

**Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada**



**INCORPORACION DE Cd EN LA CAPA NACAROSA  
DE LA CONCHA DE *Mytilus californianus***

**TESIS  
MAESTRIA EN CIENCIAS**

**LOURDES QUIROZ QUIROZ**

**ENSENADA, B. C., AGOSTO DEL 2000.**



TESIS DEFENDIDA POR

**Lourdes Quiroz Quiroz**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



**Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes**

*Director del Comité*



**Dra. Bertha Lavániegos Espejo**

*Miembro del Comité*



**M.C. Ma. Elena Solana Arellano**

*Miembro del Comité*



**Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra**

*Miembro del Comité*



**Dr. Jaime Farber Lorda**

*Jefe del Departamento de Ecología*



**Dr. Federico Graef Ziehl**

*Director de Estudios de Posgrado*

25 de agosto de 2000

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE  
ENSENADA

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA

INCORPORACIÓN DE Cd EN LA CAPA NACAROSA DE LA CONCHA DE  
*Mytilus californianus*

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO

EN CIENCIAS presenta:

LOURDES QUIROZ QUIROZ

Ensenada, Baja California, México. Agosto 2000.

RESUMEN de la tesis de LOURDES QUIROZ QUIROZ presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Agosto del 2000.

INCORPORACIÓN DE Cd EN LA CAPA NACAROSA DE LA CONCHA DE  
*Mytilus californianus*

Resumen aprobado por:



---

Dra. Ma. Lucila del Carmen Lares Reyes  
Directora de Tesis

En este estudio se evaluó la incorporación de Cd en la capa nacarosa de la concha de *Mytilus californianus* después de una exposición a diferentes concentraciones de este metal por 60 días. Mejillones de talla similar (5 a 6 cm) fueron colocados en 29 acuarios utilizando ocho como control y los restantes para los diferentes tratamientos. Éstos consistieron en adiciones diarias de Cd con concentraciones de 1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (medio "estable") y en adicionar cada tercer día concentraciones de 2, 5 y 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (medio "variable"). Los acuarios fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura, luz y oxígeno, efectuando recambios diarios de agua y alimentación con una mezcla de *Chaetoceros* sp. e *Isochrysis* sp., con la finalidad de obtener un crecimiento máximo y mantener el sistema en condiciones adecuadas. El incremento del largo y alto de la concha de los organismos se evaluó en diferentes tiempos (7, 14, 30, 45 y 60 días) resultando significativo para ambas variables. Los organismos del control permitieron estimar la proporción de la franja calcítica de las valvas, necesaria para estimar el crecimiento de la capa nacarosa y determinar así el tamaño de muestra para el análisis de Cd. Dicha franja, mantuvo una proporción de 0.1 respecto a la longitud total en el intervalo de talla estudiado. De lo anterior se calculó que la proporción depositada en la capa nacarosa fue de 0.9 respecto al crecimiento total del mejillón. El crecimiento promedio de la capa nacarosa fue de 1.08 mm en los 60 días del bioensayo. Se efectuaron mediciones adicionales en organismos de tallas diferentes (4 a 8 cm). La proporción (0.1) se mantuvo en las tallas mayores. Sin embargo, para la talla de 4.00 a 4.99 se encontró que la proporción de la franja calcítica fue de 0.09. Los resultados de las concentraciones de Cd de la capa nacarosa para el control fue de 32  $\text{ng Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ . Para los medios estables (10 y 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) las concentraciones fueron de 128 y 161  $\text{ng Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Estos fueron los únicos que mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en referencia a todos los demás tratamientos. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la capa nacarosa de la concha de *Mytilus californianus* puede ser un indicador más de contaminación de Cd en el ambiente.

Palabras claves: Cadmio, Cd, capa nacarosa, *Mytilus californianus*, indicador de contaminación.

ABSTRACT of the Thesis that LOURDES QUIROZ QUIROZ, presented as partial requirement to obtain the degree of MASTER IN SCIENCES in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México. August 2000.

Cd INCORPORATION IN THE NACREOUS LAYER OF *Mytilus californianus* SHELL.

In this study the Cd incorporation in the nacreous layer of the shell of *Mytilus californianus* daily to Cd concentrations of 1, 5, 10, and 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ("stable environment") and every other day to concentrations of 2, 5, and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ("variable environment") was evaluated after a 60 day exposure. Mussels of 5-6 cm length were placed into 29 different aquariums (8 control and 21 experimental) with three replicates for each concentration formerly mentioned. The aquariums were under controlled temperature, light, and oxygen conditions. Water was changed daily and the food offered was a mixture of *Chaetoceros* sp. and *Isochrysis* sp., in order to maintain a healthy system. At different times (7, 14, 30, 45, and 60 days), height and length of the mussel shells were measured observing significant increases in both. It was possible to calculate the proportion of the calcitic stripe in the valves, required to assess the nacreous layer growth and establish the sample size for the Cd analysis. This stripe maintained a 0.1 proportion of the total length of the valve in the mussels class studied. The proportion of the nacreous layer was 0.9 of the total mussel growth. The average growth of the nacreous layer was 1.08 mm during the 60 days of the bioassay period. Additional measurements were made in organisms of different sizes (4-8 cm) to verify the 0.1 proportion parameter obtained in this work. It was found that in the 4-5 cm size range the calcitic stripe proportion was 0.09. The Cd concentration in the nacreous layer for control was 32 ng Cd $\cdot\text{L}^{-1}$ . For organisms in the stable (10 and 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) environments, the concentration was 128 y 161 ng Cd $\cdot\text{L}^{-1}$  respectively. The stable environments were the only ones that showed significant differences ( $p < 0.05$ ) in relation to the rest of the treatments. The results of this study indicate that the nacreous layer of *Mytilus californianus* could be another Cd pollution indicator of the environment.

Key words: Cadmium, Cd, nacreous layer, *Mytilus californianus*, contamination indicator.

## DEDICATORIA

A Rosy, Jesús y Marina

Por la fortaleza brindada.

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Lucila Lares.

A los miembros del comité de tesis, M.C. Ma. Elena Solana, Dra. Bertha Lavaniegos y Dra. Pilar Saavedra.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la M. C. Anamaría Escofet y Marina Mondragón por el apoyo brindado.

A todos mis profesores compañeros amigos y aquellos que de algún modo participaron en la elaboración de este trabajo.

## CONTENIDO

|  | Página |
|--|--------|
| I INTRODUCCIÓN   | 1      |
| I.1 ANTECEDENTES                                       | 4      |
| I.1.1 Crecimiento de <i>Mytilus californianus</i>      | 4      |
| I.1.2 Formación de la concha                           | 4      |
| I.1.3 Cadmio   | 6      |
| I.1.4 Indicadores biológicos                           | 8      |
| I.2 OBJETIVOS  | 10     |
| II MATERIALES Y MÉTODOS                                | 11     |
| II.1 Área de colecta                                   | 11     |
| II.2 Periodo de aclimatación                           | 12     |
| II.3 Producción de microalgas                          | 14     |
| II.4 Periodo de inoculación de Cd                      | 15     |
| II.5 Evaluación del crecimiento de la capa aragonítica | 16     |
| II.5.1 Medición de la longitud de la franja calcítica  | 17     |
| II.5.2 Medición de la franja calcítica en otras tallas | 18     |
| II.6 Análisis químico de Cd                            | 20     |
| II.7 Control de calidad                                | 22     |
| II.8 Análisis de agua de mar                           | 23     |
| II.9 Equipo de detección de Cd                         | 23     |
| II.10 Procesamiento estadístico de los datos           | 25     |

## CONTENIDO (Continuación)

|  | Página |
|--|--------|
| III RESULTADOS   | 27     |
| III.1 SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO  | 27     |
| III.1.1 Organismos del control   | 27     |
| III.1.2 Organismos seleccionados por máximo crecimiento                                    | 30     |
| III.2 PROPORCIÓN DE LA LONGITUD DE LA FRANJA CALCÍTICA CON<br>RESPECTO A LA LONGITUD TOTAL | 32     |
| III.2.1 Organismos de la talla estudiada (5 a 6 cm)  | 32     |
| III.2.2 Organismos de otras tallas   | 32     |
| III.3 CONCENTRACIÓN DE Cd EN LA CAPA NACAROSA DE LA<br>CONCHA                              | 35     |
| IV DISCUSIÓN   | 38     |
| V CONCLUSIONES   | 47     |
| LITERATURA CITADA  | 49     |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | <p>A) Corte transversal mostrando las diferentes capas de la concha del mejillón.</p> <p>B) Flujo de iones a través del epitelio del manto para la mineralización de la concha del mejillón (Figuras tomadas de Wilbur y Saleuddin, 1983).</p>  | 7      |
| 2      | <p>Sistema experimental utilizado para <i>Mytilus californianus</i>, distribuidos en un arreglo en canastas de plástico suspendidas (A), dentro de cubetas blancas de 20 L de capacidad. En el esquema se indica (B) la distribución de organismos para diferentes tiempos de muestreo. En el sistema experimental (C) se indican los tratamientos de cadmio utilizados (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>) en un medio con concentraciones estables "E" (1, 5, 10 y 20 <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>) y un medio de concentración variable "V" (2, 5 y 10 <math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>).</p> | 13     |
| 3      | <p>Puntos estándar de las mediciones de la franja calcítica de <i>Mytilus californianus</i>.</p> <p>A = Punto de mayor longitud, es decir, donde comienza la formación de la franja calcítica hacia el borde de la valva.</p> <p>B = Punto donde finaliza la formación del músculo abductor y comienza la formación de la franja calcítica hacia el borde de la valva.</p>  | 19     |
| 4      | <p>Incremento promedio y error estándar de la longitud de la concha de <i>Mytilus californianus</i> en diferentes tiempos (7, 14, 30, 45 y 60 días) de cultivo (organismos del control).</p>  | 29     |
| 5      | <p>Incremento promedio y error estándar de la altura de la concha de <i>Mytilus californianus</i> en diferentes tiempos (7, 14, 30, 45 y 60 días) de cultivo (organismos del control).</p>  | 29     |
| 6      | <p>Incremento promedio y error estándar de la longitud de la concha de <i>M. californianus</i> de los organismos seleccionados por presentar el mayor incremento al final del experimento. Los números que describen los tratamientos, representan las distintas concentraciones de Cd a las que fueron expuestos los organismos y las letras indican la forma en la que fueron proporcionadas dichas concentraciones: E= Medio Estable, V= Medio Variable y C= Control.</p>  | 31     |

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 7      | Incremento promedio y error estándar de la altura de la concha de <i>M. californianus</i> de los organismos seleccionados por presentar el mayor incremento al final del experimento. Los números que describen los tratamientos, representan las distintas concentraciones de Cd a las que fueron expuestos los organismos y las letras indican la forma en la que fueron proporcionadas dichas concentraciones: E= Medio Estable, V= Medio Variable y C= Control. | 31     |
| 8      | Proporción media y error estándar de la longitud de la franja calcítica respecto a la longitud total de <i>M. californianus</i> en organismos del control de 5 a 6 cm.  | 33     |
| 9      | Proporción media y error estándar a partir de la cicatriz del músculo abductor respecto a la longitud de la concha de <i>M. californianus</i> en organismos del control de 5 a 6 cm.  | 33     |
| 10     | Proporción media y error estándar de la longitud de la franja calcítica respecto a la longitud total de <i>M. californianus</i> en otras tallas.  | 34     |
| 11     | Concentración (media $\pm$ error estándar) de Cd en la capa nacarosa de la concha de <i>M. californianus</i> expuestos a diferentes medios y concentraciones de este metal en el agua; el círculo vacío representa el medio estable y el círculo relleno representa el medio variable.  | 37     |

## LISTA DE TABLAS

| Tabla |  | Página |
|-------|--|--------|
| I     | Crecimiento (media $\pm$ 1.0 desviación estándar) del largo y alto de la concha de <i>M. californianus</i> después de 7, 14, 30, 45 y 60 días de cultivo (N=30 en todos los casos).  | 28     |
| II    | Concentración media y desviación estándar de Cd en la capa nacarosa de la concha de <i>M. californianus</i> en diferentes tratamientos. Los números de las concentraciones de Cd del agua de mar, representan las distintas concentraciones a las que fueron expuestos los organismos y las letras indican los medios de concentración: C= control, E= medio estable y V= medio variable.  | 36     |
| III   | Comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls de la concentración de Cd en la capa nacarosa de la concha de <i>M. californianus</i> en diferentes tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ). Las diferentes concentraciones de Cd a las que fueron expuestos los organismos están representadas por los números y los medios de concentración: C= control, E= medio estable y V= medio variable, son indicados con las letras. Los valores resaltados representan los las comparaciones significativas. | 36     |

# INCORPORACIÓN DE Cd EN LA CAPA NACAROSA DE LA CONCHA DE *Mytilus californianus*

## I INTRODUCCIÓN

La capa nacarosa de la concha de los mejillones ha sido considerada como una alternativa de indicador de metales biodisponibles en el ambiente (Bourgoin, 1990). Esta capa, es la única que no está expuesta al medio exterior y por tanto, solo contiene los metales asimilados por el organismo, funcionando así como un almacén histórico del ambiente en que crece el molusco (Sturesson, 1978; Bourgoin, 1990).

Esta capa es una estructura formada en el interior de la concha, constituida por láminas cristalinas que forman una pared uniforme, las cuales, incrementan el tamaño de la concha de los bivalvos (Wilbur y Yonge, 1964). La secreción de la concha es a través del epitelio del manto el cual produce el fluido extrapaleal que contiene componentes biominerales (*e.g.*,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , moléculas orgánicas, metales traza) que forman la pared durante el crecimiento (Bourgoin, 1990).

Autores como Sturesson (1978) y Bourgoin (1990), han propuesto el uso de la capa nacarosa de más reciente formación como un indicador más fiel de los niveles de metales del ambiente. Sturesson (1978) estudió el contenido de Pb y Cd en las tres capas (periostraco, prismática o calcítica y nacarosa o aragonítica) de la concha de *Mytilus edulis*, observando que existe una linealidad entre los niveles de los metales, particularmente del Cd, en el agua y la capa aragonítica de la concha. Consecuentemente, Bourgoin (1990) utilizó solo la capa nacarosa eliminando el periostraco y la capa prismática para el análisis de Pb, encontrando una fuerte correlación de los niveles de este metal en dicha capa con las concentraciones obtenidas en el tejido blando de *Mytilus edulis*.

