y la industria del estiércol. En las corrientes residuales puede, también entrar en el aire a través de la quema de residuos urbanos y de la quema de combustibles fósiles. Debido a las regulaciones sólo una pequeña cantidad de cadmio entra ahora en el agua a través del vertido de aguas residuales de casas o industrias (Greenwood y Earnshaw, 1997).

La escorrentía es una fuente importante de entrada de cadmio a los ecosistemas costeros, por el uso de fertilizantes como los fosfatos. Parte del cadmio termina en el suelo después de que el fertilizante es aplicado en las granjas y el resto es transportado en las aguas superficiales por los ríos. También puede ser transportado a grandes distancias cuando es absorbido por el lodo. Este lodo rico en cadmio puede contaminar las aguas superficiales y los suelos, el cadmio es adsorbido fuertemente por la materia orgánica del suelo. En los suelos ácidos, se aumenta la disponibilidad y por lo tanto la toma del metal por las plantas, lo que se convierte en un tóxico potencial para los animales que dependen de las plantas para sobrevivir; puede acumularse en los tejidos de los herbívoros, especialmente cuando estos consumen una mayor diversidad de alimento. El ganado puede concentrar grandes cantidades de cadmio en sus riñones debido a que éste también sintetiza metalotioneínas (Greenwood y Earnshaw, 1997).

En ecosistemas acuáticos el cadmio puede bioacumularse en mejillones, ostras, gambas, langostas y peces. La susceptibilidad al cadmio puede variar ampliamente entre organismos acuáticos. Se sabe que los organismos que habitan en ambientes salinos son más resistentes al envenenamiento por este metal que los organismos de agua dulce. Los animales que comen o beben este contaminante, presentan algunas veces una presión sanguínea muy alta, daños del hígado, nervios y el cerebro (Greenwood y Earnshaw, 1997).

2. METODOLOGÍA

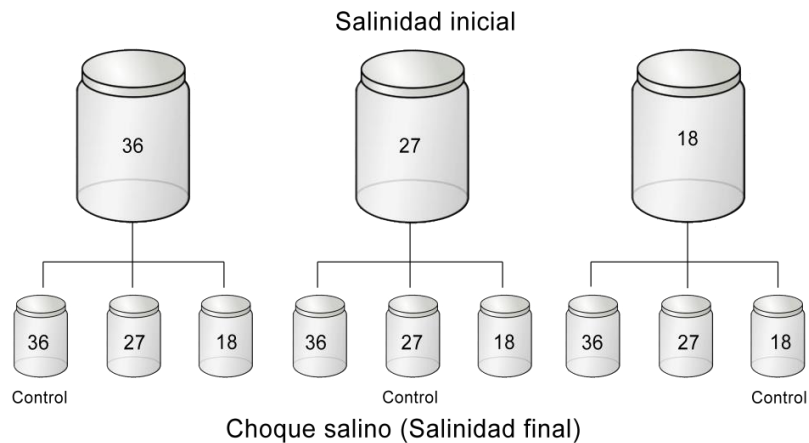
2.1 Recolección y preparación de los organismos

El material biológico fue recolectado en la Escollera, sector El Rodadero con coordenadas 11° 12' 31,56'' N y 74° 13' 30,49'' W de la región de Santa Marta, en el cual se puede encontrar abundantemente. Se recolectaron 200 individuos de talla media entre 4 y 6 cm (ya que en estas tallas las ostras se comportan mejor metabólicamente en experimentos pilotos realizados y por ser más abundantes en el área de recolección); los cuales fueron previamente lavados, eliminándose los epibiontes. Los animales fueron trasladados al laboratorio del CECIMAR, en el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR), donde se colocaron en acuarios de vidrio y se mantuvieron durante 30 días con aireación constante, realizando dos recambios parciales de agua de mar diarios, con agua tomada del sector de Punta Betín en Santa Marta, de la cual los animales obtenían su alimento.

2.2 Procedimiento para la evaluación de las respuestas fisiológicas

Los individuos fueron aclimatados durante un mes en tres acuarios, a tres salinidades diferentes (36, 27 y 18). Después del período de aclimatación, se realizaron los experimentos para determinar la respuesta de los individuos ante el choque salino; para esto, se dividieron las ostras de cada uno de los tres acuarios en tres grupos, los cuales, fueron expuestos a tres salinidades finales (36, 27 y 18), para un total de nueve experimentos: seis choques salinos y tres controles. (Gráfica 1).

Gráfica 1. Montaje de los experimentos para la medición de la tasas de filtración y excreción de amonio.



Para determinar la respuesta metabólica de las ostras ante el choque salino, se midieron las tasas inicial y final de respiración, filtración y excreción de amonio. Después de este experimento (**sin cadmio**), se realizó un segundo experimento (**con cadmio**) con el fin de determinar de qué manera este metal afecta la respuesta metabólica de los organismos. Lo cual, se realizó sometiendo a los individuos a una concentración sub-letal de $1 \mu\text{g}/2\text{L}$ de cloruro de cadmio, determinada con base en el estudio de (Manjarrez *et al.*, 2008), quienes evaluaron la bioacumulación de metales pesados en *Isognomon alatus*. El experimento completo se realizó por triplicado, con el fin de determinar si existe consistencia en los resultados observados.

2.2.1 Tasa de consumo de oxígeno

Después del período de aclimatación de los individuos, se midió la tasa respiratoria en cámaras respirométricas cerradas de flujo continuo (Gráfica 2) (Hanke *et al.*, 1977). El suministro continuo de agua se surtió mediante tres tanques de 19 L, cada uno con concentraciones de salinidad diferentes (36, 27, 18). En cada cámara se introdujeron cinco ostras y luego se hizo fluir el agua durante 5 h. La primera alícuota de agua se tomó en una botella Winkler de 50 mL, pasada la primera media hora a partir del choque salino. El oxígeno de la muestra se fijó con 0,5 mL de sulfato de manganeso y 0,5 mL de solución yoduro-alcalina. Posteriormente, se tomaron las muestras cada hora durante las siguientes 5 horas, llevándose a cabo el mismo tratamiento (Gráfica 2).

Gráfica 2. Montaje del experimento para la medición de la tasa de consumo de oxígeno.



La velocidad de flujo de la cámara se midió en cada tiempo con el fin de mantenerlo constante, ya que no debía sobrepasar de 20 mL/min. Esto permitió observar las respuestas del consumo de oxígeno de los individuos en el tiempo, ante cambios bruscos de salinidad. Para el segundo experimento se realizó el procedimiento anterior, agregando cloruro de cadmio al tanque de suministro de agua de 19 L para obtener una concentración final de 0,387 mg/19L de cloruro de cadmio.

La cantidad de oxígeno disuelto para cada muestra, se determinó en el LABCAM del INVEMAR, mediante el método de Winkler (1988) ajustado por (Garay *et al.*, 2001); utilizando la siguiente fórmula para la estandarización de los datos:

$$\text{Mg O}_2/\text{l} = (V_T * 0,01 * f / V_B - 1)$$

Dónde:

V_T = Volumen de tiosulfato gastado.

F = Factor de corrección de tiosulfato.

V_B = Volumen de la botella en mL.

0,01 = Normalidad de tiosulfato.

Para los cálculos del oxígeno consumido en los intervalos de tiempo, se tomó la diferencia de la concentración del oxígeno del agua entrante y saliente en mg O₂/L y se relacionó con la cantidad de agua que pasa por la cámara en un tiempo dado, obteniendo el consumo de oxígeno en mL/L (Hanke *et al.*, 1977).

$$V_B = (C_i - C_f) V / T$$

Dónde:

V = Volumen que pasa por la cámara.

T = Intervalo de tiempo de la medición.

C_i y C_f = Concentración inicial y final de oxígeno de la muestra.

2.2.2 Tasa de filtración

Se evaluó la tasa de filtración en cámaras estáticas de 2 L, en las que se introdujeron cinco ostras de cada grupo por separado y con su respectivo control en agua de mar a las salinidades propuestas, con una concentración de tinta china de 0,7 mL/L. Después de la primera media hora se tomaron tres alícuotas de 10 mL directamente de la cámara y así sucesivamente cada hora durante 5 h, con el fin de determinar los cambios en las concentraciones de tinta china en el tiempo. La tasa de filtración se calculó con la diferencia de concentraciones de tinta china en cada intervalo de tiempo. De la misma manera que para el experimento anterior, los datos obtenidos se compararon con el grupo control para cada caso y con la salinidad de aclimatación.

Para el segundo experimento se realizó el procedimiento anterior, agregando 1 µg/2L de cloruro de cadmio. La tasa de filtración (f) indica la cantidad de agua que pasa a través de las branquias del bivalvo en un tiempo determinado y se calcula en litros (L) por hora (h) según la siguiente fórmula:

$$f = \frac{v \times 2,303 (\log C_o - \log C_i)}{n \times (t_i - t_0)}$$

Donde:

f = Tasa de filtración en L/h.

v = Volumen del medio en L.

2.303 = log 10.

C_o = Concentración inicial.

C_i = Concentración en el tiempo t .

n = Número de organismos.

$t_i - t_0$ = Tiempo en horas o en fracciones.

2.2.3 Tasa de Excreción de Amonio

Las muestras se tomaron de las cámaras estáticas utilizadas para la determinación de la tasa de filtración. La concentración de amonio excretada se determinó en el LAB-CAM del INVEMAR usando el método de azul de indofenol, las muestras fueron extraídas directamente de las mismas cámaras que se usaron para la determinación de la tasa de filtración (para los dos experimentos).

El método consiste en hacer reaccionar el ion amonio presente en el agua de mar en un medio citrato-alcalino con hipoclorito de sodio para formar monocloramina, la cual en presencia de fenol y nitroprusiato de sodio actúa como catalizador, formando el azul de indofenol y un complejo de citrato

con los iones Ca^{++} y Mg^{++} , eliminando así, la interferencia que éstos puedan causar al precipitarse durante el análisis. La absorbancia de la solución resultante se mide espectrofotométricamente a 640 nm (Garay, 1981).

Todo el material empleado para los análisis químicos, se lavó previamente con ácido nítrico (HNO_3) al 5% y luego con agua desionizada, por 24 h. La manipulación de las muestras se llevó a cabo con guantes y utilizando elementos plásticos para evitar la contaminación con metales. Se realizó el siguiente procedimiento para la determinación de la concentración de amonio:

En un vial de 40 mL se adicionaron 25 mL de muestra filtrada y se adicionaron los siguientes reactivos:

- 1 mL de solución de fenol, se agitó.
- 1 mL de nitroprusiato de sodio, se agitó.
- 2,5 mL de solución oxidante y se agitó.

Los viales se mantuvieron cubiertos con papel aluminio o tapados y en la oscuridad, a temperatura entre 20 y 27 °C durante una hora, después de lo cual se leyó la absorbancia a 640 nm y luego se calculó las concentraciones de amonio y se determinaron los blancos de reactivo.

2.2.4 Análisis de los datos

Para establecer si existían diferencias entre los efectos de aclimatación, choque salino y cadmio en los experimentos, se realizaron pruebas preliminares para determinar la naturaleza de los datos y elegir entre análisis paramétricos o no paramétricos. Se utilizó el método de diseño en bloques aleatorizados, que se aplica cuando se desea estudiar la influencia de un factor sobre una variable cuantitativa y existe el efecto de otras variables indispensables para el experimento que pueden influenciar los resultados del mismo, sin ser el motivo de estudio. El desarrollo del modelo consiste en probar los supuestos de normalidad, linealidad, homocedasticidad e independencia. Cuando no se cumple con uno de esos cuatro requisitos, no es posible seguir con métodos paramétricos por lo que se requiere aplicar estadística no paramétrica. Las pruebas se realizaron en el software STATISTICA plus versión 10.0 (2012).

Para corroborar el supuesto de normalidad se aplicó una prueba Q-Q con una correlación lineal de Pearson, en la cual, se determina gráficamente la dispersión de los residuos frente a la línea de tendencia. Cuanto más distantes se encuentren los puntos de la línea, mayor es la desviación. La linealidad y la independencia se determinaron gráficamente con un diagrama de interacción entre los residuos y los valores que predijo el modelo. Si este gráfico no presenta ninguna interacción se

admite que el modelo es aditivo, es decir no muestra evidencia de un efecto, entre el factor bloque y los tratamientos. La homogeneidad de varianzas u homocedasticidad, se comprobó mediante la prueba de Levene, la cual contrasta la H_0 de que las varianzas poblacionales son iguales, frente a la H_a de que las diferencias obtenidas en las varianzas de la muestra no son producto de una muestra aleatoria de una población con varianzas iguales. El límite de rechazo de la H_0 se realiza con un valor p mayor a 0,05. La prueba se realiza para asegurar que la variabilidad de un grupo no sea distinta del otro, asegurando que ambas se encuentren entre la misma distribución permitiendo así que los grupos sean comparables. Cuando se cumplieron todos los supuestos paramétricos, se aplicaron pruebas ANOVA y las respectivas pruebas Post-hoc (Ajuste de Bonferroni). Si por lo menos uno de los supuestos no se cumplía, se aplicaba un análisis no paramétrico.

Para los análisis no paramétricos se agruparon los datos en cuatro categorías: 1) Controles, cuando la salinidad de aclimatación es la misma salinidad de análisis; 2) choque salino cuando la salinidad inicial era 36; 3) choque salino cuando la salinidad inicial era 27 y 3) choque salino cuando la salinidad inicial era 18. La variabilidad de las respuestas se representa gráficamente mediante gráficas de series de tiempo promedio, en las cuales se muestran las salinidades y/o choques salinos ante el efecto sin cadmio y con cadmio).

El efecto del choque salino se determinó al comparar las series de tiempo de cada uno de los grupos, mediante una prueba de Kruskal-Wallis que determina las diferencias respecto a la mediana, cuando las hipótesis son:

H_0 = Las distribuciones de las poblaciones son idénticas ($\alpha_1= \alpha_2= \alpha_3= \alpha_4= \alpha_t= 0$)
 H_a = Al menos una de las distribuciones tiende a mostrar valores mayores que una de las otras poblaciones (algún $\alpha_i \neq 0$).

El nivel de significancia (H), se determinó usando la tabla de Chi – cuadrado con grados de libertad n-1 (Daniels, 2005). Si una de las distribuciones es diferente, se realizan contrastes pareados de Wilcoxon para muestras independientes, donde las hipótesis son:

H_0 = La distribución $\alpha_1 = \alpha_2$

El nivel de significancia se determinó comparando el valor T_a y T_b calculado con el T_{Low} y el T_{Upper} críticos de la tabla T de Wilcoxon. El efecto del cadmio se determinó mediante contrastes pareados utilizando una prueba de signos de Wilcoxon para muestras dependientes, donde las hipótesis son:

H_0 = La diferencias son = 0
 H_a = La diferencias son $\neq 0$

El nivel de significancia se determinó comparando el T calculado más pequeño con el T_{Low} de la tabla Wilcoxon para muestras dependientes. Las pruebas y las gráficas de las series de tiempo se realizaron con el *software* MinitAb 16.

