

# Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



**INCORPORACION DE CADMIO EN DIFERENTES  
ESTRUCTURAS DEL MEJILLON *Mytilus californianus*  
EN UN MEDIO ESTABLE vs. UN MEDIO VARIABLE**

**TESIS  
MAESTRIA EN CIENCIAS**

**LAURA ANGELICA DORANTES PARRAL**

ENSENADA, B. C., MAYO DEL 2001.







TESIS DEFENDIDA POR  
**LAURA ANGÉLICA DORANTES PARRAL**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



---

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes

*DIRECTOR DEL COMITÉ*



---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

*MIEMBRO DEL COMITÉ*



---

M. C. Ma. Elena Solana Arellano

*MIEMBRO DEL COMITÉ*



---

Dr. Helmut Maske Rubach

*JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA*



---

Dr. Luis Alberto Delgado Argote

*DIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO*

31 de mayo de 2001



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE  
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSANADA

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA MARINA

INCORPORACIÓN DE CADMIO EN DIFERENTES ESTRUCTURAS  
DEL MEJILLÓN *Mytilus californianus*  
EN UN MEDIO ESTABLE vs. UN MEDIO VARIABLE

T E S I S

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

LAURA ANGÉLICA DORANTES PARRAL

Ensenada, Baja California, México. Mayo de 2001

RESUMEN de la tesis de LAURA ANGÉLICA DORANTES PARRAL presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Mayo del 2001.

INCORPORACIÓN DE CADMIO EN DIFERENTES ESTRUCTURAS  
DEL MEJILLÓN *Mytilus californianus*  
EN UN MEDIO ESTABLE vs. UN MEDIO VARIABLE

Resumen aprobado por:



Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes  
Director de Tesis

En el presente estudio se evaluó la incorporación de Cd en diferentes tejidos (branquias, borde del manto, masa visceral y pie) del mejillón *Mytilus californianus*. Se establecieron dos medios diferentes de incorporación del metal: un medio estable (ME) en el cual el contaminante se adicionó diariamente y un medio variable (MV) donde la adición se realizó en días alternados. También se instaló un medio de control el cual presentó una concentración natural de Cd disuelto de  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ . En el ME se establecieron cuatro tratamientos con concentraciones de Cd de 1, 5, 10 y  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , y en el MV tres con concentraciones promedio de Cd de 1, 2.5 y  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . El tiempo de exposición de los mejillones al metal fue de 60 días. Una vez disectados los organismos por tejidos, éstos fueron digeridos a vaso abierto con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno. La determinación de Cd se efectuó por espectrofotometría de absorción atómica de flama. Los organismos del medio estable y variable mostraron una tendencia de incorporación lineal de Cd en cada uno de sus tejidos conforme aumentó la concentración del contaminante en el agua. La masa visceral y las branquias acumularon una mayor cantidad de Cd en ambos tratamientos (ME y MV), en comparación con el pie y el borde del manto. La masa visceral y el borde del manto no mostraron diferencias significativas de incorporación de Cd en el ME y MV con respecto a la forma en que fue adicionado el metal. Por el contrario, el pie y el borde del manto mostraron ser sensibles a la forma de adición del Cd, pero sólo a concentraciones altas. Las branquias acumularon significativamente menos Cd ( $11.44 \mu\text{g g}^{-1}$ ) en el MV en comparación con el ME ( $14.21 \mu\text{g g}^{-1}$ ) a una concentración promedio en el agua de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . El pie presentó un comportamiento opuesto, acumulando más Cd en el MV ( $9.16 \mu\text{g g}^{-1}$ ) que en el ME ( $4.61 \mu\text{g g}^{-1}$ ) a la misma concentración promedio ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La masa visceral y el borde del manto resultaron ser capaces de integrar el Cd en el tiempo, por lo que podrían ser utilizados como indicadores de largo plazo. La utilización de las branquias o el pie (tejidos sensibles a la variabilidad ambiental) en conjunto con la masa visceral o el borde del manto (tejidos integradores en el tiempo) abre la posibilidad de obtener un panorama más completo de la forma en que el Cd está siendo incorporado al ambiente.

**Palabras claves:** Cd, masa visceral, branquias, pie, borde del manto, *Mytilus californianus*, incorporación de Cd.



ABSTRACT of the Thesis of LAURA ANGÉLICA DORANTES PARRAL presented in partial fulfillment of the requirements for the degree of MASTER IN SCIENCES in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México. May of 2001.

INCORPORATION OF CADMIUM IN DIFFERENT STRUCTURES  
OF THE MUSSEL *Mytilus californianus*  
IN A STABLE vs. A VARIABLE ENVIRONMENT

Abstract approved by:



---

Ph.D. María Lucila del Carmen Lares Reyes  
Thesis supervisor

The incorporation of Cd in different tissues (gills, mantle edge, visceral mass and foot) of the mussel *Mytilus californianus* was evaluated. Two different systems were settled to test metal incorporation: a stable environment (SE) where Cd concentrations were kept constant and a variable environment (VE) where Cd was added in alternated days. A control system with background Cd concentration of  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  was kept for all the experimental period. For the stable environment four treatments were established with Cd concentrations of 1, 5, 10 and  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  and for the variable environment three treatments were established with average Cd concentrations of 1, 2.5 and  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . The period of Cd exposure was 60 days. The different structures were dissected and wet digested in an open vessel with nitric acid and hydrogen peroxide. The Cd concentrations in the different tissues were determined by flame-atomic absorption spectrometry. All mussel tissues from both environments (stable and variable) incorporated Cd in a linear fashion to Cd increases in the environment. The visceral mass and gills accumulated higher amounts of cadmium in both environments in comparison with the foot and the mantle edge. The visceral mass and the mantle edge did not present significant differences in Cd concentrations with respect to the way that Cd was added (continuous vs. intermittent). On the contrary, the foot and the mantle edge showed to be sensitive to the variation in the environmental conditions, but only at high concentrations. The gills accumulated significantly less cadmium ( $11.44 \mu\text{g g}^{-1}$ ) in the VE compared with the SE ( $14.21 \mu\text{g g}^{-1}$ ) when they were exposed to an average concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . The foot showed an opposite behavior, accumulating more Cd in the VE ( $9.16 \mu\text{g g}^{-1}$ ) than in the SE ( $4.61 \mu\text{g g}^{-1}$ ), again, when the exposure was  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  on average. Based on the results of this work, we propose to use the gills or the foot (tissues sensitive to environmental metal variations) of *M. californianus* together with the visceral mass or the mantle edge (time-integrator tissues) to get a better picture of Cd environmental conditions.

**Key words:** Cd, visceral mass, gills, foot, mantle edge, *Mytilus californianus*, Cd accumulation.

## DEDICATORIA

### *A mis padres*

*Con gran cariño para mis padres  
por estar siempre conmigo alcanzando mis metas  
por su amor y confianza en este largo caminar.*

*Lic. Fco. Javier Dorantes Roa  
Ma. Del Lourdes Parral de Dorantes*

*Para ustedes mi respeto y admiración*

### *A ti*

*Lic. Fco. Javier Dorantes Parral  
Lic. Rafael Dorantes Parral*

*Solo por ser mis hermanos  
Mil gracias por su cariño y por estar siempre cerca de mi*

*Mayra A., mi cuñada  
Javier A. y Maximiliano, mis pequeños y más queridos moustros*

### *A mi familia, con un enorme cariño.....*

*A los GRANDES AMIGOS, por estar conmigo en todo momento  
por compartir las alegrías y darme ánimo cada día.  
Por aquellos veranos llenos de intenso sol y donde  
la adrenalina fue siempre nuestra mejor aliada.  
Por siempre, QUE VIVAN LOS CUATES.....*



## AGRADECIMIENTOS

*A mi directora de tesis Dra. Ma. Lucila del Carmen Lares Reyes  
por el gran apoyo y conocimiento para la elaboración  
del presente estudio*

*A mis sinodales, Dr. Jorge A. Cáceres Martínez y M.C. Ma. Elena Solana Arellano  
por sus acertadas aportaciones y comentarios para mejorar la tesis*

*A Oc. Gabriel Rendón Márquez y al Dr. Lance del Laboratorio de Geoquímica en el  
Departamento de Ciencias de la Tierra del CICESE por su gran apoyo en el  
análisis de las muestras*

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

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México*

## CONTENIDO

| CAPITULO |                                                                                                    | PÁGINA |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| I        | INTRODUCCIÓN                                                                                       | 1      |
| I.1      | ANTECEDENTES                                                                                       | 5      |
| I.1.1    | IMPORTANCIA DEL Cd EN EL MEDIO MARINO Y EN EL HOMBRE                                               | 5      |
| I.1.2    | DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT DE <i>Mytilus Californianus</i>                                             | 6      |
| I.1.3    | IMPORTANCIA DE LOS ORGANISMOS INDICADORES                                                          | 8      |
| I.1.4    | MEJILLONES COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN POR Cd                                                | 9      |
| I.2      | OBJETIVOS                                                                                          | 14     |
| I.3      | HIPÓTESIS                                                                                          | 14     |
| II       | MATERIALES Y MÉTODOS                                                                               | 15     |
| II.1     | DISECCIÓN DEL TEJIDO DE <i>Mitylus californianus</i>                                               | 17     |
| II.2     | ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS                                                                   | 19     |
| II.3     | ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Cd EN EL TEJIDO Y CONTROL DE CALIDAD                             | 21     |
| II.4     | TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS                                                          | 22     |
| III      | RESULTADOS                                                                                         | 23     |
| IV       | DISCUSIÓN                                                                                          | 37     |
| V        | CONCLUSIONES                                                                                       | 46     |
| VI       | RECOMENDACIONES                                                                                    | 47     |
|          | LITERATURA CITADA                                                                                  | 48     |
|          | ANEXO                                                                                              | 55     |
| A        | INCONSISTENCIA DE LOS RESULTADOS DEL “MEDIO ESTABLE” EN EL TRATAMIENTO DE 10 µg Cd L <sup>-1</sup> | 56     |
| B        | RESULTADOS GENERALES DEL ANÁLISIS DE Cd EN EL TEJIDO DEL MEJILLÓN <i>Mytilus californainus</i> .   | 59     |