Estudios sobre la concentración de los metales en la concha de *M. californianus* son escasos. Koide *et al.* (1982) analizaron la concha de este organismo y no encontraron una relación entre la concentración de los metales en la concha y el tejido blando. Diversos autores (Koide *et al.*, 1982; Nolan y Dahlgaard, 1991; Fisher *et al.*, 1996) han observado la concentración de Cd en la concha de otras especies del género *Mytilus* encontrando gran variabilidad, debido a que han utilizado toda la concha al realizar sus análisis. La aparente variabilidad descrita en los estudios anteriores, se debe a que se ha incluido en los análisis al periostraco y a la capa prismática (Babukutty y Chacko, 1992). El periostraco introduce variabilidad debido a que se encuentra en contacto directo con el agua de mar. La capa prismática también presenta variabilidad debido a que en ocasiones el periostraco se encuentra erosionado y permite el contacto de esta capa con el medio exterior. Por lo que, otros autores (Sturesson, 1978; Bourgoin, 1990) han separado las capas de la concha obteniendo resultados más fieles que pueden representar al ambiente.

Los escasos estudios sobre variabilidad natural, acumulación y/o cinética de metales en el mejillón *M. californianus* que han sido realizados (Young y Folsom, 1967; Griffin *et al.*, 1980; Ouellette, 1981; Koide *et al.*, 1982; Lares, 1988; Lares, 1995; Lares y Orians, 1997), proponen continuar con investigaciones que aclaren los diferentes patrones de acumulación entre algunas de las especies del género *Mytilus*. Por ejemplo, Griffin *et al.* (1980) observaron que esta especie presenta diferente grado de acumulación de  $^{210}\text{Po}$  en el tejido blando que *M. edulis*. Por su parte, Lares (1995) observó un comportamiento cinético diferente entre *M. trossulus* y *M. californianus* en cuanto a su capacidad para liberar Cd después de haber sido expuestos a concentraciones altas de este metal. Lo anterior sugiere que las especies del género *Mytilus* responden de manera diferente a las variaciones de Cd en el ambiente. Sin embargo, programas de seguimiento sistemático de la contaminación

como el del “Mussel Watch” propuesto por Goldberg en los 70’s (Goldberg *et al.*, 1978) no tomaron en cuenta dichas diferencias por haber sido poco estudiadas y consideraron que las especies de *Mytilus* podrían incluirse como “equivalentes”, bajo el supuesto de que presentarían similitudes en la cinética de asimilación y liberación de metales. Sin embargo estas especies presentan diferencias y es importante efectuar estudios sobre la incorporación de Cd a la concha de *M. californianus* y no considerar que los resultados reportados para otras especies representan la cinética de esta especie.

El tejido blando de *M. californianus* se ha utilizado como herramienta en estudios de bioacumulación de metales desaprovechando el potencial de la concha como acumulador. Ouellette (1981) estudió la variabilidad estacional de seis metales traza en el tejido blando de *M. californianus*, detectando un incremento en la concentración de Cd durante la primavera debido a eventos de surgencias. Así mismo, Lares (1988) detectó concentraciones de Cd en *M. californianus* cuatro veces más altas en junio (cuando las surgencias son más intensas) que en febrero. Además, concluyó que la fracción disuelta del Cd fue la que determinó la incorporación de este elemento en el tejido blando de *M. californianus*. Existen diversos factores de variabilidad que influyen significativamente en la incorporación de metales en el tejido blando que incluyen: la condición fisiológica, la razón de crecimiento, la edad, el sexo, la madurez, el tamaño, la variación estacional y la condición reproductiva (Nolan y Dahlgaard, 1991). En cambio, la aparente variabilidad de la concentración de metales en la composición de la concha puede deberse a fallas en la técnica de análisis químico, especialmente si el periostraco ha sido incluido (Babukutty y Chacko, 1992). El uso de estructuras como la capa nacarosa de la concha de *M. californianus* es una alternativa para el seguimiento de metales en el ambiente, debido a que presenta una menor variabilidad inherente que el tejido blando (Bourgoin, 1990) y que

las capas restantes de la concha del mejillón (Sturesson, 1978).

En este estudio se evalúa la factibilidad de utilizar la capa nacarosa de la concha de *M. californianus* como un indicador de contaminación por Cd, experimentando con diferentes formas de exposición al metal. Esto es, efectuando adiciones diarias (medio estable) o cada tercer día (medio variable) de diferentes concentraciones del metal.

## I.1 ANTECEDENTES

### I.1.1 Crecimiento de *Mytilus californianus*

La tasa de crecimiento en los mejillones, es regulada por varios factores, como la cantidad y naturaleza del alimento, producción y secreción de gametos, temperatura del agua y concentración de oxígeno (Jorgensen, 1976). El crecimiento de *M. californianus* depende de la cantidad de alimento disponible y de la altura de marea (Coe y Fox, 1942). Se ha reportado que este mejillón crece más lentamente que otros (*e.g.*, *M. edulis*) pero alcanzan mayor longitud que otras especies del mismo género (Coe y Fox, 1942; Jorgensen, 1976; Suchanek, 1981).

En La Jolla California, se ha reportado que a temperaturas de 17 a 19 °C, *M. californianus* obtuvo su máximo crecimiento (2 a 5 mm·mes<sup>-1</sup>) en la zona submareal (Coe y Fox, 1942). Behrens Yamada y Peters (1988) encontraron que este mejillón en el intermareal de las costas de Oregon, de marzo a noviembre, creció de 0.6 a 1.7 mm·mes<sup>-1</sup> en tallas de 2 a 4 cm, además de que el crecimiento es más rápido cuando el mejillón está continuamente sumergido que cuando está expuesto al aire por varias horas (Behrens Yamada y Dunham, 1989).

### I.1.2 Formación de la concha

La concha de los bivalvos está formada de cristales de carbonato de calcio absorbidos en una matriz orgánica, la secuencia de los componentes estructurales que lo conforman (Fig. 1 A) son: el periostraco, la capa prismática o calcítica y la capa nacarosa o aragonítica (Wilbur y Yonge, 1964; Simkiss y Wilbur, 1977; Wilbur y Saleuddin, 1983; Bourgoïn, 1990).

El periostraco es una delgada capa cuticular formada de material orgánico que cubre el doblez interior del borde del manto y la superficie de la concha. La capa calcítica está compuesta de filamentos de material calcáreo unido en su interior por una sola estructura de matriz orgánica (conchiolina) que se encuentra presente entre las láminas de los cristales. Dicha capa se encuentra formada entre el periostraco y la capa nacarosa. La capa nacarosa se forma en la parte interior de la concha, es espesa en la región media y delgada en los bordes, su estructura consiste en una serie de lamelas delgadas con lugares irregulares colocadas una sobre de otras en línea horizontal a la superficie de la concha, similar a la formación de una pared (Wilbur y Yonge, 1964; Simkiss y Wilbur 1977; Bourgoïn, 1990).

Las capas calcítica y nacarosa tienen grandes cantidades de matriz orgánica la cual es importante para la formación de los cristales. La mayor proporción de las proteínas secretadas a la concha, están presentes entre los cristales de carbonato de calcio (Simkiss y Wilbur, 1977). Lo anterior se debe al manto, que es un órgano delgado localizado en el interior de la superficie de la concha, y es el responsable de la secreción de la matriz orgánica y de la depositación de cristales en la concha (Wilbur y Yonge, 1964; Simkiss y Wilbur 1977; Bourgoïn, 1990). La secreción de la concha ocurre a través del espacio extrapaleal, donde el epitelio del manto secreta el fluido extrapaleal, que contiene los componentes de la biomineralización ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , moléculas orgánicas, conchiolina,

metales traza) (Krampitz y Graser, 1988).

El sistema de formación de la concha, puede ser descrito como un proceso celular de transporte iónico, secreción y síntesis de proteínas y una serie de procesos físico-químicos en donde los cristales de  $\text{CaCO}_3$  son nucleados y orientados, los cuales crecen en íntima asociación con la secreción de la matriz orgánica (Krampitz y Graser, 1988).

Para entender el proceso de formación de la concha en la Fig. 1 B, se presenta un esquema el cual incluye: el medio exterior, la sangre y tejido, el fluido extrapaleal (entre el manto y la superficie interior de la concha), la concha y dos epitelios.

El epitelio corporal permite la asimilación de iones del medio exterior a la sangre, los cuales fluyen al epitelio del manto. De ahí se transfiere  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y otros iones de la sangre a los compartimentos del fluido extrapaleal, al mismo tiempo que son secretados componentes orgánicos (Wilbur y Saleuddin, 1983). El tejido del cuerpo provee una porción de  $\text{HCO}_3^-$  y puede estar envuelto en otras actividades metabólicas relacionadas a la síntesis de compuestos orgánicos (proteínas, mucopolisacáridos, etc.) de la concha. Durante la depositación de iones a ésta, el transporte neto de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{HCO}_3^-$  puede ser bidireccional a la mineralización de la superficie de la concha, es decir, que un proceso de depositación de iones y solubilización esté ocurriendo en la superficie interior de la concha (Wilbur y Saleuddin, 1983), en el cual, el  $\text{CaCO}_3$  actúa como una fuente de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{HCO}_3^-$ , dirigiéndose estos últimos a otras partes del cuerpo y del medio exterior.

### I.1.3 Cadmio

El Cd es miembro del mismo grupo de la tabla periódica al que pertenece el Zn y el Hg, los cuales comparten ciertas propiedades físico-químicas. La alta toxicidad del Cd en el

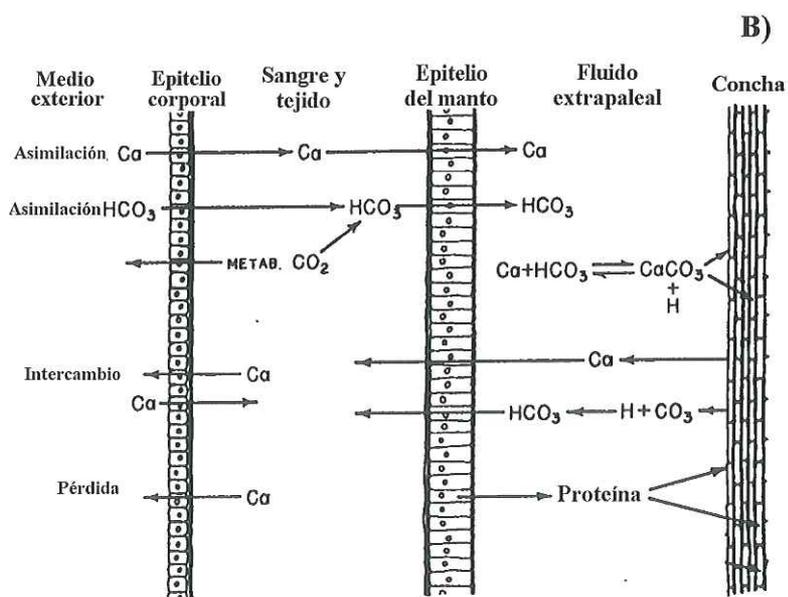
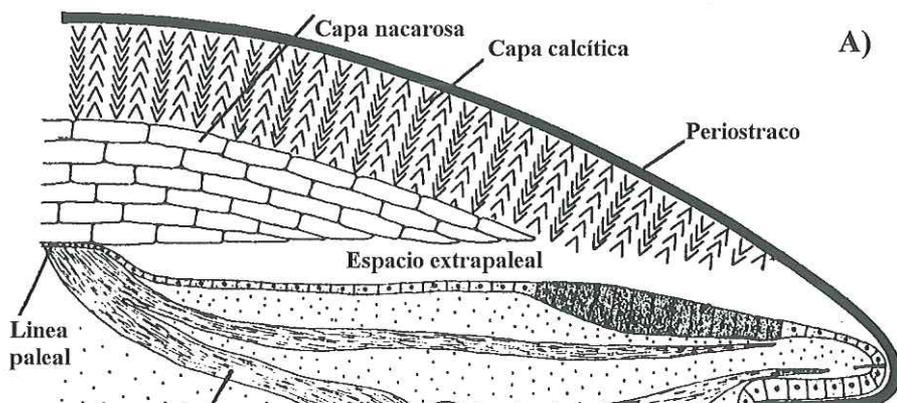


Figura 1. A) Corte transversal mostrando las diferentes capas de la concha del mejillón. B) Flujo de iones a través del epitelio del manto para la mineralización de la concha del mejillón (Figuras tomadas de Wilbur y Saleuddin, 1983).

tejido blando es debida a la similitud en su estructura atómica con el Zn. Este metal puede ser reemplazado por el Cd en sitios activos de las metaloenzimas. Además, cualquier ion Cd puede unirse a los grupos sulfhidrilos de las enzimas afectando, por ejemplo, la fosforilación oxidativa en el ciclo respiratorio (Wittmann, 1981). En cambio, en la concha el Cd es incorporado como un cristal más o en la matriz orgánica sin causar ninguna alteración en el crecimiento del organismo. El  $\text{Cd}^{+2}$  y el  $\text{Ca}^{+2}$  tienen un radio iónico similar lo que permite que el  $\text{Cd}^{+2}$  reemplace al  $\text{Ca}^{+2}$  en la formación de la concha del mejillón conforme incrementa su tamaño (Bourgoin, 1990).

El periodo de vida media del Cd en la concha, es del orden de miles de años, (Sturesson, 1978) lo que le confiere una capacidad de registro de metales del ambiente. En seres humanos, el periodo de vida media del Cd es de 16 a 33 años (FAO/WHO, 1972) los efectos conocidos incluyen daño al hígado, al riñón y problemas gastrointestinales, así como su depositación en huesos, que en casos severos puede causar enfermedades como la osteoporosis o la llamada itai-itai (osteomalacia) (Friberg *et al.*, 1974; Laws, 1993).

En el agua de mar la concentración del Cd aumenta de manera natural, por eventos de surgencias (Ouellette, 1981; Lares, 1988) y de forma artificial, por procesos tales como el galvanizado, colorantes, manufactura de plásticos de vinyl, baterías de níquel-cadmio, a través de la atmósfera y la hidrósfera (Goldberg, 1976).

#### **I.1.4 Indicadores biológicos**

El término bioindicador es utilizado para describir una especie que denota un efecto ecológico por simple presencia o ausencia de la misma. Indicador biológico denota los grados de cambios ecológicos por respuestas fisiológicas o bioquímicas, como un cambio en la razón de crecimiento o respiración (Phillips y Rainbow, 1993).