Se determinó que los supuestos del modelo paramétrico no se cumplieron en los experimentos de consumo de oxígeno, tasa de filtración y tasa de excreción, por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas. Detalles sobre los resultados obtenidos en las pruebas de normalidad, homocedasticidad, linealidad y aditividad, se adjuntan en el (Anexo A).

3. RESULTADOS

3.1 Tasa de consumo de oxígeno

3.1.1 Diferencias en el consumo de oxígeno entre las salinidades de aclimatación de los experimentos control y efecto del cadmio

Salinidades de aclimatación sin el efecto del cadmio

En la gráfica de las tasas en el experimento sin cadmio (Figura 1, der) se muestra que a salinidades de 36:36 y 27:27, el consumo de oxígeno presentó un comportamiento similar, en el que el consumo fue estable (siguen el mismo patrón o comportamiento), indicando que los organismos se encontraron en condiciones óptimas. El tiempo en el que el consumo se estabilizó, ocurrió dos horas después de iniciado el experimento, después de lo cual, permaneció cerca del rango de 16 a 18 mL/min de O₂.

La tasa de consumo de oxígeno disminuyó significativamente en la salinidad de 18:18 cuyo tiempo de estabilización ocurrió a partir de las 3 horas, tiempo después del cual, la tasa de consumo de oxígeno permaneció entre 7 y 8 mL/min de O₂, por lo que existen diferencias cercanas a los 10 mL/min O₂ respecto a lo observado en los experimentos con cadmio (Figura 1, izq). El tiempo de estabilización de la reacción ocurre cuando la respuesta metabólica deja de ser mecánica debido al cierre de las valvas y el proceso de regulación comienza a ser celular; en el caso de la salinidad de aclimatación de 18:18, el bajo consumo de oxígeno ocurre debido a una adaptación intracelular que le permite a los organismos conformarse con tasas de oxígeno menores.

Salinidades de aclimatación con el efecto del cadmio

Las tasas de consumo oxígeno con el efecto del cadmio (Figura 1, izq) son inferiores al consumo observado en los organismos no expuestos al cadmio (Figura 1, der). Al inicio del experimento el consumo de O₂ estuvo cerca de 0 mL/min de O₂, en las tres salinidades, para luego incrementarse progresivamente en el tiempo, estabilizándose una hora después del inicio del experimento a una tasa baja, aproximadamente entre 6 a 8 mL/min de O₂, en las salinidades de 36:36 y 27:27 (Figura 1, izq). Es decir, los organismos sometidos al efecto del cadmio permanecieron en una tasa de consumo estable en el tiempo, que no obstante, era inferior a las condiciones óptimas, las cuales, en el experimento control se establecieron en un rango de 16 a 18 mL/min O₂ (línea discontinua), por lo que presentan al parecer, un comportamiento osmoconforme. En la salinidad de 18:18, se observó un posible efecto sinérgico entre el choque salino con la exposición al cadmio, ya que las tasas de consumo de oxígeno permanecieron durante la mayor parte del experimento, en un umbral inferior a

los 6 mL/min O₂ y solo después de transcurridas 5 h, se observa que los organismos tienden a estabilizarse (Figura 1, der).

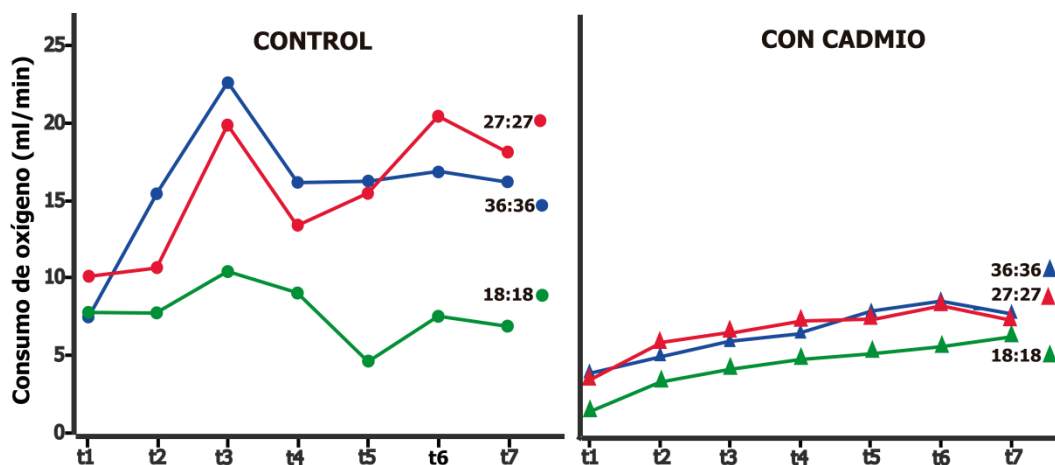


Figura 1. Tasa de consumo de oxígeno de *Isognomon alatus* en los grupos control sin cadmio y los experimentos con cadmio.

Se determinó que existen diferencias entre las tres salinidades control sin cadmio ($H_{\text{calculado}} = 10,29 > H_{\text{crítica}} (gl\ 2; \alpha\ 0,05) = 5,99$); las pruebas pareadas de Wilcoxon para muestras independientes indican que esas diferencias se presentan entre la salinidad de aclimatación de 18:18, respecto a las salinidades de 36:36 y 27:27 (Tabla 1). Asimismo, se determinó que bajo la exposición al cadmio, no existen diferencias en las tasas de consumo de oxígeno, entre las tres salinidades de aclimatación ($H_{\text{calculado}} = 4,994 > H_{\text{crítica}} (gl\ 2; \alpha\ 0,05) = 5,992$). Al comparar las pruebas con y sin cadmio, mediante las pruebas de signos, se determinó que existen diferencias entre los experimentos en cada una de las salinidades de aclimatación (Tabla 2).

Tabla 1. Contrastes pareados de Wilcoxon para muestras independientes del consumo de oxígeno entre los grupos control, sometidos a tres salinidades de aclimatación: 36, 27 y 18, sin el efecto del Cadmio. Valores críticos n_2/n_1 : 7/7; α 0,05.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Máximo calculado Vs. Máximo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:36 / Sin_Cd 27:27	T _{Low} = 37 < T _A = 50	T _{Upper} = 68 > T _B = 55	Acepto H ₀ No existen diferencias
Sin_Cd 36:36 / Sin_Cd 18:18	T _{Low} = 37 > T _A = 33	T _{Upper} = 68 < T _B = 72	Rechazo H ₀ Existen diferencias
Sin_Cd 27:27 / Sin_Cd 18:18	T _{Low} = 37 > T _A = 34	T _{Upper} = 68 < T _B = 73	Rechazo H ₀ Existen diferencias

Tabla 2. Contrastes entre las tasas de consumo de oxígeno de los controles con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes; $n = 7$ $\alpha_{una\ cola} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:36 / Con_Cd 36:36	$T_{crítico} = 2 > T_{calculado} = 0$	Rechazo H_0 Existen diferencias
Sin_Cd 27:27 / Con_Cd 27:27	$T_{crítico} = 2 > T_{calculado} = 1$	Rechazo H_0 Existen diferencias
Sin_Cd 18:18 / Con_Cd 18:18	$T_{crítico} = 2 < T_{calculado} = 3$	Acepto H_0 No existen diferencias

3.1.2 Efecto del choque salino en la tasa de consumo de oxígeno con aclimatación a 36

Choque salino sin el efecto del cadmio

En las series de tiempo (Figura 2, der) se observó que al descender la salinidad de 36:27 en el experimento sin cadmio, la tasa de consumo de oxígeno se estabiliza transcurridas las dos primeras horas del experimento, conservándose entre 19 a 20 mL/min de O_2 ; mostrando un comportamiento similar al experimento control (en negro), aunque con una tasa de consumo ligeramente incrementada.

Cuando el choque salino fue mayor y pasó de una salinidad de 36:18, la tasa de consumo de oxígeno descendió situándose en un intervalo de 5 a 15 mL/min de O_2 , en el cual, no se observó un comportamiento de estabilización durante el tiempo de duración del experimento; lo cual, indica que la adaptación de los organismos ante un descenso importante en la salinidad ocurre muy lentamente. Aparentemente de haber continuado el experimento, el consumo se habría estabilizado en un valor cercano a los 8 mL/min de O_2 , de ser así, los organismos estarían ajustándose a una tasa de consumo de oxígeno inferior a la tasa de aclimatación (Figura 2).

Choque salino con el efecto del cadmio

Se observa que aún sin el efecto del choque salino, las tasas de consumo de oxígeno entre los organismos expuestos al cadmio son inferiores (líneas negras continua y discontinua en las gráficas de la figura 2); asimismo, los descensos de salinidad de 36:27 fueron diferentes entre los experimentos con y sin cadmio (Figura 2). Mientras que la respuesta ante un descenso de salinidad de 36:18 no

presentó diferencias, indicando que los organismos ante una baja concentración salina, ya se encuentran sometidos a una situación lo suficientemente estresante, capaz de generar un descenso en el consumo de oxígeno. En los tres experimentos bajo la exposición al cadmio, se observa que las ostras no son capaces de osmorregular con la misma eficiencia, pero su tasa de consumo se estabiliza a la primera hora del experimento manteniéndose entre 7 y 9 mL/min de O₂ (Figura 2, izq).

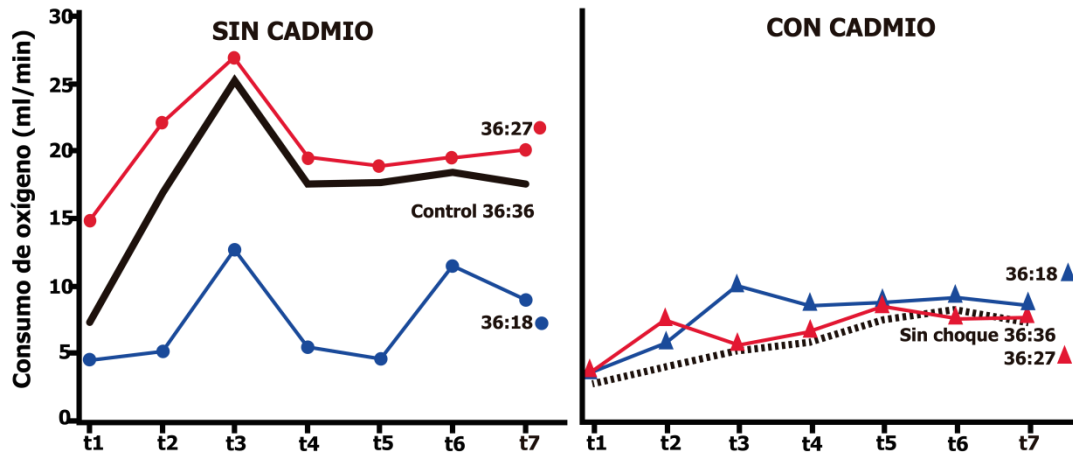


Figura 2. Tasas de consumo de oxígeno de *Isognomon alatus* en los grupos aclimatados a 36 en experimentos de choque salino sin y con cadmio.

Los organismos que se aclimataron a una salinidad de 36 fueron sometidos a descensos de salinidad a 27 y 18, tanto en los experimentos sin cadmio como con cadmio. Las pruebas de Kruskal-Wallis indicaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno debidas al choque salino, en las pruebas sin el efecto del cadmio ($H_{\text{calculado}} = 13,4470 > H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$). Según las pruebas pareadas de Wilcoxon para muestras independientes, los efectos significativos ocurrieron entre los descensos de 36:18 respecto al control 36:36 y el descenso 36:27. No obstante, cuando el descenso fue de 36:27, no se observaron diferencias respecto al control 36:36 (Tabla 3). Los tratamientos **con cadmio**, no presentaron diferencias en el consumo de oxígeno debidas al choque salino ($H_{\text{calculado}} = 4,1484 < H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$). Al comparar los efectos **con y sin cadmio**, mediante la prueba de signo de Wilcoxon, solo se encontraron diferencias entre los descensos de 36:27 (Tabla 4).

Tabla 3. Contrastes pareados de Wilcoxon para muestras independientes, entre la tasa de consumo de oxígeno durante el experimento control de 36 y los grupos sometidos a choques salinos de descenso de 27 y 18, sin el efecto del Cadmio. Valores críticos n_2/n_1 : 7/7; α 0,05.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Máximo calculado Vs. Máximo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:36 / Sin_Cd 36:27	T _{Low} = 37 < TA= 39	T _{Upper} = 68 > TB = 66	Acepto Ho No existen diferencias
Sin_Cd 36:36 / Sin_Cd 36:18	T _{Low} = 37 > TA= 31	T _{Upper} = 68 < TB = 74	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 36:18 / Sin_Cd 36:27	T _{Low} = 37 > TA= 28	T _{Upper} = 68 < TB = 77	Rechazo Ho Existen diferencias

Tabla 4. Contrastes entre las tasas de consumo de oxígeno de los experimentos con salinidad de aclimatación a 36, cuando son sometidos a descensos de salinidad a 27 y 18 con y sin cadmio, mediante prueba de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{una\ cola} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:27 / Con_Cd 36:27	T _{crítico} = 2 > T _{calculado} = 0	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 36:18 / Con_Cd 36:18	T _{crítico} = 2 < T _{calculado} = 13	Acepto Ho No existen diferencias

3.1.3 Efecto del choque salino en las tasas de consumo de oxígeno con aclimatación a 27

Choque salino sin el efecto del cadmio

En la figura 3 se observa que los organismos incrementan la tasa de consumo de oxígeno en el tiempo cuando se someten a un choque, independientemente de que el cambio sea un incremento o un descenso en la salinidad. Lo cual, indica que los organismos aclimatados a salinidades intermedias intentan osmorregular cuando se encuentran sometidos a un cambio repentino en la concentración salina (Figura 3, der). El incremento progresivo en la tasa de consumo de oxígeno indica que el proceso de regulación, si bien, comienza siendo mecánico mediante el cierre de las valvas, gradualmente comienza a hacerse a nivel intracelular. El proceso de osmoregulación ocurrió de forma lenta, debido a que no se observó estabilidad en la curva de consumo de oxígeno durante el transcurso del experimento; sin embargo la tendencia indica que cuando se incrementa la salinidad a

27:36, los organismos tienden a estabilizarse en condiciones óptimas, superiores a los 16 mL/min de O₂ y cuando se disminuye de 27:18, la tendencia es a permanecer ligeramente por debajo de los 16 mL/min de O₂, pero muy por encima del umbral de los 6 mL/min de O₂ (líneas discontinuas, Figura 3, der).