## ÍNDICE DE FIGURAS

### FIGURA

### PÁGINA

- 
- |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Distribución mundial de las diferentes especies del género <i>Mytilus</i> basado en evidencias de datos morfológicos y/o genéticos de distintos autores (Tomado de Gosling, 1992).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 7  |
| 2 | Sistema experimental para determinar la incorporación de Cd en los diferentes tejidos del mejillón <i>Mytilus californianus</i> en un período de 60 días. Los números de las cubetas tanto en el medio estable como en el variable indican la concentración promedio diaria de Cd en el agua ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) en cada uno de los tratamientos. Los organismos del medio de control permanecieron a una concentración promedio de Cd medida en el agua de $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 18 |
| 3 | Asimilación de Cd en diferentes tejidos del mejillón <i>Mytilus californianus</i> sometidos a concentraciones promedio diarias de 1, 2.5, 5 y $20 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ . En el “medio estable” el Cd se inoculó a los organismos diario y en el “medio variable” fue en días alternados; en ambos durante un período de 60 días. Los organismos del “medio de control” permanecieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de $0.05 \mu\text{g l}^{-1}$ . Las barras representan $\pm 1$ error estándar. Los símbolos en color rojo representan los tejidos de los organismos del medio estable, azul los del medio variable y verdes los del medio de control. El incremento brusco que se nota es aparente ya que se debe a que el eje de la variable independiente tiene un corte en su escala. | 28 |
| 4 | Factor de concentración de Cd en cada una de los tejidos del mejillón <i>Mytilus californianus</i> . Los organismos fueron sometidos a concentraciones promedio diarias de 1, 2.5, 5 y $20 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ . Los símbolos de color rojo representan los tejidos de los organismos del medio estable, azul los del variable y verde los del medio de control.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 34 |
-

# ÍNDICE DE TABLAS

## TABLA

## PÁGINA

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Análisis de la concentración de Cd en el material de referencia (hepatopáncreas de langosta, LUTS-1) (n= 14), mostrando una eficiencia de recuperación del cd en la digestión del 96 %.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 22 |
| 2 | Estadística descriptiva correspondiente a los valores de asimilación de Cd en diferentes tejidos del mejillón <i>Mytilus californianus</i> . Donde: [Cd] medio = concentración promedio de Cd en el agua, [Cd] tejido = concentración de Cd en el tejido en peso seco, PROM = concentración promedio de Cd en el tejido del mejillón $\pm$ 1 desviación estándar, MAX = concentración máxima de Cd en el tejido, MIN= concentración mínima de Cd en el tejido.                                                                                                                                     | 24 |
| 3 | Comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) para identificar diferencias de asimilación entre los tejidos del mejillón <i>Mytilus californianus</i> pertenecientes a un mismo tratamiento. Donde: [Cd] medio = concentración promedio diaria de Cd en el agua en $\mu\text{g L}^{-1}$ , MV = masa visceral, B = branquias, P = pie, BM = borde del manto. Los organismos del medio de control permanecieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores en "negritas" representan las comparaciones significativas de los tratamientos. | 27 |
| 4 | Análisis de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) para determinar diferencias de asimilación de Cd en cada una de los tejidos del mejillón <i>Mytilus californianus</i> en los distintos tratamientos del medio estable y del variable. Donde [Cd] medio = concentración promedio diaria de Cd en el agua. Los organismos del control se mantuvieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores en "negritas" representan las comparaciones significativas de los tratamientos.                                                  | 30 |
| 5 | Pruebas de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) para determinar diferencias de concentración de Cd en los tejidos del mejillón <i>Mytilus californianus</i> comparando el medio estable vs. medio variable. Se presentan solo las comparaciones relevante. Donde: ME = medio estable, MV = medio variable; los números subsiguientes representan las concentraciones promedio del agua que se están comparando en $\mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores en "negritas" representan las diferencias significativas entre los tratamientos.                                                                          | 31 |

- 
- 6 Contenido de Cd en diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus* en un medio estable, variable y de control. Donde: [Cd] medio = concentración promedio diaria de Cd en el agua, P.S. = peso seco del tejido, CONT. = contenido de Cd en el tejido. En el medio de control es la concentración natural de Cd medida en el agua.

33

- 7 Análisis de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar diferencias entre los factores de concentración (FC) de Cd en cada uno de los tejidos del mejillón *Mytilus californianus* en los distintos tratamientos del medio estable y variable. Donde: [Cd] medio = concentración promedio diaria de Cd en el agua. Los organismos del control se mantuvieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores en “negritas” representan las comparaciones significativas de los tratamientos.

36

---



INCORPORACIÓN DE CADMIO EN DIFERENTES ESTRUCTURAS  
DEL MEJILLÓN *Mytilus californianus*  
EN UN MEDIO ESTABLE vs. UN MEDIO VARIABLE

## I INTRODUCCIÓN

Los programas de monitoreo ambiental que realizan el seguimiento sistemático de la contaminación de aguas marinas principalmente por metales traza, han utilizado distintos organismos como especies bioindicadoras de los niveles de concentración del tóxico en el ambiente; tanto los anélidos como los crustáceos y moluscos han sido ampliamente utilizados en estos proyectos. A los mejillones del género *Mytilus* (*M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* y *M. californianus*) se les ha reconocido como excelentes organismos indicadores de contaminación en zonas costeras y tienen ahora un lugar muy importante en este tipo de estudios. De manera general, los programas de monitoreo manifiestan que estos organismos pueden acumular los metales a partir del consumo de alimento y agua en concentraciones que superan considerablemente las encontradas en el ambiente marino y además lo hacen proporcionalmente a las concentraciones del medio (Phillips, 1976).

Existen factores bióticos y abióticos que pueden llegar a influir en la asimilación del Cd por el mejillón como el sexo, etapa de reproducción, tamaño del organismo, temporada de colecta, posición de los organismos en la zona intermareal, presencia de otros metales en el ambiente, entre otros (Cossa, 1989).

Al considerar al mejillón como un organismo indicador, los programas que realizan seguimientos sistemáticos de la contaminación como el "Mussel Watch", suponen que los niveles del metal en el tejido representan la cantidad biodisponible del metal en el ambiente marino (Muñoz-Barbosa, 1997) y que todas las especies del género *Mytilus* integran en el

tiempo y eliminan muy lentamente el contaminante (Cossa, 1989) y por lo tanto pueden llegar a representar el promedio de las concentraciones que se encuentran en el medio en el orden de meses (Phillips, 1976).

La especie más empleada en los programas de seguimiento sistemático de la contaminación efectuados en la costa del Pacífico de Norte América se le conocía como *Mytilus edulis*, pero en 1988 McDonald mediante estudios electroforéticos prueba que existen dos especies diferentes en ésta área, *M. trsossulus* que se distribuye en zonas de aguas frías del Norte de California y Sur de Alaska y *M. galloprovincialis* que se encuentra en aguas templadas del Sur de California. Las investigaciones realizadas por George y Coombs (1977), Scholz (1980), Ritz *et al.* (1982), Luten *et al.* (1986), Coleman *et al.* (1986), Everaarts (1990), entre otros autores demuestran que *M. edulis* llega a manifestar una rápida asimilación de cadmio la cual es lineal con el tiempo de exposición, pero que su capacidad de autodepuración por el contrario es muy lenta, en algunos casos puede llegar a ser hasta 18 veces más lenta que la razón de asimilación. Este mismo comportamiento se ha observado también para otros metales como el plomo (Schulz, 1974) y el cromo (Walsh y O'Halloran, 1998). En la especie *M. californianus* son escasos los estudios realizados sobre cinética de asimilación de metales (Eganhouse y Young, 1978; Reinoso Nuño y Jorajuria, 1988) y aun en eliminación de los mismos (Oullette, 1981). Lares y Orians (1997 y 2001) han demostrado que *M. californianus* tiene la capacidad de representar en su tejido las concentraciones de Cd que se encuentran en el ambiente y que además puede reducir sus niveles del metal significativamente en un intervalo de tiempo muy corto (1-2 días) en comparación con *M. edulis*. De esta manera nos podemos dar cuenta que estas dos especies presentan una cinética de eliminación muy diferente y por lo tanto se pone en duda lo

supuesto anteriormente por los programas de monitoreo ambiental de que las especies de este género presentan un comportamiento cinético similar.

En 1989 Cossa propone evaluar la variación temporal de los metales en las aguas mediante el análisis de los tejidos del mejillón, ya que éstos al tener diferente tiempo de respuesta permiten detectar los cambios de las concentraciones del metal en el medio a diferentes periodos de tiempo.

Roesijadi y Robinson (1994) mencionan que la forma en la que se encuentre el metal también influye en cuanto a qué tipo de estructura lo va a asimilar. Los metales que están relacionados con partículas por lo regular son ingeridos por los organismos en asociación con la comida y los principales tejidos que los asimilan son el hígado y la glándula digestiva; los metales que se presentan en forma disuelta son absorbidos inicialmente por las branquias y el intestino, siendo ésta la vía más importante de asimilación.

Los mejillones de la especie *M. edulis* asimilan el Cd más rápido en el riñón, el pie y las branquias, y los tejidos que llevan a cabo con mayor velocidad la excreción son el riñón, las branquias y el hepatopaneas (George y Coombs, 1977; Scholz, 1980; Everaarts, 1990). En *M. californianus* se ha identificado que las branquias podrían utilizarse como un tejido indicador para comparar variaciones de niveles de Cd en el ambiente marino en un corto tiempo (días) (Lares y Orians, 1997), esto nos indica una cinética de excreción rápida por el tejido.