Las especies ideales para ser utilizadas como bioindicadores ambientales deben de reunir ciertos criterios: deben ser sedentarias, fáciles de identificar, abundantes, tener larga vida y estar disponibles para su colecta durante todo el año, deben proporcionar suficiente cantidad de tejido para un análisis, ser resistentes al estrés causado por el manejo en el laboratorio en estudios de cinética de metales y/o por transplatación en el campo. Deben ser tolerantes a las variaciones ambientales como la salinidad y ser acumuladores netos del metal, de manera que presenten una correlación entre su concentración en el tejido blando y la concentración disponible en el ambiente en un periodo de tiempo dado (Rainbow, 1995). Los organismos comúnmente empleados en programas de seguimiento como indicadores biológicos incluyen a los bivalvos del género *Mytilus*, por tener la capacidad de soportar altas concentraciones de metales traza y otros contaminantes del medio que los circunda (Ouellette, 1981). Sin embargo, es difícil eliminar la variabilidad intraespecífica que presentan estos organismos para poder realizar estudios de laboratorio. Se requiere controlar distintas variables, por lo que actualmente se prefiere especializar los indicadores y utilizar solo un órgano o estructura del organismo.

El uso de estructuras como la capa nacarosa de la concha de *M. californianus* es una alternativa para el seguimiento de metales en el ambiente, el único requisito que debe reunir es que la concha no esté dañada o perforada (Bourgoin, 1990).

## I.2 OBJETIVOS

- 1) Determinar la incorporación de Cd en la parte más reciente de la capa nacarosa de la concha de *Mytilus californianus* sujeta a diferentes niveles de exposición de este metal.
- 2) Comparar la incorporación de Cd en la parte más reciente de la capa nacarosa de la concha de *Mytilus californianus*, después de estar expuestas a un medio de concentración estable de Cd y a uno de concentración variable.

## I.3 HIPÓTESIS

- 1) Se espera encontrar un aumento en la concentración de Cd en la capa nacarosa más reciente, conforme se aumente la concentración de este metal en el medio.
- 2) Debido a la capacidad de *Mytilus californianus* de liberar Cd del tejido blando y a que el flujo de iones hacia la capa nacarosa de la concha es a través del manto, se espera encontrar mayor incorporación de Cd en la capa nacarosa más reciente de la concha en el medio estable que en el medio variable.

## II MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1 Área de colecta

El mejillón *Mytilus californianus* se distribuye a lo largo de las costas del Pacífico desde Alaska, E.U.A. hasta Bahía Magdalena Baja California Sur, México. La presencia de la corriente de California es el fenómeno de mayor influencia en estas costas y se caracteriza por tener un flujo de agua hacia el sur, de aproximadamente 300 km de ancho, entre las latitudes 48° a 23° N, siendo común la formación de meandros y remolinos (Berstein *et al.*, 1977) en donde las aguas del subártico convergen con las ecuatoriales. Estas aguas frías de baja salinidad, son alteradas por eventos de surgencias, prevalecientes desde mediados de febrero hasta finales de julio. Las corrientes de aguas superficiales son predominantemente paralelas a la costa, con direcciones noreste-sureste. El clima en estas costas es mediterráneo (Carlucci *et al.*, 1986).

Las colectas de mejillones fueron realizadas en la saliente conocida como Punta Cabras (31° 20' N - 116° 27' W), la cual cuenta con un área extensa de mantos de mejillones. El sustrato del área es rocoso y escarpado con numerosas grietas y canales arenosos. Es una zona de alta energía de oleaje que provoca intensa mezcla en la columna de agua aún a niveles de 5 a 10 m de profundidad. La temperatura superficial del agua de mar es mínima (12 °C) en primavera y máxima (17 °C) en verano (Calderón-Aguilera, 1991). Los valores promedios de salinidad y pH son de 30 ups y 8.03 respectivamente y el oxígeno disuelto fluctúa entre 4.9 y 7.4 ml·L<sup>-1</sup>.

Las colectas se realizaron seleccionando mejillones entre 5 y 6 cm de longitud, del nivel de marea más bajo los días 4 y 6 de noviembre de 1998. Estas colectas se efectuaron manualmente utilizando un cuchillo de acero inoxidable teniendo cuidado de no arrancar el

bisus del músculo de los mejillones. Los organismos fueron colocados en bolsas y transportados a las instalaciones del Departamento de Acuicultura, del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) en hieleras de plástico con bolsas de sílica gel congelado. Posteriormente, fueron colocados en estanques con agua de mar previamente aireada después de enjuagarlos con agua de mar para remover la materia orgánica y los posibles organismos adheridos. La selección de los 435 organismos se llevó a cabo con base en la condición de la concha, es decir, que no se observaran reparaciones y/o perforaciones por epibiontes. Posteriormente fueron pesados con una balanza analítica y medidos en su longitud y altura con un vernier digital con precisión de 0.1 mm. Los organismos seleccionados fueron colocados en grupos de 15 individuos en canastas suspendidas para evitar el contacto con las heces, distribuidos en 29 cubetas blancas de plástico con 15 L de agua de mar previamente aireada, filtrada e irradiada. Las cubetas fueron divididas en: Organismos del control (8) Organismos del medio estable (12) Organismos del medio variable (9) (Fig. 2).

## II.2 Periodo de aclimatación

Después de la distribución de los organismos en el sistema experimental, los mejillones tuvieron 7 días de aclimatación en agua de mar filtrada e irradiada, suministrando aireación y temperatura constante (18 a 19 °C). El pH se mantuvo entre 8.0 y 8.2, la salinidad entre 35 y 36 ups y el oxígeno se mantuvo entre 5 y 7 ml·L<sup>-1</sup>. Los cambios de agua y el lavado de cubetas se realizaron diariamente; asimismo, los organismos fueron alimentados diariamente con cultivos fitoplanctónicos (*Isochrysis* sp. y *Chaetoceros* sp.).

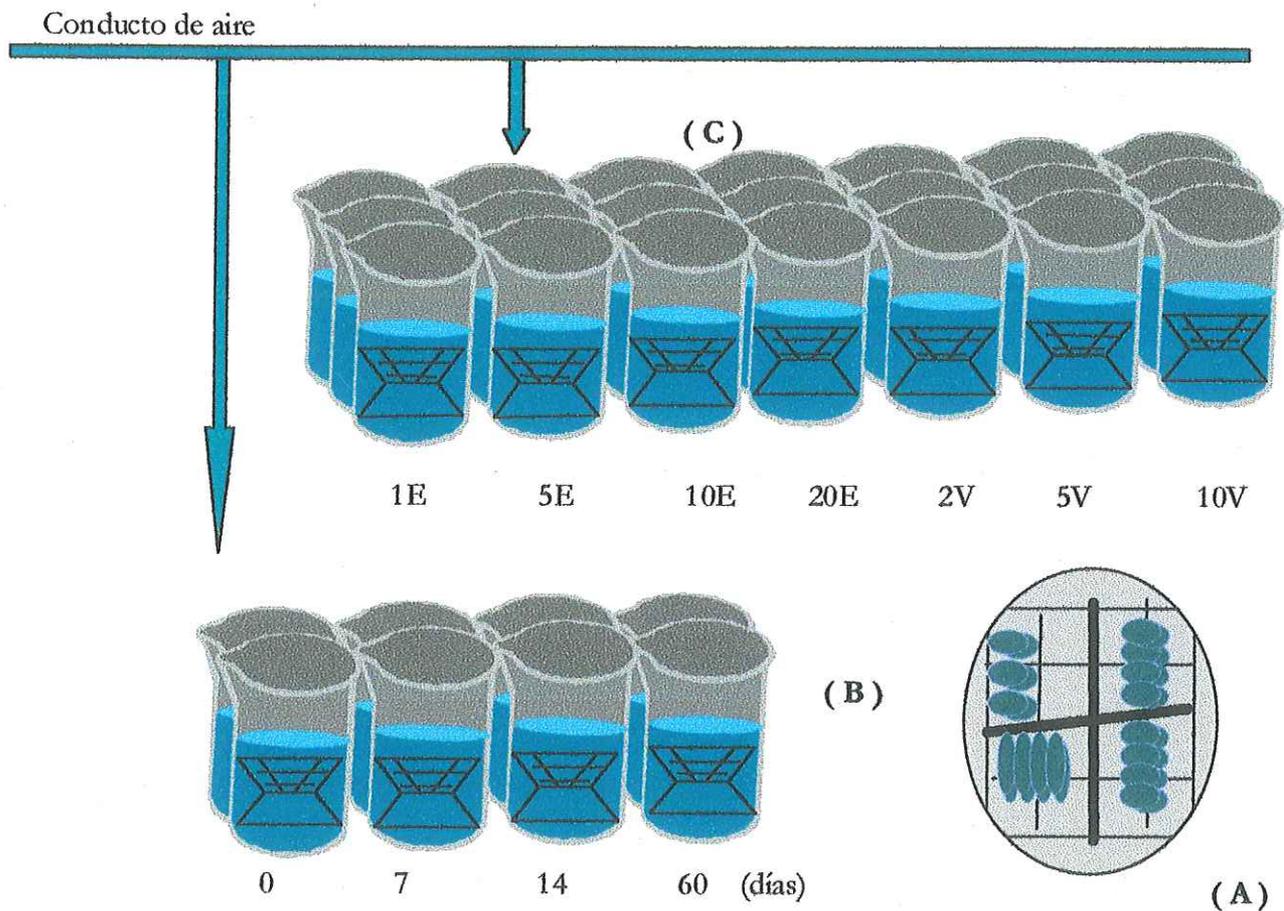


Figura 2. Sistema experimental utilizado para *Mytilus californianus*, distribuidos en un arreglo en canastas de plástico suspendidas (A), dentro de cubetas blancas de 20 L de capacidad. En el esquema se indica (B) la distribución de organismos para diferentes tiempos de muestreo. En el sistema experimental (C) se indican los tratamientos de cadmio utilizados ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en un medio con concentraciones estables "E" (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y un medio de concentración variable "V" (2, 5 y 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### II.3 Producción de microalgas

Se utilizó como alimento una mezcla de dos especies de microalgas: *Chaetoceros* sp. (Clave CH-X-1) e *Isochrysis* sp. (Clave IS-X-1), las cepas de estas especies fueron obtenidas de la "Colección de Cepas de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE".

Para los cultivos de ambas especies, se utilizó la técnica clásica. Ésta consiste en el uso de recipientes de volumen progresivamente mayor, desde tubo de ensaye de 10 ml, Erlenmeyer 100 ml, Fernbach 2.8 L hasta garrafones de 20 L. Cada especie se mantuvo uniespecíficamente y hasta nivel de Fernbach se utilizaron cultivos estáticos o en "batch", únicamente para obtener una cantidad apropiada de inóculo para los cultivos en garrafón.

El medio de cultivo utilizado, para las dos especies de microalgas, fue el medio "f" de Guillard y Ryther (1962); para los recipientes desde tubo hasta Fernbach, el volumen del medio de cultivo fue esterilizado en una autoclave a 121 °C y 1.05 kg cm<sup>-2</sup>. El agua de mar utilizada para los cultivos en garrafón, fue desinfectada según la técnica descrita por Hemerick (1973), utilizando 3 ml de cloro al 6 % por litro de agua de mar, por un periodo de 24 h y para declorinar el agua, se adicionaron 0.15 g de tiosulfato por litro de agua de mar tratada, además de una abundante aireación.

Para cada especie de microalga, se mantuvieron por triplicado cultivos semicontinuos en garrafones de 20 L de capacidad con 18 L de medio. Se realizó una dilución diaria del 30 % para *Chaetoceros* sp. y 50 % para *Isochrysis* sp. El pH del medio de cultivo se mantuvo entre 7.7 y 8.0 por medio de la adición de CO<sub>2</sub> al sistema de aireación de los cultivos. Del volumen de cultivo cosechado para cada especie, se estimó la concentración celular por medio de un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con

ayuda de un microscopio compuesto. Además, se determinó el peso seco siguiendo la técnica descrita por Sorokin (1973) a partir de submuestras obtenidas por triplicado y estimando un valor promedio para los distintos días de cultivo. Para lo anterior, se concentró un volumen apropiado de cultivo en filtros de fibra de vidrio “Poretics GF/C” de 4.7 cm de diámetro, previamente incinerados en una mufla a 470 °C por 4 h. El peso seco fue determinado por evaluaciones del peso de los filtros mantenidos en una estufa a 60 °C, hasta obtener valores de peso constante. El contenido de cenizas de las muestras se obtuvo por diferencia entre el valor del peso seco constante y el obtenido después de incinerar las muestras en una mufla a 470 °C por 4 h.

La ración de alimento suministrada por día a los mejillones se determinó con base al peso seco de *Chaetoceros* sp. (227.7 µg por 10<sup>6</sup> células) y de *Isochrysis* sp. (289.0 µg por 10<sup>6</sup> células) adicionando una ración del 2 % del peso seco promedio del tejido del organismo. El 50 % de la ración del alimento se suministró en la mañana y el otro 50 % en la tarde, realizando una mezcla de las dos microalgas en una proporción del 70 % para *Isochrysis* sp. y del 30 % para *Chaetoceros* sp.

#### **II.4 Periodo de inoculación de Cd**

Después del período de aclimatación, la inoculación de Cd (Cadmium Atomic Spectroscopy Standard Solution Fluka) fue llevada a cabo durante 60 días. Para los bioensayos del “medio estable” la inoculación de Cd se efectuó diariamente a concentraciones de (1, 5, 10 y 20 µg·L<sup>-1</sup>). Para el “medio variable” las inoculaciones de Cd (2, 5 y 10 µg·L<sup>-1</sup>) fueron intermitentes, es decir, un día se inoculaba y al siguiente se dejaba en agua de mar natural (Fig. 2). Durante el periodo del bioensayo se mantuvo un control,

que consistió en organismos sometidos a las mismas condiciones ambientales y de alimentación excepto que no se les añadió Cd. Diariamente, se llevaban a cabo recambios de agua para eliminar las heces y mantener el sistema en buenas condiciones para el organismo. La temperatura del agua de las cubetas durante este periodo, fluctuó entre los 15 y los 19 °C. El pH en la unidad control se mantuvo entre 8 y 8.2. Para las diferentes inoculaciones de Cd el pH fluctuó entre 7.1 y 8.0 y después de 2 h el pH fue similar al del control. La salinidad se mantuvo en 35 ups y el oxígeno se mantuvo entre 5 y 7 ml·L<sup>-1</sup>. Las anteriores variables fueron medidas con un termómetro con cubierta de teflón, un potenciómetro (Cole Parmer, Vernon Hills ILL) con electrodo sumergible, un refractómetro (Cole Parmer) y un oxímetro (YSI modulo 232) respectivamente.