Choque salino con el efecto del cadmio

A pesar que se encontraron diferencias entre las aclimataciones 27:27 (línea negra, der. y línea punteada, Figura 3, izq); las series de tiempo de los choques salinos, indican que los experimentos con cadmio y sin cadmio presentaron una tasa de consumo de oxígeno intermedio permaneciendo entre 6 y 10 mL/min de O₂ durante la mayor parte del tiempo. No obstante, la respuesta en los primeros minutos del experimento con cadmio, evidencian que las curvas se encuentran ligeramente por debajo de estos límites (Figura 3, izq); mientras que en el experimento sin cadmio (Figura 3, der) el consumo incrementó durante las dos últimas horas del experimento superando el límite. Por lo tanto, es posible que en un experimento más prolongado, las ostras no sometidas al cadmio alcancen una tasa de consumo de oxígeno mayor.

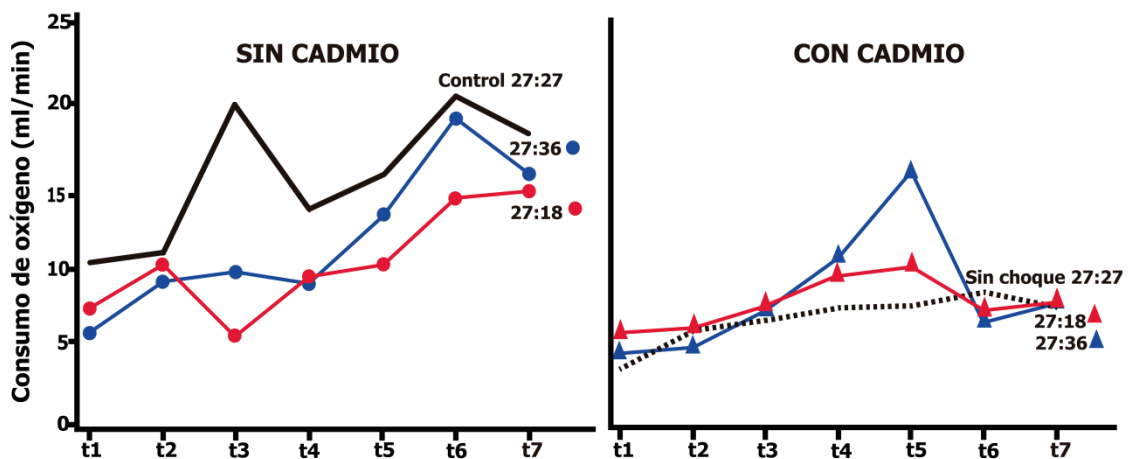


Figura 3. Tasas de consumo de oxígeno de *Isognomon alatus* en los grupos aclimatados a 27 en experimentos de choque salino sin y con cadmio.

Los individuos aclimatados a una salinidad de 27 se sometieron a un descenso de salinidad a 18 y a un incremento a 36, en experimentos con y sin cadmio. En los cuales, no se observaron diferencias en la tasa de consumo oxígeno debidos al efecto del choque salino, ni en los individuos no sometidos al efecto del cadmio ($H_{\text{calculado}} = 5,128 < H_{\text{crítica}} (gl\ 2; \alpha\ 0,05) = 5,992$) ni en aquellos expuestos al cadmio ($H_{\text{calculado}} = 0,423 < H_{\text{crítica}} (gl\ 2; \alpha\ 0,05) = 5,992$). No se observaron diferencias significativas entre los choques salinos con y sin cadmio, al aplicar la prueba de signo de Wilcoxon (Tabla 5).

Tabla 5. Contrastes entre las tasas de consumo de oxígeno de los experimentos con salinidad de aclimatación de 27, cuando son sometidos a descensos de salinidad a 18 e incrementos de salinidad a 36, con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{una\ cola} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 27:18 / Con_Cd 27:18	Tcrítico = 2 < Tcalculado= 5	Acepto Ho No existen diferencias
Sin_Cd 27:36 / Con_Cd 27:36	Tcrítico = 2 < Tcalculado= 6	Acepto Ho No existen diferencias

3.1.3 Efecto del choque salino en la tasa de consumo de oxígeno con aclimatación a 18

Choque salino sin el efecto del cadmio

Al encontrarse aclimatadas en un medio diluido, las ostas se mantienen en un estado osmoconforme, en el cual, el consumo de oxígeno es bajo, como se observa en el control 18:18 (línea negra Figura 4, der). Al ser sometidas a un incremento de salinidad, el efecto del choque hace que los organismos incrementen irregularmente la tasa de consumo de oxígeno, por lo que es posible observar múltiples picos en las series de tiempo de los incrementos de 18:36 y 18:27; sin embargo es evidente que no logran estabilizar su tasa de consumo durante el experimento, probablemente porque esto implica un gasto energético muy elevado (Figura 4, der).

Choque salino con el efecto del cadmio

El consumo de oxígeno en los animales expuestos al cadmio a una salinidad de aclimatación de 18:18 permanece por debajo del umbral de los 6 mL/min de O₂ (línea punteada, Figura 4, izq), mientras que sin el efecto del cadmio la tasa se mantiene por encima de dicho límite la mayor parte del tiempo (línea negra, Figura 4, der). Cuando en los organismos sometidos al cadmio se incrementó la salinidad de 18:27, se observó un aumento en el consumo de oxígeno a partir de la tercera hora del experimento, tiempo tras del cual, la curva se estabilizó cerca a los 10 mL/min de O₂.

No obstante, cuando el incremento en la salinidad es más intenso (18:36), el consumo de oxígeno permanece cercano a lo observado en el experimento de aclimatación 18:18 (línea punteada), esto

posiblemente se deba a que el choque salino es tan intenso que las ostras no consiguen osmorregular permaneciendo en un estado de estrés (Figura 4, izq).

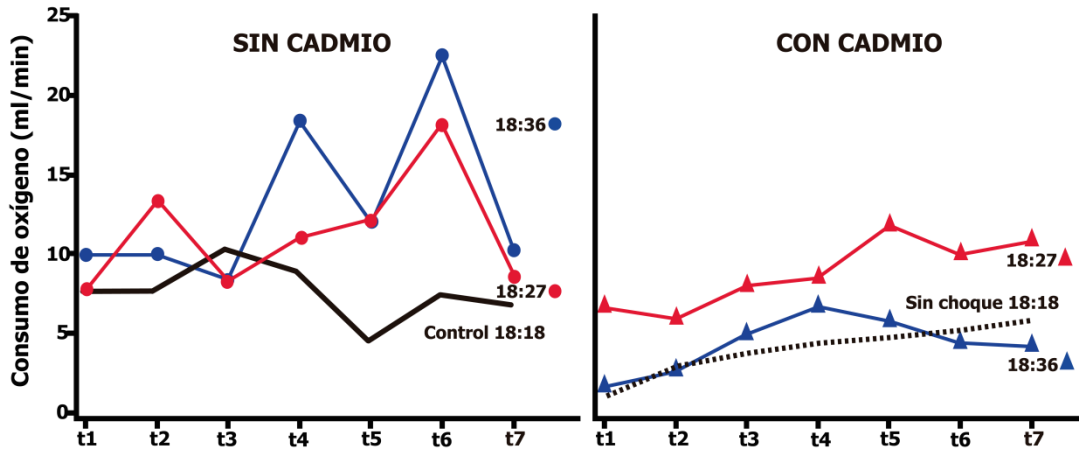


Figura 4. Tasas de consumo de oxígeno de *Isognomon alatus* en los grupos aclimatados a 18 en experimentos de choque salino sin y con cadmio.

Los individuos aclimatados a una salinidad inicial de 18 se sometieron a incrementos de salinidad a 27 y 36. Las tasas de consumo de oxígeno en los experimentos **sin cadmio** presentaron diferencias debidas al efecto del choque salino ($K - W: H_{\text{calculado}} = 8,222 > H_{\text{crítica}} (gl 2; \alpha 0,05) = 5,992$), entre el control (18:18) y los incrementos de 18:36 y 18:27. No se observaron diferencias entre los tratamientos 18:27 y 18:36 (Tabla 6). Asimismo, se determinó que **bajo la exposición al cadmio**, existen diferencias en las tasas de consumo de oxígeno ($H_{\text{calculado}} = 11,273 > H_{\text{crítica}} (gl 2; \alpha 0,05) = 5,992$) entre 18:18 y el incremento de 18:27 (Tabla 6). Mediante las pruebas de signo de Wilcoxon, se estableció que existen diferencias entre los choques **con y sin cadmio** en los incrementos de 18:36 (Tabla 7).

Tabla 6. Contrastes pareados de Wilcoxon para muestras independientes entre la tasa de consumo de oxígeno durante el experimento control de 18 y los grupos sometidos a choques salinos incremento de 27 y 36, sin y con el efecto del Cadmio. Valores críticos n_2/n_1 : 7/7; α 0,05.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Máximo calculado Vs. Máximo crítico	Interpretación
Sin_18:18 / Sin_18:27	Tlow= 37 > TA=34	Tupper= 68 < TB=71	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_18:18 / Sin_18:36	Tlow= 37 > TA=33	Tupper= 68 < TB=78	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_18:36 / Sin_18:27	Tlow= 37 < TA=48	Tupper= 68 > TB=57	Acepto Ho No Existen diferencias
Con_18:18 / Sin_18:27	Tlow= 37 > TA=30,5	Tupper= 68 < TB=74,5	Rechazo Ho Existen diferencias
Con_18:18 / Sin_18:36	Tlow= 37 < TA=48,5	Tupper= 68 < TB=48,5	Acepto Ho No Existen diferencias

Tabla 7. Contrastes entre las tasas de consumo de oxígeno de los experimentos con salinidad de aclimatación de 18, cuando son sometidos a incrementos de salinidad a 27 y 36 con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes; $n = 7$ $\alpha_{una\ cola} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 18:36 / Con_Cd 18:36	Tcrítico = 2 > Tcalculado= 0	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 18:27 / Con_Cd 18:27	Tcrítico = 2 < Tcalculado= 4	Acepto Ho No existen diferencias

3.2 Tasa de filtración

3.2.1 Diferencias en las tasas de filtración entre las salinidades de aclimatación de los experimentos control y efecto del cadmio

Salinidades de aclimatación sin el efecto del cadmio

Para los controles con salinidades de aclimatación de 36:36 y 18:18, se determinó que el tiempo de estabilización de la tasa de filtración ocurrió entre la primera y segunda hora de haber iniciado el experimento, mientras que en la salinidad de aclimatación de 27, este punto llegó después de la tercera hora del experimento. El punto en que el agua se hizo visiblemente clara estuvo cerca entre

los tres experimentos, lo que indica que durante la aclimatación, las ostras se encuentran filtrando activamente, lo cual, comprueba que la regulación osmótica está ocurriendo a nivel de los tejidos y no por el cierre de las valvas (Figura 5, der).

Salinidades de aclimatación con el efecto del cadmio

Las series de tiempo de los ensayos a los que se les adicionó Cd, muestran una curva en incremento, que indica que no se alcanzó la transparencia del agua, en los experimentos aclimatados a una salinidad de 36:36, 27:27 y 18:18 (Figura 5, b).

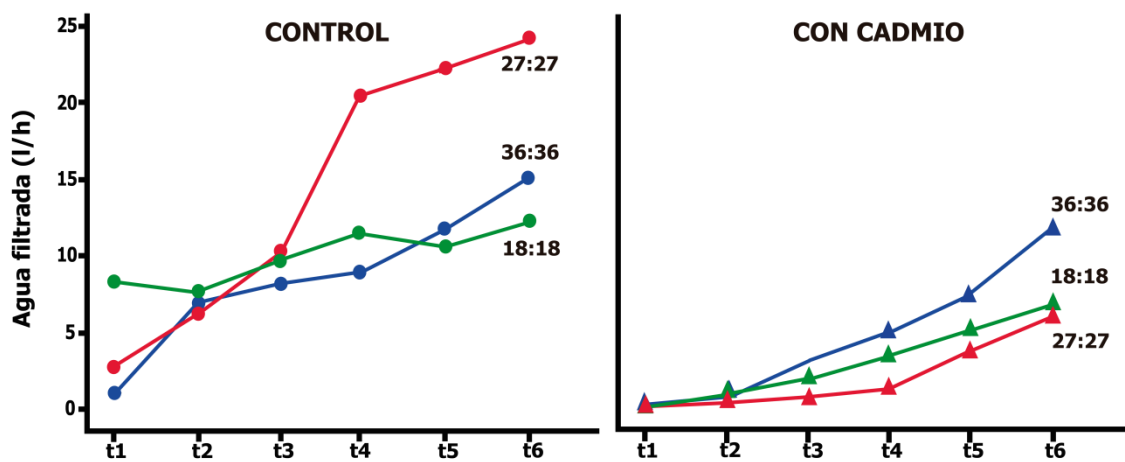


Figura 5. Tasas de filtración de los grupos de *Isognomon alatus* sin cadmio y los experimentos con cadmio.

No se encontraron diferencias en las tasas de filtración debidas al efecto de la salinidad de aclimatación ni en los experimentos **sin cadmio** ($K-W: H_{\text{calculado}} = 1,368 < H_{\text{crítica}}=5,992$) ni **con cadmio** ($K-W: H_{\text{calculado}} = 1,205 < H_{\text{crítica}}=5,992$). No obstante las pruebas de signo indican que existen diferencias entre los efectos **con y sin** cadmio en las tres salinidades de aclimatación (Tabla 8).

Tabla 8. Contrastes entre las tasas de filtración de los controles con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes; $n = 7$ $\alpha_{una\ cola} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:36 / Con_Cd 36:36	$T_{crítico} = 1 > T_{calculado} = 0$	Rechazo H_0 Existen diferencias
Sin_Cd 27:27 / Con_Cd 27:27	$T_{crítico} = 1 > T_{calculado} = 0$	Rechazo H_0 Existen diferencias
Sin_Cd 18:18 / Con_Cd 18:18	$T_{crítico} = 1 < T_{calculado} = 0$	Rechazo H_0 Existen diferencias

3.2.2 Efecto del choque salino en las tasas de filtración con aclimatación a 36

Choque salino con el efecto del cadmio

Bajo la exposición al cadmio la tasa de filtración disminuye y las ostras no logran depurar toda la concentración de tinta china durante las 5 horas del experimento ni en la aclimatación 36:36 (Línea punteada, Figura 6, izq), ni en ninguno de los descensos. No obstante, la pérdida de la capacidad de filtración es ligeramente más evidente en los experimentos de descenso de 36:27 y 36:18, debido a que el efecto sinérgico entre el choque salino y la exposición al cadmio, es tal, que la tasa de filtración, que no supera el límite de los 5L/h (Figura 6, izq).

