

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA MARINA

COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Cd ENTRE EL TEJIDO BLANDO Y  
LA CONCHA DE *Mytilus californianus* EN UNA ZONA DE SURGENCIAS

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS presenta:

LUIS ENRIQUE RIVERO

Ensenada, Baja California, México. Octubre de 1999.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA MARINA

COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Cd ENTRE EL TEJIDO BLANDO Y  
LA CONCHA DE *Mytilus californianus* EN UNA ZONA DE SURGENCIAS

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS presenta:

LUIS ENRIQUE RIVERO

Ensenada, Baja California, México. Octubre de 1999.

RESUMEN de la Tesis de Luis Enrique Rivero presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Octubre de 1999.

## COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Cd ENTRE EL TEJIDO BLANDO Y LA CONCHA DE *Mytilus californianus* EN UNA ZONA DE SURGENCIAS

Resumen aprobado por:

---

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes

El tejido blando de *Mytilus californianus* tiene la capacidad de disminuir rápidamente (días) su concentración de Cd (Lares y Orians, 1997). Por lo tanto, surge la necesidad de buscar otra estructura en *M. californianus* que represente la acumulación de Cd en un período de tiempo más largo (meses) y así tener otro panorama de los niveles de este metal en la zona que se quiera monitorear. En este trabajo se propuso a la concha como una alternativa para estudios a mediano plazo, por lo que se comparó la variabilidad diaria de la concentración de cadmio (Cd) en el tejido blando con la de la capa aragonítica de la concha de *M. californianus* en un período de 26 días en una zona de surgencias. Se desarrolló una metodología para separar una sección de la capa aragonítica que representara al material recientemente depositado (CaCO<sub>3</sub> y metales). Esta zona aislada de la cocha presentó una menor variabilidad entre días que el tejido blando, sin diferencias significativas en 25 de los 26 días. La concentración de Cd se mantuvo constante excepto un día (31 julio), en el cual existió un incremento significativo en la concentración de Cd en comparación con el resto de los días. Los organismos de este día se caracterizaron por tener un índice de condición alto (buen estado fisiológico), la proporción ancho:alto más baja (razón de crecimiento más rápida), las conchas menos erosionadas, además de ser los organismos más jóvenes de acuerdo al método del grosor de la concha (Griffin *et al.*, 1980). Con base en los análisis estadísticos realizados (Correlaciones de Pearson y Análisis de Componentes Principales) se piensa que las conchas de los mejillones del 31 de julio presentaron concentraciones elevadas de Cd debido a un efecto de edad (metabolismo), aunado a que se encontraban en condiciones ambientales más favorables. El tejido blando fue más sensible que la capa aragonítica a los cambios en la concentración de Cd en el agua de mar, lo cual lo hace una buena alternativa como indicador de la concentración de Cd a corto plazo (días), mientras que la capa aragonítica posiblemente sea un mejor indicador ambiental del Cd a mediano plazo (meses). En este estudio se encontró que las medidas de la concha como el ancho, peso, erosión y las proporciones alométricas peso:longitud y ancho:alto fueron mejores indicadores de la edad del organismo que la longitud de la concha. Se recomienda utilizar mejillones cultivados de una misma cohorte y transplantarlos a la zona que se quiera monitorear, disminuyendo de esta manera la variabilidad en las concentraciones de Cd debido a diferencias de edad y condiciones ambientales distintas.

**Palabras clave:** Cd en mejillones; Cd en la Concha; *M. californianus*.

ABSTRACT of the Thesis of Luis Enrique Rivero, presented as partial requirement to obtain the MASTER IN SCIENCES grade in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México. October 1999.

COMPARISON OF THE Cd CONCENTRATION BETWEEN THE SOFT TISSUE AND  
THE SHELL OF *Mytilus californianus* IN AN UPWELLING ZONE

ABSTRACT

The soft tissue of *Mytilus californianus* has the capacity to rapidly decrease (days) its Cd concentration (Lares and Orians, 1997). There is the necessity to search for another structure in *M. californianus* that will represent the Cd accumulation during a longer period of time (months) and therefore, have a different picture of the metal level in the zone aimed to be monitored. In this study, we have proposed the shell as an alternative for medium term studies. Therefore, the daily variability of cadmium (Cd) concentration in mussel tissue was compared with the aragonite layer in the shell of *M. californianus* in a period of 26 days in an upwelling zone. A method was developed to separate a section of the aragonite layer that would represent the material recently deposited (CaCO<sub>3</sub> and metals). This separated section of the shell showed a lower variability between days, without significant differences in 25 of the 26 days. The Cd concentration was constant except one day (July 31), in which there was a significant increment in the concentration of Cd in comparison with the rest of the days. The organisms of this day were characterized by having a high condition index (good physiological state), the lowest width: height proportion (the fastest growing rate), the least eroded shells additionally with being the youngest organisms in agreement with the shell width method (Griffin *et al.*, 1980). In regard with the statistical analysis used (Pearson correlation and Principal Component Analysis) it is believed that the shells of the mussels of July 31 had a higher concentration of Cd due to an age effect (metabolism), and that in addition were localized in a more favorable environment. The soft tissue was more sensitive than the aragonite layer to the Cd concentration variations in seawater, that makes it a good alternative as a indicator of Cd concentration in a short term, the aragonite layer possibly is a better environmental indicator of Cd in a medium term (months). In this study, it was found that shell measurements like width, weight, erosion and the allometric proportions weight:length and width:height were associated in a higher degree with the age of the organism than the shell length. For monitoring purposes, it is recommended to use cultured mussels of the same age group and to transplant them to the zone of interest, decreasing in this form the variability of the Cd concentrations due to differences in age and environmental conditions.

**Keywords:** Cd in mussels; Cd in shells; *M. californianus*.

## **DEDICATORIA**

### **A mi madre :**

Gracias por apoyarme en la realización de todas mis metas, por tus buenos consejos y por todo el amor que me has dado.

### **A Vicente, Jesús y Carmen:**

Gracias por su cariño, apoyo y buen ejemplo.

### **A Gaby:**

Gracias por los detalles que has tenido conmigo y por todos los momentos especiales que hemos compartido.

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco especialmente a la Dra. Lucila Lares por todo el apoyo y conocimiento que me proporcionó durante la elaboración de este trabajo.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Jorge Cáceres, Dra. Bertha Lavaniegos y el Dr. Miguel Angel Huerta por sus críticas constructivas que permitieron que este trabajo fuera mejor.

A todas las personas que con muy buena disposición me apoyaron en la realización de este trabajo: Arturo Siqueiros, Ignacio Rivera, Sergio Ramos, Dra. Silvia Ibarra, Miriam Poumian, Ignacio Romero, Vicente Ferreira y Ivonne Best.

A mis amigos y compañeros, por los buenos ratos: Fernando, Elsa, Sarita, Leonardo, Oscar , Lulú, Rosi, Jesús, Adriana, Magi, Adán, Letty, Ricardo, Jaime y el Mare.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

## CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 OBJETIVOS	6
I.2 ANTECEDENTES	7
I.2.1 Cadmio	7
I.2.2 Surgencias	10
I.2.3 Indicadores biológicos	10
I.2.4 Formación y estructura de la concha	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS	16
II.1 Muestreo	16
II.2 Laboratorio	16
II.2.1 Estimación de la edad de los mejillones	18
II.2.2 Limpieza del material	18
II.2.3 Reactivos utilizados	19
II.2.4 Eliminación del periostraco	19
II.2.5 Separación de la zona de interés del resto de la concha	20
II.2.6 Digestión del material	22
II.2.7 Control de calidad	22
II.2.8 Instrumentación	23
II.3 Análisis de datos	23
III. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN DE LAS CAPAS Y DIGESTIÓN DE LA CONCHA DE <i>M. californianus</i>	26
III.1 Introducción	26
III.2 Pruebas realizadas	28
III.3 Resultados	30

## CONTENIDO (Continuación)

	<b>Página</b>
III.4 Discusión	39
IV. RESULTADOS	42
IV.1 Variación de la concentración de Cd en el tejido blando y capa aragonítica	42
IV.2 Características biométricas y alométricas de <i>M. californianus</i>	45
IV.3 Matriz de correlación de Pearson	48
IV.4 Análisis de Componentes Principales	53
IV.5 Factor de enriquecimiento de Cd en el tejido blando y la capa aragonítica con respecto al agua de mar	55
IV.6 Estimación de la edad de los mejillones recolectados	55
IV.7 Correlación entre la edad y las diferentes variables medidas en la concha	57
V. DISCUSIÓN	59
VI. CONCLUSIONES	69
LITERATURA CITADA	70
ANEXOS	76



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Variabilidad temporal de las concentraciones de Cd en <i>M. californianus</i> (tejido blando) de Baja California (México) en una zona de surgencias. Las barras verticales representan $\pm 1$ error estándar y cada punto es la media de 3 réplicas de 15 mejillones (Tomado de Lares, 1988).	2
2.	Sistema de mineralización de un molusco (redibujado de Wilbur y Saleuddin, 1983).	13
3.	Sección radial del borde del manto de un bivalvo para mostrar la relación entre la concha y el manto (no está a escala). EPS, espacio extrapaleal; IE, epitelio interno; IF, pliegue interno; LPM, músculo paleal longitudinal; MC, célula mucosa; MF, pliegue medio; NC, capa aragonítica; OE, epitelio externo; OF, pliegue externo; P, periostraco; PG, lengüeta del periostraco; PL, línea paleal; PM, músculo paleal; PN, nervio paleal; PR, capa prismática de la concha (tomado de Wilbur y Saleuddin, 1983).	15
4.	Localización de la estación de muestreo en Amphitrite Point (Isla de Vancouver), Columbia Británica, Canadá.	17
5.	Cara interna de la valva de <i>M. californianus</i> . 1) Capa calcítica. 2) banda de la capa aragonítica que fue aislada. 3) músculo abductor. 4) región del umbo.	21

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
6.	Concha de <i>M. californianus</i> recolectada en Amphitrite Point, en la costa oeste de la isla de Vancouver, Canadá. La parte oscura de la cara externa de la concha representa el periostraco.	27
7.	Secciones de la concha: 1) Periostraco, 2) capa calcítica, 3) capa calcítica de formación reciente, 4) capa aragonítica, 5) lámina de la capa aragonítica formada recientemente (zona raspada por Bourgoïn, 1990), 6) sección de la capa aragonítica de <i>M. californianus</i> aislada en este estudio (zona oscura).	29
8.	Concha de <i>M. californianus</i> procesada en la mufla a 350 °C durante 1 hora. La parte oscura de la concha representa la parte del periostraco que queda después del tratamiento.	33
9.	Concha de <i>M. californianus</i> procesada en la mufla a 400 °C durante 18 horas. Prueba propuesta por Bourgoïn (1988) para la concha de <i>M. edulis</i> .	34
10.	Concha de <i>M. californianus</i> en la cual se ha eliminado el periostraco utilizando peróxido de hidrógeno al 30 % con una temperatura de 80 a 85 °C durante 10 a 15 minutos.	36
11.	Concha de <i>M. californianus</i> en la cual se ha eliminado el periostraco utilizando peróxido de hidrógeno al 30 % con una temperatura de 80 a 85 °C durante 10 a 15 minutos y que posteriormente ha recibido un tratamiento con calor a 350 °C durante 1 hora.	37

Figura	LISTA DE FIGURAS (Continuación)	Página
12.	Variabilidad temporal de las concentraciones de Cd en <i>M. californianus</i> (tejido blando) colectado en Amphitrite Point, Canadá (1991). Las barras verticales representan $\pm 1$ error estándar de un promedio de 3 réplicas de 10 mejillones cada una. Datos tomados de Lares (1997).	43
13.	Variabilidad temporal de las concentraciones de Cd en la capa aragonítica de <i>M. californianus</i> en Amphitrite Point, Canadá (1991). Las barras verticales representan $\pm 1$ error estándar de un promedio de 3 réplicas de 10 mejillones cada una.	44
14.	Relación entre la concentración de Cd en la capa aragonítica de <i>M. californianus</i> y la proporción ancho:altura de la concha (n=78).	50
15.	Relación entre la concentración de Cd en la capa aragonítica de <i>M. californianus</i> y la proporción peso:longitud de la concha (n=78).	51
16.	Relación entre la concentración de Cd en el tejido blando de <i>M. californianus</i> y la proporción ancho:altura de la concha (n=78).	52

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Desventajas que cada tratamiento presentó en la separación de la zona de interés por medio de calor, en la concha de <i>M. californianus</i> . Una X significa que el tratamiento tuvo esa limitante. La prueba propuesta por Bourgoin (1988) está marcada con asteriscos. La técnica escogida en este estudio está resaltada en negritas.	32
II.	Eliminación del periostraco utilizando peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes condiciones de experimentación. La prueba escogida presenta un asterisco.	35
III.	Digestión de la capa aragonítica utilizando diferentes reactivos a distintas condiciones de experimentación. La prueba escogida se presenta en negritas.	38
IV.	Correlación de Pearson entre la concentración de Cd en el tejido y la capa aragonítica de <i>M. californianus</i> . La serie de datos de Cd en la capa aragonítica fue desfasada de 1 a 7 días con respecto al Cd en el tejido blando.	46
V.	Características biométricas y alométricas más importantes del mejillón <i>M. californianus</i> (media ± desviación estándar). Los números en negritas representan los valores máximos y mínimos.	47
VI.	Matriz de correlación de Pearson entre las variables del estudio (n=78). Las variables 1, 2, 3 y 4 representan mediciones hechas en la concha para cada día. * Correlación significativa a P=0.05, ** significativa a P = 0.01, *** significativa a P=0.001.	49

## LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla		Página
VII.	Análisis de componentes principales. Las proporciones son medidas tomadas en la concha. * Cargas usadas en la interpretación.	54
VIII.	Factor de enriquecimiento de Cd en la capa aragonítica y tejido blando con respecto al agua de mar. Los valores con asteriscos fueron tomados del estudio realizado por Lares (1997).	56
IX.	Estimación de la edad de los organismos (n=125) de acuerdo al método del grosor de la concha (Griffin <i>et al.</i> , 1980).	56
X.	Correlación de Pearson (n=125). Relación entre la edad del mejillón y las diferentes mediciones de la concha. * Correlación significativa a $P=0.001$ .	58

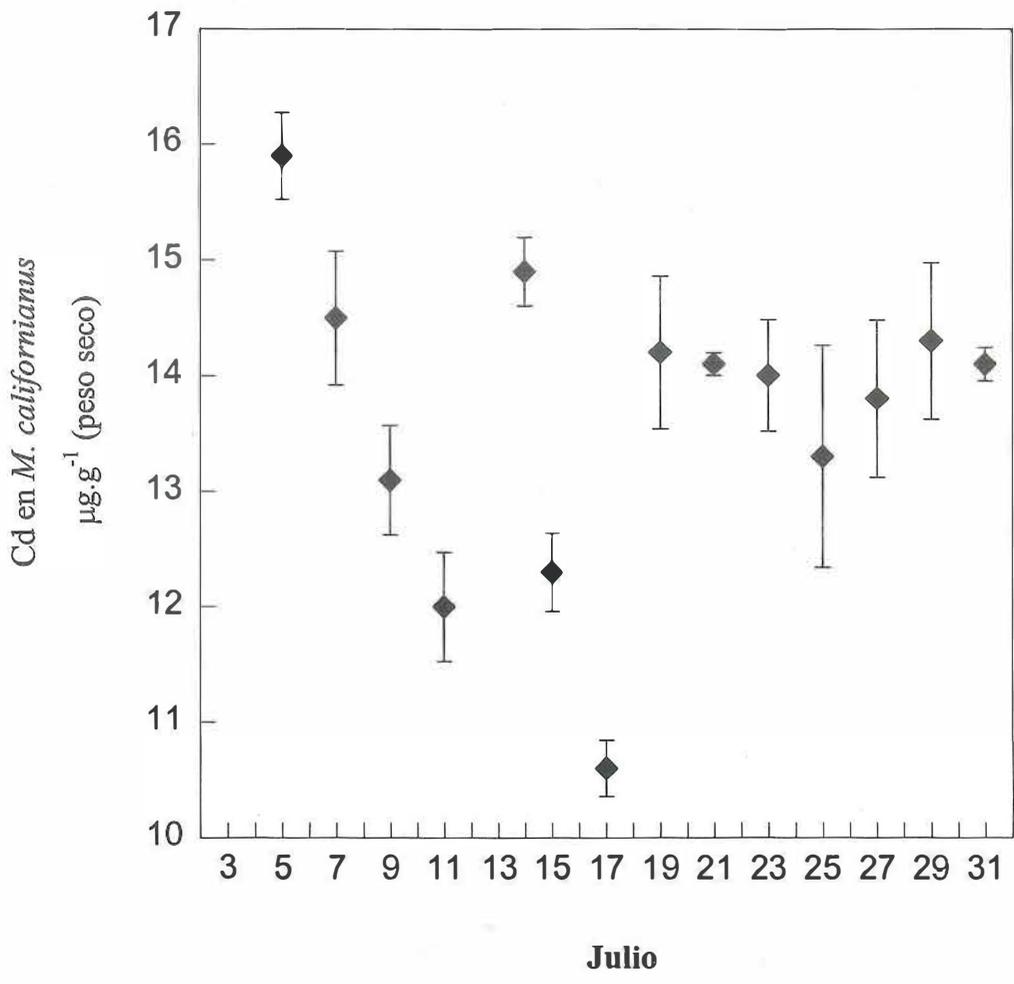
# COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Cd ENTRE EL TEJIDO BLANDO Y LA CONCHA DE *Mytilus californianus* EN UNA ZONA DE SURGENCIAS

## I. INTRODUCCIÓN

Los programas de monitoreo de contaminación que han utilizado al mejillón como indicador de la concentración de cadmio (Cd) en el ambiente, han trabajado bajo el supuesto de que este metal se acumula en el tejido blando y que posteriormente puede ser medido, representando un valor integrado del orden de meses. Estos programas (e.g. Mussel Watch Program y Status and Trends) han realizado sus monitoreos con una frecuencia mensual, estacional y anual (Lauenstein *et al.*, 1990). No se han hecho distinciones entre los procesos de incorporación de Cd en las diferentes especies del género *Mytilus*; en particular *Mytilus edulis* y *Mytilus californianus* se han considerado como equivalentes en cuanto a su cinética de asimilación y eliminación de metales (NAS, 1980).

En un estudio realizado por Lares (1988) en Bahía San Quintín, Baja California, se encontró que las concentraciones de Cd en el tejido blando de *M. californianus* podían variar hasta un 30 % dentro de un período de 3 días en condiciones de surgencias (Fig. 1), siendo el primer estudio de campo que se realizara tomando muestras a corto plazo. Lares y Orians (1997) reportaron también una variabilidad alta en las concentraciones de Cd en el tejido blando de *M. californianus* en la costa oeste de la isla de Vancouver, Canadá, donde ocurren surgencias importantes, con diferencias significativas de un día a otro. Estos autores mencionan que para los sistemas de surgencias, el tejido blando del mejillón *M. californianus* refleja proporcionalmente la variabilidad a corto plazo en la concentración de Cd en el agua de mar.

Varios investigadores han demostrado que el Cd se acumula en el tejido blando de *M. edulis* en forma lineal con respecto al tiempo (Scholz, 1980; Ritz *et al.*, 1982;



**Figura 1.** Variabilidad temporal de las concentraciones de Cd en *M. californianus* (tejido blando) de Baja California (México) en una zona de surgencias. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar y cada punto es la media de 3 réplicas de 15 mejillones (Tomado de Lares, 1988).

Riisgard *et al.*, 1987). La eliminación de Cd en *M. edulis* es muy lenta y se ha estimado su vida media entre 14 y 1200 días (Cossa, 1989). Lares (1995), observó en experimentos realizados en laboratorio que *M. trossulus* (antes considerado *M. edulis*) y *M. californianus* no se comportaban en forma similar en cuanto a la retención de Cd en el tejido blando, ya que *M. californianus* liberaba rápidamente este metal a diferencia de *M. trossulus* que lo acumulaba.