## II.5 Evaluación del crecimiento de la capa aragonítica

Debido a que el análisis de Cd debía efectuarse sobre la capa aragonítica depositada durante el biensayo, era necesario determinar si el crecimiento de dicha capa había sido suficiente para obtener una muestra adecuada para el análisis. Es evidente, que la capa aragonítica de la concha no crece al mismo ritmo que la capa calcítica, ya que en todas las conchas de los mejillones se puede observar una capa calcítica no cubierta por cristales de aragonita. Sin embargo, si la distancia del borde de la capa aragonítica al borde de la valva (longitud de la franja calcítica, Fig. 3) guarda una proporción constante con respecto a la longitud total (al menos en el rango de talla estudiado), es posible inferir el crecimiento de la capa aragonítica ( $C_{CA}$ ) multiplicando el crecimiento total ( $C_T$ ) por la proporción de la longitud de la capa aragonítica ( $P_{CA}$ ) con respecto a la longitud total ( $L_T$ ). El modelo correspondiente es el siguiente:

$$C_{CA} = C_T \cdot P_{CA},$$

donde  $P_{CA}$  representa la proporción de la longitud de la capa aragonítica con respecto a la longitud total de la concha ( $P_{CA} = L_{CA} \cdot L_T^{-1}$ ).

La medición directa de la capa aragonítica tiene la dificultad de que la concha es cóncava lo que puede inducir a errores en la medición. Debido a esto, resulta más fácil efectuar mediciones de la longitud de la franja calcítica ( $L_{FC}$ , Fig. 3) y calcular la proporción de ésta con respecto a la longitud total ( $P_{FC} = L_{FC} \cdot L_T^{-1}$ ). De esta manera se puede estimar, por diferencia con la unidad, la proporción que guarda la longitud de la capa aragonítica con respecto a la longitud total ( $P_{CA} = 1 - P_{FC}$ ).

El crecimiento total de la concha de los mejillones fue estimado por diferencia del largo de la concha de todos los individuos a los 0 y 60 días de cultivo. Con el fin de determinar el momento de detener el bioensayo, se dio seguimiento al crecimiento de los mejillones durante el periodo de cultivo, midiendo el largo y alto de la concha de 30 individuos, con un vernier de plástico, a los 0, 7, 14, 45 y 60 días de cultivo. Estos organismos, excepto los correspondientes a los 45 días de cultivo, fueron congelados y disectados para efectuar sobre ellos las mediciones de la franja calcítica de su concha.

### II.5.1 Medición de la longitud de la franja calcítica

La longitud de la franja calcítica de la concha de *M. californianus*, fue medida con un microscopio estereoscópico. Para poder visualizar dicha franja, se utilizó una cámara (COHU) que estaba conectada a la pantalla y ésta, a su vez, a una computadora (Macintosh) donde se utilizó el programa IMAGEN. Este programa permitió congelar la imagen y medir con precisión la longitud de dicha franja. El programa fue calibrado utilizando una regla estándar.

A ambas valvas del organismo se les midió la longitud de la franja calcítica, tomando como referencia el lado exterior de la línea paleal, a partir de dos puntos estándar.

Estas dos distancias se midieron de la siguiente manera:

A) Del centro o la parte de mayor longitud, es decir, donde comienza la formación de la franja calcítica hasta el borde de la valva.

B) Donde finaliza la cicatriz del músculo abductor y comienza la formación de la franja calcítica hasta el borde de la valva.

Estos dos puntos sirvieron como patrón para determinar la proporción de la longitud de la franja calcítica respecto a la longitud total (Fig. 3). De esta manera, se pudo calcular el crecimiento de la capa aragonítica a partir del crecimiento total.

### **II.5.2 Medición de la franja calcítica en otras tallas**

A tres grupos de 20 organismos de *M. californianus* con tallas de 4.00 a 4.99, 6.00 a 6.99 y 7.00 a 7.99 cm de longitud, se les midió la longitud de la franja calcítica utilizando el procedimiento arriba mencionado. Ésto, con la finalidad de observar si la proporción de la franja calcítica se mantiene en otras tallas del mejillón.

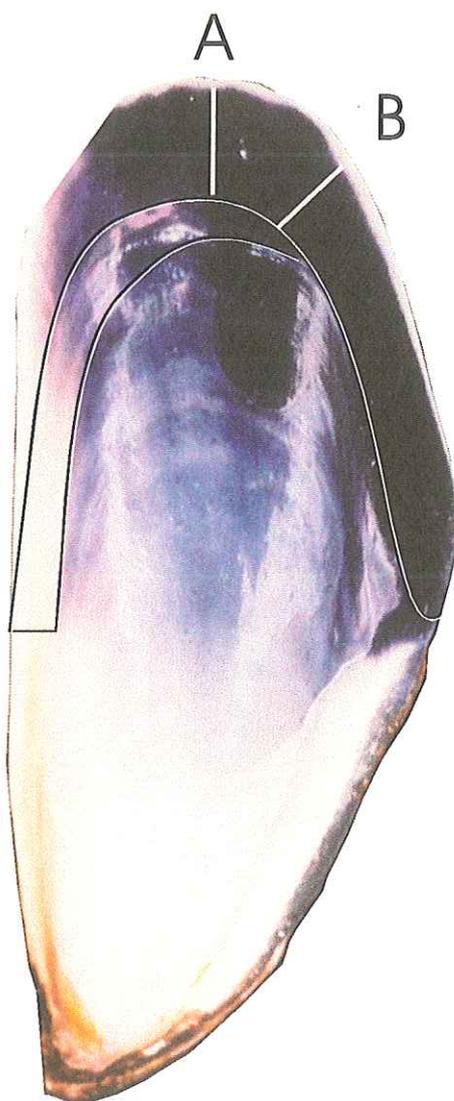


Figura 3. Puntos estándar de la medición de la franja calcítica de *Mytilus californianus*

A= Punto de mayor longitud, es decir, donde comienza la formación de la franja calcítica hasta el borde de la valva.

B= Punto donde finaliza la cicatriz del músculo abductor y comienza la formación de la franja calcítica hasta el borde de la valva.

## II.6 Análisis químico de Cd

El procesamiento de las conchas para la determinación de Cd de la capa nacarosa fue realizado en un laboratorio provisional diseñado para metales pesados en las instalaciones del Departamento de Ecología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La mayoría del material utilizado durante el análisis fue de plástico, el cual fue previamente lavado con una solución de jabónalconox durante 12 h, enjuagado 3 veces con agua destilada y desionizada. Posteriormente fue puesto en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 6 M (grado reactivo) durante 24 h y enjuagado 3 veces con agua destilada y desionizada (DDI). Por último se dejó en una solución de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 1M (grado metal traza) durante 12 h para posteriormente ser enjuagado 3 veces con agua DDI. Después de pasar por este proceso de limpieza el material fue colocado en recipientes de plástico dentro de la estufa a 60 °C durante 12 h para su secado.

La técnica utilizada para extraer la muestra y determinar las concentraciones de Cd de la capa nacarosa fue la desarrollada por Rivero (1999), modificada en el tiempo de exposición al peróxido debido a que las valvas de los organismos utilizados para desarrollar el presente trabajo eran más delgadas. La técnica consistió en tres pasos fundamentales:

### 1) Eliminación del periostraco

- 1- Las valvas, previamente lavadas con agua DDI, fueron colocadas en vasos de precipitados que contenían peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grado reactivo) al 30%. Se utilizaron 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 3 valvas a una temperatura de 80-85 °C durante 10-15 minutos.
- 2- Las valvas se extrajeron del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caliente y se enjuagaron 3 veces con agua DDI para

evitar que el peróxido continuara actuando en la capa nacarosa.

- 3- Se removió rápidamente el periostraco con un cuchillo de acero inoxidable y se volvió a enjuagar 3 veces con agua DDI. Esto con el fin de que no se volviera a adherir el periostraco a la capa calcítica.
- 4- Se enjuagó la zona de interés (capa nacarosa) con  $H_2O_2$  bajo en metales 1M (Fluka Chemika) durante 30 segundos y posteriormente se enjuagó 3 veces con agua DDI. Esto para eliminar el Cd que pudiera ser adsorbido.
- 5- Después de que las valvas quedaron libres del periostraco, se procedió a darles una segunda limpieza quitando, con un cuchillo de acero inoxidable, restos del periostraco para evitar la contaminación por el Cd contenido en éste.

## **2) Separación de la capa nacarosa**

- 1- Cinco valvas fueron colocadas en un recipiente de aluminio seccionado (para evitar contacto entre las conchas) con su respectiva tapa. Cuatro de estos recipientes fueron colocados en una mufla durante 40 min a 350 °C, dejándolos enfriar durante 30 min antes de retirarlos de la mufla. Cada día que se utilizó la mufla se corrió una muestra del material de referencia ( $\cong$  30 mg de  $CaCO_3$  99.995 %, Aldrich Chem Co.), para determinar la posible contaminación por Cd en el proceso de calentamiento de las valvas en la mufla. Este material de referencia fue necesario ya que no existe uno certificado para conchas.
- 2- Posteriormente, la zona de interés para cada espécimen fue separada cuidadosamente en el interior de una caja de acrílico, utilizando una aguja de acero inoxidable previamente lavada con agua DDI.
- 3- Por último, el material de 20 valvas fue colocado en una botella de polietileno de 30 ml

limpia, (previamente pesada y etiquetada) y pesado en una balanza analítica.

### **3) Digestión de la capa nacarosa**

- 1- En el interior de una caja de acrílico se colocaron las botellas destapadas, conteniendo el material de interés, sobre una plancha de calentamiento.
- 2- A cada botella se le agregaron 0.5 ml de ácido clorhídrico (HCl) 6 M bajo en metales (Fisher Chem) y 1 ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 7 M bajo en metales (Fisher Chem) para disolver la muestra.
- 3- Las botellas fueron calentadas a 75 °C (temperatura de la plancha de calentamiento) por un periodo de 6 a 7 h. Para acelerar el proceso de evaporación, se utilizó, además de la plancha una lámpara con foco de 100 watts colocada cerca de la caja de acrílico. Las botellas fueron retiradas en el momento en que se evaporó la solución casi por completo (75 a 85 %).
- 4- Por último, la muestra se diluyó con 1 ml de HNO<sub>3</sub> 1M bajo en metales.
- 5- La solución final fue pesada para posteriormente calcular la concentración de Cd en esta solución.

### **II.7 Control de calidad**

Por cada juego de muestras digeridas se corrió un blanco de digestión para dar seguimiento a la posible contaminación por Cd durante el proceso. Además, se efectuó una prueba de recuperación para saber si se estaba obteniendo todo el Cd después de someter las muestras a dicho proceso. El blanco de digestión fue tratado de la misma manera descrita anteriormente para las muestras excepto que la botella no contenía muestra. Para la prueba de recuperación se colocó una cantidad de carbonato de calcio ultrapuro (CaCO<sub>3</sub> 99.995 %). Se tomó el peso, se agregó 1 ml del subestándar de Cd de 1 ppb y

posteriormente fue tratado de la misma forma que en la digestión de las muestras.

## **II.8 Análisis de agua de mar**

Con el fin de conocer el nivel base de Cd en el agua utilizada para el bioensayo:

- 1- Se tomó 1 L de agua de mar filtrada utilizada en los experimentos en una botella de polietileno (HDPE) previamente lavada con ácido.
- 2- La muestra fue filtrada en una caja de acrílico (previamente limpiada con  $\text{HNO}_3$  bajo en metales), utilizando un filtro de membrana (millipore) de  $0.45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- 3- La muestra fue acidificada agregándole 1 ml de HCl concentrado bajo en metales, y preconcentrada utilizando la técnica de columna con resina de intercambio iónico (Chelex 100). Primeramente la columna de Chelex 100 fue lavada en 6 ml de  $\text{HNO}_3$  2N bajo en metales y 6 ml de agua DDI y el pH ajustado con 6 ml de Buffer de Acetato de Amonio (pH = 6), con un flujo controlado únicamente por gravedad. Posteriormente se virtieron 30 ml de agua de mar, ajustando el pH a 6 con solución de Amonio.
- 4- La elución de la muestra se llevó a cabo con 4 ml de  $\text{HNO}_3$  2N bajo en metales.
- 5- La concentración de Cd en la muestra fue determinada por Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (AAS-GF) (Varian Techtron Ltd. Modelo AA300/400) equipado con un atomizador de tubo de grafito (Varian Techtron GTA-96). Cabe mencionar que junto con las muestras de agua de mar se efectuaron pruebas de recuperación obteniendo un porcentaje de recuperación del 100 %.

## **II.9 Equipo de detección de Cd**

La concentración de Cd de las muestras de la capa nacarosa de la concha, blancos, agua de mar y material de referencia, fueron medidas en un Espectrofotómetro de

Absorción Atómica con Horno de Grafito y corrector de fondo Zeeman. Estas mediciones se efectuaron en el Departamento de Oceanografía de la Universidad de la Columbia Británica de Vancouver, Canadá.

### Programación del espectrofotómetro

| CARACTERÍSTICAS DE PROGRAMACIÓN |                      |
|---------------------------------|----------------------|
| Modo de Instrumento             | absorbancia          |
| Calibración                     | concentración        |
| Modo de medición                | área del pico        |
| Posición de la lámpara          | 1                    |
| Corriente de la lámpara (mA)    | 4                    |
| Ancho de incisión (nm)          | 0.5                  |
| Altura de incisión (nm)         | normal               |
| Ondas (nm)                      | 228.8                |
| Introducción de la muestra      | muestra automezclada |
| Tiempo constante                | 0.05                 |
| Tiempo de medición (s)          | 1                    |
| Réplicas                        | 2                    |
| Corrección                      | on                   |
| Máxima absorbancia              | 0.7                  |

| PARÁMETROS DEL HORNO |                     |               |   |
|----------------------|---------------------|---------------|---|
| Paso No.             | Temperatura<br>(°C) | Tiempo<br>(s) | Flujo del Gas<br>(L·min <sup>-1</sup> ) |
| 1                    | 85                  | 5             | 3                                       |
| 2                    | 95                  | 40            | 3                                       |
| 3                    | 120                 | 10            | 3                                       |
| 4                    | 300                 | 5             | 3                                       |
| 5                    | 300                 | 1             | 3                                       |
| 6                    | 300                 | 2             | 0                                       |
| 7                    | 1800                | 0.8           | 0                                       |
| 8                    | 1800                | 2             | 0                                       |
| 9                    | 1900                | 1             | 3                                       |
| 10                   | 40                  | 13.3          | 3                                       |

## II.10 Procesamiento estadístico de los datos

Con cada serie de datos generados, se hicieron pruebas de homogeneidad de varianzas de Bartlett y de normalidad de Kolmogorov-Smirnov; requisitos necesarios para determinar el tipo de estadística a utilizar (paramétrica o no paramétrica). A los datos de longitud y altura de las conchas obtenidas, que cumplieron los requisitos anteriores, se les aplicó por separado una prueba t-student para muestras dependientes. Esto último, con el fin de encontrar diferencias significativas entre las mediciones iniciales y las mediciones finales en los diferentes tiempos de cultivo (7, 14, 30, 45 y 60 días). Los datos del crecimiento (largo y altura) del mejillón en los diferentes tiempos de muestreo fueron analizados con estadística no paramétrica, dado que no cumplieron con la prueba de normalidad, ni aún cuando se transformaron los datos utilizando logaritmos o raíz cuadrada. En este caso, se aplicó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis para  $K=n$  muestras, aunado a un análisis de comparaciones múltiples de Tukey. Lo anterior, se realizó para conocer si existían diferencias significativas en el crecimiento del largo y alto de la concha respecto al tiempo y poder estimar el momento en el cual se podía detener el bioensayo.