Choque salino sin el efecto del cadmio

El tiempo que tardaron los organismos en filtrar el agua hasta llegar a un punto visiblemente claro fue menor en el control 36:36, mostrándose en la serie de tiempo una tasa de filtración más eficiente en L/h (Línea negra, Figura 6, der); en este experimento, se observó un cambio en la pendiente entre la primer y tercer hora de iniciado el experimento; punto en el cual, el agua se hace visiblemente más clara. La tasa de filtración fue ligeramente más baja cuando los organismos se sometieron los choques salinos, de 36:27 y 36:18, permaneciendo constante en un intervalo de 5-9 L/h durante la mayor parte del experimento. Ante los choques salinos, el agua se volvió transparente solo entre la cuarta y quinta hora del experimento en ambos descensos, sugiriendo una respuesta mecánica por parte de los organismos cuando son sometidos a estrés osmótico (Figura 6).

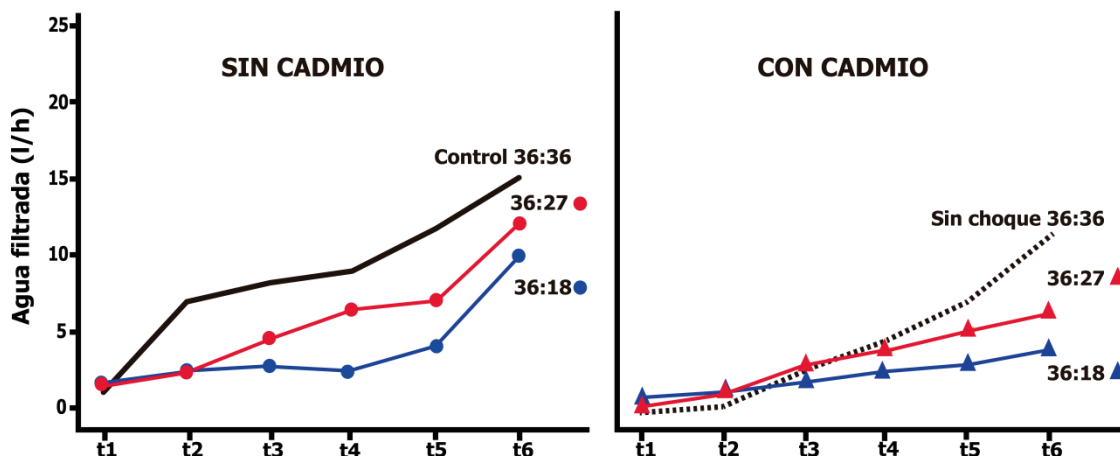


Figura 6. Tasas de filtración de *Isognomon alatus* en los grupos aclimatados a 36 en experimentos de choque salino y con cadmio.

No se observaron diferencias en las tasas de filtración debidas al choque salino cuando las ostras acondicionadas a 36 se sometieron a descensos en la salinidad a 27 y 18, **sin el efecto del cadmio** ($H_{\text{calculado}} = 1,615 < H_{\text{crítica}}=5,992$). De igual manera no se observaron diferencias en los descensos de salinidad **bajo la exposición al cadmio** ($H_{\text{calculado}} = 0,766 < H_{\text{crítica}}= 5,992$). Sin embargo, mediante las pruebas de signo se determinó que existen diferencias entre los experimentos con y sin cadmio en el descenso de 36:27 (Tabla 9).

Tabla 9. Contrastes entre las tasas de filtración de los experimentos con salinidad de aclimatación de 36, cuando son sometidos a descensos de salinidad a 27 y 18 con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{\text{una cola}} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:27 / Con_Cd 36:27	$T_{\text{crítico}} = 2 > T_{\text{calculado}}=0$	Rechazo H_0 Existen diferencias
Sin_Cd 36:18 / Con_Cd 36:18	$T_{\text{crítico}} = 2 < T_{\text{calculado}}=13$	Acepto H_0 No existen diferencias

3.2.3 Efecto del choque salino en las tasas de filtración con aclimatación a 27

Choque salino sin el efecto del cadmio

Los organismos aclimatados a una salinidad de 27:27 (Línea negra, Figura 7, der) presentaron una tasa de filtración elevada, en la cual se observa un cambio en la pendiente entre la segunda y tercer hora de transcurrido el experimento, punto en el cual, el agua comienza a hacerse visiblemente más clara. Este comportamiento es muy similar al observado en descenso 27:18. Esto se debe al intento de los organismos para mantenerse isosmóticos frente a un medio con una baja concentración de iones. Por otra parte, el comportamiento ante el incremento de salinidad de 27:36, evidenció una reducción en la tasa de filtración. Sin embargo, se observó que el agua se tornó transparente durante la primera y segunda hora tanto en el experimento control como en los choques de descenso e incremento de salinidad, indicando que las ostras continúan filtrando activamente aunque en menor cantidad, a pesar del choque salino (Figura 7, der).

Choque salino con el efecto del cadmio

La tasa de filtración disminuye considerablemente por la exposición al cadmio, manteniéndose siempre por debajo de los 6 L/h, por lo que durante la prueba, las ostras no alcanzaron a filtrar toda la concentración de tinta china, en ninguna de las salinidades.

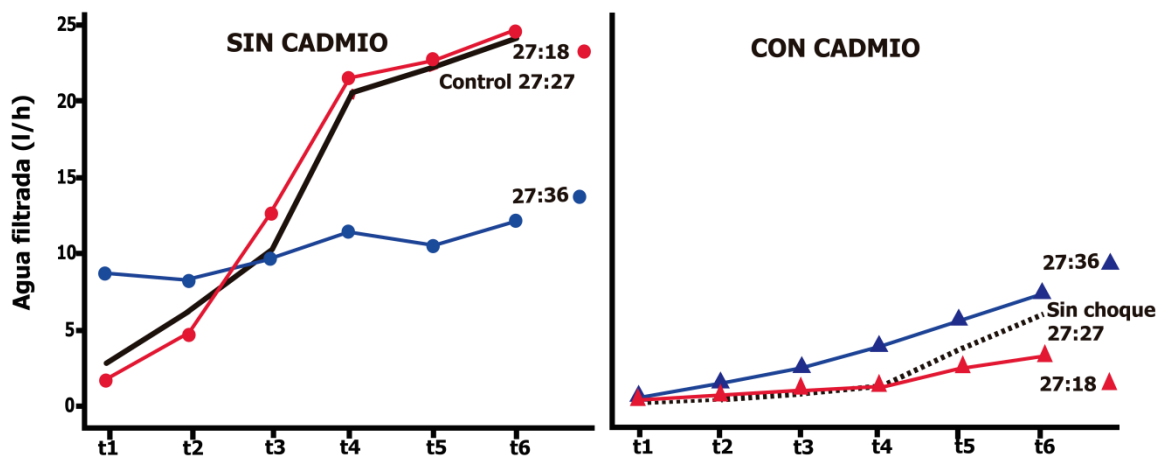


Figura 7. Tasas de filtración de *Isognomon alatus* en los grupos aclimatados a 27 en experimentos de choque salino sin y con cadmio.

Los individuos aclimatados a una salinidad de 27 se sometieron a un descenso de salinidad a 18 y a un incremento de salinidad a 36, en experimentos con y sin cadmio; en los cuales no existen diferencias significativas debidas al choque salino (**sin el efecto del cadmio** K-W: $H_{\text{calculado}} = 1,094 < H_{\text{crítica}}=5,992$; **bajo la exposición al cadmio** K-W: $H_{\text{calculado}} = 1,838 < H_{\text{crítica}}=5,992$). No obstante, existen diferencias entre los choques salinos en los experimentos **con y sin cadmio**, cuando se sometieron a descensos de 27:18 y a incrementos de 27:36 (Tabla 10).

Tabla 10. Contrastes entre las tasas de filtración de los experimentos con salinidad de aclimatación de 27, cuando son sometidos a descensos a 18 y a incrementos de salinidad a 36, con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{\text{una cola}} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 27:18 / Con_Cd 27:18	$T_{\text{crítico}} = 1 > T_{\text{calculado}} = 0$	Rechazo H_0 Existen diferencias
Sin_Cd 27:36 / Con_Cd 27:36	$T_{\text{crítico}} = 1 > T_{\text{calculado}} = 0$	Rechazo H_0 Existen diferencias

3.2.4 Efecto del choque salino en las tasas de filtración con aclimatación a 18

Choque salino sin el efecto del cadmio

La tasa de filtración permanece prácticamente constante en un intervalo de 9-12 L/h en los experimentos control de 18:18 (Línea negra, Figura 8, der) y desciende cuando la salinidad se incrementa; las series de tiempo indican que ante los incrementos de salinidad la tasa de filtración desciende aproximadamente a un intervalo de 2-6 L/h, permaneciendo entre estos límites hasta por lo menos las tres primeras horas del experimento, para luego incrementar alcanzando la transparencia solo al final del experimento (Figura 8, der).

Choque salino con el efecto del cadmio

Bajo la exposición al cadmio las ostras presentan una tasa de filtración menor que las ostras expuestas solo al choque salino, por lo que no logran filtrar toda la concentración de tinta china en las 5 horas de experimento permaneciendo por debajo del límite de los 5L/h de agua filtrada (Figura 8, izq).

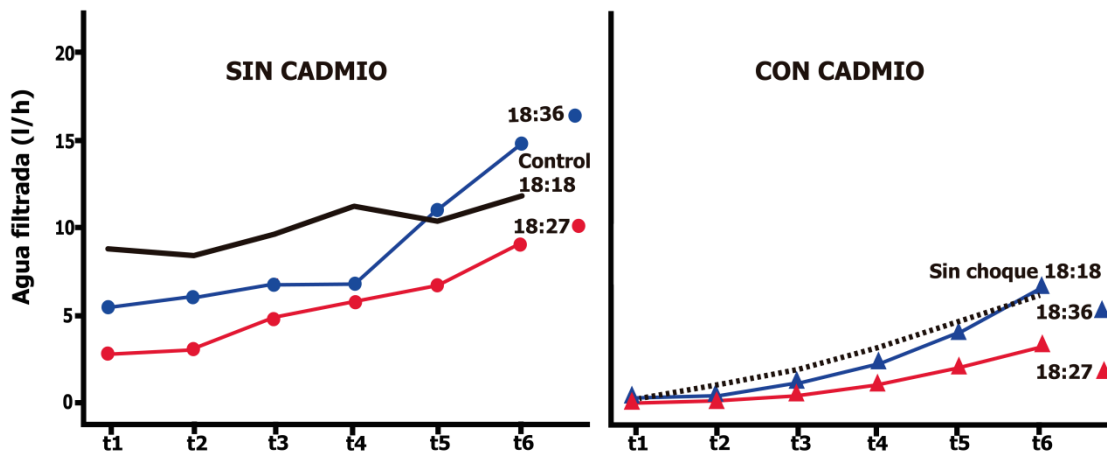


Figura 8. Tasas de filtración de *Isognomon alatus* en los grupos aclimatados a 18 en experimentos de choque salino sin y con cadmio.

No se determinaron diferencias significativas debidas al choque salino al incrementar la salinidad de 18:27 ni de 18:36, **sin el efecto del cadmio** (K-W: $H_{\text{calculado}} = 2,686 < H_{\text{crítica}}=5,992$) y **bajo la exposición al cadmio** (K-W: $H_{\text{calculado}} = 1,071 < H_{\text{crítica}}=5,992$). Sin embargo, al contrastar los experimentos **con y sin cadmio** se observaron diferencias al incrementar la salinidad de 18:36 y 18:27 (Tabla 11).

Tabla 11. Contrastes entre las tasas de filtración de los experimentos con salinidad de aclimatación de 18, cuando son sometidos a incrementos de salinidad a 27 y 36 con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{\text{una cola}} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 18:36 / Con_Cd 18:36	$T_{\text{crítico}} = 1 > T_{\text{calculado}} = 0$	Rechazo H_0 Existen diferencias
Sin_Cd 18:27 / Con_Cd 18:27	$T_{\text{crítico}} = 1 > T_{\text{calculado}} = 0$	Rechazo H_0 Existen diferencias

3.3 Tasa de excreción de amonio

3.3.1 Diferencias en la tasa de excreción de amonio entre las salinidades de aclimatación de los experimentos control y efecto del cadmio

Salinidades de aclimatación sin el efecto del cadmio

Los organismos aclimatados a una salinidad de 36:36 presentan una tasa de excreción inferior a 40 $\mu\text{g/h}$ con poca variación en el tiempo, según Chandran (2002) al encontrarse en un medio iónicamente concentrado deben generar una orina hipotónica, con el fin de conservar su concentración iónica interna (Figura 9, der).

A una salinidad de aclimatación de 27:27, el medio tiene una menor concentración de iones, así que para mantener el estado isotónico, los organismos excretan orina con una concentración de iones más alta, lo cual se observa en la gráfica de las series de tiempo, en la cual se observó que la excreción se incrementó en el tiempo, alcanzando al final del experimento una tasa de 140 $\mu\text{g/h}$ (100 veces mayor que a la salinidad de aclimatación de 36; por lo que las ostras se encontraban osmorregulando (Figura 9, der)

Por otra parte, en la salinidad de aclimatación de 18:18, los organismos pierden la capacidad de eliminar iones a través de la orina y entran a un estado osmoconforme, con tasas de excreción superiores a 40 $\mu\text{g/h}$ e inferiores a los 60 $\mu\text{g/h}$, encontrándose posiblemente hipertónicas respecto al medio, debido al desequilibrio osmótico que genera el ingreso de agua al interior de los organismos (Figura 9, der).

Salinidades de aclimatación con el efecto del cadmio

La tasa de excreción de amonio fue más elevada en los organismos sometidos al efecto del cadmio en las salinidades de aclimatación de 36:36 y 18:18, respecto a los experimentos sin cadmio. En las series de tiempo de estas dos salinidades, se observa que la tasa de excreción tiende a disminuir en el tiempo en las ostras expuestas al cadmio y a permanecer constante en los experimentos sin cadmio (Figura 9).