Se sabe que *M. californianus* tiene la capacidad de liberar rápidamente el Cd en el tejido blando (Lares, 1988; Lares, 1995; Lares y Orians, 1997) y que dicha estructura solo sirve como indicador de lo que hay biodisponible a corto plazo. Por lo tanto surge la necesidad de buscar otra estructura de monitoreo en *M. californianus* que represente la acumulación de Cd en un período de tiempo más largo. En este trabajo se propone que tal estructura sea la concha. Hasta el presente, los estudios de detección de metales en la concha de *M. californianus* son escasos (Chow *et al.*, 1976; Koide *et al.*, 1982), ya que la mayoría de las investigaciones se han realizado en *M. edulis*.

La incorporación activa de metales a la concha de *M. edulis* ha sido demostrada en el laboratorio (Sturesson, 1976) y en experimentos de campo (Bertine y Goldberg, 1972). Sturesson (1978) estudió las concentraciones de Cd en las tres capas de la concha de *M. edulis* (periostraco, capa calcítica y capa aragonítica) encontrando durante el tiempo que duró el experimento (52 días) una acumulación del metal en las estructuras de la concha. Este investigador demostró que había una proporcionalidad entre los niveles en el agua de mar y la concha. Bajo condiciones experimentales, el factor de concentración en la aragonita fue alrededor de 100 con respecto al agua de mar.

Los primeros estudios en la concha de *M. edulis* y *M. californianus* se realizaron utilizando toda la concha y se obtuvieron correlaciones muy bajas entre ésta y el tejido (Chow *et al.*, 1976; Koide *et al.*, 1982). Bourgoin (1990), basándose en los

resultados obtenidos en los estudios de Sturesson (1976, 1978), propuso usar únicamente la capa aragonítica, descartando el periostraco (parte más externa) y la capa calcítica (parte intermedia) para el análisis de las concentraciones de metales. La razón para descartar estas estructuras se fundamenta en que hay una absorción pasiva de metales en el periostraco y posiblemente en la capa calcítica en caso de erosionarse la primera, enmascarando de esta forma lo que realmente se ha incorporado en la concha debido al metabolismo del organismo. No sólo es importante separar las capas de la concha para evitar problemas de variabilidad en la concentración del metal, sino que también es esencial escoger la sección adecuada de la capa aragonítica que represente el período de tiempo que se quiere monitorear. Bourgoïn (1990) encontró en un estudio realizado en *M. edulis* una correlación alta entre los niveles de Pb en la capa aragonítica más reciente y el tejido blando ( $r=0.95$ ). Schettler y Pearce (1996) mencionan que la desventaja de usar datos obtenidos de la digestión de la concha completa es que se pierde el registro temporal. Babukutty y Chacko (1992) sugieren separar las diferentes secciones de las capas ya que éstas pueden proveer de información más valiosa en cuanto a los incrementos que ocurren en los diferentes períodos de tiempo. En este estudio se utilizará la sección depositada recientemente en la capa aragonítica de la concha de *M. californianus* para monitorear el Cd que ha sido acumulado a corto plazo.

Se ha observado que algunas de las ventajas de utilizar la concha como una alternativa al tejido blando es que su manejo y almacenamiento es más fácil y menos costoso (Bourgoïn, 1990). En ocasiones en el trabajo de campo no es posible preservar el tejido blando por lo que la concha es una buena alternativa, aunado a que puede estar almacenada largos períodos de tiempo sin que sufra alteración alguna (Sturesson, 1978; Al-Aasm *et al.*, 1998).

Otra de las ventajas de utilizar la concha de *M. edulis* es que muestra una variabilidad inherente menor que el tejido permitiendo inferencias estadísticas más precisas (Bourgoïn, 1990). Se sabe que las concentraciones de metales en los tejidos de

los mejillones no solamente están relacionados con las variaciones de las concentraciones de los metales en el ambiente, sino que existen otras fuentes de variación que incluyen la edad, tamaño, razón de crecimiento, variación estacional, condición reproductiva, sexo, salinidad, temperatura, posición en la zona de entremareas y la interacción con otros contaminantes en el ambiente (Phillips, 1980). Aún teniendo cuidado de minimizar todos estos factores, persiste la variabilidad en los datos (Lares, 1995). De acuerdo a Borchardt (1983, 1985) la acumulación de Cd en la concha parece estar libre de los efectos en los cambios metabólicos, quizás como resultado de la absorción sin excreción. La variabilidad que se ha observado en la concentración de metales en la concha se atribuye principalmente a que se incluye el periostraco en el análisis y a un pobre tratamiento y limpieza antes de la digestión (Bourgoin, 1990; Babukutty y Chacko, 1992).

Las conchas de *M. edulis* dan otro panorama de lo que está ocurriendo en el medio ambiente, ya que integran la concentración del metal durante un período más largo que el tejido e inclusive quedan preservadas estas concentraciones después de la muerte del organismo (Sturesson, 1978). Con base en lo que se conoce en *M. edulis* se espera que la concha de *M. californianus* retenga el Cd en los cristales de aragonita y en la matriz orgánica durante más tiempo que su respectivo tejido, con lo que se espera una disminución en la variabilidad entre días permitiendo un monitoreo a un plazo más largo.

## **I.1 OBJETIVOS**

### **Principal**

Comparar la variación temporal a corto plazo (días) en las concentraciones de Cd en la capa aragonítica depositada recientemente y en el tejido blando de *Mytilus californianus* en una zona de surgencias.

### **Secundario**

Desarrollar una metodología para aislar la zona de interés de la capa aragonítica en la concha de *Mytilus californianus*.

## I.2 ANTECEDENTES

### I.2.1 Cadmio

#### Distribución

El Cd es un elemento reciclado con una distribución en el océano altamente correlacionada con los nutrientes, en particular con el fosfato. Este metal exhibe una distribución típica de nutriente, en la cual los niveles cerca de la superficie son bajos ( $\approx 0.005$  ppb; Bruland *et al.*, 1978) y en aguas profundas está enriquecida, alcanzando sus niveles máximos ( $\approx 0.120$  ppb) alrededor de los 1000 m de profundidad.

El Cd se encuentra en el mar predominantemente como  $\text{CdCl}_2^0$  y  $\text{CdCl}_3^+$ . Estos clorocomplejos tienden a permanecer en solución, razón por la cual la mayoría del Cd detectado en el agua de mar está disuelto en lugar de estar asociado al material particulado (Eaton, 1976).

#### Fuentes y usos

Cantidades significativas de Cd son descargadas al medio ambiente debido a fuentes antropogénicas tales como la extracción del Zn (al cual se encuentra asociado) de las minas y su fundición, descargas de aguas residuales por parte de industrias, incineración de desperdicios, etc.

Existen también flujos naturales al medio ambiente representados principalmente por las erupciones volcánicas. Esto se explica por la presencia de este metal en la roca volcánica y por su relativa volatilidad debido a lo cual es liberado en forma gaseosa a la atmósfera. Otras fuentes naturales son la exudación de las plantas, el polvo levantado por el viento y los incendios forestales.

Tanto las fuentes naturales como las antropogénicas contribuyen a introducir grandes cantidades de Cd al océano, ya que se estima que por fuentes naturales y antropogénicas se introducen 5540 y 3700 toneladas de Cd al año, respectivamente (Laws, 1993). No hay depósitos de Cd lo suficientemente ricos para justificar su extracción, por lo tanto es obtenido como un subproducto de la minería de otros metales, principalmente del Zn, ya que ambos metales tienen procesos geoquímicos semejantes (Manahan, 1990).

Los usos principales que se le dan al Cd son: en la producción de baterías de Ni-Cd, en los procesos de galvanización, como pigmentos (plástico, textiles, hule, vidrio, pinturas, etc.), en estabilizadores de plástico, aleaciones y en usos diversos como pesticidas, fertilizantes fosfatados, combustibles fósiles, pantallas de rayos x, celdas solares, cubiertas de llantas, etc.

### **Toxicidad**

El Cd no es un elemento esencial para el ser humano, ni siquiera en pequeñas cantidades, más bien se le considera como uno de los metales más tóxicos junto con el Hg y el Pb (Wittman, 1981). Aunque todos los órganos del ser humano absorben Cd, las concentraciones más altas se encuentran en el hígado y los riñones. Una de las mayores preocupaciones relacionadas con este metal es que el Cd ingerido tiene una vida media de 16 a 33 años en el cuerpo humano. La ingestión de pequeñas cantidades durante un largo período puede llevar a la acumulación de niveles tóxicos de Cd en el cuerpo. En Estados Unidos una persona ingiere en promedio  $30 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$  en la comida,  $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$  en el agua y  $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$  en el aire que respira (Laws, 1993).

El daño al riñón ocurre cuando la cantidad de Cd sobrepasa la habilidad de este órgano para formar complejos de metalotioninas. Se cree que una gran parte de la actividad fisiológica del Cd se debe a su similitud con el Zn. Específicamente, se piensa que el Cd reemplaza al Zn en algunas enzimas, alterando la estructura de la enzima y deteniendo su actividad catalítica (Manahan, 1990). Otros daños que produce en el ser humano son: incremento en la presión arterial, destrucción del tejido testicular y de glóbulos rojos (Manahan, 1990). Los casos extremos de intoxicación por Cd están asociados con osteomalacia (ablandamiento de los huesos) y osteoporosis.

El caso más grave de contaminación por Cd reportado hasta el presente fue el que ocurrió en Japón en los años 50's, en la cuenca del río Jintsu cerca de la ciudad de Toyama, en donde una compañía minera y fundidora de Zn, Pb y Cd descargaba sus aguas residuales. El Cd fue ingerido del agua y del arroz irrigado por el río contaminado. Las personas de esta localidad consumieron concentraciones elevadas de Cd (en promedio 600  $\mu\text{g}$  por día antes de 1955) durante varios años (Yamagata y Shigematsu, 1970), lo cual les provocó una enfermedad degenerativa de los huesos llamada itai-itai, por la cual se estima que murieron 100 personas hacia el final de 1965 (Wittmann, 1981).

El nivel máximo permitido por la Organización Mundial de la Salud (WHO) para mejillones destinados al consumo humano es de 2  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso húmedo o 11  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso seco (Phillips, 1983). El límite permitido de Cd en agua potable según la Agencia de Protección Ambiental (EPA) es de 10 ppb (Laws, 1993).

### **I.2.2 Surgencias**

Las surgencias son un mecanismo de transporte de nutrientes y de metales como el Cd a la superficie. El aporte de Cd por surgencias puede incrementar la concentración de este metal en la superficie hasta en un orden de magnitud con respecto a las concentraciones que se detectan normalmente cuando no se presentan estos eventos (Bruland *et al.*, 1978). La ventaja que tiene el escoger una zona en que se presentan eventos de surgencia para un estudio de monitoreo de Cd en organismos, es que se puede hacer una comparación entre los incrementos y decrementos en la concentración de este metal en el agua de mar con respecto a la cinética de asimilación y eliminación del Cd en los organismos y de esta forma detectar si es que existe una proporcionalidad.

### **I.2.3 Indicadores biológicos**

Los mejillones que viven en el fondo de lagos, ríos y mares se alimentan filtrando grandes volúmenes de agua, por lo que pueden concentrar y retener en sus partes blandas y duras un registro químico del ambiente acuático en donde viven. Se sabe que los mejillones responden a los aportes de Cd de las aguas superficiales que los rodean con un incremento correspondiente de Cd en sus tejidos (Ouellette, 1981) y conchas (Sturesson, 1976). Por esta razón estos bivalvos son comúnmente usados como organismos indicadores de contaminación.

Pitts y Wallace (1994) mencionan que el monitoreo directo de la calidad del agua es difícil por varias razones:

- 1) Las concentraciones de los contaminantes en el agua de mar son generalmente tan bajas que la preconcentración química es necesaria antes del análisis.
- 2) Se requieren cuidados especiales tanto en la colección de la muestra como en su manejo.
- 3) Se requiere de muestreos frecuentes (aumentando el costo del monitoreo) debido a la variabilidad inherente en las concentraciones de contaminantes en el agua de mar

debido a las variaciones temporales y espaciales en las fuentes o en los procesos de remoción.

La ventaja de analizar el tejido o concha del mejillón es que los moluscos son concentradores naturales de metales, lo que simplifica el procedimiento de muestreo, almacenamiento y técnica analítica utilizada. Aunque se obtuvieran valores muy exactos del contenido del metal en el agua de mar, sería difícil determinar la biodisponibilidad del metal, ya que hasta el momento no se sabe qué complejos son preferentemente asimilados por los mejillones (Sturesson, 1978).

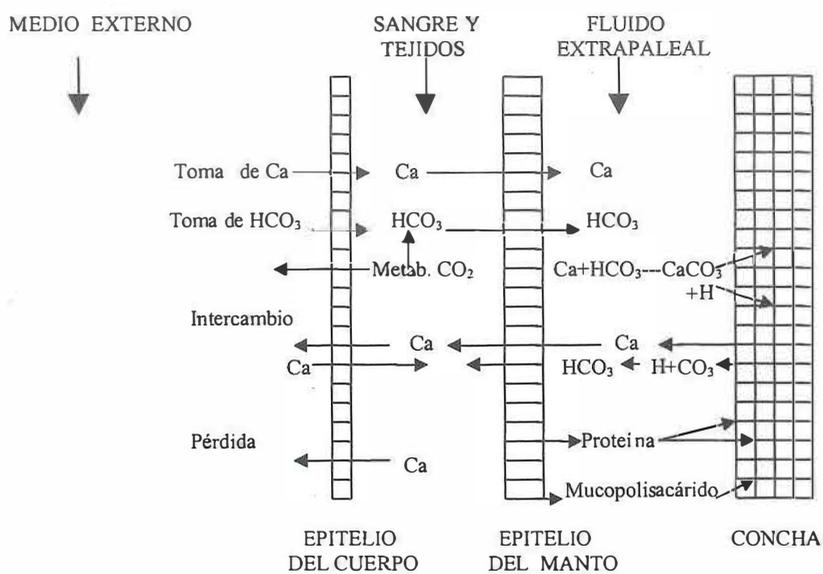
De acuerdo a Cossa (1989) y Al-Aasm *et al.* (1998) el género *Mytilus* cumple con los siguientes requisitos para ser un buen indicador de contaminación:

- 1) Tiene un período de vida relativamente largo.
- 2) Es sedentario y por lo tanto es un representante auténtico del área de estudio.
- 3) Es fácil de coleccionar y manejar.
- 4) Está distribuido ampliamente.
- 5) Es capaz de soportar una concentración alta de metales sin sufrir mortalidad.
- 6) Se encuentra disponible todo el año.
- 7) Puede ser transplantado.
- 8) Con relación a su ambiente, acumula metales con un factor de concentración de  $10^3$  a  $10^5$ . Es decir, bioacumula lo suficiente para permitir la medición directa, evitando de esta manera la preconcentración.
- 9) Es utilizado para el consumo humano y por lo tanto, es una fuente potencial de daños a la salud en caso de estar contaminado.

## I.2.4 Formación y estructura de la concha

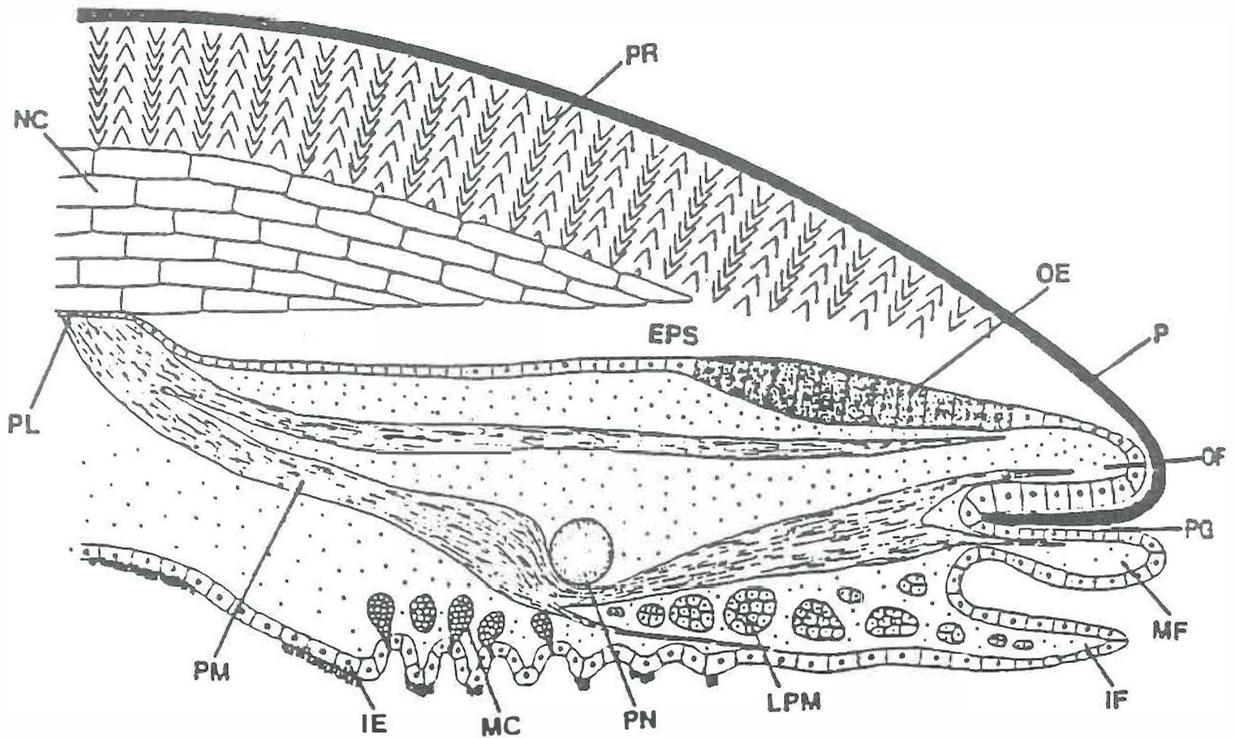
El manto es un órgano situado dentro de la superficie interna de la concha el cual es directamente responsable de la depositación de los cristales de carbonato de calcio y de la secreción de la matriz orgánica de la concha. La secreción de los diferentes componentes de la concha (periostraco, capa calcítica y capa aragonítica) está determinada por diferentes regiones del epitelio del manto (Wilbur y Saleuddin, 1983). La secreción de la concha ocurre dentro del espacio extrapaleal en el cual el epitelio del manto secreta el fluido extrapaleal. Además de contener todos los componentes de la biomineralización (Ca,  $\text{HCO}_3^-$ , moléculas orgánicas), el fluido extrapaleal puede contener metales pesados. El sistema de formación de la concha comprende cuatro compartimientos: 1) el medio externo 2) la hemolinfa y los tejidos del cuerpo 3) el fluido extrapaleal 4) la concha (Fig. 2).

La concha de un bivalvo es un sistema orgánico/inorgánico consistente de 2 valvas calcificadas, cubiertas por una capa orgánica externa llamada periostraco y de dos o más componentes estructurales compuestos de cristales de carbonato de calcio y de una pequeña cantidad ( $\approx 3\%$ ) de matriz orgánica (Wilbur y Saleuddin, 1983). La concha de *M. californianus* consiste de 4 capas principales: periostraco, capa calcítica o prismática externa, la capa aragonítica o nacarosa y la capa prismática interna. Existe comúnmente un contacto interdigital entre la capa aragonítica y la capa prismática interna. Esta capa calcítica es microestructuralmente similar a la capa prismática externa, la cual consiste de cristales poligonales alargados, acomodados en agregados en forma de conos. La capa prismática interna es secretada del lado del umbo y decrece de grosor posteriormente. El grado de desarrollo de esta capa está altamente correlacionado con la temperatura (Dodd, 1964).