Para los datos de crecimiento (largo y alto) de los organismos seleccionados de cada tratamiento, que presentaron la mayor longitud, se utilizó la prueba estadística ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples de Tukey para datos no paramétricos. Esto, para comprobar al final del experimento las posibles diferencias significativas en el crecimiento para los diferentes tratamientos y el control.

Para los datos de la proporcionalidad de la franja calcítica respecto a la talla, que cumplieron la normalidad y homogeneidad de varianzas, se efectuó, como primer paso, un análisis de varianzas paramétricas de una vía, para conocer si había diferencias significativas de proporcionalidad. Como segundo paso, se realizó un análisis de

comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK) para detectar dónde se encontraban las diferencias. Los mismos análisis estadísticos, fueron aplicados a los datos de concentración de Cd a la capa nacarosa de la concha de *M. californianus*, con la finalidad de conocer si había diferencias significativas entre las concentraciones de Cd de los diferentes medios y saber en cual de los tratamientos se encontraban dichas diferencias. Los análisis anteriores fueron procesados por medio del paquete Statistica, a un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  en todos los casos.

### III RESULTADOS

#### III.1 SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO

##### III.1.1 Organismos del control

La media y la desviación estándar de las mediciones biométricas (largo y alto) de la concha así como los incrementos a diferentes tiempos de cultivo, se muestran en la Tabla I. La longitud y altura de la concha tienen incrementos con respecto al tiempo; la prueba t-student para cada tiempo muestra diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el largo y en el alto de los tiempos iniciales respecto a los finales, a partir del día 7.

Las Figs. 4 y 5 representan el crecimiento promedio del largo y alto de *M. californianus* a diferentes tiempos de cultivo. Los resultados del ANOVA Kruskal-Wallis mostraron diferencias significativas ( $H= 10.4$ ,  $p < 0.05$ ) en el crecimiento del largo de la concha y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tiempo de crecimiento del día 7 con los días 45 y 60 y del día 14 con el 60. El mayor crecimiento del largo de la concha fue de 1.2 mm a los 60 días de cultivo. Las pruebas estadísticas para el crecimiento en la altura de la concha no marcaron diferencias significativas ( $H= 6.67$ ,  $p > 0.05$ ) entre los diferentes tiempos; de cualquier manera se puede observar un incremento en la altura de la concha, del día 7 (0.6 mm) al día 60 (1.1 mm) (Fig. 4).

Tabla I. Crecimiento (media  $\pm$  1.0 desviación estándar) del largo y alto de la concha de *M. californianus* después de 7, 14, 30, 45 y 60 días de cultivo (N=30 en todos los casos).

| Tiempo | Largo (mm) |            |       |            | Crecimiento     |
|--------|------------|------------|-------|------------|-----------------|
| (días) | Inicial    |            | Final |            | (mm)            |
| 7      | 55.01      | $\pm$ 2.63 | 55.28 | $\pm$ 2.52 | 0.27 $\pm$ 0.35 |
| 14     | 54.69      | $\pm$ 2.64 | 55.14 | $\pm$ 2.51 | 0.45 $\pm$ 0.50 |
| 30     | 53.42      | $\pm$ 2.58 | 54.29 | $\pm$ 2.92 | 0.97 $\pm$ 1.31 |
| 45     | 53.42      | $\pm$ 2.58 | 54.46 | $\pm$ 2.88 | 1.04 $\pm$ 1.31 |
| 60     | 53.42      | $\pm$ 2.58 | 54.65 | $\pm$ 2.90 | 1.22 $\pm$ 1.39 |

| Tiempo | Alto (mm) |            |       |            | Crecimiento     |
|--------|-----------|------------|-------|------------|-----------------|
| (días) | Inicial   |            | Final |            | (mm)            |
| 7      | 25.47     | $\pm$ 1.65 | 26.13 | $\pm$ 1.44 | 0.65 $\pm$ 0.80 |
| 14     | 25.30     | $\pm$ 1.77 | 25.98 | $\pm$ 1.62 | 0.67 $\pm$ 0.91 |
| 30     | 25.26     | $\pm$ 1.16 | 26.03 | $\pm$ 0.92 | 0.76 $\pm$ 1.05 |
| 45     | 25.26     | $\pm$ 1.16 | 26.31 | $\pm$ 0.92 | 1.04 $\pm$ 1.07 |
| 60     | 25.26     | $\pm$ 1.16 | 26.43 | $\pm$ 0.93 | 1.17 $\pm$ 1.17 |

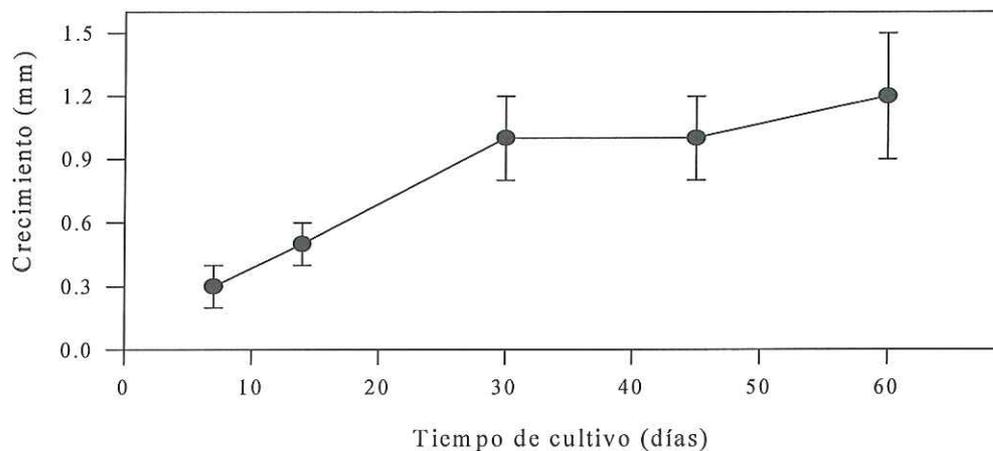


Figura 4. Incremento promedio y error estándar de la longitud de la concha de *Mytilus californianus* en diferentes tiempos (7, 14, 30, 45 y 60 días) de cultivo (organismos del control).

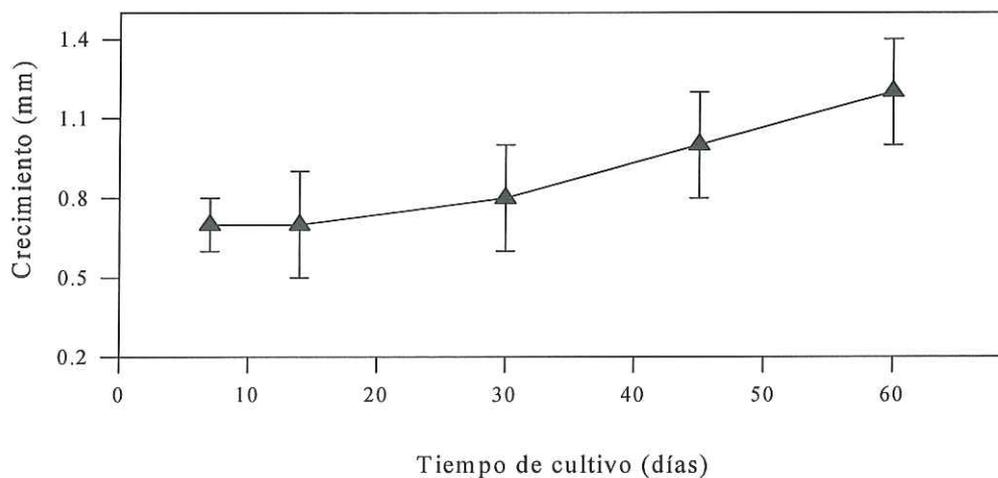


Figura 5. Incremento promedio y error estándar de la altura de la concha de *Mytilus californianus* en diferentes tiempos (7, 14, 30, 45 y 60 días) de cultivo (organismos del control).

### III.1.2 Organismos seleccionados por máximo crecimiento

Debido a que no hubo mortandad durante el bioensayo, se pudieron seleccionar los 10 organismos que obtuvieron el máximo crecimiento de los 15 organismos colocados inicialmente por tratamiento. La selección de estos organismos fue conveniente para asegurar que la muestra tomada de la capa nacarosa fuera únicamente la depositada durante el bioensayo. Los resultados del ANOVA Kruskal-Wallis mostraron diferencias significativas ( $H=19.32$ ,  $p<0.05$ ) del largo inicial respecto al largo final de la concha en los diferentes tratamientos.

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró diferencias del crecimiento del largo de la concha de *M. californianus* entre los diferentes tratamientos. Únicamente los organismos del tratamiento 5E ( $p< 0.05$ ), presentaron un crecimiento significativamente mayor (2.1 mm) respecto al resto (Fig. 6). Para la altura de la concha no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos (Fig. 7).

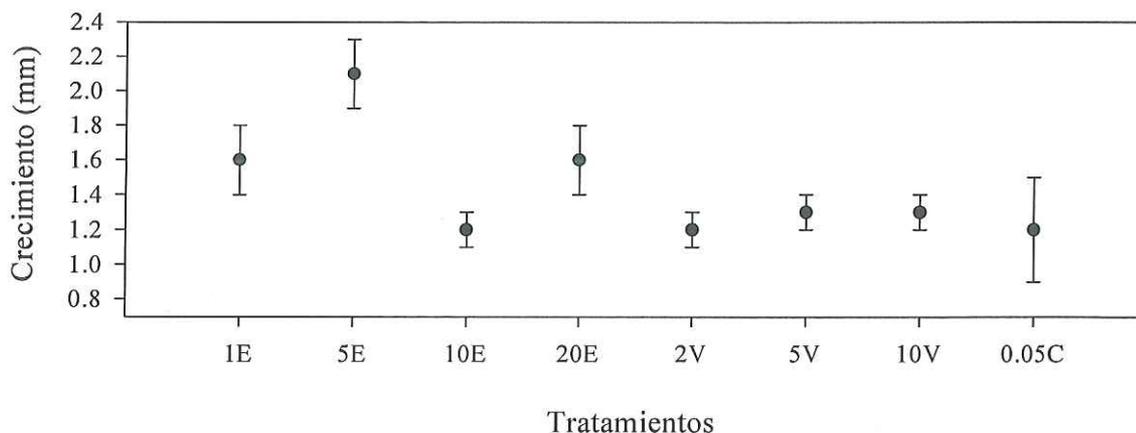


Figura 6. Incremento promedio y error estándar de la longitud de la concha de *M. californianus* de los organismos seleccionados por presentar el mayor incremento al final del experimento. Los números que describen los tratamientos, representan las distintas concentraciones de Cd a las que fueron expuestos los organismos y las letras indican la forma en la que fueron proporcionadas dichas concentraciones: E= Medio Estable, V= Medio Variable y C= Control.

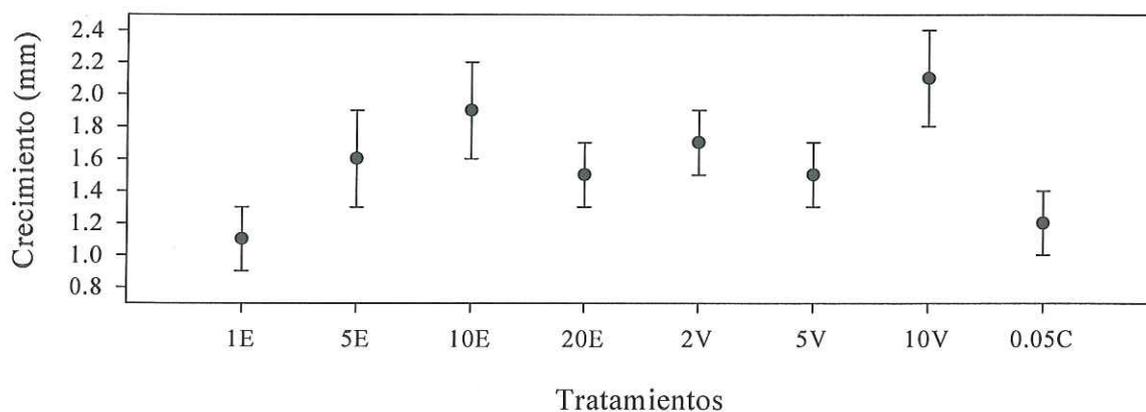


Figura 7. Incremento promedio y error estándar de la altura de la concha de *M. californianus* de los organismos seleccionados por presentar el mayor incremento al final del experimento. Los números que describen los tratamientos, representan las distintas concentraciones de Cd a las que fueron expuestos los organismos y las letras indican la forma en la que fueron proporcionadas dichas concentraciones: E= Medio Estable, V= Medio Variable y C= Control.

## III.2 PROPORCIÓN DE LA LONGITUD DE LA FRANJA CALCÍTICA CON RESPECTO A LA LONGITUD TOTAL

### III.2.1 Organismos de la talla estudiada (5 a 6 cm)

La proporción de la franja calcítica, por intervalos de talla, para los organismos de 5 a 6 cm de longitud, respecto a la longitud total (Fig. 8) y la longitud a partir del músculo abductor (Fig. 9) de ambas valvas, muestra que la proporción de la franja calcítica se mantiene en 0.1 respecto a la longitud total. Los resultados del ANOVA de una vía no mostraron diferencias significativas ( $F = 1.3$ ,  $p > 0.05$ ), lo que indica que la proporción de la franja calcítica se mantiene entre estos rangos de talla y entre los puntos estandarizados. Por lo tanto, la capa aragonítica mantiene una proporción de 0.9 respecto al crecimiento total, obteniendo un crecimiento promedio de la capa aragonítica de 1.08 mm en los 60 días de bioensayo.