Debido a que en los estudios realizados por Lares y Orians (1997 y 2001) se ha mencionado que *M. californianus* tiene la capacidad de incorporar y eliminar el Cd rápidamente (1-2 días) y que este hecho se puede ver mejor reflejado en algunos tejidos, en



el presente trabajo se pretende comparar los niveles de Cd asimilado por diferentes tejidos del mejillón *M. californianus* de un medio con concentraciones estables contra las de un medio con concentraciones variables. Si se encuentra diferencia en la asimilación de Cd entre los tejidos, se tratará de inferir cual de ellos participa en mayor grado en la eliminación del metal. De ésta manera se podrá evaluar la capacidad que tiene cada tejido de reflejar la contaminación del medio marino por Cd y así utilizarlo como indicador biológico cuantitativo.

## I. 1 ANTECEDENTES

### I. 1. 1 IMPORTANCIA DEL Cd EN EL MEDIO MARINO Y EN EL HOMBRE

Los océanos como otros cuerpos de agua reciben descargas incontrolables de diversos contaminantes que pueden llegar a ser severamente perjudiciales y causar un desbalance en el medio ambiente aún a concentraciones bajas (Da Costa-Gómez y Valle-Díaz, 1989). Los metales traza, como el Pb, As, Cu, Hg y Cd, son solo algunos de estos elementos tóxicos.

En el ambiente natural los diversos metales traza llegan a tener un papel específico (esenciales y no esenciales) dentro de la biología de los organismos. El Cd en particular, hasta tiempos recientes, no se conocía que participara en ninguna función metabólica importante de los organismos; sin embargo, Price y Morel (1990) encontraron que este metal puede actuar como un nutriente cuando el medio se encuentra limitado por Zn, mejorando el crecimiento de diatomeas (*Thalassiosira weissflogii*); Lee y Morel (1995) demostraron que bajo estas mismas condiciones el Cd puede también mejorar el crecimiento de microalgas clorofitas y prymnesiofitas.

En la columna de agua, el Cd presenta una distribución vertical fuertemente correlacionada con la de los nutrientes inorgánicos como el fosfato y nitrato, caracterizándose por presentar niveles bajos cerca de la superficie ( $5 \text{ ng L}^{-1}$ ) pero incrementando sus valores por debajo de la termoclina, alcanzando sus niveles máximos ( $\approx 120 \text{ ng L}^{-1}$ ) aproximadamente a los 1000 metros de profundidad (Libes, 1992).

Las principales fuentes naturales de Cd al océano son las desembocaduras de los ríos (Libes, 1992). Las actividades antropogénicas como la manufactura de plásticos,

colorantes, pesticidas, baterías de cadmio y níquel, la industria del galvanizado, eléctrica, farmacéutica, metalúrgica, la elaboración de fungicidas, etc., aportan grandes cantidades de Cd al medio ambiente a través de descargas atmosféricas y de aguas residuales (Olguín-Espinoza, 1989; Romero-Vargas, 1995; Lares-Reyes, 1995). El cadmio, como otros metales traza, puede llegar a causar intoxicaciones y en algunos casos la mortandad de aves, organismos marinos y del ser humano. A partir de las intoxicaciones en humanos en Japón a principios de los 50's tanto el cadmio como el mercurio empezaron a adquirir mayor interés (Olguín-Espinoza, 1989). En el hombre, cuando el Cd se incorpora en el organismo puede interferir en el metabolismo del calcio y depositarse en los huesos causando la osteomalacia y/o osteoporosis. El cadmio puede además producir daño al riñón y el hígado (Da Costa-Gómez y Valle-Díaz, 1989).

### **I. 1. 2 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT DE *Mytilus californianus***

Las distintas especies del género *Mytilus* se encuentran ampliamente distribuidas tanto en el hemisferio norte como en el sur ocupando las zonas intermareales de la mayoría de los continentes (Fig. 1). Los factores más importantes que pueden llegar a limitar la distribución de *Mytilus* en la costa son la intolerancia a temperaturas extremas y la desecación en los límites superiores de las áreas rocosas, mientras tanto que en los límites inferiores se ven fuertemente influenciados por los factores biológicos (*e.g.*, depredación y competencia) y en ocasiones por factores físicos (*e.g.*, oleaje extremo) (Seed y Suchanek, 1992).

En particular, *M. californianus* se encuentra distribuido a lo largo de las costas del Pacífico de Norte América, desde las Islas Aleutianas hasta el norte de México (Sarver y



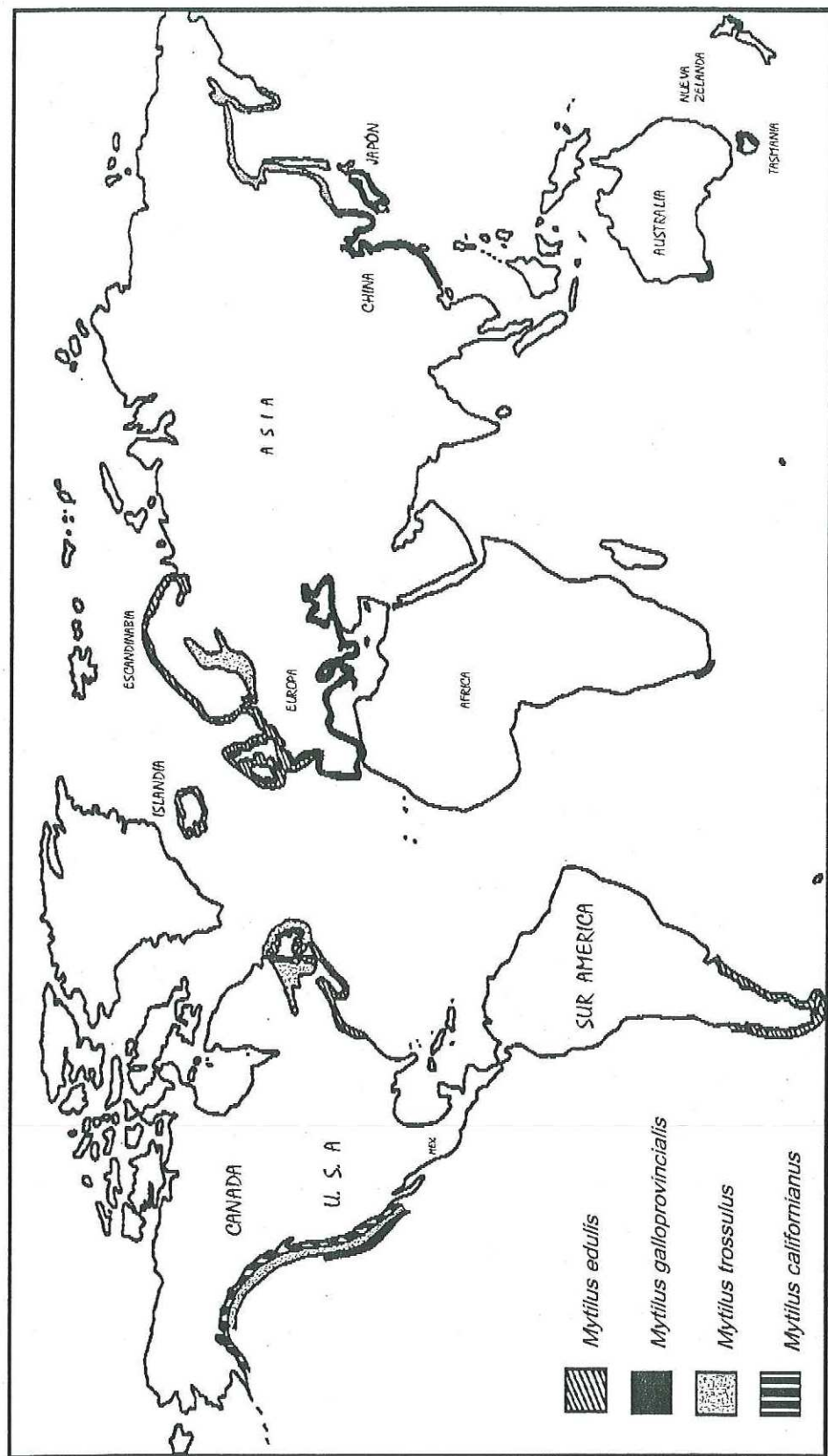


Figura 1. Distribución mundial de las diferentes especies del género *Mytilus* basado en evidencias de datos morfológicos y/o genéticos de distintos autores (Tomado de Gosling, 1992).

Foltz, 1993). En México, *M. californianus* se encuentra densamente distribuido a lo largo de la costa del Pacífico de la península de Baja California desde la frontera con los Estados Unidos de América hasta Bahía Magdalena en el sur de la península, habitando principalmente las áreas intermareales altas y bajas de las costas rocosas expuestas pero también se le puede encontrar a profundidades de 12 metros (Cáceres-Martínez, 1997).

Esta especie presenta una buena razón tanto de supervivencia como de crecimiento y su concha le ofrece una gran resistencia contra sus depredadores. Una gran diversidad de organismos (balanos, poliquetos, isópodos) y flora marina (algas de los géneros *Gelidium sp.*, *Egregia sp.*, *Coralina sp.* y *Gigartina sp.*) se encuentran asociados a esta especie en la misma zona rocosa. Por lo regular *M. galloprovincialis* también se encuentra compartiendo el área intermareal con *M. californianus* pero en menor abundancia, ya que por su débil órgano de fijación (biso) las zonas rocosas expuestas no son un buen sitio para su sobrevivencia y crecimiento (Cáceres-Martínez, 1997).

Hoy en día *M. californianus* es una de las dos especies de mejillón que tiene un excelente potencial para ser cultivada en Baja California (Cáceres-Martínez, 1997); en los mercados europeos llega a tener una gran apreciación por su textura y sabor (Arizpe-Covarrubias, 1992).

### **I. 1. 3 IMPORTANCIA DE LOS ORGANISMOS INDICADORES**

Para evaluar temporal y espacialmente los niveles de contaminación en el ambiente marino se pueden realizar diferentes estudios como análisis de las aguas y sedimentos; sin embargo, la utilización de “organismos indicadores” se considera más apropiada ya que no solo nos indica las concentraciones de los metales en el agua, sino que también puede

representar el valor promedio de la disponibilidad biológica relativa de los metales en la zona, con respecto al tiempo (Muñoz-Barbosa, 1997).