**Figura 2.** Sistema de mineralización de un molusco (Redibujado de Wilbur y Saleuddin, 1983).

La capa aragonítica consiste de cristales de aragonita en forma de tabletas acomodadas en delgadas hojas paralelas (láminas). Estos cristales están generalmente orientados paralelamente a la superficie de la concha, tienen una longitud de 2 a 10  $\mu\text{m}$  y un grosor de 0.4 a 3  $\mu\text{m}$ , los cristales están acomodados en láminas. Estas láminas están separadas por hojas compuestas de una matriz orgánica (básicamente proteína) llamada *conquiolina*, de menos de 0.1  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cristales de aragonita están separados por una matriz intercrystalina, a su vez dentro de cada cristal hay hojas muy finas de matriz intracrystalina (Watabe, 1965). El patrón formado por las matrices interlaminares e intercrystalinas dan la apariencia de paredes de ladrillos en las secciones verticales de la capa aragonítica (Fig. 3).



**Figura 3.** Sección radial del borde del manto de un bivalvo para mostrar la relación entre la concha y el manto (no está a escala). EPS, espacio extrapaleal; IE, epitelio interno; IF; pliegue interno; LPM, músculo paleal longitudinal; MC, célula mucosa; MF, pliegue medio; NC, **capa aragonítica**; OE, epitelio externo; OF, pliegue externo; P, periostraco; PG, lengüeta del periostraco; PL, línea paleal; PM, músculo paleal; PN, nervio paleal; PR, capa prismática de la concha (tomado de Wilbur y Saleuddin, 1983).

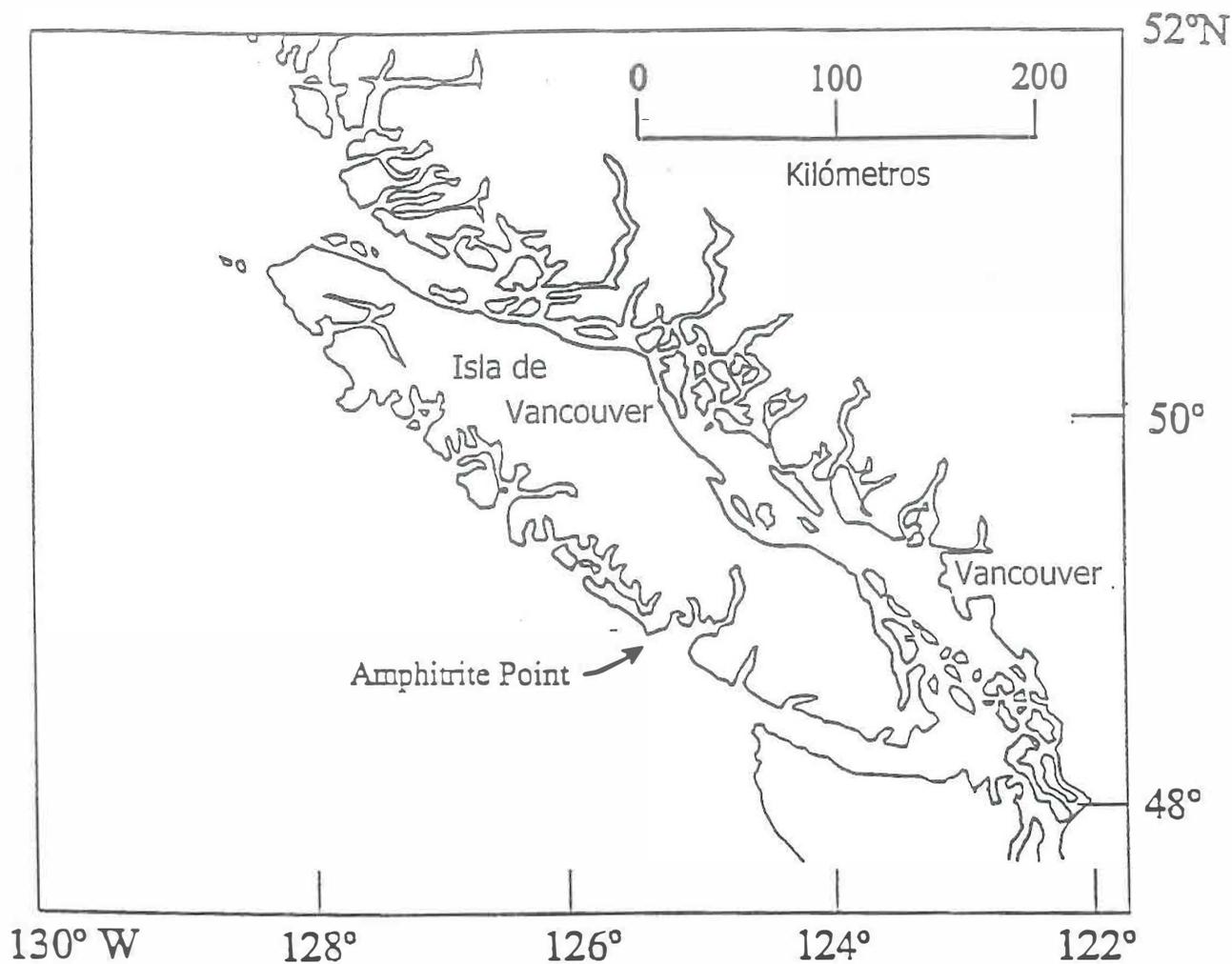
## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1 Muestreo

Se colectaron 30 mejillones (*M. californianus*) diariamente durante 4 semanas (26 de julio al 22 de agosto, 1991), en Amphitrite Point, Columbia Británica, en la costa oeste de la isla de Vancouver (región donde ocurren eventos de surgencia durante el verano; Thompson *et al.*, 1989), Canadá (Fig. 4). El 7 y 8 de agosto no se obtuvieron mejillones debido a que se presentó una tormenta. Los mejillones colectados cada día fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos de 10, con lo que se obtuvieron 3 réplicas por día. Con estas muestras integradas se tiene la ventaja de analizar un mayor número de organismos con lo que se obtiene una mejor estimación de la media de la población. Adicionalmente, la varianza de las muestras integradas generalmente es menor que la varianza de la población calculada a partir de muestras individuales (Gordon *et al.*, 1980). En total fueron 26 días de muestreo con lo que se obtuvieron 780 mejillones para hacer el estudio. Estos ejemplares fueron colectados de un solo banco de mejillón a nivel intermareal medio, el tamaño de los mejillones seleccionados fue de 6.41 a 7.22 cm. Estos cuidados se llevaron a cabo con el propósito de evitar fuentes de variación inherentes al organismo (Boyden, 1977; Coleman, 1980).

### II.2 Laboratorio

Los organismos fueron llevados al laboratorio, en donde el tejido blando fue separado de la concha con un bisturí de acero inoxidable. Las conchas fueron limpiadas con un cepillo de cerdas de plástico para eliminar toda la epifauna y enjuagadas con agua destilada y desionizada. Las conchas se secaron al aire durante 2 días, para posteriormente ser pesadas en una balanza analítica (XE-100, Denver instrument). La longitud, ancho y altura de cada concha se midió con un vernier. Asimismo se analizó el estado en que se encontraba cada valva, es decir, si éstas presentaban quebraduras, erosión del periostraco y



**Figura 4.** Localización de la estación de muestreo en Amphitrite Point (Isla de Vancouver), Columbia Británica; Canadá.

capa calcítica a más del 50 % de su superficie externa, acidificación y reparaciones mayores al 50 % de la cara interna de la valva. Para los análisis realizados se escogieron aquellas valvas que estaban en mejores condiciones, tanto izquierdas como derechas. Una vez seleccionadas, las valvas fueron almacenadas en bolsas de plástico etiquetadas. La concentración de Cd en el tejido blando ya había sido previamente analizada por Lares (1995), en el presente trabajo se analizó la concentración de Cd en la concha que correspondía a estos tejidos blandos.

### **II.2.1 Estimación de la edad de los mejillones**

Para la determinación de la edad en 125 organismos se utilizó el método del grosor de la concha, que consiste en dividir el peso de cada concha entre su área (Griffin *et al.*, 1980). El área de las conchas se calculó utilizando un cuadrado de papel aluminio de área y peso conocidos. Posteriormente se forró con este papel toda la superficie externa de la concha recortándolo en los bordes. Se pesó la concha forrada con papel aluminio y se le restó el peso de la concha, la diferencia indicó cuanto pesó el papel aluminio y por consiguiente se obtuvo el área de la concha. Se conoce que la depositación de  $\text{CaCO}_3$  en *M. californianus* cerca de la zona donde fueron recolectados los organismos para este estudio es de aproximadamente  $100 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{a}^{-1}$  (Griffin *et al.*, 1980), por lo tanto, con la estimación del grosor de la concha y la razón de depositación se pudo estimar la edad de los mejillones.

### **II.2.2 Limpieza del material**

Todo el material que tuvo contacto con las muestras, reactivos y estándares fue lavado con una solución de Alconox<sup>®</sup> libre de fosfatos durante 12 horas y enjuagados 3 veces con agua destilada y desionizada. Una vez lavado el material, se dejó 24 horas en una solución de ácido clorhídrico (grado reactivo) al 50 % y luego fue enjuagado 3 veces con agua destilada y desionizada. Finalmente se colocó en una solución de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 1 M grado metal traza durante 12 horas como mínimo. Inmediatamente antes de su

uso el material fue enjuagado 3 veces con agua destilada y desionizada. Una vez pasadas por el proceso de limpieza los viales y las puntas de pipetas fueron colocadas en un recipiente semisellado en la estufa durante 12 horas a 60 °C para ser secados.

### II.2.3 Reactivos utilizados

El agua utilizada para la limpieza del material y la preparación de reactivos fue destilada y desionizada (Sistema Nanopure; resistencia específica de 18 megaohms). Se usaron ácido clorhídrico (HCl) grado reactivo al 50 % y ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) grado metal traza (1 M) para lavar el material. Para el proceso de digestión se utilizaron solamente ácidos grado metal traza: ácido clorhídrico al 50% (6M), ácido nítrico 50% (7 M) y ácido nítrico (1M). El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizado para eliminar el periostraco en las valvas fue grado reactivo, mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usado para eliminar las partículas adheridas en la superficie de la zona de interés una vez eliminado el periostraco fue grado metal traza. Para la preparación de los estándares de calibración de Cd se utilizó un estándar certificado de Cd de 1.000 g/L (Fluka, Chemika) y una matriz de HNO<sub>3</sub> (0.5 M) grado metal traza.

Debido a que no existe un material de referencia certificado con una matriz semejante a la de las conchas (e.g. NIST, Estados Unidos y NRCC, Canadá), se utilizó carbonato de calcio ultrapuro al 99.995 % (Aldrich Chem) inyectado con 1 ml de 1 ppb de Cd.

### II.2.4 Eliminación del periostraco

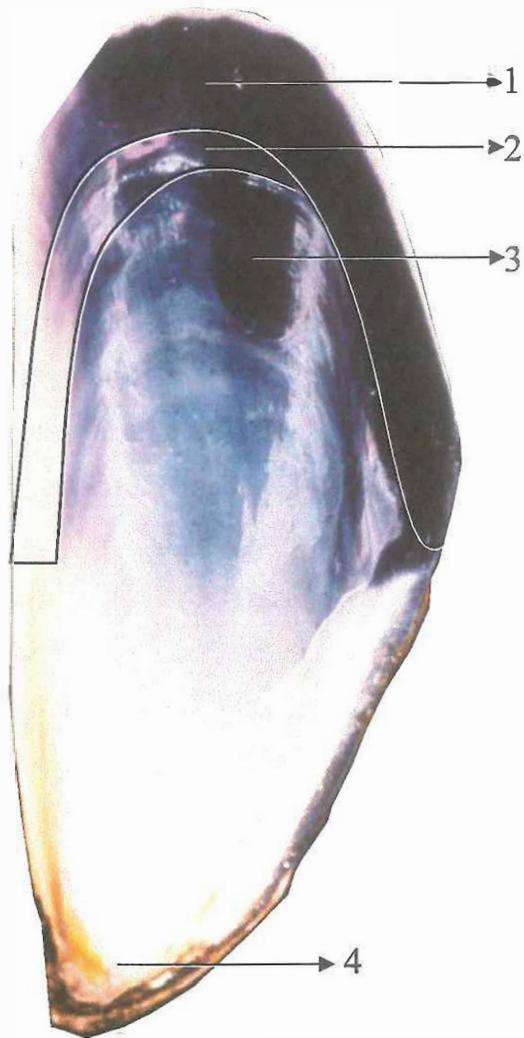
Para proceder al análisis del Cd en la capa aragonítica se eliminó primeramente el periostraco. Las valvas fueron colocadas individualmente en vasos de precipitado de 250 ml y sumergidas en 75 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % a una temperatura de 80-85 °C durante 10 a 15 minutos. Para lograr esta temperatura, se colocaron los vasos de precipitado en planchas de calentamiento. Una vez listas las valvas (cuando el periostraco comenzó a separarse del

resto de la concha y su consistencia se hizo suave), se retiraron las valvas del  $H_2O_2$  caliente con unas pinzas y se enjuagaron 3 veces con una piceta con agua destilada y desionizada. El periostraco fue extraído posteriormente con un cuchillo de acero inoxidable y se enjuagaron las valvas 3 veces con agua destilada y desionizada por ambos lados. La zona de interés se dejó sumergida en  $H_2O_2$  grado metal traza al 10 % durante 30 segundos. Posteriormente las valvas fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada y desionizada. Finalmente fueron secadas con toallas Kim-wipes® para ser almacenadas en bolsas de plástico etiquetadas hasta su posterior procesamiento.

### II.2.5 Separación de la zona de interés del resto de la concha

Se colocaron las valvas de cada día de muestreo en recipientes de aluminio etiquetados. Estos recipientes estaban seccionados por dentro en 5 compartimientos para la colocación del mismo número de valvas, cada recipiente tenía su respectiva tapa de aluminio. Las valvas fueron colocadas con la capa aragonítica expuesta hacia arriba para evitar la pérdida de la zona de interés. Posteriormente, los recipientes fueron introducidos en una mufla (Sybron-Thermolyne) a una temperatura preestablecida de 350 °C durante 1 hora y luego se dejaron enfriar dentro de ésta durante 30 minutos.

Se separó una sección de aproximadamente 2 a 3 mm de la zona aragonítica recientemente depositada en la cara interna y anterior de la valva (extremo opuesto al umbo; Fig. 5), utilizando una aguja de acero inoxidable previamente lavada con agua destilada-desionizada y secada con toallas Kim-wipes®. El material de 10 valvas pertenecientes a cada muestra fue empujado con la aguja a un vial de polietileno de baja densidad previamente lavado, secado, pesado y etiquetado. Esta operación se realizó dentro de una caja de acrílico previamente lavada con HCl 6 M grado metal traza. Una vez introducido el material dentro del vial, se le colocó su respectiva tapa y se pesó en una balanza analítica (XE-100, Denver instrument), la cantidad de material aislado se cuantificó por diferencia de peso. Del procesamiento de diez valvas, se obtuvieron en promedio 42 mg de material.



**Figura 5.** Cara interna de la valva de *M. californianus*. 1) capa calcítica. 2) banda de la capa aragonítica que fue aislada. 3) músculo abductor. 4) región del umbo.

## II.2.6 Digestión del material

A cada vial con el material extraído de la zona de interés de 10 valvas se le agregó 0.5 ml de HCl 6 M y 1 ml de HNO<sub>3</sub> 7 M (ambos grado metal traza) con una pipeta automática (Eppendorf®). Los viales fueron colocados en una plancha de calentamiento a 75 °C (temperatura de la plancha) situada dentro de una caja de acrílico sellada. La digestión duró de 6 a 7 horas hasta la evaporación de la mayor parte (75 al 80 %) de esta solución, a la cual posteriormente se le agregó 1 ml de HNO<sub>3</sub> 1M (grado metal traza). La solución final fue pesada en una balanza analítica (XE-100, Denver instrument) para calcular posteriormente la concentración final.

La caja de acrílico durante la fase de la digestión estuvo sellada teniendo sólo tres entradas: un filtro (clase 100) por donde entraba el aire sin partículas, una entrada con un guante interno para manipular los viales y otra abertura conectada a un tubo plegable unido a un extractor para remover los vapores producidos.

## II.2.7 Control de calidad

La etapa de calentamiento en la mufla se llevó a cabo en 8 fases (8 días), todos los días se corrió una muestra de 30 a 70 mg de carbonato de calcio ultrapuro (99.995%) junto con las valvas para detectar una posible contaminación por Cd. Una vez que se sacaban los recipientes de aluminio de la mufla, se retiraba del interior de una de estas charolas el material de referencia y se diluía en 1 ml de HNO<sub>3</sub> grado metal traza. Esta operación se realizaba dentro de la caja de acrílico.

Las muestras de interés fueron digeridas en 4 fases (4 días) con una duración de 6 a 7 horas cada una, teniendo cuidado de no tener 2 de las 3 réplicas por día en la misma fase y con esto evitar el riesgo de perder los datos de un día en caso de presentarse algún tipo de contaminación. En cada fase se incluyeron 2 blancos de reactivos (reactivos utilizados

durante la digestión sin el material de interés) para detectar cuánto Cd estaban aportando estos ácidos. Se utilizó un blanco de matriz (1.0 ml de HNO<sub>3</sub> 1M grado metal traza) para saber si se presentó contaminación por Cd durante el proceso. Se usó como material de referencia carbonato de calcio ultrapuro (99.995 %), el cual fue inyectado con 1 ml de 1 ppb de Cd, esto con el objetivo de determinar el porcentaje de recuperación de Cd una vez concluido el proceso de digestión.

### II.2.8 Instrumentación

Las mediciones de Cd en la capa aragonítica se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian Spectra, modelo AA300/400 con un horno de grafito Varian Techtron GTA-96 con corrección de fondo Zeeman. El límite de detección instrumental fue de 0.05 ppb (n=21), calculado como 3 veces la desviación estándar del blanco (2 % HNO<sub>3</sub> grado metal traza). El límite de detección en el procedimiento de digestión (ácidos usados en esta etapa) fue de 0.062 ppb (n = 4) o por abajo del 0.5 % de las concentraciones medidas. La eficiencia de recuperación del Cd en la digestión fue de 93 % ± 13 (n=4).

### II.3 Análisis de datos

Utilizando las diferentes variables de la concha (peso, longitud, alto y ancho), se calcularon las siguientes proporciones: ancho:alto, peso:longitud, longitud:altura y ancho:longitud. También fue calculado el índice de condición (IC) propuesto por Lobel *et al.* (1991) en el cual se divide el peso seco del tejido blando entre las dimensiones de la concha (longitud x ancho x altura).

Para fines comparativos, en este estudio se utilizaron las conchas que correspondían a las réplicas del tejido blando provenientes del estudio de Lares y Orians (1997). A la serie de datos de la concentración de Cd en la capa aragonítica se le hicieron

pruebas de homogeneidad de varianza (Bartlett) y normalidad (bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov), requisitos necesarios para utilizar estadística paramétrica. Se aplicó a la serie de datos un análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias significativas entre días. También se realizaron comparaciones múltiples con la prueba Student-Newman-Keuls (SNK) para detectar qué días eran significativamente diferentes.

Se efectuaron correlaciones (producto-momento de Pearson) entre las diferentes variables del estudio (Cd en el tejido blando, Cd en la capa aragonítica, ancho, alto, longitud, peso de la concha, ancho:alto, ancho:longitud, peso:longitud, longitud:altura, erosión y reparación de la concha). A las series de datos que no pasaron la prueba de normalidad se les aplicó una transformación  $\log_{10}$ . La correlación entre la concentración de Cd en el tejido blando y la concha fue desfasada hasta 7 días debido a que el Cd pasa primero por el tejido blando antes de ser incorporado en la cara interna de la concha, con lo cual era posible que se presentara una incorporación retardada de este metal en la capa aragonítica.

Para obtener el grado de asociación entre las diferentes variables medidas (Cd en el tejido blando y capa aragonítica, índice de condición, características de la concha y proporciones alométricas e isométricas) se efectuó un Análisis Multivariado de Componentes Principales (ACP) con una rotación varimax a partir de la matriz de correlación de Pearson. Se escogieron componentes cuyo eigenvalor fuera igual o mayor a 1.0 (criterio sugerido por Nie *et al.*, 1970) y se interpretaron aquellas variables con una carga por arriba de 0.40.