### III.2.2 Organismos de otras tallas

Cuando se comparó la proporción de la franja calcítica de la concha de *M. californianus* respecto a la longitud total en diferentes tallas (4.00 a 4.99, 6.00 a 6.99, 7.00- a 7.99 cm) se encontraron diferencias significativas ( $F = 4.1$ ,  $p < 0.05$ ) y la prueba SNK mostró que los organismos de menor talla (4.00 a 4.99 cm) eran diferentes (SNK = 0.016,  $p < 0.05$ ) al resto, con una proporción de 0.09 (Fig. 10). Las tallas restantes presentaron una proporción similar (0.1) al intervalo de talla estudiado (5 a 6 cm).

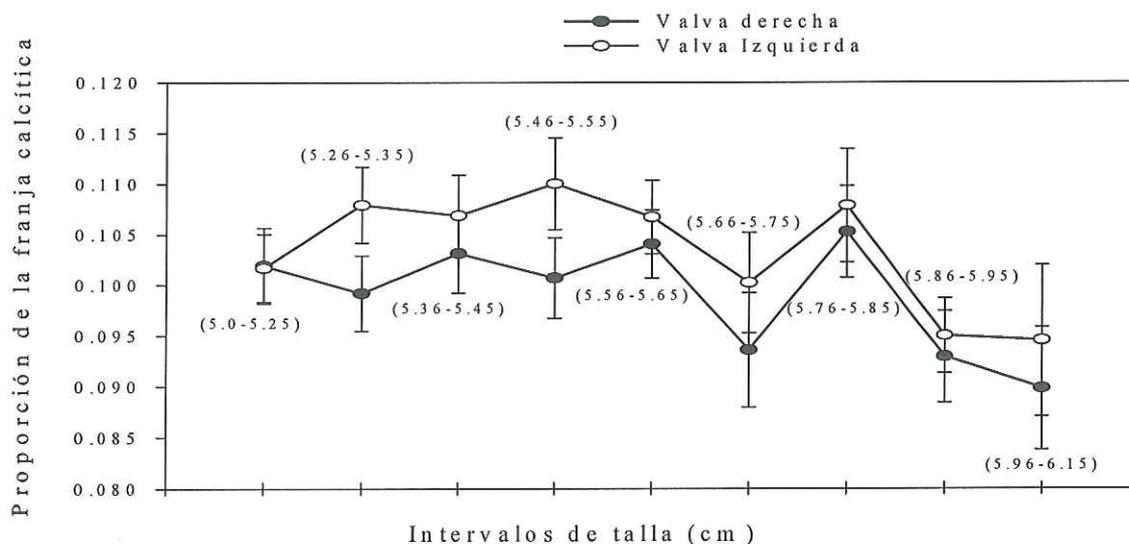


Figura 8. Proporción media y error estándar de la longitud de la franja calcítica respecto a la longitud total de la concha de *M. californianus* en organismos del control de 5 a 6 cm.

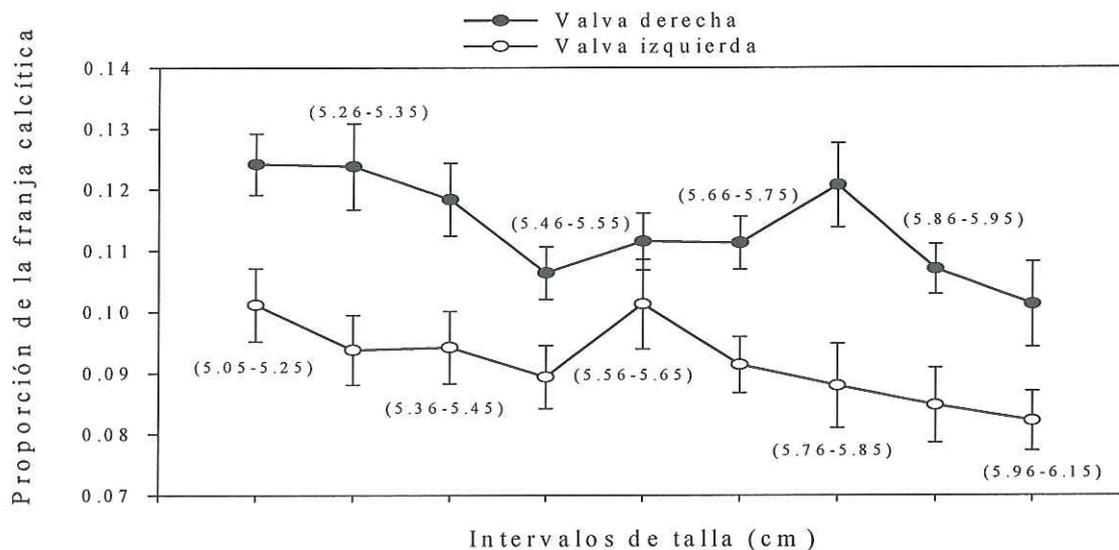


Figura 9. Proporción media y error estándar de la franja calcítica a partir de la cicatriz del músculo abductor respecto a la longitud de la concha de *M. californianus* en organismos del control de 5 a 6 cm.

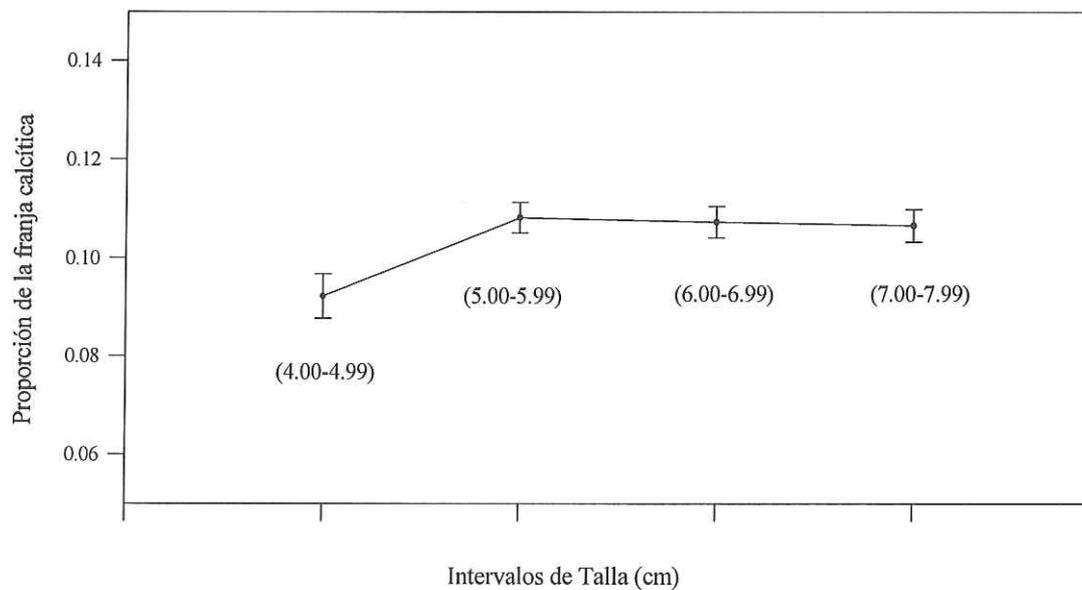


Figura 10. Proporción media y error estándar de la longitud de la franja calcífica respecto a la longitud total de *M. californianus* en otras tallas.

### III.3 CONCENTRACIÓN DE Cd EN LA CAPA NACAROSA DE LA CONCHA

La concentración de Cd en la capa nacarosa de la concha de *M. californianus*. Se incrementó al aumentar la concentración de Cd del agua de mar a la que estuvieron expuestos los organismos en los diferentes tratamientos (Tabla II). Este comportamiento es observado tanto en el medio estable como en el medio variable (Fig. 11) con concentraciones que van desde  $32 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en el control hasta 128 y  $161 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en los tratamientos estables en que se suministraron  $10$  y  $20 \mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . El análisis de varianza de una vía, muestra diferencias significativas ( $F= 23.03$ ;  $p < 0.05$ ) entre las diferentes concentraciones. Las pruebas de comparaciones múltiples (SNK) muestran que las concentraciones correspondientes a los medios de 0.05C (control) y 20E (medio estable) fueron significativamente diferentes con respecto a todas las demás (Tabla III). La del medio estable con  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  fue diferente a todas excepto al tratamiento 10V.

Tabla II. Concentración media y desviación estándar de Cd en la capa nacarosa de la concha de *M. californianus* en diferentes tratamientos. Los números de las concentraciones de Cd del agua de mar, representan las distintas concentraciones a las que fueron expuestos los organismos y las letras indican los medios de concentración: C= control, E= medio estable y V= medio variable.

| [Cd] $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>Agua de mar | [Cd] $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$<br>Capa nacarosa | Tratamientos<br>N |
|---|---|-------------------|
| 0.05 C  | 32.66 $\pm$ 6.4                                     | 6                 |
| 1E  | 78.47 $\pm$ 16.0                                    | 3                 |
| 2V  | 70.44 $\pm$ 7.3                                     | 3                 |
| 5V  | 73.16 $\pm$ 9.9                                     | 3                 |
| 5E  | 104.26 $\pm$ 13.9                                   | 3                 |
| 10V   | 91.93 $\pm$ 22.7                                    | 3                 |
| 10E   | 128.77 $\pm$ 30.7                                   | 3                 |
| 20E   | 161.62 $\pm$ 18.0                                   | 3                 |

Tabla III. Comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls de la concentración de Cd en la capa nacarosa de la concha de *M. californianus* en diferentes tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ). Las diferentes concentraciones de Cd a las que fueron expuestos los organismos están representadas por los números y los medios de concentración: C= control, E= medio estable y V= medio variable, son indicados con las letras. Los valores resaltados representan las comparaciones significativas.

|       | 0.05C         | 1E            | 2V            | 5V            | 5E            | 10V           | 10E           | 20E |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----|
| 0.05C |               |               |               |               |               |               |               |     |
| 1E    | <b>0.0099</b> |               |               |               |               |               |               |     |
| 2V    | <b>0.0083</b> | 0.8070        |               |               |               |               |               |     |
| 5V    | <b>0.0135</b> | 0.6829        | 0.8339        |               |               |               |               |     |
| 5E    | <b>0.0016</b> | 0.3058        | 0.3608        | 0.3282        |               |               |               |     |
| 10V   | <b>0.0004</b> | 0.1355        | 0.1016        | 0.1049        | 0.3475        |               |               |     |
| 10E   | <b>0.0002</b> | <b>0.0046</b> | <b>0.0026</b> | <b>0.0029</b> | <b>0.0249</b> | 0.0706        |               |     |
| 20E   | <b>0.0002</b> | <b>0.0001</b> | <b>0.0001</b> | <b>0.0001</b> | <b>0.0003</b> | <b>0.0008</b> | <b>0.0189</b> |     |

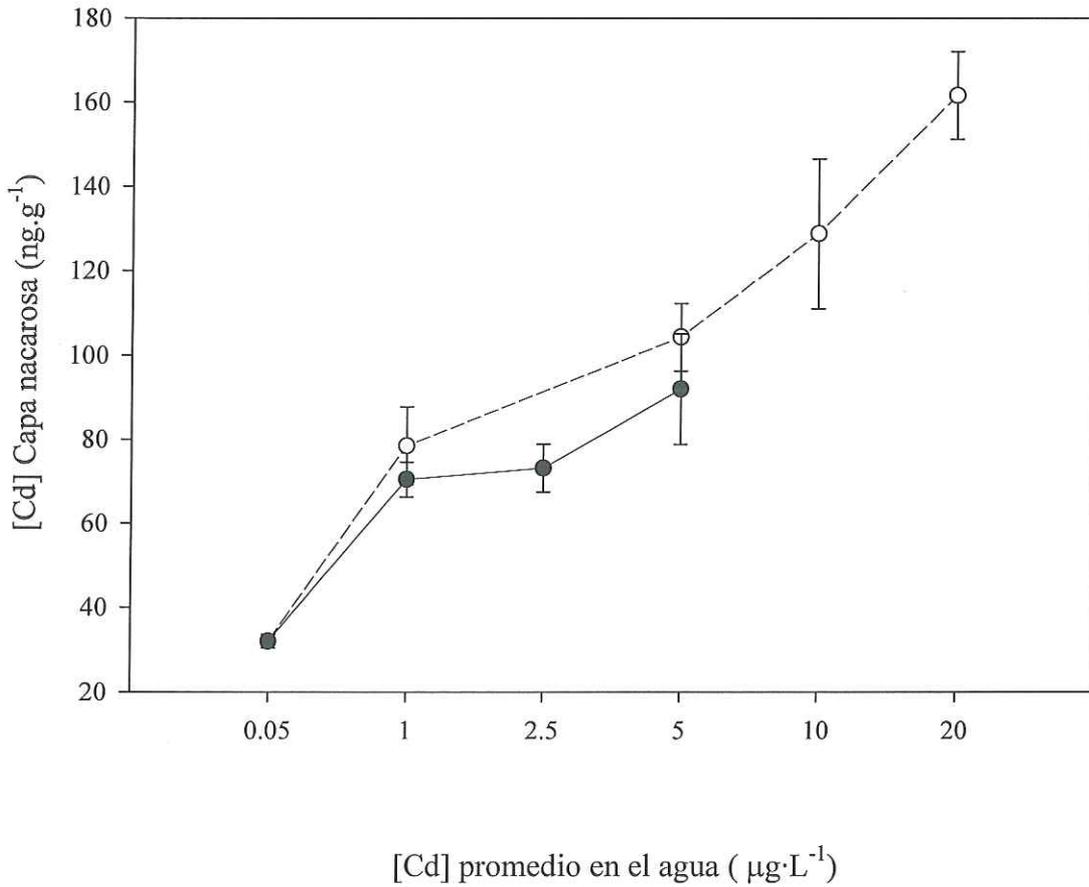


Figura 11. Concentración (media  $\pm$  error estándar) de Cd en la capa nacarosa de la concha de *M. californianus* expuestos a diferentes medios y concentraciones de este metal en el agua; el círculo vacío representa el medio estable y el círculo relleno representa el medio variable.