Al mejillón del género *Mytilus* se le considera un excelente indicador de la contaminación marina porque es un organismo sedentario con una extensa distribución geográfica, resiste amplios rangos de salinidad, tiene una gran tolerancia a diferentes tipos de contaminantes en comparación con los peces y crustáceos, sobrevive bajo condiciones de contaminación que a menudo pueden llegar a reducir severamente o eliminar por completo a otras especies, puede ser transplantado en áreas donde otras poblaciones de organismos normalmente no crecerían y, quizás lo más importante, tiene especies con un alto valor comercial a nivel mundial (Farrington, 1983).

#### **I. 1. 4 MEJILLONES COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN POR Cd**

##### *Factores que afectan la concentración del Cd en el organismo*

A partir de que los mejillones se comenzaron a utilizar como bioindicadores también se han realizado investigaciones para conocer los factores o procesos que afectan la variabilidad de la concentración de los metales en el organismo, así como también cuales son aquellos órganos que intervienen en mayor grado en la acumulación y excreción del elemento tóxico.

Los niveles de cadmio en el tejido del organismo pueden estar influenciados por factores internos como el tamaño (Latouche y Mix, 1982); sexo y etapa de madurez del organismo (Cossa *et al.*, 1979; Orren *et al.*, 1980). También por factores externos como el tiempo de exposición del organismo al contaminante y la concentración de éste en el medio (Scholz, 1980; Ritz *et al.*, 1982); salinidad (Lee *et al.*, 1998) y temperatura (Phillips, 1976);



disponibilidad del alimento (Borchardt, 1983); posición de los organismos en la zona intermareal y la temporada de colecta (Cossa, 1989).

Para reducir las variaciones de concentración del metal en el organismo debidas a algunos de los factores anteriormente mencionados se recomienda que los mejillones a analizar sean colectados a una misma altura de marea (Coleman, 1980), presenten un índice de condición (relación peso del tejido:tamaño de la concha) y edad uniforme (relación ancho:alto de la concha) (Lobel *et al.*, 1991); sean organismos que correspondan a una sola población (Ritz *et al.*, 1982); que los mejillones que se pretendan comparar sean colectados en la misma temporada (Phillips, 1976). Latouche y Mix en 1982 al comparar los niveles de Cd en tejido somático y gonadal de *M. edulis* de organismos depurados y sin depurar no encontraron diferencias significativas de concentración, por lo que mencionan que no es necesario someter a los organismos a un régimen como éste previo cuando se pretende evaluar los niveles de Cd en su tejido.

#### *Mecanismos de asimilación de metales traza en tejidos*

De manera general, los tejidos que funcionan como sitios de asimilación (*e.g.* branquias, intestino y glándula digestiva) también tienden a concentrar los metales y por consiguiente, exhiben niveles altos de concentración del tóxico. Los metales que se encuentran en forma disuelta se estima que pueden ser absorbidos por superficies externas del cuerpo como las branquias; los que se presentan en forma particulada por lo regular se llegan a ingerir cuando se encuentran adheridos al alimento para posteriormente ser solubilizados en el intestino (Roesijadi y Robinson, 1994).

Los mejillones pueden absorber los metales por tres formas: 1) difusión de iones o complejos, 2) transporte mediado y/o endocitosis y, 3) pinocitosis; estos mecanismos de

absorción se pueden presentar en órganos como las branquias, glándula digestiva o bien en la superficie del manto pero la importancia relativa de cada uno de los medios dependerá de la forma (especiación) del metal en el medio acuático. La mayoría de los iones metálicos son solo capaces de penetrar el citoplasma de la célula del organismo con la ayuda de una sustancia portadora mediada (ligando) y una vez dentro se tendrán que unir a otros ligandos (amino ácidos, metaloproteínas, glutationinas, etc.) para evitar que se dé una difusión al exterior de la célula (Cossa, 1989).

En particular, el cadmio no se considera que tenga un mecanismo específico de asimilación. Cuando se encuentra en su forma iónica puede atravesar membranas e incluso introducirse por las branquias de los moluscos cuando estos filtran el agua (Roesijadi y Robinson, 1994).

Cuando los metales logran penetrar al organismo del mejillón son atrapados en gránulos o lisosomas los cuales forman sitios de almacenamiento y detoxificación, de esta manera los metales se vuelven químicamente inertes lo que explica la gran resistencia de los mejillones a dosis letales de ciertos metales (Cossa, 1989). Roesijadi y Robinson (1994) mencionan que el riñón y el sistema digestivo son algunas de las principales rutas de excreción. La excreción de los metales puede ocurrir a través del tegumento, por medio del excremento, por producción de bisco, a través de la valva o por emisión de gametos durante el desove (Cossa, 1989).

El utilizar diferentes órganos para evaluar los niveles de contaminación por metales traza tiene mayor ventaja en lugar de manipular todo el tejido. Algunos órganos, como la glándula digestiva y el riñón, tienen la habilidad de concentrar una mayor cantidad de metales que otros pero el principal interés reside en que los diferentes tejidos no tienen la

misma capacidad de respuesta a los cambios en la disponibilidad del metal en el ambiente (Cossa, 1989).

#### *Cinética de asimilación y eliminación del Cd*

Los diferentes estudios sobre bioacumulación de Cd realizados en mejillones del género *Mytilus* prueban que estos organismos asimilan rápidamente el metal y que esta asimilación es lineal con el tiempo de exposición; sin embargo, presentan una capacidad de excreción lenta. Fowler y Benayoun (1974) demostraron que los mejillones de la especie *M. galloprovincialis* asimilaron el Cd en proporción directa a la concentración presente en el agua de mar, pero tanto los organismos que se mantuvieron en el laboratorio como los del campo presentaron una razón de excreción lenta (vida media biológica de 1254 y 307 d, respectivamente). En 1977 George y Coombs probaron que cuando *M. edulis* se encuentra en un medio contaminado por Cd, asimila el metal de forma lineal con el tiempo de exposición y exhibe una concentración directamente proporcional a la del medio; sin embargo, la razón de eliminación llega a ser hasta 18 veces más lenta. Ritz *et al.* (1982) señalaron que *M. edulis* siguió incrementando su concentración de Cd aun cuando permaneció 20 días en un medio de niveles de metal base, pero a una razón menor que cuando se encontraba en un medio altamente contaminado. Borchardt (1983) demostró que *M. edulis* absorbió preferentemente el Cd que se encontraba en solución que aquel en el alimento; indicó que el Cd del alimento contribuyó con un porcentaje de 0.2 a 0.5 % del total asimilado por el organismo y calculó una vida biológica media de 96 a 190 días.

Contrariamente a lo reportado para *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, estudios realizados en el campo por Lares (1988) y Lares y Orians (1997) demostraron que *M. californianus* tiene la capacidad de reducir significativamente las concentraciones de Cd de



su tejido en un tiempo corto (1 ó 2 días), como respuesta a las variaciones de los niveles del metal que se presentan en el medio. Posteriormente, Lares y Orians (2001) corroboraron en el laboratorio la capacidad de eliminación rápida de *M. californianus* y lo compararon con la especie *M. trossulus* (semejante a la especie *M. edulis*). Después de someter un día a *M. trossulus* a concentraciones altas de cadmio ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) encontraron que esta especie no logró disminuir sus niveles a los del control ( $3 \mu\text{g g}^{-1}$ ) después de un periodo de depuración de 5 días, manteniendo una concentración promedio de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco durante este tiempo, por el contrario *M. californianus* sí consiguió reducir significativamente sus niveles en tan solo un día de depuración alcanzando los niveles del control en dos días.

## I. 2 OBJETIVOS

Comparar los niveles de Cd incorporado por el mejillón *Mytilus californianus* entre los medios (control, estable y variable) y la capacidad de asimilación del metal en cada una de las estructuras (pie, branquias, borde del manto y masa visceral) del organismo.

Determinar mediante la comparación del patrón de incorporación de Cd en las estructuras cuál de ellas participa eficazmente en la eliminación del metal.

## I. 3 HIPÓTESIS

Con base en la capacidad de depuración que se ha reportado para la especie *Mytilus californianus* en estudios anteriores (Lares y Orians, 1997 y 2001), se espera que:

Los organismos que permanecieron en un medio con concentraciones estables de Cd disuelto incorporaran en sus tejidos más metal durante el bioensayo que las del medio con concentraciones variables.

Las estructuras de los organismos del medio variable que al compararlas con las del medio estable presenten niveles bajos de concentración de Cd, podrán ser identificadas como las que participan eficazmente en la eliminación del metal.

## II MATERIALES Y MÉTODOS

Los organismos que se utilizaron en el presente estudio fueron proporcionados por la Oc. Lourdes Quiroz Quiroz quien realizó un proyecto de investigación con la finalidad de estudiar la incorporación de cadmio en la capa nacarosa de la concha del mejillón *Mytilus californianus*. Los detalles del experimento se describen a continuación.

Se colectaron aproximadamente 400 mejillones de 5 a 6 cm de longitud del área de Punta Cabras en Baja California, los cuales fueron colocados en bolsas de plástico para ser transportados en hieleras al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, los mejillones fueron colocados en estanques de agua de mar aireada, posteriormente se limpiaron uno por uno con agua de mar corriente para remover la materia orgánica y otros organismos adheridos a la concha. Cada uno de los mejillones fue medido con un vernier de plástico obteniendo así el largo, alto y ancho de la concha (según Seed, 1968). Los organismos se separaron en grupos de 15 y se colocaron en cubetas de plástico las cuales contenían 15 litros de agua de mar filtrada, pasada por U.V. y previamente aireada. Los organismos fueron aclimatados a condiciones de laboratorio por siete días, durante esta fase el agua de mar permaneció con aireación constante, a una temperatura de 18 a 19 °C, un pH de 8.0 a 8.2, una salinidad de 35 a 36 ups y una concentración de oxígeno de 5 a 7 ml L<sup>-1</sup>.

Durante el periodo del bioensayo los organismos fueron alimentados con una mezcla de cultivos fitoplanctónicos de *Chaetoceros* sp. (30 %) e *Isochrysis* sp. (70 %), con una ración diaria de alimento basada en el 2 % del peso seco del mejillón (Bayne, 1975, cit. por Quiroz-Quiroz, 2000).