La ventaja de este tipo de análisis multivariado es que permite resolver asociaciones entre un número grande de variables y proyectar los patrones de variación conjunta en un reducido número de variables no correlacionadas que reciben el nombre de componentes. Los términos que se usarán posteriormente en la descripción y análisis de los resultados son los siguientes:

- 1) Componente: es una variable compuesta en la que las variables presentan una relación única.
- 2) Porcentaje de varianza común: es la cantidad de variabilidad explicada por el componente a partir de la matriz de datos.
- 3) Carga ( $\alpha$ ): es el grado y dirección de asociación (correlación) de las variables con cada uno de los componentes resultantes.

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa Statistica versión 5.0.

### III. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN DE LAS CAPAS Y DIGESTIÓN DE LA CONCHA DE *M. californianus*

#### III.1 Introducción

Bourgoin (1988) desarrolló un método sencillo para eliminar el periostraco de la concha y para separar la capa aragonítica de la calcítica en el mejillón *Mytilus edulis* aplicando calor a las conchas (400 °C durante 18 h). Una vez separada la capa aragonítica, toda la parte interna era raspada a una profundidad no mayor de 0.1 mm para asegurar que sólo el material depositado recientemente fuera colectado, obteniendo aproximadamente 50 mg de material. Este método fue desarrollado con la finalidad de analizar metales en la concha así como para estudios paleontológicos.

La ventaja de analizar metales asociados a la capa aragonítica a diferencia del periostraco o la capa calcítica es que ésta se encuentra en la parte más interna de la concha y por lo tanto, está más protegida del medio externo, por lo que los metales ahí depositados se supone que representan solamente lo que fue acumulado por el metabolismo del organismo (Bourgoin, 1990). El periostraco presenta la desventaja de tener contacto directo con el medio externo (agua de mar), factor que también puede influir en la capa calcítica cuando el periostraco se erosiona.

La aplicación de esta técnica en conchas de *Mytilus californianus* (Fig. 6) hasta el presente no ha sido reportada, por lo que este trabajo pretende investigar si se obtienen los mismos resultados que en *Mytilus edulis* y de no ser el caso desarrollar o modificar la técnica ya existente para que se adapte a las características propias de *M. californianus*.

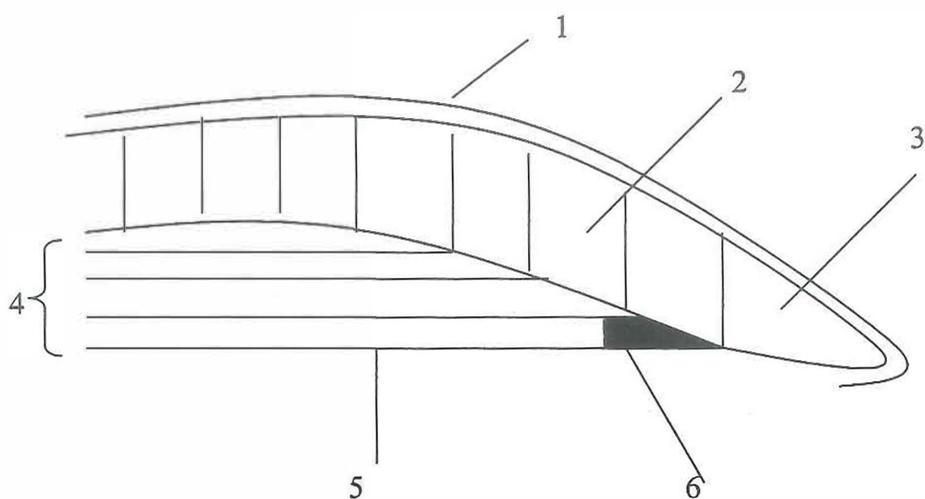


**Figura 6.** Concha de *M. californianus* recolectada en Amphitrite Point, en la costa oeste de la isla de Vancouver, Canadá. La parte oscura de la cara externa de la concha representa el periostraco.

### III.2 Pruebas realizadas

La sección de la capa aragonítica aislada en este estudio representa el crecimiento más reciente. Esta zona se encuentra en la cara interna de la valva, adyacente a la parte interna de la capa calcítica, es decir en dirección al crecimiento del organismo (Fig. 7). En este estudio se ensayaron diferentes temperaturas y tiempos de calentamiento para separar la zona de interés del resto de la concha (Tabla I). Asimismo se experimentó con diferentes volúmenes de inmersión en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y temperaturas (Tabla II), con la finalidad de eliminar el periostraco. Como se puede apreciar en la Tabla III, se llevaron a cabo diferentes combinaciones de reactivos a diferentes volúmenes y temperaturas para digerir el material de interés.

**Nota:** Las tablas I, II y III se encuentran en la sección de resultados de este capítulo.



**Figura 7.** Secciones de la concha: 1) Periostraco. 2) capa calcítica. 3) capa calcítica de formación reciente. 4) capa aragonítica. 5) lámina de la capa aragonítica formada recientemente (zona raspada por Bourgoïn, 1990). 6) sección de la capa aragonítica de *M. californianus* aislada en este estudio (zona obscura).

### III.3 Resultados

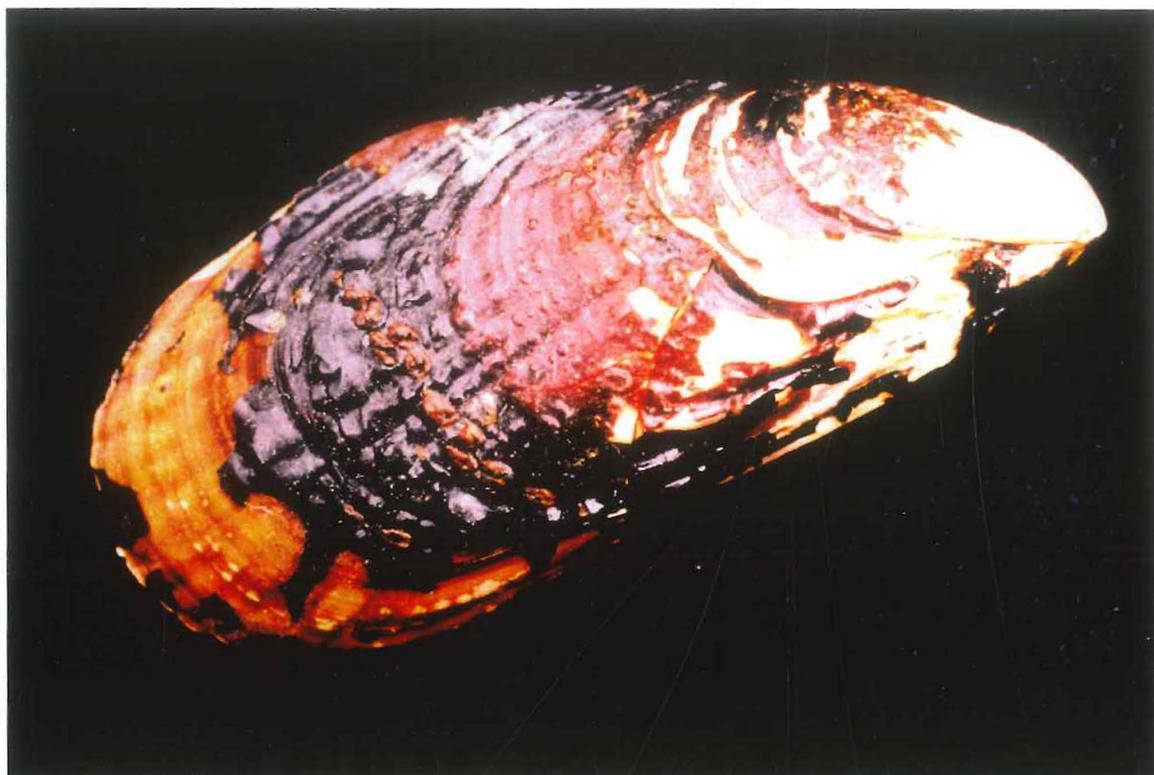
El procedimiento óptimo para separar la parte más reciente de la capa aragonítica fue a 350 °C durante 1 hora (Tabla I). Las valvas presentaron una buena consistencia (lo cual facilitó su manejo) y la zona de interés quedó intacta por lo que fue separada fácilmente, además de disminuir substancialmente el tiempo de procesamiento propuesto para *M. edulis* (de 18 a 1 h). La única desventaja que presentó esta técnica fue que no se pudo eliminar el periostraco por completo (Fig. 8). Cuando las valvas fueron sometidas a calor, a 400 °C durante 18 h (técnica de Bourgoïn, 1988) éstas se tornaron muy frágiles y por lo tanto su manejo era difícil (Fig. 9), lo que ocasionaba una frecuente pérdida de la zona de interés. Además el tiempo de procesamiento con el método de Bourgoïn (1988) era considerable, lo que lo puede hacer poco práctico cuando es necesario procesar una gran cantidad de valvas. Al colocar las valvas a 300 °C (1 hora) y 400 °C (30 min) se observó que en un gran número de valvas no se separaba la zona de interés de la capa calcítica. A 400 °C durante 1 hora también se observó una separación de la zona de interés, sin embargo se consideró que la consistencia de la valva era mejor a 350 °C durante 1 hora (Tabla I).

La manera más eficiente, sencilla y rápida para separar el periostraco del resto de la concha fue sumergiéndolas en 75 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % a 80-85 °C durante 10 a 15 minutos (Fig. 10). De los 60 a los 70 °C no se eliminó el periostraco y de los 70 a los 80 °C sólo fue separado parcialmente. A temperatura ambiente (18 °C) durante 12 y 24 h sólo se eliminó parcialmente el periostraco, aún utilizando un cuchillo de acero inoxidable algunas partes del periostraco quedaban fuertemente adheridas (Tabla II). Una vez eliminado el periostraco de las conchas, éstas eran colocadas en la mufla a 350 °C durante 1 hora presentando las ventajas ya mencionadas anteriormente además de no presentar el riesgo de contaminación por Cd debido a que el periostraco ya había sido eliminado (Fig. 11).

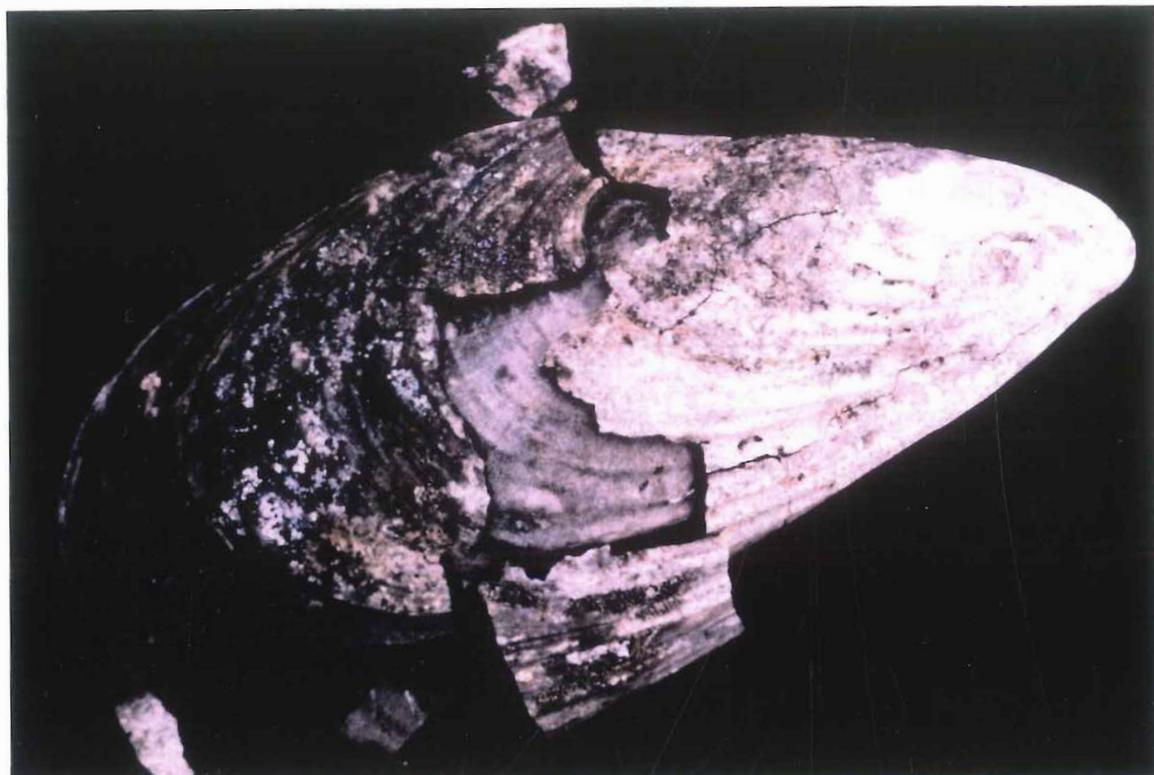
El procedimiento óptimo para disolver el carbonato de calcio (aragonita) y digerir la matriz orgánica fue utilizando 0.5 ml de HCl (6 M) y agregando inmediatamente 1.0 ml de HNO<sub>3</sub> (7 M). Las demás pruebas sólo digirieron parcialmente el material orgánico. El proceso de digestión duró de 6 a 7 horas (Tabla III).

**Tabla I.** Desventajas que cada tratamiento presentó en la separación de la zona de interés por medio de calor, en la concha de *M. californianus*. Una X significa que el tratamiento tuvo esa limitante. La prueba propuesta por Bourgoïn (1988) está marcada con asteriscos. La técnica escogida en este estudio está resaltada en negritas.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	La zona de interés se perdió	Valva quebradiza	Tiempo considerable en el procesamiento	No se separó la zona de interés	No se eliminó el periostraco
400*	18 *	X	X	X		X
<b>350</b>	<b>1</b>					X
350	18	X	X	X		X
400	0.5				X	X
400	1					X
400	1.5		X			X
400	2.5		X			X
300	1				X	X
500	1.5	X	X			X



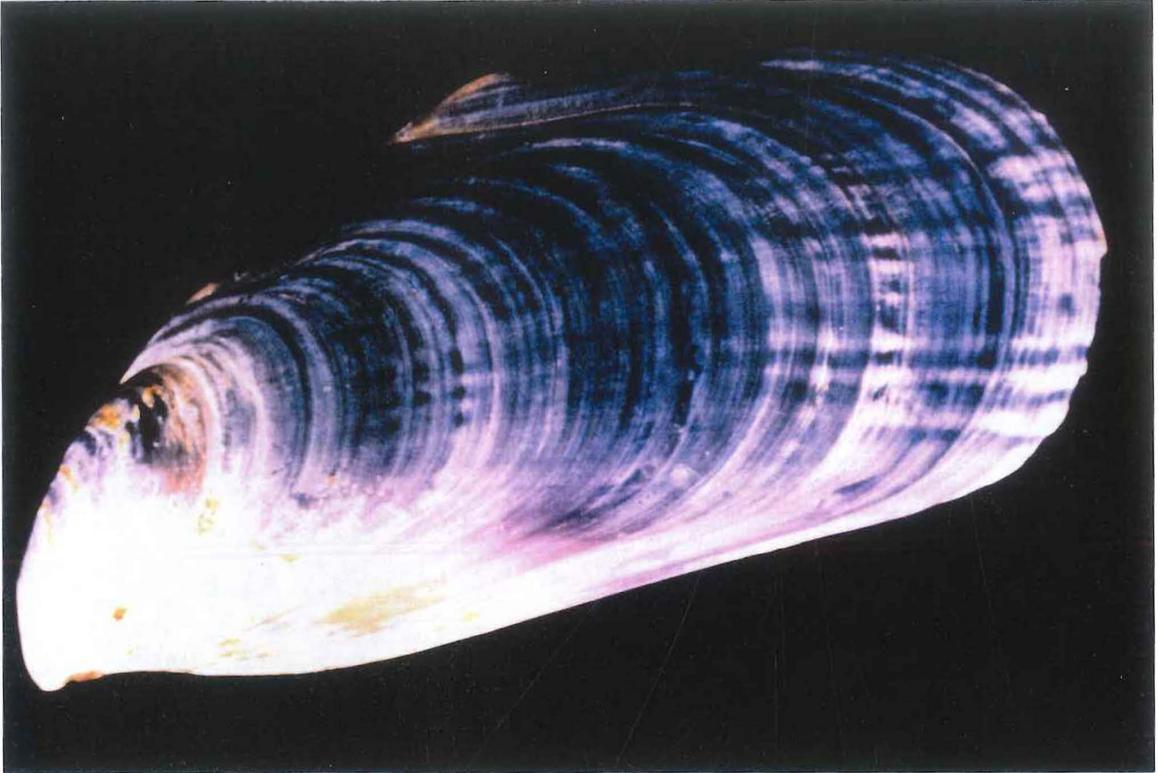
**Figura 8.** Concha de *M. californianus* procesada en la mufla a 350 °C durante 1 hora. La parte oscura de la concha representa la parte del periostraco que queda después del tratamiento.



**Figura 9.** Concha de *M. californianus* procesada en la mufla a 400 °C durante 18 horas. Prueba propuesta por Bourgoin (1988) para la concha de *M. edulis*.

**Tabla II.** Eliminación del periostraco utilizando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a diferentes condiciones de experimentación. La prueba escogida presenta un asterisco.

Concentración (%)	Temperatura del peróxido (°C)	Tiempo	Eliminación del periostraco
30	Ambiente	12 h	<b>Parcialmente</b>
30	Ambiente	24 h	<b>Parcialmente</b>
20	60-65	10-15 min	<b>No</b>
30	60-65	10-15 min	<b>No</b>
30	65-70	10-15 min	<b>No</b>
30	70-75	10-15 min	<b>Parcialmente</b>
30	75-80	10-15 min	<b>Parcialmente</b>
30	80-85	10-15 min	<b>Sí*</b>



**Figura 10.** Concha de *M. californianus* en la cual se ha eliminado el periostraco utilizando peróxido de hidrógeno al 30 % con una temperatura de 80 a 85 °C durante 10 a 15 minutos.



**Figura 11.** Concha de *M. californianus* en la cual se ha eliminado el periostraco utilizando peróxido de hidrógeno al 30 % con una temperatura de 80 a 85 °C durante 10 a 15 minutos y que posteriormente ha recibido un tratamiento con calor a 350 °C durante 1 hora.

**Tabla III.** Digestión de la capa aragonítica utilizando diferentes reactivos a diferentes condiciones de experimentación. Todas las pruebas de digestión duraron de 6 a 7 horas. La prueba escogida se presenta en negritas.

Volumen (ml)	Temperatura (°C)	Concentración (M)	Reactivos	Digestión de capa aragonítica
1.0	Ambiente	1	HNO <sub>3</sub>	Parcial
1.5	Ambiente	6	HNO <sub>3</sub>	Parcial
1.5	Ambiente	6	HCl	Parcial
1.5	50	6	HCl	Parcial
1.5	75	6	HCl	Parcial
1.5	100	6	HCl	Parcial
1.0	75	12	HCl	Parcial
1.0	75	15	HNO <sub>3</sub>	Parcial
1.0	75	10	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Parcial
1.0 c/u	75	*1 c/u	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +HNO <sub>3</sub>	Parcial
0.5 +1.0 respectivamente	75	* 6, 7 respectivamente	HCl+HNO <sub>3</sub>	<b>Completa</b>

\* Representa la concentración que tienen los reactivos antes de ser combinados.