Por otra parte, en los experimentos con y sin cadmio a una salinidad de aclimatación de 27:27, los organismos presentan una tasa de excreción elevada desde el comienzo del experimento, que va en incremento conforme avanza el tiempo. Así, en los experimentos sin el efecto del cadmio, se presenta

una tasa inicial de excreción de amonio de 60 $\mu\text{g/h}$ alcanzando 140 $\mu\text{g/h}$ al final del tiempo de experimentación; mientras que los organismos expuestos al cadmio inicia con una tasa de excreción de cerca de 100 $\mu\text{g/h}$ y se incrementa a 160 $\mu\text{g/h}$, indicando que también en este experimento la tasa de excreción es mayor en el medio sometido al efecto del contaminante (Figura 9).

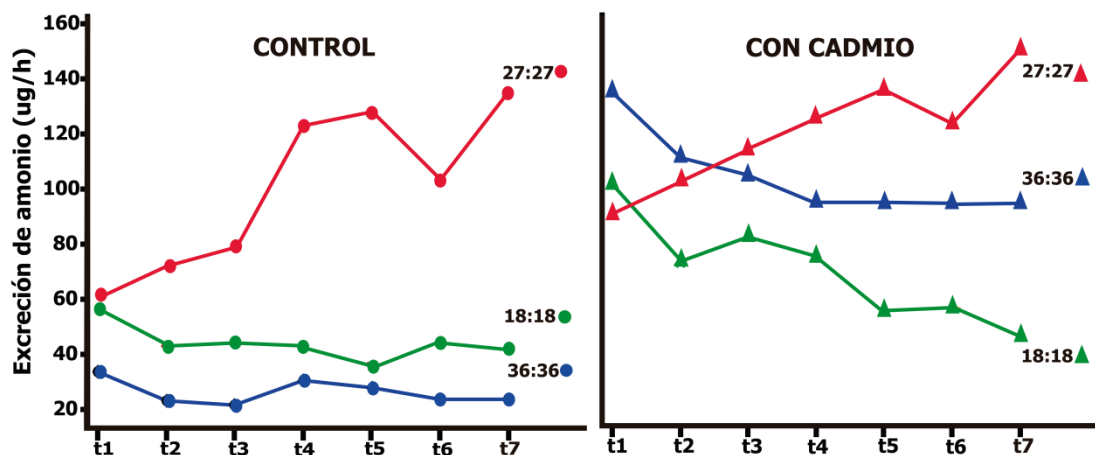


Figura 9. Tasa de excreción de amonio de *Isognomon alatus* en los grupos control sin cadmio y los experimentos con cadmio.

Se determinaron diferencias en las tasas de excreción de amonio entre las tres salinidades de aclimatación, respecto a la salinidad de aclimatación **sin el efecto del cadmio** ($K-W: H_{\text{calculado}} = 17,829 > H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$) y **con cadmio** ($K-W: H_{\text{calculado}} = 12,038 > H_{\text{crítica}} = 5,992$), las pruebas pareadas de Wilcoxon indican que las diferencias se encuentran entre las salinidades de aclimatación de 36:36 y 27:27 (Tabla 12). Cuando se contrastaron los efectos **con y sin cadmio**, mediante la prueba de signos de Wilcoxon, se encontró que la tasa de excreción de amonio es diferente en los organismos expuestos al cadmio en las tres salinidades de aclimatación (Tabla 13).

Tabla 12. Contrastes pareados de Wilcoxon para muestras independientes de la tasa de excreción de amonio entre los grupos control sometidos a tres salinidades de aclimatación: 36, 27 y 18, sin el efecto del Cadmio. Valores críticos n_2/n_1 : 7/7; α 0,05.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Máximo calculado Vs. Máximo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:36 / Sin_Cd 27:27	Tlow = 37 > TA = 28	Tupper = 68 < TB = 77	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 36:36 / Sin_Cd 18:18	Tlow = 37 > TA = 28	Tupper = 68 < TB = 77	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 27:27 / Sin_Cd 18:18	Tlow = 37 > TA = 28	Tupper = 68 < TB = 77	Rechazo Ho Existen diferencias
Con_Cd 36:36 / Con_Cd 27:27	Tlow = 37 < TA = 41	Tupper = 68 > TB = 64	Acepto Ho No existen diferencias
Con_Cd 36:36 / Con_Cd 18:18	Tlow = 37 > TA = 32	Tupper = 68 < TB = 73	Rechazo Ho Existen diferencias
Con_Cd 27:27 / Con_Cd 18:18	Tlow = 37 > TA = 29	Tupper = 68 < TB = 79	Rechazo Ho Existen diferencias

Tabla 13. Contrastes entre las tasas de excreción de amonio de los controles con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{una\ cola} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:36 / Con_Cd 36:36	Tcrítico = 2 > Tcalculado=0	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 27:27 / Con_Cd 27:27	Tcrítico = 2 > Tcalculado=0	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 18:18/ Con_Cd 18:18	Tcrítico = 2 < Tcalculado=0	Rechazo Ho Existen diferencias

3.3.2 Efecto del choque salino en la tasa de excreción de amonio con aclimatación a 36

Salinidades de aclimatación sin el efecto del cadmio

En los descensos a partir de la salinidad de aclimatación de 36 a salinidades de 27 y 18, se observó una concentración de amonio más baja que en el control 36:36 (línea negra); en los choques salinos, la tasa de excreción de amonio permanece cercana a los 10 $\mu\text{g/h}$, con una tasa de cambio que

permaneció estable en ese rango durante el experimento; lo cual, indica que frente al choque salino, los organismos no eliminan iones de forma significativa a través de la orina. (Figura 10)

Salinidades de aclimatación con el efecto del cadmio

Las ostras expuestas a los choques salinos, presentaron una estabilidad en la concentración de amonio en el tiempo, no obstante, bajo la exposición al cadmio las tasas de excreción aumentaron considerablemente (Figura 10).

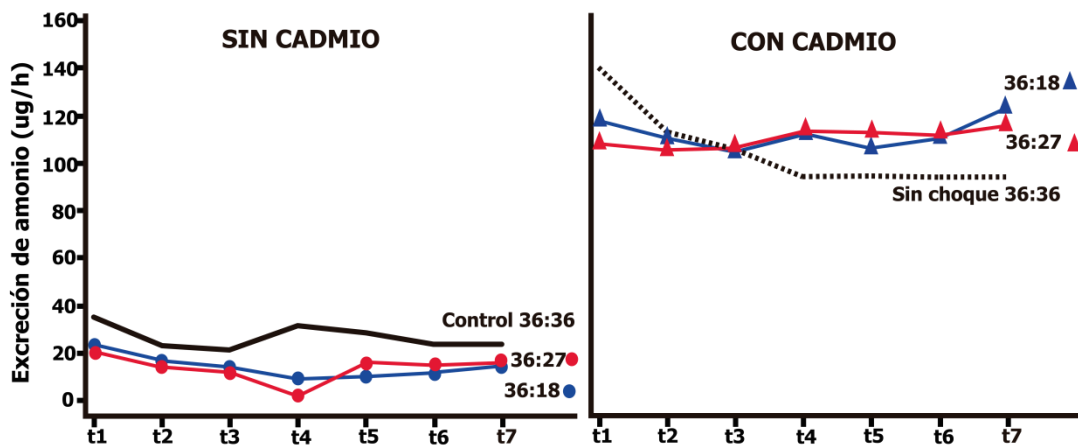


Figura 10. Tasa de excreción de amonio de los grupos aclimatados a 36 en experimentos con choque salino sin y con cadmio.

Se determinaron diferencias significativas en las tasa de excreción de amonio debidas al choque salino, en los experimentos **sin cadmio** cuando la concentración salina desciende ($K-W: H_{\text{calculado}} = 11,823 > H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$). Según las pruebas pareadas, las diferencias se presentaron entre el control 36:36 y los descensos de salinidad de 36:18 y 36:27; sin embargo, no se observaron diferencias en la tasa de consumo entre estos dos descensos de salinidad (Tabla 14). Para los experimentos **con cadmio**, se determinó que no existen diferencias en las tasa de excreción de amonio ($H_{\text{calculado}} = 2,956 < H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$). Mediante las pruebas de signo, se determinó que existen diferencias entre las respuestas **con y sin** efecto del cadmio en los descensos de 36:27 y 36:18 (Tabla 15).

Tabla 14. Contrastes pareados de Wilcoxon para muestras independientes, entre la tasa de excreción de amonio durante el experimento control de 36 y los grupos sometidos a choques salinos de descenso de 27 y 18 sin el efecto del Cadmio. Valores críticos n_2/n_1 : 7/7; α 0,05.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Máximo calculado Vs. Máximo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:36 / Sin_Cd 36:27	Tlow = 37 > TA = 28	Tupper = 68 < TB = 77	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 36:36 / Sin_Cd 36:18	Tlow = 37 > TA = 31	Tupper = 68 < TB = 74	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 36:27 / Sin_Cd 36:18	Tlow = 37 < TA = 51	Tupper = 68 > TB = 54	Acepto Ho NO Existen diferencias

Tabla 15. Contrastes entre las tasas de excreción de amonio de los experimentos con salinidad de aclimatación de 36, cuando son sometidos a descensos a 27 y 18 con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{una\ cola} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 36:27 / Con_Cd 36:27	Tcrítico = 2 > Tcalculado= 0	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 36:18 / Con_Cd 36:18	Tcrítico = 2 > Tcalculado= 0	Rechazo Ho Existen diferencias

3.3.3 Efecto del choque salino en la tasa de excreción de amonio con aclimatación a 27

Salinidades de aclimatación sin el efecto del cadmio

Durante el descenso de salinidad de 27:18, las ostras permanecieron con una tasa de excreción de amonio baja durante la primera hora del experimento, en la que posiblemente las valvas permanecieron cerradas, lo cual concuerda con las otras mediciones en la tasa de filtración y respiración, debido al cambio de salinidad. A partir de la segunda hora del experimento, la tasa de excreción comenzó a incrementar, hasta alcanzar una tasa máxima de $60\mu\text{g/h}$, la cual, es inferior a la del control 27:27 (línea negra), pero indica que las ostras están osmorregulando (Figura 11, der). El incremento de salinidad de 27:36 presentó una tasa de excreción de amonio similar al control, estabilizándose a partir de la primera hora del experimento en un intervalo de $100 - 140\mu\text{g/h}$.

Salinidades de aclimatación con el efecto del cadmio

La serie de tiempo del descenso de 27:18 con efecto del cadmio, muestra que los organismos tienen la capacidad de osmorregular para mantener el equilibrio iónico; las tasas de excreción de amonio presentaron un comportamiento similar al observado en el experimento sin cadmio (Figura 11, der), pero la tasa promedio del tratamiento con Cd, fue ligeramente más elevada, alcanzando al final del experimento los 100 µg/h (Figura 11 izq). Esa tasa no obstante, es mucho menor que la observada en la salinidad de aclimatación con cadmio (Línea punteada, Figura 11, izq), demostrando un efecto conjunto entre la salinidad y el contaminante.

La tasa de excreción ante el incremento de salinidad de 27:36 presentó una concentración y tendencia en el tiempo muy similar a la observada en la salinidad de aclimatación 27:27 con cadmio (Línea punteada) (Figura 11, izq); asimismo, al comparar el incremento de salinidad de 27:36, en los experimentos con y sin cadmio, se observa la misma tendencia en la serie de tiempo, solo que ante el efecto del cadmio la tasa de consumo es ligeramente más alta alcanzando un valor máximo de 160 µg/h.

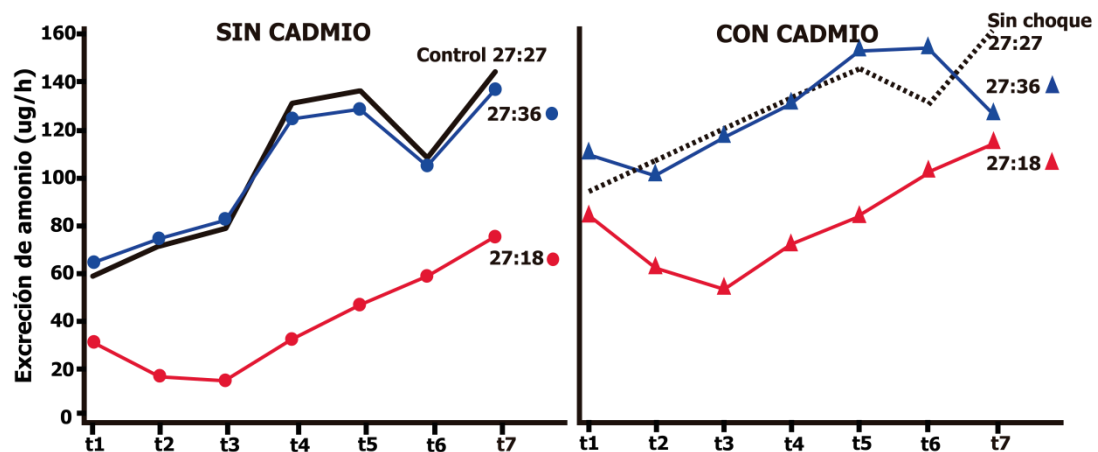


Figura 11. Tasa de excreción de amonio en el tiempo de *Isognomon alatus* en los grupos aclimatados a 27 en experimentos de choque salino sin y con cadmio.

No se observaron diferencias entre las tasas de excreción de amonio, debidas al efecto del choque salino, ni en los experimentos **sin cadmio** ($K-W: H_{\text{calculado}} = 1,815 < H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$) ni **con cadmio** ($K-W: H_{\text{calculado}} = 0,467 < H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$). Las pruebas de signo entre los experimentos con y sin cadmio no indican diferencias entre los experimentos (Tabla 16).

Tabla 16. Contrastes entre las tasas de excreción de amonio de los experimentos con salinidad de aclimatación de 27, cuando son sometidos a descensos de salinidad a 18 e incrementos de salinidad a 36, con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{una\ cola} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 27:18 / Con_Cd 27:18	Tcrítico = 2 = Tcalculado= 2	Acepto Ho No existen diferencias
Sin_Cd 27:36 / Con_Cd 27:36	Tcrítico = 2 < Tcalculado= 12	Acepto Ho No existen diferencias

3.3.4 Efecto del choque salino en la tasa de excreción de amonio con aclimatación a 18

Salinidades de aclimatación sin el efecto del cadmio

Los organismos aclimatados a una salinidad de 18:18 permanecieron con tasas de excreción de amonio bajas, lo cual, posiblemente indica que en lugar de osmorregular, eliminando activamente iones a través de la orina, permanecen en un estado osmoconforme e isotónico respecto al medio. Cuando se llevan a condiciones estables de salinidad (en este caso concentraciones elevadas como 18:27 y 18:36), al parecer comienzan a eliminar iones activamente evidenciando una tendencia de incrementar en el tiempo (Figura 12).