Al término del período de aclimatación se estableció un “medio de control” con 30 mejillones los cuales fueron separados aleatoriamente en dos cubetas (15 organismos por cubeta), al cual no se le adicionó Cd durante el bioensayo. Por separado, se destinaron 180 organismos para establecer el medio con concentraciones estables (“medio estable”) y 135 organismos para el de concentraciones variables (“medio variable”) de Cd disuelto. Los tres medios se mantuvieron con agua de mar filtrada y pasada por U.V., y con iguales condiciones de laboratorio (temperatura, salinidad, pH y oxígeno) como se mencionó anteriormente. El tiempo de exposición de los mejillones al metal tanto en el medio estable como en el variable fue de 60 días y durante este lapso se sometieron a un recambio de agua diario.

#### MEDIO ESTABLE

Para este medio se establecieron cuatro tratamientos de distintas concentraciones de cadmio (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  Cd), cada uno constaba de tres cubetas y en cada una de estas se colocaron 15 organismos, en total 45 organismos por tratamiento. El Cd se adicionaba todos los días a cada uno de los tratamientos y de esta manera se mantuvieron las condiciones estables de concentración de Cd en el medio durante el bioensayo.

#### MEDIO VARIABLE

Para este medio se establecieron tres tratamientos de diferentes concentraciones de cadmio (2, 5 y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  Cd), cada uno constaba de tres cubetas y en cada una de éstas se colocaron 15 organismos, en total 45 organismos por tratamiento. El Cd se adicionaba en días alternados, de esta manera un día los organismos estaban expuestos a una de las concentraciones de Cd antes mencionadas y al siguiente se remplazaba el agua contaminada

por agua de mar filtrada, pasada por U.V. y de concentraciones naturales de cadmio ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Al finalizar los 60 días del bioensayo los organismos se almacenaron en bolsas de plástico y se congelaron a una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la disección de sus órganos en el laboratorio. La figura 2 muestra el sistema experimental en el cual permanecieron los mejillones en el laboratorio.

## **II. 1 DISECCIÓN DEL TEJIDO DE *Mytilus californianus***

Los recipientes de polietileno de 120 ml de capacidad que se emplearon para almacenar los tejidos de los mejillones recibieron previamente un tratamiento especial de limpieza. Primeramente el material se lavó con jabón Alconox® permaneciendo en esta solución por 12 horas, enseguida se enjuagaron con agua de la llave y finalmente tres veces con agua destilada y desionizada (DDW). A cada recipiente se le agregó 120 ml de ácido clorhídrico 6 M (grado reactivo) y se almacenaron en una cubeta de plástico, la cual permaneció con su tapa parcialmente abierta, por 24 horas y a la temperatura ambiente del laboratorio. Posteriormente se enjuagaron tres veces con DDW, por último permanecieron con ácido clorhídrico 1 M (grado metal traza) durante 12 horas. Antes de almacenar las estructuras en estos recipientes, a cada uno se le vertió el ácido clorhídrico y se enjuagaron tres veces con DDW dejándose secar a temperatura ambiente en el laboratorio.

Previo a la disección, los mejillones se descongelaron a temperatura ambiente una noche anterior en el laboratorio. De cada cubeta se eligieron 10 organismos, aquellos que registraron un crecimiento mayor durante el bioensayo, a los cuales se les realizó la disección de los tejidos (pie, branquias, borde del manto y masa visceral) con un bisturí de acero inoxidable estéril, cortando primeramente el músculo abductor para abrir las valvas.

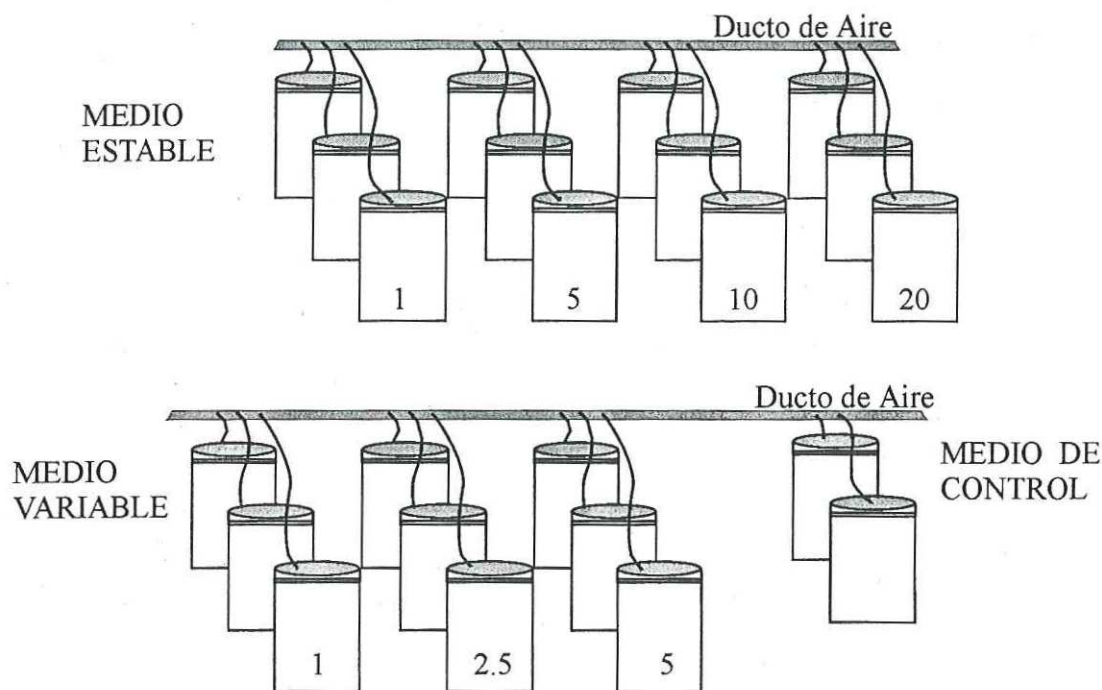


Figura 2. Sistema experimental para determinar la incorporación de Cd en las diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus* en un periodo de 60 días. Los números de las cubetas tanto del "Medio Estable" como del "Medio Variable" indican las concentraciones de cadmio en  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada uno de los tratamientos. Los organismos del "Medio de Control" permanecieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ .



Se ha demostrado que el acero inoxidable no produce contaminación por Cd (Lares com. personal). Cuando se obtuvieron 10 órganos de igual fisiología se transfirieron a un recipiente de polietileno etiquetado y se pesaron en una balanza analítica (Denver Instruments, modelo XE-100). Posteriormente, las muestras se almacenaron en un congelador a  $-15^{\circ}\text{C}$  de temperatura hasta el momento de su análisis en el laboratorio.

## **II. 2 ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS**

### **LIMPIEZA DE LA CRISTALERÍA**

Los vidrios de reloj y vasos de precipitado de 50 ml que se utilizaron en la fase de digestión del tejido, al igual que los viales de polietileno de 30 ml en los que se almacenó la muestra final del análisis del tejido, recibieron un tratamiento especial de limpieza previo. El material se lavó con jabón Alconox<sup>®</sup>, después se enjuagó con agua de la llave y DDW, finalmente se dejaron en ácido clorhídrico (grado reactivo) al 50 % por 24 horas. Al día siguiente se enjuagaron con agua desionizada y después se dejaron en ácido clorhídrico (grado metal traza) al 1 % hasta el momento de su uso en el laboratorio. Un día antes de iniciar la digestión, se enjuagaron con DDW y por último se secaron en el horno a  $75^{\circ}\text{C}$  por 2 horas.

### **SECADO DEL TEJIDO**

Previamente se descongelaron las muestras de tejido y el material de referencia (hepatopáncreas de langosta, LUTS-1, National Research Council Canada) a temperatura ambiente en el laboratorio, posteriormente se transfirieron a cada los vasos de precipitado previamente etiquetados y se pesaron en una balanza analítica registrando su peso inicial como “peso húmedo”. Por último se llevaron a sequedad en un horno a  $75^{\circ}\text{C}$  por 48 horas y al finalizar se volvieron a pesar para registrar de esta forma su “peso seco”.

## DIGESTIÓN DE LA MUESTRA

### 1. ADICIÓN DE ÁCIDO NÍTRICO ( $\text{HNO}_3$ )

Un día anterior a la digestión, se colocaron las muestras de tejido, el estándar de referencia y dos “blancos de reactivo” en una plancha de calentamiento sin temperatura, se les agregó 5 ml de ácido nítrico concentrado (grado metal traza) y se taparon con un vidrio de reloj dejándolas reaccionar de esta forma hasta el siguiente día bajo la campana de extracción.

Al día siguiente se calentaron las muestras a 75 °C vigilando que la espuma de la reacción no se desbordara del vaso de precipitado y cuando ésta empezaba a subir se colocaba el vaso de precipitado fuera de la plancha para que se enfriara la reacción y bajara la espuma, de nuevo se colocaba el vaso de precipitado sobre la plancha.

Cuando la espuma de la reacción desapareció se cubrieron las muestras con el vidrio de reloj y se les dejó en reflujo por tres horas. Posteriormente, se les retiró el vidrio de reloj y se dejaron secar sin aumentar la temperatura. Una vez secas se retiraron de la plancha de calentamiento, se les colocó el vidrio de reloj y se dejaron reposar bajo la campana de extracción hasta el día siguiente.

### 2. CARBONIZACIÓN

Al siguiente día las muestras se calentaron lentamente hasta llegar a los 350 °C. Se inició con 100 °C y poco a poco se fue aumentando la temperatura (50 °C cada 20 minutos) hasta que las muestras humearan, cuando el humo cesó se incremento la temperatura (50 °C cada 30 minutos) hasta llegar a los 350 °C. Las muestras se mantuvieron a esta temperatura por tres horas y finalmente se dejaron reposar hasta el siguiente día.