### III.4 Discusión

La zona que se aisló (Fig. 7) en la capa aragonítica es diferente a la que propone Bourgoin (1990) para *M. edulis*. Este investigador obtiene aproximadamente 50 mg de la capa aragonítica raspando suavemente la superficie interna de esta capa a una profundidad no mayor de 0.1 mm para asegurar que el material depositado fuera reciente. En el caso de *M. californianus* se observó que no se podía raspar la última lámina de la capa aragonítica ya que el 95 % de las valvas presentaban algún grado de acidificación (color blanco en la cara interna de la valva), en algunos casos también se presentaban reparaciones en su superficie interna (color violeta). La acidificación se produce cuando las valvas se cierran y el organismo no tiene acceso al oxígeno del medio externo (agua de mar), esto ocurre por ejemplo durante la marea baja cuando están expuestos al aire. El interior del mejillón se vuelve anaeróbico y disminuye el pH del fluido extrapaleal, con lo que el  $\text{CaCO}_3$  recientemente depositado se disuelve (Wilbur y Saleuddin, 1983) y con ello los metales ahí asociados (Schettler y Pearce, 1996). Cuando se presentan reparaciones surge la posibilidad de que el agua de mar tenga contacto con la cara interna de la concha, lo que puede ocasionar que los metales aportados a esta parte de la concha sean de un origen diferente a los depositados por el metabolismo del mejillón.

En las conchas de *M. californianus* se observó que la sección de la capa aragonítica recientemente depositada (Fig. 7) estaba intacta, es decir libre de acidificación y reparaciones. Esta observación coincide con lo reportado por Crenshaw (1980) para el bivalvo *Mercenaria mercenaria*, quien menciona que la disolución del carbonato de calcio ocurre principalmente dentro de la línea paleal. Se sabe que la razón más alta de depositación de la concha ocurre en el margen que está creciendo (Crenshaw, 1980), por lo que es razonable suponer que la zona que se aisló estuvo expuesta poco tiempo al rigor ambiental, lo cual se vio reflejado en una mejor condición de la zona. La sección de la capa aragonítica que se obtuvo no fue raspada, sino que se desprendió fácilmente al tocarla ligeramente con una aguja de acero inoxidable.

El mejillón *M. edulis* es característico de lugares semiprotegidos como son las bahías, en donde el oleaje es menos severo (Suchanek, 1981) y por lo tanto las conchas se erosionan menos y presentan mejores condiciones externas e internas, por lo que la aplicación de la técnica de Bourgoïn no presenta problemas. El caso de *M. californianus* es diferente ya que se encuentra en zonas expuestas al oleaje fuerte, por lo que en general presenta una mayor erosión del periostraco y de la capa calcítica, además de reparaciones en su cara interna. Los organismos que se utilizaron en este estudio fueron obtenidos del intermareal y por lo tanto estuvieron expuestos periódicamente al aire por lo que presentaron acidificación en la cara interna de la valva. Sin embargo, es importante mencionar que la disolución de la concha no está restringida solamente a moluscos expuestos al aire durante la marea baja, ya que aún los bivalvos que permanecen continuamente en agua de mar cierran sus valvas periódicamente y sufren un cierto grado de disolución (Crenshaw, 1980). En el caso de *M. californianus* es difícil saber, en el momento en que se realiza el muestreo, si van a presentar acidificación en la capa aragonítica, ya que este proceso se puede presentar incluso en organismos que se ven en buenas condiciones externas. En el caso de las reparaciones, éstas sólo se observaron en las conchas que estaban muy erosionadas del periostraco y la capa calcítica.

Aunque en la Tabla I se observa que la prueba óptima para separar la zona de interés es a 350 °C durante 1 hora, el periostraco no era eliminado (Fig. 8). Esta parte de la concha es una fuente de variabilidad ya que adsorbe pasivamente los metales del medio externo (Sturesson, 1978; Bourgoïn, 1990), por lo que se buscó una técnica para eliminar el periostraco antes de separar por calor la zona de interés. Las opciones para eliminarlo fueron tres: 1) Por medio de calor (Bourgoïn, 1990), mecánicamente (Sturesson, 1978) y por medio de algún reactivo (Babukutty y Chacko, 1992).

La técnica de Bourgoïn (sin separación previa del periostraco) presentaba la desventaja de que quedaban cenizas del periostraco adyacentes a las valvas, las cuales podían representar una fuente de contaminación en caso de tener contacto con la capa

aragonítica, ya que el periostraco es la estructura de la concha que contiene la mayor concentración de metales (Sturesson, 1976). La opción mecánica, que consistía en la utilización de un escalpelo, presentaba la desventaja de ser tardado y tedioso, lo cual es una limitante en el caso de querer procesar un número elevado de valvas. La tercera opción era utilizar algún reactivo que eliminara el periostraco (compuesto de proteína) sin afectar al resto de la concha compuesta por una matriz de carbonato de calcio. El reactivo que cumplió con este requisito fue el  $H_2O_2$ , Babukutty y Chacko (1992) lo usaron diluido al 40 % durante 2 horas para eliminar el periostraco en el bivalvo *Villorita cyprinoides* var. *cochinensis*. Estos autores mencionan que la variabilidad aparente en la concha puede ser debida generalmente a una limpieza no uniforme, razón por la cual diseñaron un proceso de limpieza que removiera el periostraco completamente y que por lo tanto eliminara la variabilidad asociada a los metales adsorbidos. La prueba óptima para eliminar el periostraco en *M. californianus* fue a una temperatura de 80-85 °C durante 10 a 15 minutos (Fig. 10), la rapidez con la que se separó el periostraco de la capa calcítica permitió procesar muchas valvas en poco tiempo.

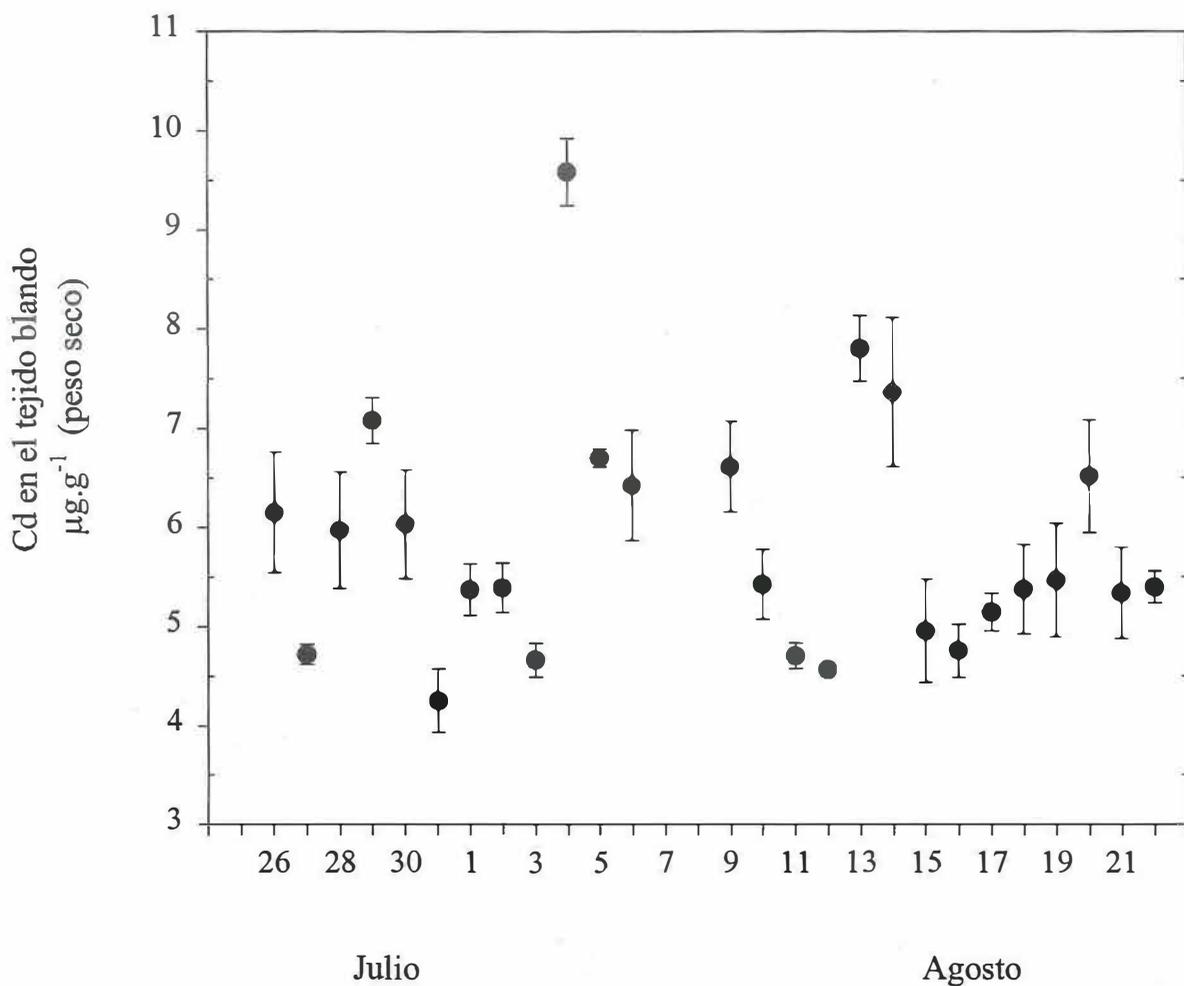
El método que se propone para separar una sección de la capa aragonítica de *M. californianus* es sencillo y rápido. Este método es útil para procesar un gran número de valvas y es efectivo para conchas que en muchas ocasiones no se encuentran en la mejor condición debido al riguroso ambiente al que están expuestas. La sección de la valva que se propone separar en este estudio se cree que representa al metal acumulado de uno a tres meses de acuerdo a la razón de crecimiento de los organismos de esta región.

## IV. RESULTADOS

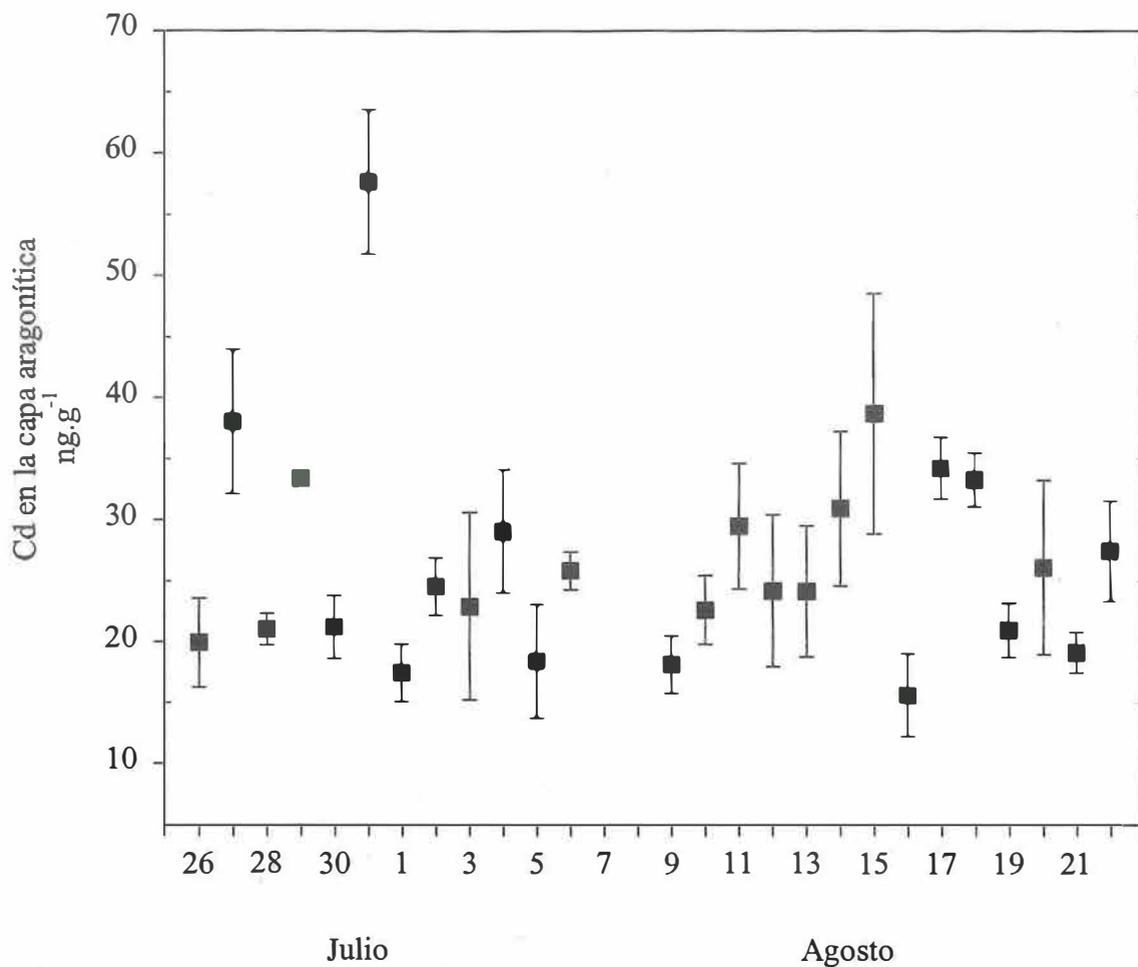
### IV.1 Variación temporal de la concentración de Cd en el tejido blando y capa aragonítica

La concentración de Cd en el tejido blando del 4 de agosto fue significativamente diferente a todos los demás días (Fig. 12) según la prueba SNK ( $P = 0.05$ ). El 13 y 14 de agosto fueron diferentes del 27, 31 de julio y 3, 11, 12, 15, 16 y 17 de agosto. El 29 de julio fue distinto del 27, 31 de julio y al 3, 11, 12, 16 de agosto. El 5 de agosto fue diferente del 31 de julio y 12 de agosto. Se observaron decrementos significativos (hasta  $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco) del 4 de agosto al 5 de agosto, 29 al 31 de julio y del 5 al 11 de agosto. La concentración promedio de Cd en el tejido blando fue de  $5.8 \pm 1.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (peso seco) durante los 26 días que duró el estudio. La concentración de Cd en el tejido varió de un mínimo de  $4.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco (31 de julio) a un máximo de  $9.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco (4 de agosto). Los resultados descritos de la concentración de Cd en el tejido blando en este trabajo fueron tomados del estudio de Lares y Orians (1997) con la finalidad de poder realizar la comparación con las conchas correspondientes.

En cuanto a la variabilidad temporal en las concentraciones de Cd en la capa aragonítica de *M. californianus*, se encontró que el 31 de julio fue significativamente diferente al resto de los días (Fig. 13), en los otros 25 días no se presentaron diferencias significativas según la prueba SNK ( $P = 0.05$ ). La concentración promedio (26 días) en la capa aragonítica fue de  $27.0 \pm 11.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , con un valor mínimo de  $16.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (16 de agosto) y un máximo de  $58.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (31 de julio).



**Figura 12.** Variabilidad temporal en las concentraciones de Cd en *M. californianus* (tejido blando) colectado en Amphitrite Point, Canadá (1991). Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de un promedio de 3 réplicas de 10 mejillones cada una. Datos tomados de Lares (1997).



**Figura 13.** Variabilidad temporal en las concentraciones de Cd en la capa aragonítica de *M. californianus* colectado en Amphitrite Point, Canadá (1991). Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de un promedio de 3 réplicas de 10 mejillones cada una.

No se encontró una correlación entre la concentración de Cd en el tejido blando y la capa aragonítica ( $r = -0.249$ ;  $P = 0.221$ ). Tampoco se presentó una correlación significativa al desfasar de 1 a 7 días los datos de la concentración de Cd en la capa aragonítica de los de la concentración de Cd en el tejido blando (Tabla IV).

#### IV.2 Características biométricas y alométricas de *M. californianus*

Las principales características biométricas y alométricas se muestran en la Tabla V y el resto de las medidas y proporciones se encuentran en el Anexo I y II. El máximo valor ancho:alto (medidas tomadas en la concha) se registró el 28 de julio (0.978) y el mínimo (0.850) el 31 de julio. El 27 de julio presentó el índice de condición más alto ( $26.39 \text{ g.cm}^{-3}$ ) y el más bajo fue el 4 de agosto. El 31 de julio registró uno de los índices de condición más altos con  $25.37 \text{ g.cm}^{-3}$ . Las conchas menos erosionadas fueron de las del 31 de julio, sólo 2 de las 30 conchas estuvieron erosionadas del periostraco y de la capa calcítica a más del 50 % de su superficie total externa, mientras que el 28 de julio presentó 27 conchas erosionadas (Tabla V).

**Tabla IV.** Correlación de Pearson entre la concentración de Cd en el tejido blando y la capa aragonítica de *M. californianus*. La serie de datos de Cd en la capa aragonítica fue desfasada de 1 a 7 días con respecto a la serie Cd en el tejido.

<b>Desfasamiento (días)</b>	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
0	-0.249	0.221	26
1	0.040	0.851	25
2	0.114	0.595	24
3	-0.204	0.352	23
4	-0.051	0.824	22
5	0.237	0.301	21
6	-0.074	0.756	20
7	-0.071	0.773	19

**Tabla V.** Características biométricas y alométricas más importantes del mejillón *M. californianus* (media  $\pm$  desviación estándar). Los números en negritas representan los valores máximos y mínimos .

Día	Indice de condición g.cm <sup>-3</sup>	Ancho:alto	# valvas erosionadas
<b>Julio</b>			
26	23.22 $\pm$ 4.5	0.928 $\pm$ 0.06	13
27	<b>26.39 <math>\pm</math> 2.0</b>	0.890 $\pm$ 0.01	13
28	25.90 $\pm$ 4.9	<b>0.978 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>27</b>
29	19.99 $\pm$ 0.5	0.878 $\pm$ 0.05	13
30	25.04 $\pm$ 1.3	0.914 $\pm$ 0.01	23
31	25.37 $\pm$ 1.7	<b>0.850 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>2</b>
<b>Agosto</b>			
1	21.00 $\pm$ 1.6	0.878 $\pm$ 0.04	9
2	21.08 $\pm$ 1.4	0.905 $\pm$ 0.07	13
3	20.99 $\pm$ 0.7	0.851 $\pm$ 0.04	3
4	<b>16.55 <math>\pm</math> 0.7</b>	0.906 $\pm$ 0.04	4
5	19.30 $\pm$ 0.5	0.929 $\pm$ 0.07	6
6	19.82 $\pm$ 0.4	0.909 $\pm$ 0.02	11
9	22.25 $\pm$ 0.8	0.936 $\pm$ 0.03	17
10	22.21 $\pm$ 2.5	0.901 $\pm$ 0.01	12
11	22.65 $\pm$ 2.5	0.888 $\pm$ 0.02	7
12	23.64 $\pm$ 0.8	0.876 $\pm$ 0.04	7
13	20.07 $\pm$ 0.5	0.955 $\pm$ 0.02	21
14	22.26 $\pm$ 1.4	0.907 $\pm$ 0.02	14
15	24.78 $\pm$ 0.6	0.871 $\pm$ 0.02	7
16	24.76 $\pm$ 0.7	0.877 $\pm$ 0.01	5
17	21.17 $\pm$ 0.6	0.885 $\pm$ 0.02	10
18	21.97 $\pm$ 1.7	0.895 $\pm$ 0.02	11
19	20.08 $\pm$ 0.3	0.863 $\pm$ 0.03	8
20	21.85 $\pm$ 1.4	0.912 $\pm$ 0.02	16
21	21.91 $\pm$ 0.3	0.923 $\pm$ 0.04	15
22	22.13 $\pm$ 2.2	0.884 $\pm$ 0.02	7

### IV.3 Matriz de correlación de Pearson

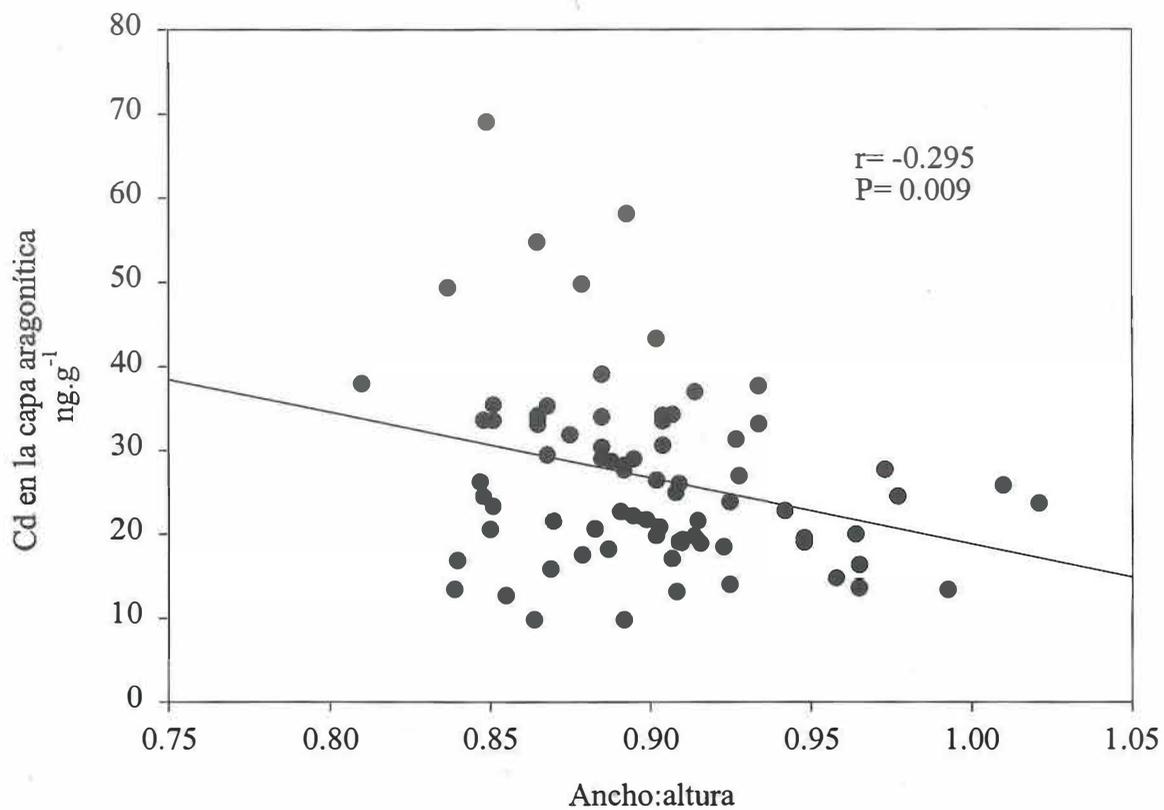
Las variables que se tomaron en cuenta para este análisis fueron: ancho:alto, ancho:longitud, longitud:altura, peso:longitud (medidas tomadas en la concha), reparación de la concha, índice de condición, Cd en el tejido blando y Cd en la capa aragonítica.