Es posible que las ostras aclimatadas a bajas salinidades, difícilmente puedan retornar a una condición estable teniendo en cuenta que se observa un incremento elevado en la tasa de excreción de amonio, al mismo tiempo que los organismos se someten a un medio con una concentración iónica elevada; lo cual podría desencadenar en una deshidratación. Asimismo, las series de tiempo en las tasas de consumo de oxígeno y filtración, en los incrementos de 18:27 y 18:36, presentaron un comportamiento fluctuante y errático, en el que se observan múltiples picos, pero no se logra establecer una tendencia, lo cual, es una señal clara de que los organismos posiblemente no logran estabilizarse. Esto puede ocurrir debido a que muchos cambios fisiológicos pueden generar modificaciones no reversibles a nivel estructural como el endurecimiento de las branquias o la pérdida de irrigación sanguínea debida a un proceso de apoptosis vascular (Chandran, 2002).

Salinidades de aclimatación con el efecto del cadmio

El comportamiento frente al incremento de la salinidad en presencia del cadmio fue similar a lo observado en los experimentos sin cadmio, tanto para la salinidad de 18:27 como para la de 18:36.

No obstante, las tasas de excreción con el efecto del cadmio, parecen continuar incrementando durante el experimento, mientras que en los experimentos sin cadmio se observó que la tasa de excreción se estabilizó después de transcurridas las primeras dos horas del experimento (Figura 12).

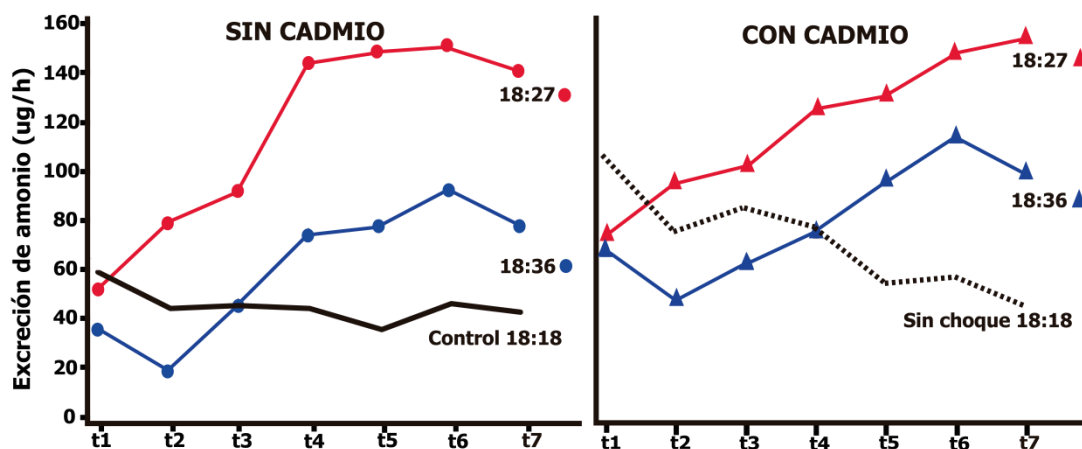


Figura 12. Tasas de excreción de amonio de *Isognomon alatus* en los grupos aclimatados a 18 en experimentos con choques salinos sin y con cadmio.

No hay diferencias en las tasas de excreción de amonio, en las pruebas **sin cadmio** ($H_{\text{calculado}} = 3,171 < H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$) ni **con cadmio** y ($H_{\text{calculado}} = 1,21015 < H_{\text{crítica}} (\text{gl } 2; \alpha 0,05) = 5,992$). Se determinaron diferencias bajo el efecto **con y sin cadmio**, en los incrementos según la prueba de signo de Wilcoxon (Tabla 17).

Tabla 17. Contrastes entre las tasas de excreción de amonio de los experimentos con salinidad de aclimatación de 18, cuando son sometidos a incrementos de salinidad, de 27 y 36 con y sin cadmio, mediante pruebas de signo de Wilcoxon para muestras dependientes. $n = 7$ $\alpha_{\text{una cola}} = 0,025$.

Contrastes	Mínimo calculado Vs. Mínimo crítico	Interpretación
Sin_Cd 18:36 / Con_Cd 18:36	Tcrítico = 2 > Tcalculado= 0	Rechazo Ho Existen diferencias
Sin_Cd 18:27 / Con_Cd 18:27	Tcrítico = 2 > Tcalculado= 0	Rechazo Ho Existen diferencias

4. DISCUSIÓN

Efectos sobre el consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno de *I. alatus* en una aclimatación a salinidades de 36 y 27 es alto, por lo contrario a una salinidad de 18 el consumo es bajo. Esto ocurre debido a una adaptación intracelular que poseen los bivalvos y que les permite responder como organismos osmoconformes con tasas de consumo de oxígeno menores. Por lo tanto, la ostra *I. alatus* se puede clasificar como una especie oxiconforme, ya que puede mantener relativamente constante la asimilación de O₂, sin importar los cambios de salinidad o la exposición a contaminantes como el cadmio en el ambiente. El sostenimiento de la toma de O₂ permite a los organismos mantener la actividad metabólica para compensar otros cambios ambientales como las fluctuaciones en la salinidad. Por otro lado la tasa de consumo de oxígeno de un animal está influenciada por un número de factores intrínsecos y extrínsecos, como el tamaño, la alimentación, las condiciones ambientales, el estado fisiológico del animal, salinidad u otros tipos de estrés ambiental. La estimación de la tasa del consumo de oxígeno es una herramienta útil para evaluar el gasto de energía para la adaptación a las alteraciones ambientales (Thompson y Bayne, 1972; Swanson, 1998).

Al observar la respuesta metabólica al choque salino, cuando hay un descenso de la salinidad de 36 a 27, la tasa de consumo de oxígeno se estabiliza, similar a la salinidad a las que estuvieron acondicionadas las ostras, aunque con una tasa de consumo de O₂ mayor. Al contrario cuando se pasa de una salinidad de 36 a una de 18, el consumo de O₂ es menor y no logra estabilizarse, indicando que a medida que existen descensos de la salinidad del medio, el proceso de adaptación a estas condiciones ocurre lentamente. Cuando *I. alatus* se encuentra acondicionado a una salinidad de 27 la tasa de consumo de oxígeno se incrementa, independiente de si el choque salino es un incremento (36) o un descenso en la salinidad (18). Los organismos aclimatados a salinidades intermedias intentan osmoregular cuando se encuentran sometidos a un cambio repentino en la concentración salina, el proceso de regulación si bien comienza siendo mecánico, mediante el cierre de las valvas, gradualmente comienza a ocurrir a nivel intracelular. Cuando las ostras son acondicionadas en un medio diluido, se mantienen en un estado osmoconforme, pero al ser sometidas a un choque salino repentino, los organismos intentan incrementar el consumo de oxígeno, por lo que es posible observar múltiples picos; sin embargo no logran estabilizar su tasa de consumo porque esto implica un gasto energético elevado. Bajo la exposición al cadmio y en salinidades de 36 y 27, el consumo de oxígeno se redujo a cerca de 0 mL O₂/h al iniciar las pruebas, luego se estabilizó en tasas de consumo muy bajas. En salinidades inferiores existe un efecto sinérgico entre el choque salino a 18 y la exposición al cadmio.

Es bien conocida la capacidad de los bivalvos para sobrevivir en la zona intermareal, la cual está sometida a frecuentes periodos de desecación, cambios de salinidad, temperatura y fuertes cargas de sedimentos. Cuando uno de estos factores se vuelve intolerable, los bivalvos lo sobrellevan cerrando sus valvas y modificando su proceso respiratorio hacia la vía anaeróbica, lo que resulta en un

incremento del ácido láctico en la hemolinfa y la modificación de la acidez del líquido intervalvar (Galtsoff, 1964). Se ha demostrado un proceso fisiológico similar frente al exceso de cobre determinado mediante la disminución en la tasa de captación de oxígeno y la reducción en las tasas de filtración por Lewis (1990), las cuales se asocian a una menor actividad ciliar en respuesta al incremento en los niveles de contaminantes (Almeida *et al.*, 2003). Lo anterior también es apoyado por Mohan (1986), que determinó que el consumo de oxígeno en *Perna viridis* desciende cuando se encuentran expuestas a concentraciones de 0,04 y 0,05 ppm de cadmio y mercurio. Los moluscos bivalvos pueden entrar a un estado de anaerobiosis bajo condiciones desfavorables; Salanki (1965, 1968) observó que los bivalvos cierran sus valvas fuertemente y dejan de filtrar bajo condiciones de estrés resultando en una disminución de la toma de oxígeno.

Por cambios en salinidad y por el alto costo en el consumo energético para osmoregular, la energía, que es almacenada o utilizada para otras necesidades fisiológicas, como la reproducción y el crecimiento, es desviada para soportar el estrés salino, producto de las diferentes salinidades o concentraciones osmóticas, razón por la cual el organismo cierra la valvas, disminuyendo la tasa de ingestión de alimento para tolerar el estrés salino. En consecuencia, la tasa de consumo de O₂ disminuye y por ende su tasa de filtración. Los moluscos que habitan en estuarios, como el caso de la almeja *Polymesoda solida*, se encuentran expuestos a cambios de salinidad por períodos variables de tiempo, durante estos lapsos, los organismos están sujetos a condiciones extremas no favorables que generan en ellos un importante factor de estrés, disminuyendo su metabolismo, su actividad de filtración y por ende su crecimiento. Los animales invierten mucha energía para tolerar los cambios de salinidad y por estar sometidos a estos cambios de salinidad, los organismos requieren y necesitan hacer ajustes fisiológicos que les permitan vivir bajo estas condiciones (Morillo y Belandria, 2006).

Uno de los mecanismos más importantes de *I. alatus* es el comportamiento de cierre de sus valvas cuando se presentan choques salinos bruscos, sea con un descenso o un incremento de la salinidad del medio. Según Chandran (2002) los bivalvos tienden a aislar su cuerpo por los cambios repentinos en el medio ambiente y observa que la isotonicidad entre el fluido perivisceral y el medio, no se alcanza inmediatamente después de un cambio de la salinidad del medio ambiente. El fluido perivisceral en las especies eurihalinas oferta un entorno ambiental claramente diferente del entorno inmediato para las partes blandas del cuerpo ante un cambio de la salinidad. El cierre de las valvas es uno de los mecanismos que adoptan para mantener los desequilibrios con el medio ambiente exterior. El mecanismo de cierre de las valvas puede ayudar a un individuo determinado a resistir, al menos temporalmente, un cambio drástico en la concentración del medio externo. *I. alatus* como otros bivalvos tienen un comportamiento osmoconforme, ya que cambia su condición interna con el cambio del medio externo y son capaces de escapar a los cambios transitorios de la salinidad por medio de respuestas en su comportamiento. El cierre de las valvas es una respuesta inmediata y ayuda al animal a simplificar el mecanismo fisiológico para el medio ambiente alterado; por lo tanto los estudios sobre el efecto de los cambios en la salinidad sobre los mecanismos fisiológicos de bivalvos deben ir acompañados de estudios sobre las respuestas de su comportamiento (Akberali y Trueman, 1985).

Algo muy similar sucede en el mantenimiento en la toma de oxígeno de los crustáceos; está relacionada con el incremento de la tasa de ventilación y el porcentaje de utilización del O₂ en la cámara branquial. Los ajustes son efectivos hasta que el incremento del costo energético de ventilación de las branquias es superado por los beneficios derivados de la producción energética ampliada. El porcentaje de utilización de oxígeno en la cámara branquial se debe al incremento en la presión sanguínea que permite una mayor transferencia de O₂ (Hochachtoka, 1980; Kennedy, 1982).

Efecto sobre la tasa de filtración

La tasa de filtración de *I. alatus* Figura 5, es más eficiente conforme la concentración de la salinidad disminuye, asemejándose a las condiciones estuarinas, como ocurre en la dilución 3:1 que corresponde a una salinidad de 27; contrario a esto, en los experimentos en los que los individuos se encontraban influenciados por las concentraciones de mayor o menor salinidad 1:0 (36) y 1:1 (18), la tasa de filtración fue mucho menor, siendo más notable cuando los organismos se encontraban aclimatados a salinidades diluidas previamente y se sometieron a una salinidad mayor. No obstante en la mayoría de los tratamientos la tendencia de las tasa de filtración fue a aumentar, indicando que a pesar de la preferencia que presentan los bivalvos a ser osmoconformes, se observa que existe una capacidad pequeña de regulación que permite conservar las condiciones osmóticas del medio interno, lo cual, se debe a que los invertebrados también pueden desarrollar estrategias que les permiten ampliar sus límites de tolerancia (Hill *et al.*, 2004).

En el experimento bajo la exposición al cadmio, *I. alatus* presentó una tasa de filtración mucho menor que en el experimento sin cadmio, las ostras no lograron filtrar toda la cantidad del grafito utilizado (tinta china), aunque su tendencia es de seguir incrementado la tasa a medida que pasa el tiempo. Cuando presenta un descenso de la salinidad en el medio, se determina que existen diferencias en el descenso de 36 a 27 debido al efecto del metal, no obstante, cuando el descenso es 36 a 18, no se presentan diferencias. Las ostras no filtraron todas las partículas de grafito durante las 5 h del experimento en ninguno de los descensos. No obstante, el efecto del cadmio es menos evidente en los experimentos de descenso a 18, debido a que la respuesta ante este choque salino, es tal, que genera un descenso importante en la tasa de filtración aún sin el efecto del cadmio.

Muchas especies de bivalvos son usadas como biomonitores, ya que denotan generalmente el grado del cambio ecológico con una respuesta en el comportamiento fisiológico o bioquímico, reflejados en alteraciones en la curva de crecimiento, las tasas metabólicas y el grado de latencia lisosomal; además de una alta capacidad resiliente que les permite sobrevivir en ecosistemas alterados, en las cuales posiblemente, otras especies estenohalinas no logran sobrevivir y esto lo hacen desarrollando una capacidad osmoreguladora pequeña. Al cerrar las valvas por algún factor estresante del medio, los bivalvos modifican su proceso respiratorio con un incremento del lactato en la hemolinfa y modificando la acidez del líquido intervalvar (Baqueiro-Cárdenas *et al.*, 2007), lo cual, ocurrió posiblemente en los experimentos en los que los organismos se encontraban aclimatados a las

salinidades de 27 y 18, y que fueron sometidos a una salinidad de 36, causando el descenso en la tasa de filtración.