### 3. ADICIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO ( $H_2O_2$ )

Al día siguiente a cada muestra se le agregó 5 ml de ácido nítrico (grado metal traza) concentrado, se cubrieron con un vidrio de reloj y se mantuvieron en reflujo a una temperatura de 100 °C por dos horas para lavar las paredes interiores de los vpp y disolver los residuos. Al finalizar, se les retiró el vidrio de reloj y se disminuyó la temperatura a 90 °C; posteriormente, a cada una de las muestras se les agregó gota a gota 12 ml de peróxido de hidrógeno concentrado (al 30 %) para evitar que la reacción fuera enérgica. Cuando las muestras aclararon y no hubo burbujas se les colocó el vidrio de reloj y se les dejó en reflujo por una hora. Posteriormente, sin el vidrio de reloj, se dejaron secar y se retiraron de la plancha de calentamiento cuando aún estaban húmedas sin quemarse.

A cada muestra se le agregó 20 ml de ácido nítrico (grado metal traza al 1 %) y se transfirió este líquido a un vial de 30 ml limpio, rotulado y debidamente pesado, cuidando de no transferir material no disuelto. Finalmente se volvió a pesar el vial con el líquido y se registró el peso total en la bitácora.

## II. 3 ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Cd EN EL TEJIDO Y CONTROL DE CALIDAD

Las mediciones de la concentración de cadmio efectuadas sobre los digeridos de las diferentes estructuras, blancos y material de referencia (LUTS-1) se realizaron con un espectrofotómetro de absorción atómica de flama (aire-acetileno) marca Thermo Jarrell Ash Corporation, modelo 042207-00. El límite de detección instrumental fue de 0.0005 ppm ( $n=30$ ), calculado como tres veces la desviación estándar del blanco ( $HNO_3$  grado metal traza al 1 %). El límite de detección del método fue de  $0.015 \pm 0.001$  ppm ( $n=30$ ).



Tabla I. Análisis de la concentración de Cd en el material de referencia (hepatopancreas de langosta, LUTS-1, National Research Council Canada) (n = 14), mostrando una eficiencia de recuperación del Cd en la digestión del 96 %.

| Material de referencia          | Valor certificado | Valor obtenido |
|---------------------------------|-------------------|----------------|
| LUTS-1 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | $14.2 \pm 1.0$    | $14.6 \pm 0.8$ |

Con la finalidad de conocer la capacidad de acumulación de Cd por las estructuras conforme variaba la concentración del metal en el medio se estimó el factor de concentración (FC) para cada una de ellas de la siguiente manera:

$$\text{FC} = \frac{\text{Concentración de Cd en la estructura } (\mu\text{g g}^{-1})}{\text{Concentración de Cd en el medio } (\mu\text{g g}^{-1}) (10^{-3})}$$

## II. 4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

A los resultados obtenidos se les aplicó una estadística descriptiva además de las pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianza (Bartlett) requeridas para efectuar estadística paramétrica. También se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos de cada uno de los medios (estable y variable) para cada estructura y un ANOVA de dos vías para comparar el medio estable con el variable para cada órgano. El procesamiento estadístico se realizó en el paquete "Statistics, 5.1" para Windows.

### III RESULTADOS

Los resultados de concentración de Cd de los organismos que se mantuvieron en el tratamiento de  $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$  del medio estable se discuten por separado en el anexo I debido a que en ellos se encontraron inconsistencias que podrían deberse a la manipulación del experimento o al análisis de los tejidos del mejillón en el laboratorio.

En la tabla II se presentan los promedios, valores máximos y mínimos obtenidos de la estadística descriptiva aplicada a los valores de concentración de Cd en los diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus* tanto del medio de control, estable como del variable. La concentración fue calculada a partir del peso seco del tejido.

De los organismos que permanecieron en el medio de control (concentración de Cd medida en el agua,  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en promedio las branquias mostraron una mayor concentración de Cd ( $8.10 \mu\text{g g}^{-1}$ ), seguidas por la masa visceral ( $7.41 \mu\text{g g}^{-1}$ ), el borde del manto ( $3.50 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y finalmente el pie ( $1.58 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Tanto en el medio estable como en el variable, la masa visceral fue la que asimiló una mayor cantidad de Cd seguida por las branquias, el pie y el borde del manto.

Los tejidos del medio estable mostraron un incremento en la concentración de Cd conforme aumentó la cantidad del contaminante en el medio. La masa visceral en promedio fue el tejido que alcanzó los valores más altos de concentración de Cd en cada uno de los tratamientos del medio estable. En el tratamiento de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (1) obtuvo una concentración de  $7.23 \mu\text{g g}^{-1}$ , en el de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (5) aumentó casi al doble ( $13.45 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y en el de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (20) fue de  $28.82 \mu\text{g g}^{-1}$ . Las branquias en el tratamiento 1 alcanzaron una concentración de  $6.99 \mu\text{g g}^{-1}$  y en el de 5 aumentaron a  $14.21 \mu\text{g g}^{-1}$ , pero su valor

Tabla II. Estadística descriptiva correspondiente a los valores de asimilación de Cd en diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus*. Donde: [Cd] medio = concentración promedio de Cd en el agua, [Cd] tejido = concentración de Cd en el tejido en peso seco, PROM = concentración promedio de Cd en el tejido del mejillón  $\pm$  1 desviación estándar, MAX concentración máxima de Cd en el tejido, MIN = concentración mínima de Cd en el tejido.

| MEDIO ESTABLE                          |                 |                                      |       | MEDIO VARIABLE                         |                 |                                      |       |
|----------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-------|----------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-------|
| [Cd] medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | TEJIDO          | [Cd] tejido ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |       | [Cd] medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | TEJIDO          | [Cd] tejido ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |       |
|                                        |                 | PROM.                                | MAX.  |                                        |                 | PROM.                                | MAX.  |
| 1                                      | Masa visceral   | 7.23 $\pm$ 0.79                      | 7.73  | 1                                      | Masa visceral   | 7.32 $\pm$ 1.13                      | 8.18  |
| 5                                      | Masa visceral   | 13.45 $\pm$ 1.02                     | 14.30 | 2.5                                    | Masa visceral   | 10.47 $\pm$ 1.81                     | 12.41 |
| 20                                     | Masa visceral   | 28.82 $\pm$ 5.33                     | 35.50 | 5                                      | Masa visceral   | 13.52 $\pm$ 0.57                     | 14.13 |
| 1                                      | Branquias       | 6.99 $\pm$ 1.41                      | 8.79  | 1                                      | Branquias       | 7.39 $\pm$ 0.23                      | 7.67  |
| 5                                      | Branquias       | 14.21 $\pm$ 0.56                     | 14.70 | 2.5                                    | Branquias       | 9.57 $\pm$ 1.24                      | 10.82 |
| 20                                     | Branquias       | 27.10 $\pm$ 1.12                     | 28.14 | 5                                      | Branquias       | 11.44 $\pm$ 0.64                     | 12.06 |
| 1                                      | Pie             | 2.31 $\pm$ 0.68                      | 3.05  | 1                                      | Pie             | 3.63 $\pm$ 1.46                      | 5.39  |
| 5                                      | Pie             | 4.61 $\pm$ 2.18                      | 7.40  | 2.5                                    | Pie             | 5.67 $\pm$ 2.80                      | 9.27  |
| 20                                     | Pie             | 15.16 $\pm$ 2.35                     | 18.10 | 5                                      | Pie             | 9.16 $\pm$ 0.78                      | 10.12 |
| 1                                      | Borde del manto | 3.99 $\pm$ 0.89                      | 5.04  | 1                                      | Borde del manto | 3.69 $\pm$ 0.36                      | 4.14  |
| 5                                      | Borde del manto | 5.57 $\pm$ 0.63                      | 6.32  | 2.5                                    | Borde del manto | 4.74 $\pm$ 0.27                      | 5.03  |
| 20                                     | Borde del manto | 10.28 $\pm$ 1.21                     | 11.80 | 5                                      | Borde del manto | 5.12 $\pm$ 0.14                      | 5.26  |

| MEDIO DE CONTROL                       |                 |                                      |      |
|----------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|------|
| [Cd] medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | TEJIDO          | [Cd] tejido ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |      |
|                                        |                 | PROM.                                | MAX. |
| 0.05                                   | Masa visceral   | 7.41 $\pm$ 0.37                      | 7.73 |
| 0.05                                   | Branquias       | 8.10 $\pm$ 0.76                      | 8.72 |
| 0.05                                   | Pie             | 1.58 $\pm$ 0.48                      | 1.99 |
| 0.05                                   | Borde del manto | 3.50 $\pm$ 0.59                      | 3.87 |



más alto se registró en el tratamiento de 20 ( $27.10 \mu\text{g g}^{-1}$ ). El pie en el tratamiento 1 concentró  $2.31 \mu\text{g g}^{-1}$  de Cd y en el 5 aumentó a  $4.61 \mu\text{g g}^{-1}$ , alcanzando valores de  $15.16 \mu\text{g g}^{-1}$  en el tratamiento 20. El borde del manto en el tratamiento 1 presentó una concentración mayor que el pie ( $3.99 \mu\text{g g}^{-1}$ ), alcanzando un valor de  $10.28 \mu\text{g g}^{-1}$  en el tratamiento 20.

Los organismos del medio variable en promedio permanecieron a la misma concentración diaria que los organismos del medio estable por lo que la adición, en días alternados, de 2, 5 y  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  del medio variable equivale a 1, 2.5 y  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Al igual que en el medio estable los tejidos de los mejillones que permanecieron en el medio variable, también mostraron un incremento en su concentración de Cd conforme aumentó la cantidad del contaminante en el agua. La masa visceral concentró una mayor cantidad de Cd en los tres tratamientos [1 ( $7.32 \mu\text{g g}^{-1}$ ), 2.5 ( $10.47 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y 5 ( $13.52 \mu\text{g g}^{-1}$ )]. Las branquias mantuvieron un comportamiento muy similar al tejido anterior en los tratamientos de 1 y 2.5 ( $7.39$  y  $9.57 \mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente) alcanzando una concentración de  $11.44 \mu\text{g g}^{-1}$  en el 5. El pie en el tratamiento 1 obtuvo valores de concentración de  $3.63 \mu\text{g g}^{-1}$  y  $9.16 \mu\text{g g}^{-1}$  en el 5. El borde del manto en el tratamiento 1 acumuló una concentración de Cd ligeramente mayor que el pie ( $3.69 \mu\text{g g}^{-1}$ ), incrementándose hasta  $5.12 \mu\text{g g}^{-1}$  en el tratamiento 5.