Las correlaciones de Cd en la capa aragonítica con las proporciones ancho:alto ( $r=-0.295$ ) y longitud:altura ( $r=-0.284$ ) fueron negativas con una significancia de  $P=0.01$  y con el peso:longitud ( $r=-0.226$ ) fue significativa a una  $P=0.05$  (Tabla VI). El Cd en el tejido blando presentó una correlación significativa con las proporciones ancho:alto ( $r=0.443$ ,  $P=0.001$ ), ancho:longitud ( $r=0.276$ ,  $P=0.01$ ), longitud:altura ( $r=0.379$ ,  $P=0.01$ ) y peso:longitud ( $r=0.493$ ,  $P=0.001$ ). La correlación más alta se presentó con el índice de condición ( $r=-0.567$ ,  $P=0.001$ ). La proporción peso:longitud estuvo correlacionada con el ancho:alto ( $r=0.619$ ,  $P=0.001$ ), ancho:longitud ( $r=0.382$ ,  $P=0.01$ ) y con longitud:altura ( $r=0.522$ ,  $P=0.001$ ). La erosión externa del periostraco y capa calcítica de las valvas estuvo correlacionada con las proporciones ancho:alto ( $r=0.551$ ,  $P=0.001$ ), ancho:longitud ( $r=0.472$ ,  $P=0.001$ ), longitud:altura ( $r=0.325$ ,  $P=0.01$ ) y peso:longitud ( $r=0.416$ ,  $P=0.001$ ). La erosión de la concha estuvo también correlacionada con las reparaciones internas de la misma ( $r=0.675$ ,  $P=0.001$ ).

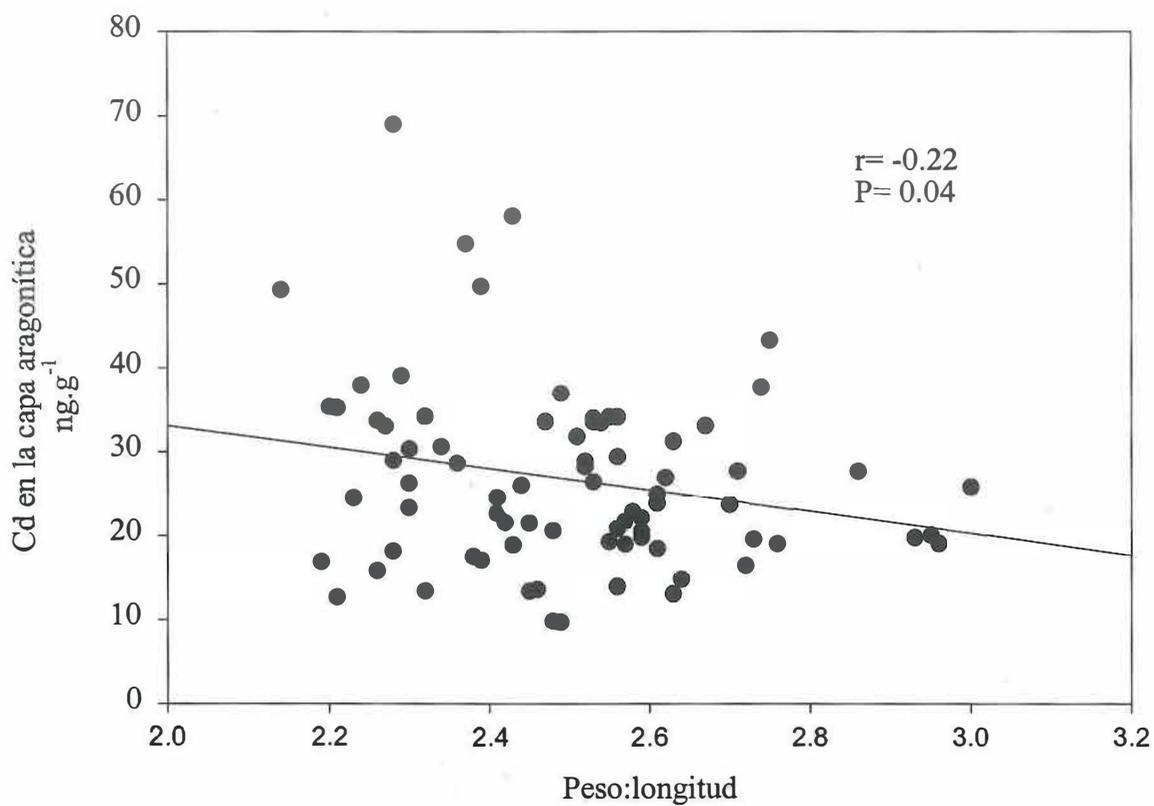
En la Figura 14 y 15 se observa que las concentraciones más altas de Cd en la capa aragonítica están asociadas a valores bajos en las proporciones ancho:altura y peso:longitud. Los organismos de los días que presentaron un valor ancho:alto por arriba de 0.907 tuvieron concentraciones de Cd en la capa aragonítica por abajo de los  $40 \text{ ng.g}^{-1}$ . Las concentraciones más altas de Cd en la concha se presentaron en los días en que éstas tuvieron un valor ancho:alto por abajo de 0.900. En cambio la concentración de Cd en el tejido blando de *M. californianus* incrementó conforme aumentó la proporción alométrica ancho:altura (Fig. 16).

**Tabla VI.** Matriz de correlación de Pearson entre las variables del estudio (n=78). Las variables 1, 2, 3 y 4, representan mediciones hechas en la concha para cada día. \* Correlación significativa a P=0.05, \*\*significativa a P=0.01, \*\*\* significativa a P=0.001.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ancho: alto	ancho: longitud	longitud: altura	peso: longitud	reparación concha	erosión concha	índice condición	Cd tejido	Cd concha
<b>ancho: alto</b>	1.000	0.768***	0.686***	0.619***	0.427***	0.551***	-0.082	0.443***	- 0.295**
<b>ancho:longitud</b>		1.000	0.063	0.382**	0.351**	0.472***	-0.026	0.276**	- 0.159
<b>longitud:altura</b>			1.000	0.522***	0.265**	0.325**	-0.108	0.379**	-0.284**
<b>peso: longitud</b>				1.000	0.279**	0.416***	-0.077	0.493***	- 0.226*
<b>reparación concha</b>					1.000	0.675***	0.312	0.158	-0.113
<b>erosión concha</b>						1.000	0.209	0.318**	-0.166
<b>índice de condición</b>							1.000	-0.567***	0.144
<b>Cd tejido</b>								1.000	-0.128
<b>Cd concha</b>									1.000



**Figura 14.** Relación entre la concentración de Cd en la capa aragonítica de *M. californianus* y la proporción ancho:altura de la concha (n=78).



**Figura 15.** Relación entre la concentración de Cd en la capa aragonítica de *M. californianus* y la proporción peso:longitud de la concha (n=78).



#### IV.4 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales se llevó a cabo a partir de la matriz de correlación producto-momento de Pearson (Tabla VI) que contiene las siguientes variables: ancho:alto, ancho:longitud, longitud:altura, peso:longitud, reparación de la concha, erosión de la concha, índice de condición, Cd en el tejido y capa aragonítica de *M. californianus*. En la Tabla VII se observan las correlaciones entre los componentes y las variables originales después de una rotación de tipo Varimax. En el presente estudio, se interpretaron las cargas mayores a 0.40. El análisis efectuado con las 9 variables, produjo 3 componentes con eigenvalores iguales o mayores a 1.0. Los componentes explicaron el 71.1 % de la varianza total .

El 32.5 % de la varianza común fue explicado por el componente 1. Las mayores cargas se presentaron con la proporción ancho:longitud ( $\alpha=0.810$ ), erosión de la concha ( $\alpha=0.808$ ), ancho:alto ( $\alpha=0.761$ ), reparación de la concha ( $\alpha=0.727$ ) y peso:longitud ( $\alpha=0.530$ ). El segundo componente explicó el 19.4 % de la varianza común, presentándose la mayor carga en el índice de condición ( $\alpha=0.893$ ) y con carga negativa el Cd en el tejido de *M. californianus* ( $\alpha=-0.776$ ). El 19.2 % de la varianza común fue explicado por el tercer componente, las cargas mayores se presentaron en las proporciones longitud:altura ( $\alpha=0.804$ ), el ancho:alto ( $\alpha=0.452$ ) y con carga negativa en la concentración de Cd en la capa aragonítica ( $\alpha=-0.736$ ).

**Tabla VII.** Análisis de componentes principales. Las proporciones son medidas tomadas en la concha. \* Cargas usadas en la interpretación.

<b>Variables</b>	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>	<b>Componente 3</b>	
<b>Cd concha</b>	0.007	0.013	-0.736*	
<b>Cd tejido</b>	0.355	-0.776*	0.175	
<b>Índice de condición</b>	0.183	0.893*	-0.066	
<b>Ancho:alto</b>	0.761*	-0.241	0.452*	
<b>Ancho:longitud</b>	0.810*	-0.200	-0.086	
<b>Longitud:altura</b>	0.265	-0.154	0.804*	
<b>Peso:longitud</b>	0.530*	-0.288	0.478*	
<b>Reparación</b>	0.727*	0.338	0.161	
<b>Erosión</b>	0.808*	0.167	0.202	
<b>Varianza explicada</b>	<b>32.5 %</b>	<b>19.4 %</b>	<b>19.2 %</b>	<b>Σ 71.1 %</b>

#### **IV.5 Factor de enriquecimiento de Cd en el tejido blando y capa aragonítica con respecto al agua de mar**

La concentración promedio de todas las muestras (n=26) para el tejido blando fue de  $(5.8 \pm 1.3) \times 10^3 \text{ ng.g}^{-1}$  y en la capa aragonítica (n=26) fue de  $27 \pm 11 \text{ ng.g}^{-1}$ . Estos valores indican la presencia de un factor de enriquecimiento que es aproximadamente 215 veces más elevado en la concentración de Cd en el tejido que en la capa aragonítica. El factor de enriquecimiento del Cd fue 64000 veces mayor en el tejido blando con respecto al agua de mar (Lares, 1997) y la capa aragonítica presentó una concentración de Cd 300 veces más alta que el agua de mar (Tabla VIII).

#### **IV.6 Estimación de la edad de los mejillones recolectados**

Se analizaron un total de 125 conchas, los organismos del 31 de julio presentaron la edad promedio más baja con 2.6 años. Los mejillones del 5 de agosto presentaron la edad promedio más alta con 3.5 años. El organismo más joven de los 125 analizados se presentó el día 31 de julio con 1.4 años y el de mayor edad correspondió al 5 de agosto con 6.6 años. La edad promedio de los 125 organismos analizados fue de  $3.0 \pm 0.5$  años (Tabla IX).

**Tabla VIII.** Factor de enriquecimiento de Cd en la capa aragonítica y tejido blando con respecto al agua de mar. Los valores con asteriscos fueron tomados del estudio realizado por Lares (1997).

	<b>Concentración promedio (ng .g<sup>-1</sup>) (media ± 1 desv. estándar)</b>	<b>Factor de enriquecimiento</b>	<b>n</b>
<b>Agua de mar</b>	0.09 ± 0.04 *	1	26
<b>Capa aragonítica</b>	27.0 ± 11.0	300	26
<b>Tejido blando</b>	(5.8 ± 1.3) x 10 <sup>3</sup> *	64000	26

**Tabla IX.** Estimación de la edad de los organismos (n=125) de acuerdo al método del grosor de la concha (Griffin *et al.*, 1980).

	<b>n</b>	<b>Edad promedio (años)</b>	<b>Desviación estándar (años)</b>	<b>Edad máxima (años)</b>	<b>Edad mínima (años)</b>
<b>31 julio</b>	30	2.6	± 0.5	3.7	1.4
<b>3 agosto</b>	30	2.7	± 0.5	3.6	1.8
<b>10 agosto</b>	10	3.1	± 0.4	3.4	2.1
<b>28 julio</b>	30	3.3	± 0.5	4.4	2.4
<b>5 agosto</b>	25	3.5	± 0.8	6.6	2.6

#### **IV.7 Correlación entre la edad y las diferentes variables medidas en la concha**

La edad del organismo estuvo correlacionada significativamente con 8 de las 9 variables analizadas en la matriz producto-momento de Pearson (Tabla X). La correlación más baja fue con la altura de la concha la cual resultó no significativa ( $r = -0.030$ ,  $P = 0.739$ ). La correlación más alta ( $r = 0.784$ ,  $P = 0.001$ ) fue entre la edad del mejillón y la proporción peso:longitud. Las medidas de longitud, ancho y peso de la concha presentaron una correlación significativa con la edad, siendo el peso de la concha la que presentó la correlación más alta entre estas medidas ( $r = 0.735$ ,  $P = 0.001$ ). Las proporciones ancho:altura, longitud:altura, ancho:longitud tuvieron una correlación significativa con la edad del organismo, de las 3 proporciones, el ancho:altura presentó la correlación más alta ( $r = 0.549$ ,  $P = 0.001$ ).

**Tabla X.** Correlación de Pearson (n =125). Relación entre la edad del mejillón y las diferentes mediciones de la concha.  
\*Correlación significativa a P=0.001.

	<b>Edad</b>
<b>Peso concha</b>	0.735*
<b>Longitud</b>	0.283*
<b>Altura</b>	-0.030
<b>Ancho</b>	0.531*
<b>Erosión</b>	0.430*
<b>Ancho:altura</b>	0.549*
<b>Longitud:altura</b>	0.397*
<b>Ancho:longitud</b>	0.450*
<b>Peso:longitud</b>	0.784*

## V. DISCUSIÓN

En el tejido blando de *M. californianus* se observaron diferencias significativas en la concentración de Cd entre días (Fig. 12). Sin embargo lo más sorprendente fue el que se haya presentado una disminución en la concentración de este metal de un día a otro o en pocos días, ya que antes de estos estudios (Lares, 1988; Lares y Orians, 1997) se creía que todas las especies de *Mytilus* acumulaban linealmente el Cd y que su eliminación era lenta (Scholz, 1980; Ritz *et al.*, 1982 y Cossa, 1989). En la capa aragonítica de las conchas correspondientes a estos tejidos analizados, se observó una menor variabilidad entre días. Es decir, la tendencia en 25 de los 26 días analizados fue a que las concentraciones de Cd no variaran, ya que no se registraron ni aumentos ni disminuciones significativas en la concentración del metal como ocurrió con el tejido blando (Fig. 13). La excepción a este patrón fue el 31 de julio el cual presentó un incremento significativo con respecto a los demás días. Los mejillones de este día tuvieron la concentración más baja de Cd en el tejido blando y la más alta en la capa aragonítica.

La diferencia que se presentó en la cinética de liberación del Cd entre el tejido blando y la capa aragonítica era de esperarse, ya que es razonable suponer que si existe algún proceso difusivo del Cd en la concha éste sería muy lento, ya que el metal está incorporado en un medio sólido (cristales de carbonato y matriz intercrystalina) por lo que no se esperaría que la capa aragonítica pudiera disminuir su concentración de Cd de un día a otro como ocurre con el tejido blando de *M. californianus*. En varios estudios de metales se ha apoyado la idea de que la concha es un registro de la historia ambiental de la zona en donde los organismos se encuentran (Sturesson, 1976; Bourgoïn, 1990; Babukutty y Chacko, 1992; Pitts y Wallace, 1994). En estos estudios se ha hecho la suposición de que si llegara a existir una pérdida del metal en la estructura de carbonato de calcio, dicha pérdida sería considerablemente más lenta que en las estructuras blandas.

No existió una correlación significativa en las concentraciones de Cd entre el tejido blando y la concha, aún desfasándolos varios días (Tabla IV). Este comportamiento se explica tomando en cuenta que el tejido blando de este bivalvo tiende a aumentar o a disminuir sus niveles de Cd en un día o en unos cuantos de acuerdo a los niveles de este metal en el agua de mar (Lares y Orians, 1997). En este estudio el Cd en la capa aragonítica presentó una tendencia a mantener la concentración a un nivel constante. Esta diferencia en la cinética de asimilación y liberación de los metales no permitió que existiera una correlación significativa a corto plazo. En el caso de *M. edulis* sí se han observado incrementos proporcionales entre las concentraciones de Cd en el agua de mar y la capa aragonítica (Sturesson, 1978) así como entre la concentración de Pb en la capa aragonítica y el tejido blando (Bourgoin, 1990). Estas relaciones se deben a que el tejido de *M. edulis* tiende a acumular linealmente los metales a corto plazo (Scholz, 1980; Ritz *et al.*, 1982). A partir de los resultados obtenidos creemos que en un estudio a mediano plazo (meses) o en un estudio espacial con zonas geográficas conteniendo un gradiente de concentraciones, sí sería proporcional el incremento encontrado en el tejido o agua de mar con respecto al de la concha de *M. californianus*. Se ha encontrado que el tejido blando de *M. californianus* presenta variaciones tanto a corto plazo como estacionalmente detectándose incrementos en la concentración de Cd en aquellos meses en que se presentan surgencias (Ouellette, 1981; Lares, 1988).