Los organismos que habitan en los estuarios como *I. alatus* están capacitados, a través de procesos de selección natural, para resistir las fluctuaciones características de la salinidad y la temperatura. Estas variaciones van a incidir notoriamente en la tasa de consumo de oxígeno por parte de los organismos. La salinidad es uno de los factores principales que controla el consumo de oxígeno, afectando la tasa de filtración. En larvas de *Palaemonetes pugio* la respuesta respiratoria a cambios de salinidad sigue un patrón de respuesta para especies eurihalinas, con un cambio en la tasa a salinidades, tanto supra como subnormales (Mckenney y Neff, 1981). Se ha demostrado un proceso fisiológico similar en el mejillón cebrá *Dreissena polymorpha* con la disminución en la tasa de captación y consumo de oxígeno y reducción en las tasas de filtración por exceso de cobre en el ambiente (Lewis, 1990). La tasa de filtración está asociada con una actividad ciliar menor en respuesta al incremento en los niveles de contaminantes (Almeida *et al.*, 2003).

Reddy y Menon (1979) mencionan que existen otros mecanismos de regulación externa como lo son el cierre de las valvas, la reducción de la actividad ciliar y disminución de los niveles irrigación de la branquias que pueden utilizar los bivalvos como *I. alatus*, lo cual, parece ser más acorde con lo observado en estos experimentos, en los que la actividad reguladora fue menor en las mayores concentraciones de salinidad. Esta reducción en la actividad ciliar puede ser causada por el endurecimiento de las estructuras filtradoras, debido a que los individuos han sido sometidos a condiciones extremas, en este caso los cambios repentinos de la salinidad, se encuentran ejerciendo un efecto constante sobre las poblaciones (Baqueiro *et al.*, 2007); lo cual, coincide con lo ocurrido en este trabajo, ya que las ostras fueron aclimatadas a diferentes salinidades y a una constante exposición a salinidades altas (en este caso 36) ha hecho que los cambios sean irreversibles y es lo que causa la mayor parte de variaciones. Esta exposición constante a condiciones de estrés se puede desarrollar mediante tres mecanismos: tolerancia, aclimatación y adaptación, que con el tiempo pueden generar que los individuos de una población presenten primero una transformación de información citoplasmáticamente y luego resistencia genética por medio de selección natural (Klerks y Weis, 1987). Esta condición no obstante puede representar ventajas a las poblaciones naturales; una de ellas puede ser que estos organismos comiencen a ganar una mayor talla al desarrollar tasas metabólicas más lentas; Román *et al.*, (1999) por ejemplo, aseguran que la disminución de la salinidad posee mayor influencia negativa en el crecimiento de *Aequipecten opercularis*, es probable que en concentraciones de salinidad diluidas, las altas tasas metabólicas y el elevado consumo de oxígeno y capacidad filtradora, sean una respuesta fisiológica a un mayor gasto de energía, el cual es usado para mantener el equilibrio interno, por lo que encontrarse sometido a una actividad constante de este tipo podría acarrear a una menor tasa reproductiva y menores tallas. (Lodeiros *et al.*, 2001).

Efecto sobre la excreción de amonio

Como se puede observar en la Figura 10, al ocurrir un descenso a partir de una salinidad de aclimatación de 36 a salinidades de 27 y 18, la tasa de excreción de amonio en *I. alatus* es mucho más baja que la del control, ésta es cercana a los 10 $\mu\text{g}/\text{h}$ lo que indica que las ostras frente al choque salino, no eliminan iones de forma significativa a través de las pseudoheces y la orina, lo cual sólo puede existir si el animal posee diversos mecanismos que le permitan hacer frente al estrés osmótico. Esta respuesta en los moluscos es atribuida principalmente a la capacidad de los animales para regular su presión osmótica celular con respecto a cambios en la osmolaridad de la sangre. Según Florkin (1962), la regulación osmótica es de dos tipos, 1) regulación líquido extracelular isosmótico, que es la regulación de la presión osmótica de la sangre y la 2) es la regulación intracelular isosmótica, que es la regulación de la presión osmótica de la célula. Estas dos son los principales medios fisiológicos de adaptación a la salinidad fluctuante (Matsushima *et al.*, 1987).

Las ostras acondicionadas a una salinidad de 18, permanecieron con una tasa de excreción de amonio baja, indicando que eliminan activamente iones a través de pseudoheces y la orina, permaneciendo en un estado osmoconforme e isotónico respecto al medio, lo que podría causar rápidamente que el agua traspase las paredes del cuerpo de los organismos, por lo que es evidente que las ostras acondicionadas a bajas salinidades, difícilmente retornan a una condición estable luego de permanecer por mucho tiempo sometidas a baja salinidad. Esto se observó tanto en los incrementos a 27 como a 36. El cierre prolongado de las valvas puede resultar disparando la osmolaridad de los tejidos, desencadenando la anaerobiosis y acumulación de productos de desecho en el interior, de ahí que el cierre de las valvas no es una solución permanente para escapar de los cambios de salinidad. Existen experimentos en los que las concentraciones iónicas de fluido de la cavidad del manto y en la hemolinfa, revelan que los animales vuelven de un periodo alterado a un equilibrio después de un período de latencia; en este período los organismos evocan a su maquinaria fisiológica en el cual realizan ajustes celulares y de resistencia para alcanzar un nuevo estado de equilibrio (Chandran, 2002).

Cuando *I. alatus* está acondicionado a una salinidad de 36 presenta poca variación en la tasa de excreción en el tiempo, ya que al encontrarse en un medio con mayor concentración de iones deben generar una excreción hipotónica, con el fin de conservar su concentración iónica interna, y permanecen, a partir de los primeros 30 min en una tasa de excreción inferior a 40 $\mu\text{g}/\text{h}$. A una salinidad de 27, el medio tiene una menor concentración de iones, así que para mantener el estado isotónico, los organismos aumentan la cantidad de orina excretada, pero más diluida con una concentración de iones más alta (140 $\mu\text{g}/\text{h}$, 100 veces mayor que a la salinidad de aclimatación de 36). Este aumento se debe al metabolismo de las proteínas como fuente de energía para contrarrestar la demanda por la adaptación; por lo que las ostras empezaron a osmorregular. En la salinidad de 18, pierden la capacidad de eliminar iones a través de la orina y entran a un estado osmoconforme, con tasas de excreción superiores a 40 $\mu\text{g}/\text{h}$ e inferiores a los 60 $\mu\text{g}/\text{h}$, encontrándose en un estado hipertónico respecto al medio, debido al desequilibrio osmótico que genera el ingreso de agua al interior de los organismos. Estos resultados son apoyados por lo registrado por Navarro y

González, (1998), que al estudiar el efecto de la salinidad sobre la excreción de amonio en *Argopecten purpuratus*, determinaron que esta especie aumenta su tasa de excreción de amonio frente a una disminución de la salinidad desde un 30% a un 24%, demostrando su capacidad para regular el volumen mediante el rompimiento y utilización de los aminoácidos como reguladores isosmóticos intracelulares a medida que la salinidad disminuye. Los resultados del presente estudio también se ven apoyados por lo reportado por Livingstone *et al.*, (1979), que registraron un aumento de la tasa de excreción de amonio en el bivalvo *Mytilus edulis* asociado con el aumento de la concentración de aminoácidos en la hemolinfa a medida que disminuía la salinidad.

En los experimentos con cadmio, se determinó que las ostras presentan el mismo comportamiento que el experimento sin cadmio en las diferentes salinidades, pero las tasas de excreción de amonio son mucho mayores. Las ostras expuestas a los choques salinos, presentaron una estabilidad en las tasas de excreción de amonio en el tiempo, no obstante, bajo la exposición al cadmio las tasas aumentan, debido a que aumenta el estrés y hay un aumento de tensores en el medio. El descenso a 18 con efecto del cadmio, muestra que los organismos tienen la capacidad de osmorregular para mantener el equilibrio iónico. Las tasas de excreción de amonio presentaron un comportamiento similar al observado en el experimento sin cadmio, pero la tasa promedio fue ligeramente más elevada, alcanzando al final del experimento los 120 µg/h. La tasa de excreción ante el incremento de salinidad a 36 permaneció similar a las tasas de la salinidad de aclimatación.

Chandran (2002), señala que todas las especies eurihalinas de bivalvos, en este caso *I. alatus* conservan un entorno ambiental en la cavidad del manto durante algún tiempo cuando la fluctuación de la salinidad en el medio ambiente es mayor que el límite de tolerancia. Cuando el animal se ve obligado a vivir en la zona de resistencia, la velocidad con la que regresa al nuevo equilibrio después de la exposición es un indicativo de la perfección de la adaptación. Como se mencionó, el cierre de la valva no es una solución permanente para escapar de las alteraciones en el medio ambiente. Además imparte un conflicto entre la osmolaridad de la sangre y la anoxia. En *Villorita cyprinoides* var. *cochinensis* la concentración iónica de la hemolinfa también se incrementa de acuerdo con el aumento del contenido iónico del fluido de la cavidad del manto. La hemolinfa es hipoiónica respecto al fluido de la cavidad del manto a una baja salinidad. En salinidades elevadas la hemolinfa es más o menos isoiónica respecto al fluido de la cavidad del manto. Lo cual, refleja la ausencia de regulación extracelular anisosmótica en salinidades elevadas. De esto puede deducirse que el mecanismo de cierre de las valvas es de ayuda para el animal ante cambios trascendentes de salinidad. Al mismo tiempo, un retraso en la disminución del tiempo para alcanzar la homogeneidad ayuda a estos organismos estuarinos a prosperar mejor en un ambiente donde se experimentan cambios diurnos de salinidad.

Las variaciones en la salinidad del agua del mar pueden generar cambios en la presión osmótica; los cambios de osmolaridad son el efecto más importante para los organismos que viven en ambientes en los cuales existe variación en la salinidad. La capacidad de regulación iónica y osmótica, por lo menos a nivel celular, es esencial para la invasión a los ambientes acuáticos con un entorno químico diferente. Los animales más primitivos como los moluscos, poseen pocos mecanismos de regulación iónica extracelular. Cuando existen cambios bruscos en la salinidad hay solo una distinción marginal

entre osmoreguladores y osmoconformes, ya que los organismos eurihalinos para su regulación osmótica incluyen alguno o todos los siguientes mecanismos: 1) La regulación de volumen y la flexibilidad en la tasa de la producción de orina, 2) la regulación de los niveles de aminoácidos y de iones orgánicos para mantener el volumen celular dentro de un límite estrecho y 3) mantenimiento de los fluidos hipertónicos al medio diluido por medio de transporte activo de iones orgánicos hacia el animal para reemplazar los iones perdidos por difusión a través de la superficie corporal y por la orina. Producción de una orina hipotónica a los fluidos del cuerpo. Reducción de la permeabilidad superficial al agua y a las sales. En el transcurso de la evolución estos organismos han desarrollado y refinado su sistema de excreción para combatir esos problemas osmóticos (Chandran, 2002).

Como se pudo observar en este trabajo, el cadmio tiene un gran efecto sobre las respuestas fisiológicas de *I. alatus*, ya que reduce casi en su totalidad la capacidad de filtrar el material suspendido en la columna de agua y su captación de O₂; además de aumentar considerablemente la tasa de excreción de amonio. Esto nos indica que puede existir un efecto sinérgico del choque salino y la presencia de cadmio, aunque como se mencionó anteriormente, el choque salino fue más evidente. La contaminación del medio ambiente por metales pesados en este caso el cadmio, es un problema serio reconocido en el ámbito mundial, probablemente el elemento más biotóxico y considerado uno de los contaminantes más importantes por los efectos que produce sobre la biota marina (Sadiq, 1992). Aunque biológicamente los moluscos poseen mecanismos de detoxificación de metales (Phillips, 1995), en este caso el cadmio pudo afectar los componentes celulares de *I. alatus* y así disminuir el metabolismo mitocondrial, provocando un efecto de desequilibrio en el balance energético de estos organismos marinos (Sokolova *et al.*, 2005), resultando en una disminución generalizada del metabolismo celular (Ciocan y Rotchell, 2004).

CONCLUSIONES

- Se determinó que existen efectos sinérgicos entre los choques salinos y la exposición al cadmio sobre las respuestas fisiológicas de *Isognomon alatus*.
- *I. alatus* responde mecánicamente por el cierre de las valvas y fisiológicamente puede entrar en procesos de anaerobiosis bajo la exposición al cadmio.
- La tasa de excreción en *I. alatus* aumenta bajo exposición de metales pesados en este caso el cadmio.

RECOMENDACIONES

- Es importante profundizar el conocimiento del efecto de los factores ambientales sobre los procesos fisiológicos e incrementar este tipo de investigaciones para poder comprender los mecanismos adaptativos que permiten a los organismos sobrevivir, crecer y reproducirse ante las variaciones ambientales.
- En relación con el impacto ambiental y social generado por las altas concentraciones de cadmio en ostras, los resultados de esta investigación permiten presentar recomendaciones a las autoridades competentes y a la academia, para continuar con las determinaciones de éste y otros metales en organismos, agua, sedimentos y efluentes de industrias, y así determinar el aporte de estos a la contaminación del cuerpo de agua.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abel, P.D. 1976. Effect of some pollutants on the filtration rate of *Mytilus edulis*. Marine Pollution Bulletin (7): 228–231 p.

Akberali, H.B and Trueman, E.R., 1985. Effects of environmental stress on marine bivalve molluscs. In *Advances in Marine Biology*, J.H.S. Blaxter, F.S. Russel and M. Younge (eds.). Academic Press, New York (22): 101-198 p.

Almeida, E. A., A. C. D. Bainy, M. H. G. Medeiros and P. Di Mascio. 2003. Effects of trace metal and exposure to air on serotonin and dopamine levels in tissues of the mussel *Perna perna*. Marine Pollution Bulletin (46): 1485–1490 p.

Allen, S.E., J.A Parkinson and A.P. Rowland. 1989. Pollutants: 201-239. En OMead (E), Chemical Analysis of Ecological materials. Blackwell Publications, Oxford. 368 p.

Barber, R. Mooers, C., Bowman, M., Zeitzschel, B. 1983. Osmoregulation in estuarine and marine animals. Edit. Springer-Verlag. 221 p.

Bayne, B. L. 1976. Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press. 505 p.

Bishop, M. J., J. G. Gosselink and J. H. Stone. 1980. Oxygen consumption and hemolymph osmolality of brown shrimp *Penaeus aztecus*. Fishery Bulletin 78(3): 741-757 p.

Binelli, A., R. Bacchetta, G. Vailati, S. Galassi and A. Provini. 2001. DDT contamination in Lake Maggiore (N. Italy) and effects on zebra mussel spawning. Chemosphere 45: 409-415 p.

Campos, N. H. 1987. Los metales pesados, su contaminación y sus efectos tóxicos. Rev. Cont. Amb., 9 (17): 63 – 70 p.