Para determinar si las diferencias de asimilación de Cd entre los tejidos pertenecientes a un mismo tratamiento tanto para el medio estable, medio variable como para el control eran significativas, se realizaron ANOVA de una vía. Dado que se encontraron diferencias significativas en todos los casos se procedió a realizar las pruebas

de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) correspondientes para conocer entre qué tejidos se presentaron estas diferencias (Tabla III).

No se encontraron diferencias significativas entre la masa visceral y las branquias en ninguno de los tres tratamientos del medio estable (1, 5 y 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), los dos primeros del medio variable (1 y 2.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e incluso en el control. Sin embargo, al comparar el pie y el borde del manto de los tratamientos 1 y 20 del medio estable se encontró que las diferencias sí fueron significativas entre ellos y en comparación con los dos primeros tejidos; en el tratamiento 5 al relacionar el borde del manto vs. el pie no se encontraron diferencias significativas de concentración, pero estos mismos tejidos sí fueron diferentes comparados con la masa visceral y las branquias. En el medio variable al comparar el borde del manto vs. el pie en los tratamientos 1 y 2.5 se encontró que no hubo diferencias significativas de asimilación de Cd, mientras que para esos dos mismos tratamientos al comparar el pie y el borde del manto con la masa visceral y las branquias sí se encontraron diferencias significativas; únicamente en el tratamiento 5 la asimilación en cada una de los tejidos fue significativamente diferente entre sí. En cuanto a los organismos del medio de control se encontraron diferencias significativas de concentración entre cada uno de los tejidos excepto en la masa visceral y las branquias como se mencionó anteriormente. Este comportamiento de asimilación de Cd de cada una de los tejidos de los diferentes medios se puede observar en la figura 3.

Para determinar si hubo diferencias entre la concentración de Cd alcanzada por cada uno de los tejidos debido a los distintos tratamientos (estable, variable y

Tabla III. Comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para identificar diferencias de asimilación entre los tejidos del mejillón *Mytilus californianus* pertenecientes a un mismo tratamiento. Donde: [Cd] medio = concentración promedio diaria de Cd en el agua en  $\mu\text{g L}^{-1}$ , MV = masa visceral, B = branquias, P = pie, BM = borde del manto. Los organismos del medio de control permanecieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores en “negritas” representan las comparaciones significativas de los tratamientos.

| MEDIO ESTABLE    |          |          |           | MEDIO VARIABLE |          |          |           |
|------------------|----------|----------|-----------|----------------|----------|----------|-----------|
| [Cd] medio 1     |          |          |           | [Cd] medio 1   |          |          |           |
|                  | <i>B</i> | <i>P</i> | <i>BM</i> |                | <i>B</i> | <i>P</i> | <i>BM</i> |
| <i>MV</i>        | 0.975    | <0.001   | <0.001    | <i>MV</i>      | 0.999    | <0.001   | <0.001    |
| <i>B</i>         |          | <0.001   | <0.001    | <i>B</i>       |          | <0.001   | <0.001    |
| <i>P</i>         |          |          | 0.036     | <i>P</i>       |          |          | 0.999     |
| [Cd] medio 5     |          |          |           | [Cd] medio 2.5 |          |          |           |
|                  | <i>B</i> | <i>P</i> | <i>BM</i> |                | <i>B</i> | <i>P</i> | <i>BM</i> |
| <i>MV</i>        | 0.728    | <0.001   | <0.001    | <i>MV</i>      | 0.816    | <0.001   | <0.001    |
| <i>B</i>         |          | <0.001   | <0.001    | <i>B</i>       |          | 0.006    | <0.001    |
| <i>P</i>         |          |          | 0.574     | <i>P</i>       |          |          | 0.802     |
| [Cd] medio 20    |          |          |           | [Cd] medio 5   |          |          |           |
|                  | <i>B</i> | <i>P</i> | <i>BM</i> |                | <i>B</i> | <i>P</i> | <i>BM</i> |
| <i>MV</i>        | 0.761    | <0.001   | <0.001    | <i>MV</i>      | <0.001   | <0.001   | <0.001    |
| <i>B</i>         |          | <0.001   | <0.001    | <i>B</i>       |          | <0.001   | <0.001    |
| <i>P</i>         |          |          | 0.050     | <i>P</i>       |          |          | <0.001    |
| MEDIO DE CONTROL |          |          |           |                |          |          |           |
|                  | <i>B</i> | <i>P</i> | <i>BM</i> |                |          |          |           |
| <i>MV</i>        | 0.366    | <0.001   | <0.001    |                |          |          |           |
| <i>B</i>         |          | <0.001   | <0.001    |                |          |          |           |
| <i>P</i>         |          |          | 0.002     |                |          |          |           |

\*Los valores de la tabla son los valores de *p*



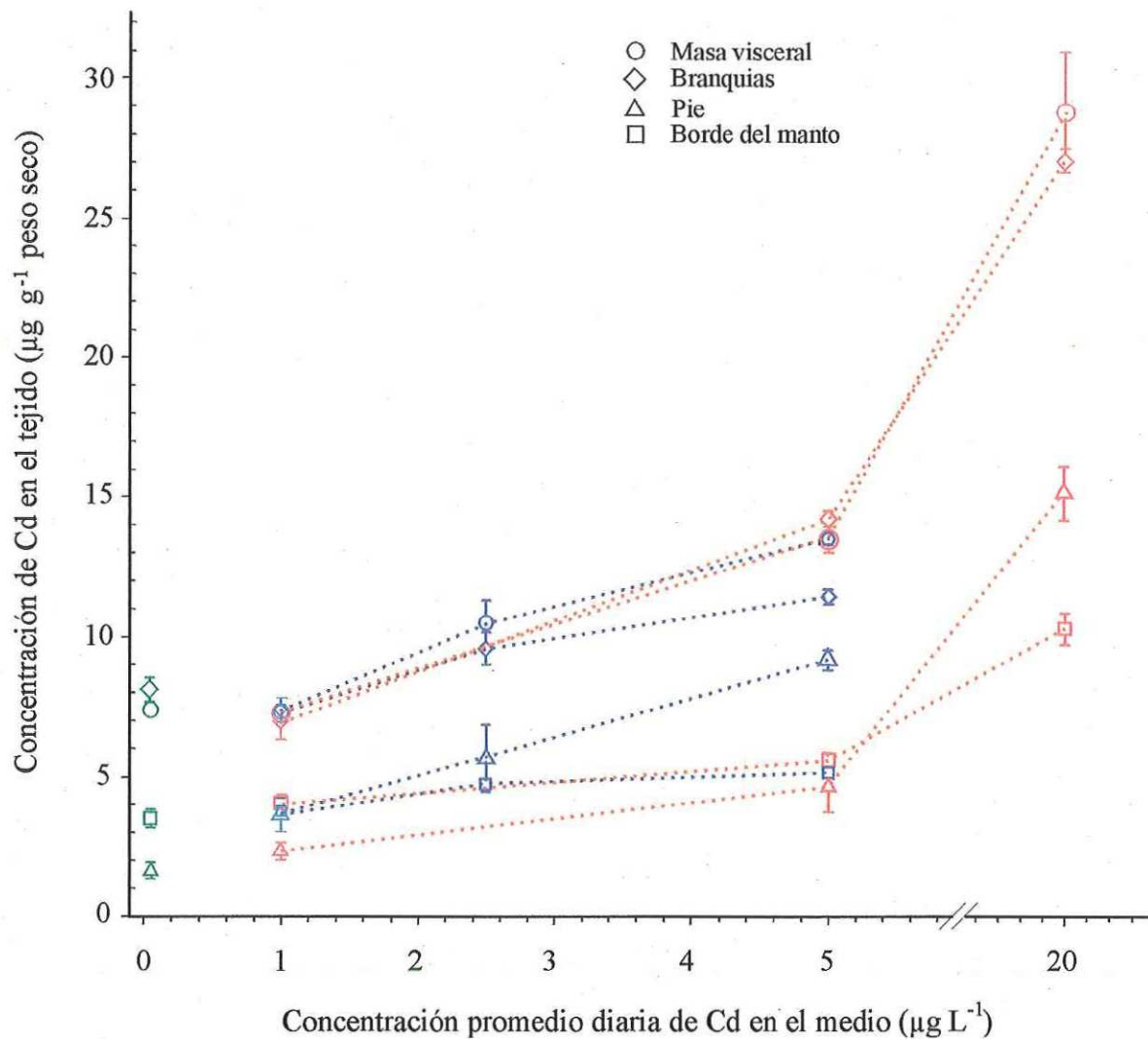


Figura 3. Asimilación de Cd en diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus* sometidos a concentraciones promedio diarias de 1, 2.5, 5 y 20  $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ . En el “medio estable” el Cd se inoculó a los organismos diario y en el “medio variable” fue en días alternados; en ambos durante un período de 60 días. Los organismos del “medio de control” permanecieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Las barras representan  $\pm 1$  error estándar. Los símbolos en color rojo representan los tejidos de los organismos del medio estable, azul los del medio variable y verde los del medio de control. El incremento brusco que se nota es aparente ya que se debe a que el eje de la variable independiente tiene un corte en su escala.

control) se realizaron ANOVA de una vía. Estos mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en todos los casos. Las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) correspondientes se presentan en la tabla IV. En general, tanto para el medio estable como para el variable no se encontraron diferencias significativas de concentración de Cd en ninguno de los tejidos de los mejillones entre los tratamientos 1 y control. En el medio estable la masa visceral, las branquias y el borde del manto los tratamientos 5 y 20 fueron diferentes entre sí y con respecto al 1 y el control; el pie sólo mostró diferencias significativas de asimilación en el tratamiento 20 con respecto a los demás. En el medio variable los análisis de comparaciones múltiples indican que la masa visceral y las branquias mostraron diferencias significativas en el tratamiento 5 con respecto a los demás (excepto entre el control y el 1 como se mencionó anteriormente); el pie mostró diferencias en el tratamiento 5 con respecto a los demás y el tratamiento 2.5 solo con el control; en el borde del manto los tratamientos 2.5 y 5 fueron diferentes al control y al tratamiento 1.