Los mejillones colectados el 31 de julio fueron los únicos en los 26 días de muestreo que mostraron un incremento significativo en la concentración de Cd en la capa aragonítica. Las tres réplicas de este día son altas por lo que se descarta la posibilidad de errores medición (Anexo III), sin embargo se observó que las conchas del 31 de julio se diferenciaron del resto de los días por varias características que pudieran explicar las concentraciones altas que se detectaron. En la Tabla V se observa que la proporción alométrica ancho:alto correspondiente a esta fecha es la más baja de los 26 días, con un valor de 0.850. Esta proporción nos brinda información acerca de la razón de crecimiento de un organismo, en donde los organismos jóvenes con un crecimiento rápido van a tener una proporción comprendida en el intervalo entre 0.6 y 0.8 (Lobel *et al.*, 1991), a

diferencia de organismos viejos que tienen razones de crecimiento muy lentas o que inclusive ya han dejado de crecer a lo largo y que poseen valores de ancho:alto entre 1.0 y 1.1. Los organismos más viejos solamente engrosan su concha haciéndose más anchos con lo que aumenta esta proporción alométrica conforme pasa el tiempo (Seed, 1968). Otra característica distintiva de los organismos del 31 de julio fue su índice de condición, siendo uno de los más altos que se presentó durante el muestreo, siendo superado únicamente por los índices del 27 y 28 de julio. Este índice nos proporciona información del estado fisiológico del organismo y refleja la cantidad de energía almacenada (Lares, 1988). Los mejillones en buenas condiciones tienen una mayor proporción de tejido blando con respecto a las dimensiones de su concha y por lo tanto índices más altos. El índice de condición de un organismo depende tanto de factores ambientales (temperatura, salinidad, tiempo de exposición al aire, etc.) como de factores bióticos (edad, razón de crecimiento, estado reproductivo, etc.). Los organismos del 31 de julio también presentaron las conchas en mejor estado, ya que sólo 2 de las 30 presentaron erosión del periostraco y capa calcítica a más del 50 % de su superficie (Tabla V). La información anterior nos podría estar indicando que los organismos del 31 de julio habían estado expuestos al rigor ambiental (oleaje) durante un período de tiempo menor debido a que son más jóvenes, lo que correspondería a lo que nos señala la proporción alométrica ancho:alto. Otra explicación es que algunos organismos que fueron recolectados en la zona pudieron estar más protegidos del oleaje debido a su posición en las rocas con lo que se erosionaron menos sus conchas.

El Cd en la concha presentó una correlación significativa con tres proporciones indicadoras de la edad relativa del organismo (Tabla VI). Estas correlaciones nos indican que las concentraciones de Cd detectadas en las conchas no solamente estuvieron relacionadas a las variaciones de las concentraciones del metal en el ambiente sino que también existió una fuente de variación en la acumulación del Cd en el mejillón debido a una diferencia de edad reflejado en la fisiología del organismo (razón de crecimiento, razón de filtración, excreción, etc.). De las tres proporciones consideradas, la que presenta la correlación más alta es el ancho:alto, esto coincide con lo reportado por Lobel *et al.*

(1991) quienes encontraron que de las tres proporciones (ancho:alto, ancho:longitud y longitud:altura) la más confiable para conocer la razón de crecimiento y edad relativa de los organismos era el ancho:alto, ya que puede haber organismos que no crezcan a lo largo, pero que seguirán creciendo a lo ancho y por lo tanto aumentarán también su grosor. Un ejemplo de lo anterior es que en una misma zona se pueden encontrar 2 mejillones de la misma longitud, sin embargo esto no significa que tengan la misma edad, ya que uno de los mejillones pudo haber llegado a esa longitud tiempo atrás y no haber seguido creciendo a lo largo debido a que es la máxima longitud potencial para la zona de acuerdo a las condiciones ambientales presentes (salinidad, temperatura, oleaje, tiempo que están sumergidos, etc.) y el otro mejillón podría haber llegado a esa longitud recientemente. Sin embargo, si se pesara la concha o se midiera el ancho se observarían diferencias marcadas entre el primer organismo y el segundo, ya que los organismos nunca dejan de depositar carbonato de calcio y por lo tanto conforme pasa el tiempo las valvas se hacen más anchas, gruesas y pesadas (Seed, 1968).

La correlación entre el Cd en la sección de la capa aragonítica más reciente y la proporción ancho:alto es negativa (Fig. 14), lo que sugiere que la depositación de Cd en esta capa varía con la edad del mejillón, ya que los organismos más viejos presentaron concentraciones bajas de Cd y los organismos más jóvenes con proporciones ancho:alto por abajo de 0.90 presentaron las concentraciones más altas de Cd en la capa aragonítica de *M. californianus*. Se sabe que los mejillones más jóvenes tienen un metabolismo más elevado por lo que filtran una mayor cantidad de agua en un tiempo dado (Cossa, 1989) y por lo tanto, acumulan más Cd ya que este metal se encuentra principalmente en forma disuelta. Los organismos que tienen un metabolismo más rápido no solamente filtran más rápido sino que también se cree que excretan más rápidamente (Lobel y Wright, 1982), por lo que se piensa que parte del Cd desechado por el tejido va a dar a la concha. Sturesson (1978) menciona que la concha puede servir como un depósito de metales desechados.

Es importante mencionar que las proporciones alométricas hasta el presente habían sido utilizadas para explicar lo que ocurre en el tejido; sin embargo, en este trabajo se

utilizaron para explicar el comportamiento del Cd tanto en el tejido como en la concha. La proporción peso de la concha:longitud (Fig. 15) también mostró la misma tendencia que la proporción ancho:alto, es decir una correlación negativa. Los organismos más viejos acumularon menos Cd en la capa aragonítica, lo cual se vio reflejado en una menor concentración de Cd a una proporción de peso de la concha:longitud más alta. Se sabe que los organismos más pesados tienden a ser organismos más viejos ya que han tenido más tiempo para acumular carbonato de calcio (Seed, 1968).

En la Figura 16 se observa una correlación positiva entre el Cd en el tejido blando y la proporción alométrica ancho:alto, es decir, que la concentración en el tejido aumenta conforme los organismos se hacen más viejos. Esta tendencia también fue reportada por Lobel *et al.* (1989) en el tejido blando de *M. edulis*. Se sabe que en los organismos viejos se detiene el crecimiento del tejido blando o que inclusive pueden perder peso corporal, sin embargo, el organismo sigue acumulando Cd con el consecuente aumento en la concentración de este metal (Cossa, 1989). En organismos jóvenes ocurre lo contrario, el tejido puede crecer más rápidamente de lo que el metal puede ser absorbido produciéndose un efecto de dilución (Cossa, 1989). Esto podría explicar por qué el 31 de julio presentó la concentración más baja de Cd en el tejido blando, ya que posiblemente fueron los organismos que presentaron la razón de crecimiento más alta como sugiere la proporción ancho:alto.

Para tener un panorama global de la relación entre todas las variables presentadas en la matriz de correlación (Tabla VI) se realizó un análisis de componentes principales (Tabla VII). El primer componente representa aquellas variables que son indicadoras de la edad relativa del organismo, como son las proporciones ancho:alto, ancho:longitud, peso:longitud, reparación y erosión de la concha, las cuales presentaron cargas altas y positivas. La relación de estas variables se puede explicar teniendo en cuenta que los organismos más viejos tienden a tener conchas más anchas y pesadas debido a que han tenido más tiempo para acumular material ( $\text{CaCO}_3$ ) y se encuentran más reparadas y erosionadas del periostraco y de la capa calcítica debido a que han estado durante más

tiempo expuestas al rigor del medio ambiente. Es importante mencionar que la proporción longitud:altura no aparece con una carga alta en este componente, lo cual confirmaría que no es un buen indicador de edad. Las proporciones ancho:alto, ancho:longitud y peso:longitud son proporciones alométricas, a diferencia de la longitud:altura que es una proporción isométrica. Esto significa que en las proporciones alométricas una variable cambia mientras que la otra se mantiene casi constante. Sin embargo la longitud y la altura varían proporcionalmente, lo que significa que al detenerse el crecimiento del mejillón esta proporción ya no brinda información acerca de la edad del organismo.

En el segundo componente se observa que el índice de condición tiene una gran influencia sobre la variación del Cd en el tejido blando, presentando este índice una correlación negativa con este componente. El segundo componente representa a aquellos factores ambientales (salinidad, temperatura, productividad primaria, etc.) y bióticos (edad, estado reproductivo, etc.) que tienen influencia en la condición del tejido blando. Esto se ve reflejado en una pérdida o ganancia en el peso corporal, lo cual implica un cambio en la concentración de Cd en el organismo. Si el peso de los organismos estuvo influenciado por factores ambientales, es posible que en la zona de muestreo hubiera diferentes microhábitats. Las condiciones anteriores implicarían que no todos los organismos estuvieron expuestos a las mismas condiciones, aunado a la diferencia en las razones de crecimiento ya explicadas. Lobel *et al.* (1989) mencionan que inclusive en una zona de muestreo reducida se pueden presentar diferentes microhábitats, con lo cual no todos los mejillones están recibiendo la misma dieta ni el mismo tiempo de exposición al agua de mar. Esto podría explicar por qué no todos los organismos con una proporción ancho:alto por abajo de 0.900 presentaron concentraciones altas de Cd.

El tercer componente refleja las variables que influyen en la concentración de Cd en la concha. Se observa que las variables alométricas peso:longitud y ancho:alto tienen cargas altas lo cual indica que la edad relativa del organismo tiene influencia sobre la concentración de Cd en la concha. Sin embargo, la carga más alta se presentó en la proporción longitud:altura. Esta proporción refleja algunas condiciones bajo las que están

creciendo los organismos. Los mejillones que tienden a ser más largos que altos como es el caso de los organismos de este estudio, tienen una razón de crecimiento rápida y se encuentran en sustratos con una alta densidad de organismos. Una alta densidad representa una restricción física para un crecimiento a lo alto en los mejillones (Seed, 1968). Los mejillones que tienen las proporciones más elevadas de longitud:altura posiblemente indican que había más organismos a su alrededor y por lo tanto una mayor competencia para obtener alimento. Al tener menos acceso al alimento filtraron menos agua (Thompson y Bayne, 1979; Janssen y Scholz, 1972; Borchardt, 1985) y por lo tanto acumularon menos Cd. Es importante mencionar que los mejillones del 31 de julio presentaron la mayor altura promedio de todos los días (Anexo I), lo cual podría indicar que no tenían una restricción para crecer a lo alto (menor densidad) y por lo tanto tuvieron una menor competencia para obtener alimento por lo que filtraron más agua y acumularon una mayor concentración de Cd. Se cree que las concentraciones altas de Cd que se observaron el 31 de julio fueron debido al metabolismo rápido que estos organismos poseían, aunado a condiciones favorables que se presentaron en el lugar en donde estaban localizados (alimento, tiempo de exposición al agua, baja densidad, etc.).

Las concentraciones más altas de Cd se encontraron en el tejido blando, seguido de la capa aragonítica de la concha y luego en el agua de mar (Tabla VIII). Esto coincide con lo que han reportado Szefer y Szefer (1985) que mencionan que la concentración de metales en el tejido blando de algunos bivalvos ha sido, en ciertos casos, hasta 100,000 veces más alto que en el agua de mar. Sturesson (1978) reporta que la concentración en la capa aragonítica de *M. edulis* fue 100 veces más alta que en el agua de mar. Aunque el Cd no tiene ninguna función biológica en los tejidos de los moluscos, presenta un comportamiento similar al  $Zn^{+2}$  por lo que puede sustituir a este último metal y concentrarse más en el tejido que en la concha (Babukutty y Chacko, 1992). *M. californianus* es un concentrador de Cd (Tabla VIII) lo cual es una ventaja sobre el análisis del agua de mar cuyo tratamiento es más difícil debido a que hay que preconcentrar, con lo que se corre el riesgo de contaminar la muestra .

La edad aproximada de los organismos que se recolectaron durante 26 días fue de alrededor de 3 años (Tabla IX). Los organismos más jóvenes fueron los del 31 de julio, algunos de ellos con una edad aproximada de menos de un año y medio. Esto sugiere fuertemente que los organismos del 31 de julio tuvieron un metabolismo más alto que influyó, junto con otros factores, sobre su cinética de asimilación del Cd. Se cree que la edad de los mejillones del 28 de julio fue mayor a la que se estimó, ya que la mayor parte de los organismos de este día presentaron una erosión extrema del periostraco y capa calcítica (27 de las 30 valvas) lo cual se vio reflejado en una pérdida de material. El método de Griffin *et al.* (1980) se basa en la estimación del peso de la concha y en el área que ésta posee, con lo que es posible una subestimación de la edad en conchas muy erosionadas. Los organismos del 5 de agosto, según el método de Griffin *et al.* (1980) fueron los de la edad más avanzada. Sin embargo este resultado se debió a la presencia de un organismo de aproximadamente 7 años en el grupo, lo cual aumentó el promedio. En ausencia de este organismo los mejillones del 28 de julio hubieran sido los más viejos.

La diferencia de edad entre el organismo más joven (1.4 años) y el más viejo (6.6 años) fueron 5 años, sin embargo los 780 organismos recolectados fueron estrictamente escogidos en un intervalo de longitud de 6.41 a 7.22 cm (menos de un cm de diferencia). Bourgoin (1990) recolectó 45 organismos (*M. edulis*) de aproximadamente 6.5 cm de longitud y encontró que había organismos de 5 a 13 años (8 años de diferencia). En algunos programas de monitoreo de mejillones (*e.g.* Status and Trends y Mussel Watch Program) se ha hecho la suposición de que organismos en el mismo intervalo de tamaño tienen aproximadamente la misma edad. Sin embargo, en estudios realizados por Bourgoin (1990), Lobel *et al.* (1991) y en el trabajo presente se ha observado que la longitud no es un parámetro muy confiable para seleccionar organismos de edad aproximada.

El método de Griffin *et al.* (1980) aunque es más sencillo que otros métodos para calcular la edad de los organismos, puede ser tedioso cuando se analiza una gran cantidad de valvas, como ocurrió en este estudio (125 conchas). Se recomienda que en el caso de tener muchas conchas se calcule la proporción peso:longitud (en el caso de tener una sola

zona de muestreo) y el ancho:alto. Con estas proporciones se podrían calcular los valores extremos y determinar con éstos la edad por el método de Griffin *et al.* (1980), lo cual permitiría saber la diferencia cronológica que existió en los organismos recolectados.

En la Tabla X se observa que la edad del organismo está correlacionada con todas las variables, excepto con la altura la cual ya se ha explicado que pudiera tener más relación con la densidad de los organismos en un sustrato. La proporción peso:longitud fue la que presentó la correlación más alta con la edad del organismo, sin embargo, hay que considerar que las variables utilizadas en esta proporción y en la estimación de la edad por el método del grosor de la concha son similares (peso de la concha/cm y peso de la concha/cm<sup>2</sup>, respectivamente). La proporción peso:longitud es útil para hacer comparaciones de la edad relativa y de razones de crecimiento entre las conchas de una misma zona de muestreo, como fue el caso de este estudio. Sin embargo, no se recomienda esta proporción para hacer comparaciones con conchas de otras zonas como el submareal o de otra localidad, debido a que la longitud de las conchas varía de un lugar a otro de acuerdo a las condiciones limitantes del medio. La erosión de las conchas es otra variable que hay que tomar en cuenta en el momento de la colecta ya que presentó una correlación significativa con la edad del organismo (Tabla X), además de presentar una carga alta en el componente que asoció aquellas variables indicadoras de la edad relativa del organismo en el Análisis de Componentes Principales (Tabla VII).

En los programas de monitoreo de contaminación como la Status and Trends y Mussel Watch Program se han utilizado mejillones (*M. edulis* y *M. californianus*) de diferentes localidades con un intervalo de longitud de concha de 5 a 8 cm bajo la suposición de que iban a tener la misma edad (Lauenstein *et al.*, 1990). En este trabajo se ha visto que no es recomendable utilizar solamente la longitud como un indicador relativo de la edad. En otros trabajos como los de Lobel *et al.* (1990, 1991) se ha mencionado que no es recomendable utilizar la longitud de las conchas para hacer comparaciones entre diferentes localidades ni entre diferentes especies. En este estudio se aconseja utilizar conchas que no estén erosionadas de la capa calcítica además de tomar organismos con

conchas que tengan un ancho similar y longitudes en un mismo intervalo. Sin embargo, las condiciones ambientales que se presentan en la zona intermareal donde se recolectan los organismos es muy variable aún en un espacio muy reducido, con lo que no es posible recolectar una cantidad considerable de organismos que presenten características uniformes. Una buena opción para disminuir la variabilidad en las concentraciones de Cd tanto en el tejido blando como en la capa aragonítica, debido a las diferencias de edad y a la exposición de condiciones ambientales diferentes, sería el utilizar mejillones cultivados que sean de una misma cohorte. Este método traería la ventaja de que todos los organismos tendrían la misma edad además de haber estado expuestos a las mismas condiciones ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno, alimentación). Estos mejillones podrían ser transplantados a zonas en las que se sospecha que hay una posible fuente de contaminación y se monitoriarían durante un tiempo determinado.

## VI. CONCLUSIONES

1. La capa aragonítica de la concha presentó una menor variabilidad en la concentración de Cd en comparación con el tejido blando, se propone a esta capa como una buena alternativa como indicador ambiental a mediano plazo.

2. La edad de los organismos influyó en las concentraciones de Cd en la capa aragonítica, los organismos más jóvenes y por lo tanto con un metabolismo más rápido presentaron las concentraciones más elevadas.

3. En este estudio se encontró que la longitud de la concha no es el mejor indicador de la edad relativa del organismo. Las medidas de la concha tales como el ancho, peso, erosión y las proporciones alométricas peso:longitud y ancho:alto se asociaron en mayor grado con la edad del organismo.

## LITERATURA CITADA

- Al-Aasm, I.S., J.D. Clarke y B.J. Fryer. 1998. Stable isotopes and heavy metal distribution in *Dreissena polymorpha* (Zebra Mussels) from western basin of Lake Erie, Canada. *Environmental Geology*. 33: 122-129.
- Babukutty, Y. y J. Chacko. 1992. Trace Metals in an Estuarine Bivalve from the Southwest Coast of India. *Ambio*. 21 (4): 292-296.
- Bertine, K.K. y E.D. Goldberg. 1972. Trace elements in clams, mussels and shrimp. *Limnology and Oceanography*. 17 (6): 877-884.
- Bourgoin, B.P. 1988. A rapid and inexpensive technique to separate the calcite and nacreous layers in *Mytilus edulis* shells. *Mar. Envir. Res.* 25: 125-129.
- Bourgoin, B.P. 1990. *Mytilus edulis* shell as a bioindicator of lead pollution: considerations on bioavailability and variability. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 61: 253-262.
- Borchardt, T. 1983. Influence of food quantity on the kinetic of cadmium uptake and loss via food and sea water in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 76: 67-76.
- Borchardt, T. 1985. Relationships between carbon and cadmium uptake by *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 85: 233-244.
- Boyden, C.R. 1977. Effect of size upon metal content of shellfish. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 57: 675-714.

- Bruland, K.W., K. Bertine, M. Koide y E.D. Goldberg. 1978. Cadmium in northeast Pacific waters. *Limnol. Oceanog.* 23(4): 618-625.
- Chow, T.J., H.G. Snyder y C.B. Synder. 1976. Mussels (*Mytilus* sp.) as an indicator of lead pollution. *Sci. Total Environ.* 6: 55-63.
- Coleman, N. 1980. The effect of Emersion on Cadmium Accumulation by *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 11: 359-362.
- Cossa, D. 1989. A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanologica Acta.* 12 (4): 417-432.
- Crenshaw, M. 1980. Mechanisms of Shell Formation and Dissolution. Cap. 3. En: *Skeletal Growth of Aquatic Organisms*. Plenum Press, New York. 115-132.
- Dodd, J.R. 1964. Environmentally controlled variation in the shell structure of a palecy pod species. *Journal of Paleontology.* 38 (6): 1065-1071.
- Eaton, A.D. 1976. Marine geochemistry of cadmium. *Mar. Chem.* 4: 141-154.
- Gordon, M., G.A. Knauer y J.H. Martin. 1980. *Mytilus californianus* as a bioindicator of trace metal pollution: variability and statistical considerations. *Mar. Pollut. Bull.* 11: 195-198.
- Griffin, J.J., M. Koide, V. Hodge y E.D. Goldberg. 1980. Estimating the ages of mussels by chemical and physical methods. *Isotope Marine Chemistry.* 193-209.