## IV DISCUSIÓN

### Seguimiento del crecimiento

Se ha reportado que *M. californianus* tiene una tasa de crecimiento en la zona del submareal rocoso de la Jolla, Calif. E.U.A. de 2 a 5 mm·mes<sup>-1</sup> (Coe y Fox, 1942; Dehnel, 1956). En este trabajo bajo condiciones de laboratorio, el crecimiento promedio en longitud de la concha, para la misma especie, fue considerablemente menor (0.6 mm·mes<sup>-1</sup>) al estimado por los anteriores autores a pesar de que estuvieron en condiciones controladas de temperatura, luz, salinidad, oxígeno suministro de alimento y sumersión continua, precisamente para tratar de obtener un crecimiento similar al mencionado por los anteriores autores. No obstante, un crecimiento menor de 2 mm·mes<sup>-1</sup> es reportado por Paine (1976), quien observó una razón de crecimiento de 1.0 mm·mes<sup>-1</sup> para la misma especie en la Bahía Mukkaw, Washington a temperaturas más bajas de los 17 °C. No obstante, Behrens Yamada y Peters (1988) encontraron que este mejillón (tallas de 2 a 4 cm) en el intermareal de la costa central de Oregon, tuvo un incremento de 0.6 a 1.7 mm·mes<sup>-1</sup> de marzo a noviembre. Las condiciones ambientales en las que habitan estos organismos marcan la diferencia entre las tasas de crecimiento mensual reportadas para *M. californianus* en las distintas regiones, así como el nivel de marea a la que se encuentran expuestos, ya que se conoce, que el crecimiento de los mejillones es más rápido cuando el mejillón está continuamente sumergido donde puede llegar a crecer hasta 4.8 mm·mes<sup>-1</sup> que cuando esta expuesto al aire por varias horas (Behrens Yamada y Dunham 1989). Lo anterior indica, que la razón de crecimiento de este cultivo es similar a la mínima reportada por Behrens Yamada y Peters (1988) para organismos del intermareal; sin embargo, los organismos utilizados en este cultivo son equivalentes a los estudiados por Coe y Fox (1942) por la

cercanía de la latitud en la que se colectaron los organismos de nuestro cultivo y también porque estuvieron siempre sumergidos. Por lo anterior, suponemos que en este cultivo no alcanzaron el crecimiento esperado (mayor de 2 mm). Varios autores (Coe y Fox, 1942; Lowenstam, 1954; Dodd, 1964) mencionan que el efecto de la temperatura es un factor importante en la depositación de calcio, dado que se conoce, que la secreción de carbonato de calcio se incrementa a altas temperaturas en el océano. En nuestros cultivos la temperatura se mantuvo entre 17 y 19 °C, la cual se ha reportado que es óptima para el crecimiento de *M. californianus* (Coe y Fox, 1942). Un factor que pudo haber influido en la razón de crecimiento del mejillón, es la densidad en la que se mantuvo el cultivo. Autores como Seed (1968) y Harger (1972) mencionan que a alta densidad poblacional (ca. 110 cm<sup>-2</sup>) los mejillones crecen a lo largo debido a la alta compresión que ejercen entre ellos; inversamente, a baja densidad (ca. 50 cm<sup>-2</sup>) el crecimiento tiende a ser hacia lo alto de la concha debido a la baja compresión. Así mismo, Harger (1972), Behrens Yamada y Peters (1988) y Suchanek (1981) indicaron que a una baja densidad el mejillón no tiene interferencia por espacio y alimento, lo que permite a los organismos tener más energía disponible para el crecimiento. En este cultivo, con baja densidad, los mejillones crecieron a lo largo de forma similar que a lo alto (1.1 mm). Los argumentos mencionados sobre la influencia de la temperatura y la densidad en el crecimiento evidencian que las condiciones en que se mantuvieron los mejillones eran ideales para que alcanzaran mayor crecimiento que el encontrado en este trabajo. Lo anterior sugiere que otro factor más importante pudo influir en el crecimiento durante el cultivo.

Los mejillones en el medio natural ingieren una gran variedad de células fitoplanctónicas (diatomeas y dinoflagelados) durante el día (Coe y Fox, 1942; Suchanek,

1981), por lo que la cantidad y calidad del alimento es uno de los factores de mayor importancia para el desarrollo y crecimiento de los mejillones, sobre todo si son cultivados en laboratorio (Fidalgo *et al.*, 1994; Kreeger y Langdon, 1993). En este cultivo, la dieta de los mejillones fue con base en el 2 % del peso seco del mejillón (Bayne *et al.*, 1976) y el peso seco de las microalgas. El control sobre la ración ingerida y la frecuencia con la que se suministra el alimento a los bivalvos es necesaria, ya que se ha visto que cuando se adiciona en forma continua se pueden obtener mayores tasas de crecimiento (Esquivel y Voltolina, 1996).

En este experimento, la ración diaria promedio de la dieta mezclada fue de  $6.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *Isochrysis* sp. y  $2.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *Chaetoceros* sp. para cada mejillón por día. Dicha cantidad de alimento, mantuvo a los mejillones durante el periodo del bioensayo con un 100 % de sobrevivencia. Con el suministro de alimento anterior ( $4.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dos veces al día), no se observó producción de pseudoheces. Widdows *et al.* (1979) mencionan que para *M. edulis* (7 cm, 1 g de peso seco) las pseudoheces se producen a concentraciones de alimento *ca.*  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

El crecimiento de *M. californianus* pudo ser significativamente afectado por una baja ración alimenticia es decir, que esta especie requiera de una ración mayor del 2% para poder crecer. Este porcentaje fue utilizado con base en lo descrito por Bayne *et al.* (1976) para *M. edulis*, dada la escasez de información sobre *M. californianus*.

La calidad del alimento es otro factor que pudo influir en la razón del crecimiento de este bivalvo. Se sabe que, las microalgas utilizadas como dieta para los mejillones en el presente estudio tienen un alto valor nutritivo. En ese sentido, Esquivel y Voltolina (1996) reportaron que *Chaetoceros* sp., cultivado en laboratorio, presentó un total de 75.61 % (en peso seco) de composición nutritiva (proteínas 34.36 %, carbohidratos 13.23 %, lípidos

28.02 %). Por otro lado, para *Isochrysis galbana* se ha reportado un alto valor nutrimental en proteínas (42.6 %), carbohidratos (20.2 %) y lípidos (17.1 %) (Kreeger y Langdon, 1993). Sin embargo, se ha observado que esta composición bioquímica varía con la edad del cultivo y la condición de la especie (Utting, 1985; Whyte, 1987).

En el presente trabajo no se efectuaron pruebas de composición bioquímica de *Chaetoceros* sp. e *Isochrysis* sp. debido a que se consideró que esta mezcla fitoplanctónica, como dieta mixta, resultaría nutritivamente balanceada. Además, de que se ha observado, que los bivalvos crecen a mayor razón cuando se les adiciona una dieta mezclada de diversas especies de microalgas (Epifanio, 1979; Webb y Chu, 1982). El crecimiento de *M. californianus* pudo ser significativamente afectado por variaciones proteicas y posiblemente por una baja ración alimenticia.

Un factor más que pudo influir en el crecimiento, es que los organismos de la primer colecta (4 de noviembre) desovaron al ser trasladados al laboratorio. Autores como Coe y Fox (1942) mencionan que el desove del organismo provoca un adelgazamiento del tejido blando. De manera particular, observaron que en *M. californianus* el peso de las gónadas puede igualar o exceder al peso del tejido del cuerpo dependiendo de la cantidad de gametos expulsados. Lo anterior podría sugerir que los mejillones del presente estudio, después del desove, utilizaron el alimento proporcionado para recuperar el peso del tejido blando y no así para crecer.

### **Proporción de la longitud de la franja calcítica con respecto a la longitud total de la concha**

Los resultados del presente estudio son de gran importancia, puesto que no se encontró bibliografía que indique qué cantidad o distancia se incrementa en la capa

aragonítica en un determinado tiempo. Por lo anterior, se supuso que si la franja calcítica mantiene una proporción constante respecto al crecimiento total, se puede inferir qué tanto se incrementa la capa nacarosa. Los resultados mostraron que la longitud de la franja calcítica mantiene una proporción de 0.1 respecto a la longitud total, por lo tanto la longitud de la capa aragonítica mantiene una proporción de 0.9 respecto a la longitud total. Con base en lo anterior, se obtuvo un crecimiento promedio de la capa aragonítica de 1.08 mm para el periodo del bioensayo. Otro dato importante, es que dicha proporción se mantiene en organismos de tallas de 5 a 8 cm de largo, lo cual eliminaría la necesidad de sacrificar organismos para dar seguimiento al crecimiento de la capa aragonítica. Esto es, en trabajos futuros el seguimiento del crecimiento total, nos permitirá inferir el crecimiento de la longitud de la capa aragonítica para determinar el tamaño de muestra adecuada para el análisis de metales.

### **Incorporación de Cd**

La capa nacarosa de *M. californianus* mostró una incorporación mayor de Cd al incrementar las concentraciones en el agua de mar en ambos medios de exposición (“estable” y “variable”). De igual manera, Sturesson (1978) encontró para *M. edulis*, que al aumentar los niveles de Cd en el agua aumentaban en la concha, particularmente en la capa aragonítica. Bourgoin (1990), encontró que la incorporación de metales como el Pb en la capa nacarosa de la concha, está fuertemente correlacionada con las concentraciones de Pb en el tejido y menciona que la concha puede proveer un índice de biodisponibilidad de Pb. El presente estudio, además de proporcionar una primera aproximación de lo que ocurre en la depositación del Cd en la capa nacarosa de la concha de *M. californianus*, marca un progreso en el seguimiento de las concentraciones de Cd en el ambiente, utilizando otra especie del género *Mytilus*, ya que demuestra que la capa aragonítica de la concha de esta

especie refleja los incrementos de Cd en el medio.

Los patrones de incorporación del Cd a la capa nacarosa en dos diferentes medios de exposición, indicaron que no hay diferencias entre un medio con niveles estables a otro con niveles variables de Cd. Cabe mencionar que esta aseveración se hace con base en solo dos comparaciones de los medios. Las de concentraciones promedio de 1 y 5  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ . El hecho de que las diferencias no sean significativas puede deberse a la capacidad de formación de complejos químicos y a la actividad cinética del Cd que acompaña a los procesos de la formación de la concha, en el caso de que estos sean similares a los llevados a cabo en el tejido blando. George y Coombs (1977), Ritz *et al.* (1982) y Coleman *et al.* (1986) coinciden en que la incorporación de Cd en el músculo blando de *M. edulis* expuesto a bajas concentraciones de este metal, es incrementada si el mejillón estuvo previamente expuesto a altas concentraciones del metal. George y Coombs (1977) señalan que el Cd debe formar complejos químicos antes de que la acumulación ocurra. Coleman *et al.* (1986) mencionan, que cuando el mejillón es transferido a agua de mar con concentraciones mayores de Cd ocurre un retardo en la acumulación del metal, debido a la necesidad de sintetizar ligandos para formar complejos de iones metálicos. Inversamente, una transferencia de mejillones a aguas de menores concentraciones, tendría un exceso de ligandos y como resultado no sufre un retardo en la acumulación del metal. Por lo tanto, la razón de incorporación se incrementará al poner al organismo nuevamente en concentraciones altas del metal. A pesar de que lo anterior ha sido observado sólo en el músculo blando (Coleman *et al.*, 1986), un proceso químico similar podría ocurrir, durante la depositación de cristales hacia la capa nacarosa. En nuestros tratamientos con medio estable pudo ocurrir que, dentro del fluido extrapaleal, se haya dado una estabilidad de complejos orgánicos e inorgánicos hacia la formación de la concha, al ser continuo el

suministro de Cd. Por otro lado, en el medio variable al estar el organismo expuesto a concentraciones cíclicas de Cd ( $2$  y  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), posiblemente ocurrió un exceso de ligandos en la concha, lo que permitió una rápida incorporación del Cd a la capa nacarosa. El Cd puede incorporarse tanto a los cristales como a la red intercristalina por absorción en la matriz orgánica de la concha (Sturesson, 1978). Los cristales están separados por esta matriz orgánica, la cual está formada por proteínas como la conchoilina, glicina, cerina y por oligosacáridos sulfatados, principalmente. Estos compuestos son los responsables de enlazar los iones  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{HCO}_3^-$  procedentes del medio para la formación de la concha (Wilbur y Saleuddin, 1983). Lo anterior sugeriría que una fracción significativa del Cd pudiera haber quedado enlazada a la matriz orgánica de la concha, como lo menciona Sturesson (1978). Otro mecanismo que pudo influir en el medio variable es que parte del Cd liberado del músculo blando en el ciclo de agua limpia, se haya dirigido hacia el fluido extrapaleal para la formación de la concha ya que se ha argumentado que parte de la liberación de los metales por el organismo es orientado ya sea hacia el ambiente o la concha (Koide *et al.*, 1982). Lares (1995) encontró que *M. californianus* tiene la capacidad de liberar una cantidad importante de Cd del tejido blando en un solo día, al ser expuesto en agua de concentraciones bajas, después de una exposición corta a este metal. Esto fortalece la hipótesis de que esa pronta liberación de Cd por el organismo se haya dirigido en parte, hacia la formación de la capa nacarosa de la concha, al estar expuesto a concentraciones cíclicas de Cd.

No hay que descartar posibles efectos de dilución en la toma de la muestra para los análisis del Cd, es decir, que se haya tomado, tanto lo depositado durante el bioensayo como lo depositado anteriormente, ya que el crecimiento obtenido estuvo en el límite

necesario para poder tomar la muestra que fue alrededor de 1.0 mm. En caso de no existir el mencionado efecto de dilución nuestros resultados nos permitirían recomendar el uso de la capa nacarosa de la concha de *M. californianus* como indicador de mediano plazo preferentemente al tejido blando. Por lo tanto, podrían realizarse estudios en el medio natural donde habita *M. californianus*, utilizando la capa nacarosa de la concha para indicar el aporte de Cd por surgencias, las cuales, representan un medio muy variable en cuanto a la concentración de Cd que inyectan a la superficie. Autores como Ouellette (1981) y Lares (1988) han estudiado el comportamiento del Cd en el tejido blando de *M. californianus* durante estos eventos, encontrando incrementos en la concentración de Cd en tejido blando y detectando concentraciones de Cd cuatro veces más altas en temporadas de surgencias. Una ventaja de la capa nacarosa sobre el músculo blando de esta especie sería que la primera integraría el Cd aportado por este evento ya que tiene la capacidad de incorporar el cadmio con una liberación mucho más lenta que la que se da por parte del tejido blando (Sturesson, 1978).