Campos, N. H. 1988. Selected bivalves for monitoring of heavy metal contamination in the Colombian Caribbean.

Chandran, V. R. 2002. Intracellular osmoregulation in the estuarine MOLLUSC *Villorita cyprinoides* var. *cochinensis* (Mollusca: Bivalvia) Hanley. Department of Marine Biology, Microbiology and biochemistry Cochin University of science and technology kochi-682016, Indiana. February 2002.

Chung, K.S. 1978. Cadmiun tolerance of the white mullet *Mugil curema* and its use to predict survival, probability in polluted sea waters. Bol. Inst. Oceanogr. Oriente, 17(1-2): 105-107 p.

Ciocan, C. M y J. M. Rotchell. 2004. Cadmium induction of metallothionein isoforms in juvenile and adult mussel (*Mytilus edulis*). Environ. Sci. Tech. (38): 1073-1078 p.

Florkin, M. 1962. Nitrogen metabolism. In *Physiology of Mollusca*. K. M. Wilbur and C. M. Yonge (eds.) Academic press, New York. (2): 309-351 p.

Gaad, G. and Griffiths, A. 1987. Microorganisms and heavy metals toxicity. Microb. Ecol. (4): 303-317 p.

- Gamboa, B.R. y R. Bonilla, 1983. Distribución de metales pesados (Fe, Mn, Cu y Zn). En sedimentos superficiales de la cuenca Tuy-Cariaco. Bol. Inst. Oceanogr. Univ. De Oriente, 22 (1 y 2): 10 –110 p.
- Galtsoff, P. S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. US Department of the Interior Fishery Bulletin. (64): 1-480 p.
- Garay, J.A. y Jurado, E. A. 1981. Contribución al estudio oceanográfico químico de la Bahía de Cartagena. Tesis de Grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Garay, J.A., Marín, B., Calvano, N., Ramírez, G., Troncoso, W. & Medina, O.L. 2001. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la protección y conservación de la calidad de las aguas marinas y costeras. Tomo II. Informe Final. INVEMAR.
- Gmelin, J. F. 1791. *Isognomon alatus*. En: Caroli a Linné, Systema Naturae, ed. 13, 2. Leipzig G. E. Beer. 752 p.
- Greenwood, N.N. and Earnshaw, A. 1997. Chemistry of the Elements. Second edition. 1201-1226 p.
- Hanke, W., Hamdorf, K., Horn, E. und Schlieper, C. 1977. Praktikum der Zoophysiologie. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, P. 350 p.
- Hare, L. 1992. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation and toxicity. Critical Reviews in Toxicology (22): 327–369 p.
- Herreid, C. 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* (67A): 311-320 p.
- Hill, R.W, G.A. Wyse y M. Anderson. 2004. Animal physiology, 1st ed. Sinaues Associates. 770 p.
- Hill, R. 1976. Comparative Physiology of Animals. Edit. Harper and Row Publishers. 656 p.
- Hochachka, P.W. 1980. Living without oxygen. Edit. Harvard University Press, London, England. 181 p.
- Hochachka, P.W. 1986. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*. (231): 234-241 p.
- Hochachka, P. y Somero G. 1978. Strategies of Biochemical Adaptation. Edit. Cambridge University Press. 358 p.
- INVEMAR, 2004. Programa Nacional de investigación, evaluación, prevención, reducción y control de Fuentes Terrestres y Marinas de Contaminación Marina. En prensa.
- Ismail, A. 2006. The use of intertidal mollusks in the monitoring of heavy metals and organotin compounds in the west coast of Peninsular Malaysia. *Coastal and Marine Science* 30 (1): 401-406 p.

- Jobling, M. 1995. Environmental Biology of Fishes. Edit. Chapman and Hall, London. 1a. Edic. 455 p.
- Kennedy V.S. 1982. Estuarine Comparisons. Edit. Academic Press. New York, USA. 709 p.
- Klerks, P. L. y J. S. Weis. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environmental Pollution* (45): 173-205 p.
- Krogh, A. 1939. Osmotic regulation in Aquatic Animals. Cambridge University Press, London. 1-242 p.
- Lahlou, B. 1980. Epithelial transport in the lower vertebrates. Edit. Cambridge University Press. 1a. Edic. 366 p.
- Lampert, W. y Sommer, U. 1997. Limnoecology. Edit. Oxford University Press, EUA. 382 p.
- Larsson, A., B. Bengtsson y C. Haux. 1981. Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus* L. exposed to sub-lethal levels of cadmium. *Aquatic Toxicology*. (1): 19-35 p.
- Lemus, M; Marin, L; Aponte, Aulo y Chung, K. 2012. Metalotioninas, glutación y consumo de oxígeno en el bivalvo *Perna viridis* expuesto al cadmio. *Revista Científica, FCV-LUZ*. Vol XXII, N° 4, 376– 382 p.
- Livingstone, D.R., J. Widdows y P. Fieth. 1979. Aspects of nitrogen metabolism of the common mussel *Mytilus edulis*: Adaptation to abrupt and fluctuating changes in salinity. *Mar. Biol.* (53): 41- 55 p.
- Lodeiros, C., A.N. Maeda-Martínez., L. Freitas., E. Uribe., D. B. Lluch-Cota y M. T. Sicard. 2001. Ecofisiología de pectínidos americanos. Capítulo 4: 77-88 pp. En: A.N. Maeda-Martínez. (ed). 2001. Los moluscos pectínidos de Iberoamérica. Ciencia y Acuicultura. Editorial Limusa, México. 501 p.
- Maitland, P. 1990. Biology of fresh waters. Edit. Chapman and Hall, 2a.edic. 276 p.
- Mangum, C. P., S. U. Silverthorn, J. L. Harris, D. W. Towle, y A. R. Krall. 1976. The relationship between blood pH, ammonia excretion and adaptation to low salinity in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* (195): 129-136 p.
- Manjarrez, G., Castro I.A y Utria, L. 2008. Bioacumulación de cadmio en ostras de la bahía de Cartagena. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*.
- Mantel, L. y Farmer, L. 1983. The biology of crustacea, vol 5: Internal anatomy and physiological regulation ; Academic press, New York: 53 – 151 p.
- Matsushima, O., Katayama, H y Yamada, K., 1987. The capacity of intracellular osmoregulation mediated by free amino acids in three bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (109): 93-99 p.
- Mohan, C. V; Gupta, T.R.C; Shett y H. P.C. Menon, N. R. 1986. Combined toxicity of mercury and cadmium to the tropical green mussel *Perna viridis*. *Diseases of aquatic organisms. Dis. aquat. Org. Vol.*(2): 65-72 p.

Morillo, N y Belandria, J.C. 2006. Utilización de moluscos bivalvos para el tratamiento de efluentes en granjas camaroneras.

Navarro, J.M. 2001. Energetic physiology of Iberoamerican scallops. Los pectinidos de Iberoamerica: Ciencia y Acuicultura. Cap (3): 61 – 76 p.

Navarro, J. M. y González C. M. 1998. Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture* (167): 315-327 p.

Newell, R.C. 1976. Adaptation to environment: essays on the physiology of marine animals. Edit. Butterworths . 539 p.

Nybakken, J. 1997. Marine Ecology. Edit. Benjamin Cummings, 4a. edic. 481 p.

Pasquali, R. 2003. Química Ambiental. Primera edición, Akadia Editorial, Buenos Aires.

Phillips, D. J. H. y Rainbow, P. S. 199. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. London. Elsevier Applied Science.

Pressley, T. A., J. S. Graves, y A. R. Krall. 1981. Amiloride sensitive ammonium and sodium ion transportin the blue crab. *Am. J. Physiol.* (241): 370-378 p.

Prosser L. 1978. Comparative Animal Physiology. Edit. Saunders College Publishing, 3a.edic. 966 p.

Rainbow, P.S, 1987. Copperand zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia.*(73): 120-126 p.

Rainbow, P. S., Malik, I. and O'brien, P. 1994. Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolved zinc and cadmium by the decapod crustacean *Orchestiagam marellus*. *Aquat. Toxic.* (25): 15-30 p.

Rainbow, P. S. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine. Pollution. Bulletin.* 31 (4 -12): 183-192 p.

Rainbow, P. S. and Kwan, M. K. H. (In press). Physiological responses and the uptake of cadmium and zinc by the amphipod crustacean *Orchestiagam marellus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*

Rainbow, P.S. 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: Langston, W.J., Bebianno, M. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London. 285 – 319 p.

Randall, D., Burggren, W. and French, K. 1998. Fisiología Animal. Edit. Mc. Graw Hill-Interamericana. 4a. Edic. 795 p.

Reddy, N. A. and Menon, N. R. (1979). Effects of ammonia and ammonium on tolerance and byssogenesis in *Perna viridis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* (1): 315-321 p.

- Riley, J.P. 1953. "The spectrophotometric Determination of Amonia in Natural Waters with Particular Refference to Sea Water". *Anal. Chim. Acta*, Vol 9. 575-589 p.
- Riisgård, H.U, Larsen, PS. 2001. Comparative ecophysiology of active zoobenthic filter-feeding, essence of current knowledge. *J Sea Res* (44):169–193 p.
- Robertson, J. 1960. Osmotic and ionic regulation in the physiology of crustacea. Vol 1. Waterman, T. (edi). academic press.
- Roesijadi, G. 1986. Mercury-binding proteins from the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Health Perspectives* (65): 45-8 p.
- Román G., M. J. Campos., C. P. Acosta y J. Cano. 1999. Growth of the queen salope (*Aequipecten opercularis*) in suspended culture: Influence at density and depth. *Aquaculture*. (178): 43-62 p.
- Rosas, C., Vanegas, C., Alcaraz, G., y Díaz F. 1991. Effect of eyestalk ablation on oxygen consumption of *Callinectes similis* exposed to salinity changes. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A (1): 75-80 p.
- Sadiq, M. 1992. Heavy metals. In: Toxic metal chemistry in marine environments. Marcel Dekker, Inc., New York, 390 p.
- Saed, K., A. Ismail, H. Omar, y M. Kusnan. 2001. Accumulation of Heavy Metals (Zn, Cu, Pb, Cd) in Flat-Tree Oysters *Isognomon alatus* exposed to pig farm effluent. *Toxicological and Environmental Chemistry*. (82): 45-58 p.
- Saed, K., Ismail, A., H. Omar, and Kusnan, M. 2004. Heavy Metal Depuration in Flat Tree Oysters *Isognomon alatus* under field and laboratory conditions. *Toxicol. and Environ. Chem.* (86): 171-179 p.
- Salanki, J. (1965). Oxygen level as a specific regulator of the rhythmic activity of freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Acta. biol. Acad. Sci. Hung.* (15): 299-310 p.
- Salanki, J. (1968). Role of cerebral ganglia in the regulation of activity in freshwater mussel *Anodonta cygnea*. In: Salanlu, J. (ed.) *Neurobiology of invertebrates*. Akade 'miai Kiado', Budapest, 493-501 p.
- Schumway, S. 1991. Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. *Develoments in Aquaculture and Fisheries. Science*. Elsevier. New York. 1094 p.
- Schulte, E. H. 1975. Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Marine Biology* (30): 331-341 p.
- Silva, L. 1986. Efecto del tamaño corporal, tensión del oxígeno y temperatura sobre la tasa de consumo de oxígeno en la escalopa *Argopecten circularis* (sowerby) (Mollusca: Lamellibranchia). Tesis de Maestría. ITESM. Mexico. 93 p.
- Siung A, M. 1980. Studies on the biology of *Isognomon alatus* gmelin (Bivalvia: Isognomonidae) with notes on its potencial as a commercial species. *Bulletin Marine Science* 30 (1): 90 – 101 p.

Sokolova, I. M, A. H Ringwood and C, Johnson. 2005. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquat. Toxicol.* (74): 218-228 p.

Theede, H. y Schoslz, N. 1982. Anreicherung und schadwirkung von cadmium beimeerestieren naturw. rdsch . 35. (7): 286 – 292 p.

Thompson, R.J and Bayne, B.L., 1972. Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis*. (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* (9) 111-124 p.

USPHS (1990). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Agency for Toxic Substances and Disease, U.S. Public Health Service, 231 p.

Vernberg, J. F. 1983. Respiratory adaptations. En: BLISS, Dorothy E. The biology of crustacean: Internal anatomy and physiological regulation. New York : Academic press. Vol. 8. 1–43 p.

Walne, P. 1985. Cultivode moluscos bivalvos: 50 años de experiencia en Comway. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 200 p.

Winkler, L. 1988. The determination of dissolved oxygen in water. *Berlin. Deut. Chem. Ges.* (21): 28-43 p.

ANEXO A

Supuestos		Homocedasticidad			Normalidad				Linealidad y Aditividad							
Experi- mento	Efectos	F	P (α 0,05)	Interp.	K-S d	p (α 0,05)	p Lilliefors (α 0,05)	Residuos	Gráfica Q-Q (x=cuantiles teóricos; y= valores obs.)	Interp.	Cadmio	Sal_ini (Cadmio)	Sal_fin (Sal_ini *Cadmio)			
Excreción Amonio	Cadmio	59,052	0,0000	No Homcd	0,3771	< 0,01	< 0,01	5,211 E-15 +7,480*X		No normal		SIN CON	SIN CON	SIN CON	SIN CON	SIN CON
	Sal_ini (Cadmio)	32,331	0,0000	No Homcd												
	Sal_fin (Sal_ini *Cadmio)	13,042	0,0000	No Homcd												
	Tiempo(Sal_fin *Sal_ini *Cadmio)	4,411	0,0000	Homcd												
Consumo Oxígeno	Cadmio	80,7739	0,0000	No Homcd	0,0956	< 0,01	< 0,01	2,1703 E-15 +2,1976*X		No normal		SIN CON	SIN CON	SIN CON	SIN CON	SIN CON
	Sal_ini (Cadmio)	18,7020	0,0000	Homcd												
	Sal_fin (Sal_ini *Cadmio)	4,5633	0,0000	Homcd												
	Tiempo(Sal_fin *Sal_ini *Cadmio)	3,8389	0,0000	Homcd												
Tasa de Filtración	Cadmio	108,7005	0,0000	No Homcd	0,2214	< 0,01	< 0,01	1,0673 E-14 +1,1837*X		No normal		SIN CON	SIN CON	SIN CON	SIN CON	SIN CON
	Sal_ini (Cadmio)	74,3906	0,0000	Homcd												
	Sal_fin (Sal_ini *Cadmio)	29,5321	0,0000	Homcd												
	Tiempo(Sal_fin *Sal_ini *Cadmio)	7,7850	0,0000	Homcd												