- Jansen, H.H. y N. Scholz. 1979. Uptake and Cellular Distribution of Cadmium in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 55: 133-141.
- Koide, M., D.S. Lee y E.D. Goldberg. 1982. Metal and transuranic records in mussel shells, byssal threads and tissues. *Estuar. coast. Shelf Sci.* 15: 679-695.
- Lares, M.L. 1988. Variabilidad temporal del Cd y Hg biodisponible en una región de surgencias. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, México. 99 pp.
- Lares, M.L. 1995. Mussels as indicators of cadmium and lead in the marine environment. Ph.D. Thesis. University of British Columbia, Canada. 153 pp.
- Lares, M.L. y K.J. Orians. 1997. Natural Cd and Pb variations in *Mytilus californianus* during the upwelling season. *Sci. Total Environ.* 197: 177-195.
- Lauenstein, G.G., A. Robertson y T. P. O'connor. 1990. Comparison of trace metal data in mussels and oysters from a mussel watch programme of the 1970s with those from a 1980s programme. *Marine pollution bulletin.* 21(9): 440-447.
- Laws, E.A. 1993. Metals. Cap. 12. En: *Aquatic Pollution an introductory text*. Wiley-Interscience. 611 pp.
- Lobel, P.B. y D.A. Wright. 1982. Total Zinc Concentration and Allometric Growth Ratios in *Mytilus edulis* Collected from Different Shore Levels. *Marine Biology*. 66: 231-236.
- Lobel, P.B., S.P. Belkhode, S.E. Jackson. y H.P. Longerich. 1989. A universal method for quantifying and comparing the residual variability of element concentrations

in biological tissues using 25 elements in the mussel *Mytilus edulis* as a model. *Marine Biology*. 102: 513-518.

Lobel, P.B., S.P. Belkhode y H.P. Longerich. 1990. Recent Taxonomic Discoveries Concerning the Mussel *Mytilus*: Implications for biomonitoring. 19: 508-512.

Lobel, P.B., C.D. Bajdik, S.P. Belkhode, S.E. Jackson y H.P. Longerich. 1991. Improved Protocol for Collecting Mussel Specimens Taking into Account Sex, Size, Shell Shape, and Chronological Age. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 409-414.

Manahan, S.E. 1990. Water pollution. Cap.7. En: *Environmental chemistry*. Lewis Publishers. 612 pp.

NAS (National Academy of Sciences). 1980. *The International Mussel Watch*. U.S. National Academy of Sciences, Washington, D.C. 248 pp.

Nie, N.H., D.H. Bent y C.H. Hull. 1970. *Statistical package for the social sciences*. McGraw-Hill, San Francisco. 343 pp.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1975. *Cadmium and the Environment: Toxicity, Economy, Control*. Paris. 88 pp.

Ouellette, T.R. 1981. Seasonal Variation of Trace-metals in the Mussel *Mytilus californianus*. *Environmental Conservation*. 8 (1): 53-58.

Phillips, D.J.H. 1980. *Quantitative Aquatic Biological Indicators*. Applied Sc. Publish. Ltd. London, U.K. 488 pp.

- Phillips, D.J.H. 1983. Trace metals of toxicological significance to man in Hong Kong seafood. *Environ. Pollut. Ser.* 27-45.
- Pitts, L.C. y G.T. Wallace. 1994. Lead Deposition in the Shell of the Bivalve, *Mya arenaria*: an Indicator of Dissolved Lead in Seawater. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 39: 93-104.
- Riisgard, H.U., E. Bjornestad y F. Mohlenberg. 1987. Accumulation of cadmium in the mussel *Mytilus edulis*: Kinetics and importance of uptake via food and seawater. *Mar. Biol.* 96: 349-353.
- Ritz, D.S., R. Swain y N.G. Elliot. 1982. Use of the mussel *Mytilus edulis planulatus* (Lamarck) in monitoring heavy metal levels in seawater. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 33: 491-506.
- Schettler, G. y J.G. Pearce. 1996. Metal pollution recorded in extinct *Dreissena polymorpha* communities, Lake Brietling, Havel Lakes system, Germany: a laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry study. *Hydrobiología* 317: 1-11.
- Scholz, N. 1980. Accumulation, loss and molecular distribution of cadmium in *Mytilus edulis*. *Helgolander Meeresunters.* 33: 68-78.
- Seed, R. 1968. Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. *J. mar. biol. Ass.* 48: 561-584.
- Sturesson, U. 1976. Lead enrichment in shells of *Mytilus edulis*. *Ambio* 5: 253-256.
- Sturesson, U. 1978. Cadmium enrichment in shell of *Mytilus edulis*. *Ambio*: 7: 122-125.

- Suchanek, T.H. 1981. The Role of Disturbance in the Evolution of Life History Strategies in the Intertidal Mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Oecología* 50: 143-152.
- Szefer, P. y K. Szefer. 1985. Occurrence of Ten Metals in *Mytilus edulis* L. and *Cardium glaucum* L. from the Gdansk Bay. 16 (11): 446-450.
- Thompson, R.J. y B.L. Bayne. 1972. Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* l. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* 9: 111-124.
- Thomson, R.E., B.M. Hickey y P.H. Leblond. 1989. The Vancouver Island Coastal Current: Fisheries Barrier and Conduit. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 108: 265-296.
- Watabe, N. 1965. Studies on shell formation XI. Crystal-matrix relationships in the inner layers of mollusk shells. *J. Ultrastruct. Res.* 12: 351-370.
- Wilbur, K.M. y A.S.M. Saleuddin. 1983. Shell formation. En: *The Mollusca Physiology*. Vol.4. Ed. K.M. Wilbur, Academic Press, NY. 235-287 pp.
- Wittman, G. 1981. Toxic metals. Cap. B. En: *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. U. Forstner y G.T.W. Wittmann (Eds.) Berlin Springer-Verlag. 486 pp.
- Yamagata, N., y I. Shigematsu. 1970. Cadmium pollution in perspective. *Bull Inst. Publ. Health.* 19: 1-27.

**ANEXO I.** Medidas de la concha . Cada dato representa el promedio de 10 mejillones.

	longitud	altura	ancho	peso
	cm	cm	cm	g
<b>26 Jul / 91 -1</b>	6.77	2.97	2.95	15.71
2	6.64	2.98	2.63	16.49
3	6.51	2.87	2.61	15.91
<b>27 Jul / 91 -1</b>	6.84	2.96	2.62	15.74
2	6.75	2.97	2.61	16.11
3	6.53	2.89	2.62	15.12
<b>28 Jul / 91-1</b>	6.73	2.9	2.96	18.14
2	6.87	2.89	2.74	18.77
3	6.6	2.81	2.71	19.49
<b>29 Jul / 91-1</b>	6.65	2.9	2.71	17.74
2	6.74	3.03	2.58	17.03
3	6.69	3.15	2.67	16.52
<b>30 Jul / 91-1</b>	6.54	2.86	2.58	16.55
2	6.41	2.87	2.65	16.7
3	6.57	2.97	2.72	15.95
<b>31 Jul / 91-1</b>	6.98	3.11	2.69	16.51
2	6.72	3.06	2.56	14.36
3	6.94	3.17	2.69	15.83
<b>1 Agosto/ 91-1</b>	6.85	2.94	2.69	16.58
2	6.87	3.07	2.7	16.32
3	7.08	3.23	2.71	17.32
<b>2 Agosto / 91-1</b>	6.99	3.21	2.73	18.11
2	6.77	3.07	3	16.33
3	7.03	3.03	2.69	16.58
<b>3 Agosto / 91-1</b>	6.99	3.11	2.52	15.65
2	6.81	3.02	2.68	15.56
3	6.95	3.04	2.6	15.37
<b>4 Agosto / 91-1</b>	7.04	3.12	2.7	18.01
2	7.27	3.09	2.93	21.54
3	6.87	3.03	2.74	17.55
<b>5 Agosto / 91-1</b>	7.23	2.96	2.99	21.71
2	7.14	3.04	2.78	20.95
3	7.01	3.08	2.66	17.41
<b>6 Agosto / 91-1</b>	6.8	2.93	2.66	17.72
2	6.84	2.94	2.63	17.23
3	6.88	2.94	2.72	17.98
<b>9 Agosto / 91-1</b>	7	2.95	2.78	18.06
2	6.65	2.89	2.62	15.9
3	7.06	2.89	2.77	18.66

**ANEXO I.** (continuación)

	<b>longitud</b> cm	<b>altura</b> cm	<b>ancho</b> cm	<b>peso</b> g
<b>10 Agosto/91-1</b>	6.75	2.99	2.7	17.27
2	6.65	2.95	2.63	16.74
3	6.49	2.88	2.62	16.66
<b>11 Agosto / 91-1</b>	6.74	3.01	2.74	17.18
2	6.61	3.04	2.69	16.7
3	6.42	2.95	2.56	14.17
<b>12 Agosto/ 91-1</b>	6.61	3.03	2.58	14.57
2	6.41	2.96	2.52	14.77
3	6.75	2.93	2.71	17.28
<b>13 Agosto/91-1</b>	6.81	3.03	2.81	17.9
2	7.05	2.93	2.85	19.09
3	6.88	2.89	2.79	16.9
<b>14 Agosto / 91-1</b>	6.94	3.02	2.69	16.76
2	7.1	3.06	2.84	18.62
3	6.96	3.07	2.77	19.13
<b>15 Agosto / 91-1</b>	6.73	3.07	2.74	16.36
2	6.72	3.04	2.66	16.89
3	6.72	3.07	2.6	15.47
<b>16 Agosto / 91-1</b>	6.82	3.06	2.73	16.97
2	6.8	2.98	2.59	15.39
3	7.17	3.15	2.74	17.59
<b>17 Agosto / 91-1</b>	6.55	2.86	2.53	15
2	6.84	3.03	2.62	15.5
3	6.61	2.93	2.65	15.49
<b>18 Agosto / 91-1</b>	6.91	3.01	2.75	17.18
2	6.65	3.02	2.62	17.05
3	7.06	3.03	2.74	17.92
<b>19 Agosto / 91-1</b>	6.65	3.03	2.57	14.8
2	6.95	3.08	2.77	17.87
3	6.78	3.07	2.58	14.83
<b>20 Agosto / 91-1</b>	7.06	3.16	2.82	20.18
2	7.22	3.03	2.83	19.8
3	7.04	3.06	2.78	18.55
<b>21 Agosto / 91-1</b>	6.93	3.04	2.72	17.96
2	6.94	2.88	2.78	18.91
3	6.87	2.97	2.7	18.94
<b>22 Agosto / 91-1</b>	6.89	3.1	2.68	15.55
2	6.93	2.95	2.61	15.78
3	7	3.06	2.76	18.16

**ANEXO II.** Proporciones de la concha. Cada dato representa el promedio de 10 mejillones. I C significa índice de condición.

	ancho/alto	peso/long g/cm	long/altura	anch/long	I C mg/cm <sup>3</sup>
<b>26 Jul / 91 -1</b>	0.993	2.32	2.28	0.436	18.38
2	0.883	2.48	2.23	0.396	27.29
3	0.909	2.44	2.27	0.401	23.99
<b>27 Jul / 91 -1</b>	0.885	2.30	2.31	0.383	25.64
2	0.879	2.39	2.27	0.387	28.67
3	0.907	2.32	2.26	0.401	24.88
<b>28 Jul / 91-1</b>	1.021	2.70	2.32	0.440	21.12
2	0.948	2.73	2.38	0.399	25.73
3	0.964	2.95	2.35	0.411	30.84
<b>29 Jul / 91-1</b>	0.934	2.67	2.29	0.408	20.28
2	0.851	2.53	2.22	0.383	20.31
3	0.848	2.47	2.12	0.399	19.37
<b>30 Jul / 91-1</b>	0.902	2.53	2.29	0.394	23.62
2	0.923	2.61	2.23	0.413	26.05
3	0.916	2.43	2.21	0.414	25.44
<b>31 Jul / 91-1</b>	0.865	2.37	2.24	0.385	26.03
2	0.837	2.14	2.2	0.381	26.59
3	0.849	2.28	2.19	0.388	23.49
<b>1 Agosto / 91-1</b>	0.915	2.42	2.33	0.393	20.49
2	0.879	2.38	2.24	0.393	22.83
3	0.839	2.45	2.19	0.383	19.69
<b>2 Agosto / 91-1</b>	0.850	2.59	2.18	0.391	22.20
2	0.977	2.41	2.21	0.443	19.57
3	0.888	2.36	2.32	0.383	21.47
<b>3 Agosto / 91-1</b>	0.810	2.24	2.25	0.361	21.72
2	0.887	2.28	2.25	0.394	20.86
3	0.855	2.21	2.29	0.374	20.39
<b>4 Agosto / 91-1</b>	0.865	2.56	2.26	0.384	16.02
2	0.948	2.96	2.35	0.403	17.32
3	0.904	2.55	2.27	0.399	16.31
<b>5 Agosto / 91-1</b>	1.010	3.00	2.44	0.414	19.85
2	0.914	2.93	2.35	0.389	18.89
3	0.864	2.48	2.28	0.379	19.15
<b>6 Agosto / 91-1</b>	0.908	2.61	2.32	0.391	19.43
2	0.895	2.52	2.33	0.385	19.85
3	0.925	2.61	2.34	0.395	20.18
<b>9 Agosto / 91-1</b>	0.942	2.58	2.37	0.397	22.99
2	0.907	2.39	2.3	0.394	21.45
3	0.958	2.64	2.44	0.392	22.29

**ANEXO II.** (continuación)

	ancho/alto	peso/long	long/alt	anch/long	I C
	g/cm				mg/cm <sup>3</sup>
<b>10 Agosto/91-1</b>	0.903	2.56	2.26	0.400	20.00
2	0.892	2.52	2.25	0.395	21.71
3	0.910	2.57	2.25	0.404	24.91
<b>11 Agosto / 91-1</b>	0.910	2.55	2.24	0.407	24.11
2	0.885	2.53	2.17	0.407	24.05
3	0.868	2.21	2.18	0.399	19.80
<b>12 Agosto/ 91-1</b>	0.851	2.20	2.18	0.390	22.84
2	0.851	2.30	2.17	0.393	23.63
3	0.925	2.56	2.3	0.401	24.44
<b>13 Agosto/91-1</b>	0.927	2.63	2.25	0.413	19.66
2	0.973	2.71	2.41	0.404	20.55
3	0.965	2.46	2.38	0.406	20.01
<b>14 Agosto / 91-1</b>	0.891	2.41	2.3	0.388	22.17
2	0.928	2.62	2.32	0.400	23.66
3	0.902	2.75	2.27	0.398	20.95
<b>15 Agosto / 91-1</b>	0.893	2.43	2.19	0.407	25.26
2	0.875	2.51	2.21	0.396	24.11
3	0.847	2.30	2.19	0.387	24.98
<b>16 Agosto / 91-1</b>	0.892	2.49	2.23	0.400	24.05
2	0.869	2.26	2.28	0.381	25.34
3	0.870	2.45	2.28	0.382	24.89
<b>17 Agosto / 91-1</b>	0.885	2.29	2.29	0.386	20.89
2	0.865	2.27	2.26	0.383	20.81
3	0.904	2.34	2.26	0.401	21.82
<b>18 Agosto / 91-1</b>	0.914	2.49	2.3	0.398	20.11
2	0.868	2.56	2.2	0.394	22.43
3	0.904	2.54	2.33	0.388	23.37
<b>19 Agosto / 91-1</b>	0.848	2.23	2.19	0.386	19.70
2	0.899	2.57	2.26	0.399	20.24
3	0.840	2.19	2.21	0.381	20.30
<b>20 Agosto / 91-1</b>	0.892	2.86	2.23	0.399	23.37
2	0.934	2.74	2.38	0.392	21.48
3	0.908	2.63	2.3	0.395	20.71
<b>21 Agosto / 91-1</b>	0.895	2.59	2.28	0.392	21.99
2	0.965	2.72	2.41	0.401	22.14
3	0.909	2.76	2.31	0.393	21.60
<b>22 Agosto / 91-1</b>	0.865	2.26	2.22	0.389	19.92
2	0.885	2.28	2.35	0.377	22.11
3	0.902	2.59	2.29	0.394	24.36

**ANEXO III.** Concentraciones de Cd en tejido blando (Lares, 1997)  
y la capa aragonítica.

<b>Fecha</b>	<b>Cd tejido ppm</b>	<b>Cd concha ppb</b>	<b>Fecha</b>	<b>Cd tejido ppm</b>	<b>Cd concha ppb</b>
<b>26 Jul / 91 -1</b>	7.17	13.31	<b>10 Agosto/91-1</b>	6.1	20.77
2	5.05	20.56	2	5.23	28.17
3	6.22	25.96	3	4.94	18.93
<b>27 Jul / 91 -1</b>	4.82	30.31	<b>11 Agosto / 91-1</b>	4.9	19.25
2	4.82	49.65	2	4.46	33.92
3	4.52	34.20	3	4.73	35.21
<b>28 Jul / 91-1</b>	6.91	23.64	<b>12 Agosto/ 91-1</b>	4.59	35.38
2	6.12	19.54	2	4.56	23.26
3	4.88	19.96	3	4.53	13.90
<b>29 Jul / 91-1</b>	7.41	33.05	<b>13 Agosto/91-1</b>	8.38	31.20
2	6.64	33.51	2	7.79	27.64
3	7.2	33.55	3	7.23	13.57
<b>30 Jul / 91-1</b>	7.05	26.39	<b>14 Agosto / 91-1</b>	7.94	22.61
2	5.89	18.42	2	8.27	26.87
3	5.15	18.81	3	5.88	43.24
<b>31 Jul / 91-1</b>	4.6	54.70	<b>15 Agosto / 91-1</b>	5.97	58.08
2	3.61	49.30	2	4.3	31.81
3	4.55	69.02	3	4.57	26.16
<b>1 Agosto / 91-1</b>	5.68	21.50	<b>16 Agosto / 91-1</b>	5.08	9.66
2	5.59	17.42	2	4.95	15.72
3	4.85	13.38	3	4.22	21.44
<b>2 Agosto / 91-1</b>	5.58	20.52	<b>17 Agosto / 91-1</b>	5.52	38.99
2	5.69	24.49	2	4.96	33.06
3	4.89	28.62	3	4.95	30.53
<b>3 Agosto / 91-1</b>	5.01	37.94	<b>18 Agosto / 91-1</b>	6.12	36.90
2	4.53	18.10	2	5.42	29.39
3	4.45	12.63	3	4.57	33.44
<b>4 Agosto / 91-1</b>	9.82	34.06	<b>19 Agosto / 91-1</b>	6.57	24.43
2	10.02	19.03	2	5.12	21.62
3	8.92	34.10	3	4.69	16.81
<b>5 Agosto / 91-1</b>	6.57	25.74	<b>20 Agosto / 91-1</b>	6.17	27.59
2	6.87	19.71	2	7.62	37.60
3	6.65	9.76	3	5.73	13.07
<b>6 Agosto / 91-1</b>	7.54	24.87	<b>21 Agosto / 91-1</b>	4.41	22.08
2	5.85	28.87	2	5.81	16.34
3	5.87	23.81	3	5.77	19.00
<b>9 Agosto / 91-1</b>	5.71	22.75	<b>22 Agosto / 91-1</b>	5.6	33.68
2	6.91	16.97	2	5.07	28.94
3	7.21	14.76	3	5.51	19.76

**ANEXO IV.** Número de conchas colectadas que presentaron reparaciones a más del 50 % de su superficie interna.

<b>Día</b>	<b>Conchas reparadas</b>
26 Julio	10
27 Julio	13
28 Julio	17
29 Julio	9
30 Julio	11
31 Julio	7
1 Agosto	9
2 Agosto	8
3 Agosto	1
4 Agosto	5
5 Agosto	4
6 Agosto	2
9 Agosto	8
10 Agosto	8
11 Agosto	4
12 Agosto	11
13 Agosto	17
14 Agosto	8
15 Agosto	0
16 Agosto	7
17 Agosto	4
18 Agosto	3
19 Agosto	2
20 Agosto	6
21 Agosto	11
22 Agosto	4