El factor de concentración de Cd en la capa nacarosa no mostró una relación directamente proporcional al incremento en las concentraciones de este metal en el agua de mar. Es decir, al incrementar las concentraciones de Cd en el agua de mar (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) el factor de concentración disminuyó a 78, 20, 12 y 8 respectivamente. Un comportamiento similar fue observado por Sturesson (1978), quien menciona que una discriminación del Cd puede ocurrir al incrementarse las concentraciones de este metal en el agua de mar. Dicho autor encuentra factores de concentración de Cd en la capa de aragonita de *M. edulis* que disminuyen de 20 a 5 al incrementarse la concentración del agua de mar. Sin embargo, las concentraciones que este autor trabajó fueron mayores (25 a 200

$\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a las utilizadas en el presente estudio y corresponden a una especie diferente. A pesar de que no son directamente comparables, las diferencias en el enriquecimiento de Cd muestran que *M. californianus* parece discriminar el metal a concentraciones mucho menores que *M. edulis*. Otras diferencias entre especies del género *Mytilus* han sido reportadas. Por ejemplo, Dodd (1964) menciona una diferencia en la formación de estructuras de la concha para *M. californianus* con la presencia de una capa prismática exterior, carente en *M. edulis*. También se han encontrado diferencias en la cinética de incorporación y liberación de metales entre *M. edulis* y *M. californianus*. Griffin *et al.* (1980) notaron diferencias de comportamiento químico entre *M. edulis* y *M. californianus*, ya que *M. edulis* mostró un incremento en la actividad del  $^{210}\text{Po}$  en el músculo blando, con la edad, mucho mayor que el incremento mostrado por *M. californianus*. Por su parte, Lares y Orians (2000) encontraron diferencias de incorporación de Cd entre *M. trossulus* y *M. californianus*. La primera especie no mostró incrementos en su concentración al estar expuesta a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cd, mientras que la segunda incrementó significativamente sus concentraciones a este mismo nivel. La actividad fisiológica y metabólica del organismo pueden jugar un papel importante en la incorporación del Cd en la capa nacarosa de la concha en especies del mismo género *Mytilus*. En caso de que la incorporación del metal a la concha del mejillón fuera un mecanismo común en especies del mismo género, cabe la posibilidad de que el uso de la capa nacarosa como bioacumulador pueda ser considerada como equivalente entre especies del mismo género sin embargo, estudios comparativos entre ambas especies deben ser realizados.

## V CONCLUSIONES

1. Este estudio marca un progreso en el seguimiento de las concentraciones de Cd en el ambiente, utilizando otra especie del género *Mytilus*, ya que se demostró que la capa nacarosa de la concha de *M. californianus* refleja los incrementos de cadmio en el medio.
2. La capa nacarosa de la concha puede ser considerada como un indicador de contaminación a mediano plazo con una baja variabilidad inherente, ya que a diferentes medios de exposición de Cd (“estable” y “variable”) no se encontraron diferencias significativas en sus concentraciones de Cd.
3. Una aportación importante de este trabajo es que se encontró que la longitud de la franja calcítica mantiene una proporción de 0.1 respecto a la longitud total en organismos de tallas de 5 a 8 cm. A partir de lo anterior, se puede inferir el crecimiento de la capa aragonítica a través del crecimiento total para futuros experimentos que tengan como objetivo el análisis de metales en la capa nacarosa de *Mytilus californianus*.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda considerar las siguientes propuestas para trabajos futuros que intenten estudiar la cinética del cadmio en la concha de esta especie.

- a) Realizar bioensayos con un tiempo experimental más prolongado, para asegurar obtener la cantidad de aragonita necesaria para el análisis de Cd. De esta manera se eliminará la incertidumbre aportada por la posible dilución de la muestra.
- b) Evitar el dosave de los organismos, mediante un manejo adecuado en el transporte y acondicionamiento al laboratorio.
- c) Realizar estudios sobre dietas para *M. californianus*, para determinar la alimentación adecuada para el crecimiento de esta especie.
- d) Realizar bioensayos con marcadores radiosódicos como el  $^{109}\text{Cd}$  para rastrear la cinética de incorporación más reciente de la capa nacarosa de la concha del mejillón.
- e) Realizar estudios similares con especies diferentes del género *Mytilus* para probar si pueden ser consideradas como especies equivalentes en estudios de contaminación por metales.

## LITERATURA CITADA

- Babukutty, Y. y J. Chacko. 1992. Trace Metals in an Estuarine Bivalve from the Southwest Coast of India. *Ambio*. Vol. 21, No. 4, pp. 292 -296.
- Bayne, B. L., R. J. Thompson y R. J. Widdows . 1976. Physiology: I. En: *Marine Mussels: Their ecology and physiology*. (B. L. Bayne, ed.). Cambridge University Press. pp. 121-206.
- Behrens Yamada, B. S. y E. Peters. 1988. Harvest management and the growth and condition of submarket-size sea mussels, *Mytilus californianus*. *Aquaculture*, Vol. 74 pp. 293-299.
- Behrens Yamada, S. y J. B. Dunham. 1989. *Mytilus californianus*, a new aquaculture species? *Aquaculture*, Vol. 81, pp. 275-284.
- Berstein, R. L., L. Breaker y R. Whritner. 1977. California Current eddy formation: ship and satellite results. *Science*. Vol. 195, pp. 535-559.
- Bourgoin, B. P. 1990. *Mytilus edulis* shell as bioindicator of lead pollution: considerations on bioavailability and variability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 61, pp. 253-262.
- Calderón Aguilera, L. E. 1991. Estudio de protección al medio ambiente y a la C. T. Ensenada. Especificación CFE-DPA-EN-01. CICESE, Ensenada. 245 pp.
- Carlucci, A. F., R. W. Eppley y J. R. Beers. 1986. Introduction to the Southern California Bight, En: *Plankton Dynamics of the Southern California Bight*. (R. W. Eppley, ed.). Springer Verlag, Berlín. pp. 1-12.

- Coe, W. R. y K. L. Fox. 1942. Biology of the California sea-mussel (*Mytilus californianus*). 1. Influence of temperature, food supply, sex and age on the rate of growth. *Journal Exp. Zoo.* Vol. 90, pp. 1-30.
- Coleman, T. F. M., M. Mobley y M. Hickman. 1986. *Mytilus edulis planulatus*: an “integrator” of cadmium pollution?. *Mar. Biol.* Vol. 92, pp. 1-5.
- Dehnel, P. A. 1956. Growth rates in latitudinally y vertically separated populations of *Mytilus californianus*. *Biol. Bull.* Vol. 110, pp. 43-53.
- Dodd, R. J. 1964. Environmentally controlled variation in the shell structure of a pelecypod species. *Journal of Paleontology*, Vol. 38, pp. 1065-1071.
- Epifanio, C. E. 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalve mollusks. *Aquaculture*, Vol. 16, pp. 187-192.
- Esquivel, C. B. y D. Voltolina. 1996. Nutritional value of preserved microalgae for subadult *Mytilus galloprovincialis*. *J. Aquaculture*. Vol. 27, pp. 113-117.
- FAO/WHO. 1972. Report of the joint expert committee on food additives. World Health Org. Tech. Report. Serv. No. 505.
- Fidalgo, P. J., I. Cid, J. López-Muñoz, J. Abalde y C. Herrero. 1994. Growth and biochemical profile of juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) fed on different algal diets. *J. of Shellfish.* Vol. 13, pp. 67-75.
- Fisher, N. S., J. L. Teyssié, S. W. Fowler y W. X. Wang. 1996. The accumulation and retention of metals in mussels from food and water: comparison under field and laboratory conditions. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 30, pp. 3232-3242.

- Friberg, L., M. Piscator, G. F. Norberg y T. Kjellstrom. 1974. Cadmium in the environment. 2a. Ed. CRC. Press, Cleveland, Ohio. 572 pp.
- George, S. G. y T. L. Coombs. 1977. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. Mar. Biol. Vol. 39, pp. 261-262.
- Golberg, E. D. 1976. Heavy metals. Cap. 5. En: The health of the oceans. The UNESCO press. pp. 97-116.
- Goldberg, E. D., V. T. Bowen, J. W. Farrington, G. Harvey, J. H. Martin, P. L. Parker, R. W. Riseborough, W. Robertson, E. Schneider y E. Gambie. 1978. The Mussel Watch. Environmental Conservation, Vol. 5, pp. 101-125.
- Griffin, J. J., M. Koide, V. Hodge y E. D. Goldberg. 1980. Estimating the ages of Mussels by Chemical and Physical Methods. En: Isotope Marine Chemistry (Goldberg, E. D., Horibe, Y. y Saruhashi, K., Eds.). Tokyo, pp. 193-209.
- Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 8, pp. 229-239.
- Harger, J. R. 1972. The effect of species composition on the survival of mixed populations of the sea mussels *Mytilus californianus* and *Mytilus edulis*. The veliger. Vol. 13, pp.147-152.
- Hemerick, G. 1973. Mass culture. En: Handbook of phycological methods. (J. R. Stein, ed.). Cambridge University Press. N. Y. pp. 255-273.
- Jorgensen, B. C. 1976. Growth efficiencies and factors controlling size in some mytilid bivalves, especially *Mytilus edulis* L.: Review and interpretation. Ophelia. Vol. 15,

pp. 175-192.

- Koide, M., D. S. Lee y E. D. Goldberg. 1982. Metal and transuranic records in mussel shells, byssal threads and tissues. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. Vol. 15, pp. 679-695.
- Krampitz, G. y G. Graser. 1988. Molecular mechanisms of biomineralization in the formation of calcified shells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* Vol. 27, pp. 1145-1156.
- Kreeger, D. A. y C. J. Langdon. 1993. Effect of dietary protein content on growth of juvenile mussels, *Mytilus trossulus* (Gould 1850). *Biol. Bull.* Vol. 185, pp.123-139.
- Lares, M. L. 1988. Variación temporal de cadmio y mercurio biodisponibles en una zona de surgencia costera. Tesis de maestría, CICESE, Ensenada, B. C. 99 pp.
- Lares, M. L. 1995. Mussel as indicators of cadmium and lead in the marine environment. Tesis de Doctorado. University of British Columbia, Vancouver, Canada, 153 pp.
- Lares, M. L. y K. J. Orians. 1997. Natural Cd and Pb variations in *Mytilus californianus* during the upwelling season. *The Science of the total Environment*. Vol. 197, pp. 177-195.
- Lares, M. L. y K. J. Orians. 2000. Differences in Cd elimination from *Mytilus californianus* and *Mytilus trossulus* soft tissues. *Environmental Pollution*. En prensa.
- Laws, A. E. 1993. *Aquatic Pollution*. 2ª. Ed. Wiley Interscience. New York, 611 pp.
- Lowenstam, H. A. 1954. Factors affecting the aragonite: calcite ratios in carbonate-secreting marine organisms. *Journal of Geology*. Vol. 62, pp. 284-322.

- Nolan, C. y H. Dahlgaard. 1991. Accumulation of metal radiotracers by *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol.70, pp. 165-174.
- Ouellette, R. T. 1981. Seasonal variation of trace-metals in the mussel *Mytilus californianus*. Env. Con., Vol. 8, No. 1, pp. 53-58.
- Paine, R. T. 1976. Biological observations on a subtidal *Mytilus californianus* bed. Veliger. Vol. 19. pp. 125-130.
- Phillips, D. J. H. y P. S. Rainbow. 1993. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Mar. Pollut. Bull. Vol. 23, pp. 251-258.
- Rainbow, S. P. 1995. Biomonitoring of Heavy metal Availability in the Marine Environment. Mar. Poll, Bull. Vol. 31, Nos. 4-12, pp. 183-192.
- Ritz, D. A., R. Swain y N. G. Elliott. 1982. Use of the mussel *Mytilus edulis planulatus* (Lamarck) in monitoring heavy metal levels in seawater. Aust. J. Mar. Freshwater Res. Vol. 33, pp. 491-506.
- Rivero, L. E. 1999. Comparación de la concentración de Cd entre el tejido blando y la concha de *M. californianus* en una zona de surgencias. Tesis de Maestría, CICESE, Ensenada, B.C. 84 pp.
- Seed, R. 1968. Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. J. Mar. Biol. Ass. U. K. Vol. 48, pp. 561-584.
- Simkiss, K. M. T. y K. M. Wilbur. 1977. The molluscan epidermis and its secretions. Symp. zool. Soc Lond. No. 39, pp. 35-76.

- Sorokin, C. 1973. Dry Weight, packed cell volume and optical density. En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. (J. R. Stein, ed.). Cambridge University Press, N. Y. pp. 321-343.
- Sturesson, U. 1978. Cadmium Enrichment in shells of *Mytilus edulis*. *Ambio*. Vol. 5, pp. 253-256.
- Suchanek, H. T. 1981. The Role of Disturbance in the Evolution of Life History Strategies in the Intertidal Mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Oecología*. Vol. 50, pp.143-152.
- Utting, S. D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture Eng.*, Vol. 4, pp. 175-190.
- Webb, K. L. y F-L. E. Chu. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: Proceedings of the 2nd international conference aquaculture nutrition: Biochemical and Physiological approaches to Shellfish nutrition, (Pruder, G., Langdon. C. y Coklin, D., Eds.). Louisiana St. University, Baton Rouge, L. A. pp. 272-291.
- Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* Vol. 60 pp. 231-241.
- Widdows, J., P. Fieth y C. M. Worrall. 1979. Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* Vol. 5, pp. 195-207.
- Wilbur, K. M. y C. M. Yonge. 1964. Physiology of mollusca. Academic Press Inc. N. Y. 472 pp.

- Wilbur, K. M. y M. S. A. Saleuddin. 1983. Shell formation. Cap. 6 En: The Mollusca Vol. 6 Physiology, Part. 1 (K. M. Wilbur, ed.). Academic press, N. Y. Vol. 4, pp. 235-287.
- Wittmann, G. 1981. Toxic metals. Cap. B. En: Metal pollution in the aquatic Environment. (Forstner, U. y Wittman, G. T. W., Eds.). Berlin: Springer-Verlag, N. Y. pp. 11-17
- Young, D. R. y T. R. Folsom. 1967. Loss of  $^{65}\text{Zn}$  from the California Sea-Mussel *Mytilus californianus*. Biol. Bull. Vol. 133, pp. 438-447.