Con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas de asimilación de Cd en los tejidos del mejillón cuando se encontraban en un medio contaminado todo el tiempo y en uno contaminado de forma pausada se realizaron ANOVA de dos vías. Dado que todos los análisis anteriores señalaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se procedió a efectuar las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para conocer dónde estaban las diferencias (Tabla V). En esta tabla sólo se presentan las comparaciones entre el tratamiento 1 del medio estable (ME) vs. 1 del medio variable (MV) y el 5 ME vs. 5 MV para cada una de los tejidos, ya que sólo estas comparaciones son relevantes. Únicamente en las branquias y el pie se encontraron diferencias significativas de

Tabla IV. Análisis de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar diferencias de asimilación de Cd en cada uno de los tejidos del mejillón *Mytilus californianus* en los distintos tratamientos del medio estable y del variable. Donde: [Cd] medio = concentración promedio diaria de Cd en el agua. Los organismos del control se mantuvieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores en “negritas” representan las comparaciones significativas de los tratamientos.

| MEDIO ESTABLE                         |       |                  |                  | MEDIO VARIABLE                        |       |                  |                  |
|---------------------------------------|-------|------------------|------------------|---------------------------------------|-------|------------------|------------------|
| <i>Masa visceral</i>                  |       |                  |                  | <i>Masa visceral</i>                  |       |                  |                  |
| [Cd]medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | 1     | 5                | 20               | [Cd]medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | 1     | 2.5              | 5                |
| <i>control</i>                        | 0.999 | <b>0.022</b>     | <b>&lt;0.001</b> | <i>control</i>                        | 0.999 | <b>0.004</b>     | <b>&lt;0.001</b> |
| 1                                     |       | <b>0.007</b>     | <b>&lt;0.001</b> | 1                                     |       | <b>0.001</b>     | <b>&lt;0.001</b> |
| 5                                     |       |                  | <b>&lt;0.001</b> | 2.5                                   |       |                  | <b>0.001</b>     |
| <i>Branquias</i>                      |       |                  |                  | <i>Branquias</i>                      |       |                  |                  |
|                                       | 1     | 5                | 20               |                                       | 1     | 2.5              | 5                |
| <i>control</i>                        | 0.379 | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | <i>control</i>                        | 0.542 | <b>0.050</b>     | <b>&lt;0.001</b> |
| 1                                     |       | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> | 1                                     |       | <b>0.001</b>     | <b>&lt;0.001</b> |
| 5                                     |       |                  | <b>&lt;0.001</b> | 2.5                                   |       |                  | <b>0.004</b>     |
| <i>Pie</i>                            |       |                  |                  | <i>Pie</i>                            |       |                  |                  |
|                                       | 1     | 5                | 20               |                                       | 1     | 2.5              | 5                |
| <i>control</i>                        | 0.913 | 0.064            | <b>&lt;0.001</b> | <i>control</i>                        | 0.289 | <b>0.009</b>     | <b>&lt;0.001</b> |
| 1                                     |       | 0.137            | <b>&lt;0.001</b> | 1                                     |       | 0.205            | <b>&lt;0.001</b> |
| 5                                     |       |                  | <b>&lt;0.001</b> | 2.5                                   |       |                  | <b>0.012</b>     |
| <i>Borde del manto</i>                |       |                  |                  | <i>Borde del manto</i>                |       |                  |                  |
|                                       | 1     | 5                | 20               |                                       | 1     | 2.5              | 5                |
| <i>control</i>                        | 0.832 | <b>0.010</b>     | <b>&lt;0.001</b> | <i>control</i>                        | 0.840 | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| 1                                     |       | <b>0.031</b>     | <b>&lt;0.001</b> | 1                                     |       | <b>&lt;0.001</b> | <b>&lt;0.001</b> |
| 5                                     |       |                  | <b>&lt;0.001</b> | 2.5                                   |       |                  | 0.274            |

\*Los valores de la tabla son los valores *p*



Tabla V. Pruebas de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar diferencias de concentración de Cd en los tejidos del mejillón *Mytilus californianus* comparando el medio estable vs. medio variable. Se presentan solo las comparaciones relevantes. Donde: ME = medio estable, MV = medio variable; los números subsiguientes representan las concentraciones promedio del agua que se están comparando en  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores en “negritas” representan las diferencias significativas entre los tratamientos.

|                        |             |                  |
|------------------------|-------------|------------------|
| <b>Branquias</b>       |             |                  |
|                        | <i>MV 1</i> | <i>MV 5</i>      |
| <i>ME 1</i>            | 0.836       |                  |
| <i>ME 5</i>            |             | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Pie</b>             |             |                  |
|                        | <i>MV 1</i> | <i>MV 5</i>      |
| <i>ME 1</i>            | 0.393       |                  |
| <i>ME 5</i>            |             | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Borde del manto</b> |             |                  |
|                        | <i>MV 1</i> | <i>MV 5</i>      |
| <i>ME 1</i>            | 0.804       |                  |
| <i>ME 5</i>            |             | 0.548            |
| <b>Masa visceral</b>   |             |                  |
|                        | <i>MV 1</i> | <i>MV 5</i>      |
| <i>ME 1</i>            | 0.998       |                  |
| <i>ME 5</i>            |             | 0.999            |

\*Los valores de la tabla son los valores *p*

asimilación al relacionar el tratamiento 5 ME vs. 5 MV. En la figura 3 se pueden observar estas diferencias de asimilación de Cd de los tejidos comparando la forma de contaminación del medio.

Para poder comparar el aporte de Cd de cada uno de los tejidos a la cantidad total en el mejillón, se calculó el contenido de Cd en los diferentes tejidos para cada uno de los tratamientos. Los resultados indican (Tabla VI) que tanto en el medio estable, variable como en el control la masa visceral y las branquias fueron los tejidos que aportaron más al contenido de Cd total a diferencia del pie y el borde del manto. El borde del manto fue el de mayor peso de tejido, sin embargo, sus bajas concentraciones (ver Tabla II) hacen que no aporte una gran cantidad al contenido total de Cd. Por su parte, el pie a pesar de alcanzar concentraciones mayores que el manto a exposiciones altas de Cd, el peso de su tejido es tan bajo que es el que menos aportó al contenido total de Cd en el mejillón.

Con la finalidad de conocer la capacidad de acumulación de Cd por los tejidos conforme aumentaba la concentración del metal en el medio se estimó el factor de concentración (FC) para cada una de ellos. La figura 4 nos muestra como cada tejido disminuyó su capacidad de concentración mientras que el nivel de Cd en el medio aumentaba. Tanto en el medio estable como en el variable la masa visceral fue la que mostró el más alto FC en el tratamiento de mayor concentración de Cd, posteriormente las branquias, pie y finalmente el borde del manto. En el medio de control las branquias presentaron el mayor valor del FC seguidas por la masa visceral, borde del manto y el pie.

Tabla VI. Contenido de Cd en diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus* en un medio estable, variable y control. Donde: [Cd] medio = concentración promedio diaria de Cd en el agua, P.S. = peso seco del tejido, CONT. = contenido de Cd en el tejido. En el medio de control es la concentración natural de Cd medida en el agua.

| MEDIO ESTABLE                          |                 |             |                            | MEDIO VARIABLE                         |                 |             |                            |
|----------------------------------------|-----------------|-------------|----------------------------|----------------------------------------|-----------------|-------------|----------------------------|
| [Cd] medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | TEJIDO          | P.S.<br>(g) | CONT.<br>( $\mu\text{g}$ ) | [Cd] medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | TEJIDO          | P.S.<br>(g) | CONT.<br>( $\mu\text{g}$ ) |
| 1                                      | Masa visceral   | 0.718       | 5.161                      | 1                                      | Masa visceral   | 0.597       | 4.244                      |
|                                        | Branquias       | 0.492       | 3.388                      |                                        | Branquias       | 0.577       | 5.262                      |
|                                        | Pie             | 0.307       | 0.711                      |                                        | Pie             | 0.281       | 1.021                      |
|                                        | Borde del manto | 0.802       | 3.168                      |                                        | Borde del manto | 0.778       | 2.829                      |
| 5                                      | Masa visceral   | 0.669       | 9.004                      | 2.5                                    | Masa visceral   | 0.666       | 6.823                      |
|                                        | Branquias       | 0.594       | 8.41                       |                                        | Branquias       | 0.639       | 6.175                      |
|                                        | Pie             | 0.303       | 1.395                      |                                        | Pie             | 0.303       | 1.721                      |
|                                        | Borde del manto | 0.727       | 4.963                      |                                        | Borde del manto | 0.769       | 3.652                      |
| 20                                     | Masa visceral   | 0.652       | 18.836                     | 5                                      | Masa visceral   | 0.645       | 8.699                      |
|                                        | Branquias       | 0.633       | 17.136                     |                                        | Branquias       | 0.779       | 8.943                      |
|                                        | Pie             | 0.293       | 4.441                      |                                        | Pie             | 0.341       | 3.121                      |
|                                        | Borde del manto | 0.851       | 8.841                      |                                        | Borde del manto | 0.889       | 4.556                      |
| MEDIO DE CONTROL                       |                 |             |                            |                                        |                 |             |                            |
| [Cd] medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | TEJIDO          | P.S.<br>(g) | CONT.<br>( $\mu\text{g}$ ) |                                        |                 |             |                            |
| 0.05                                   | Masa visceral   | 0.431       | 3.165                      |                                        |                 |             |                            |
|                                        | Branquias       | 0.539       | 4.354                      |                                        |                 |             |                            |
|                                        | Pie             | 0.306       | 0.484                      |                                        |                 |             |                            |
|                                        | Borde del manto | 0.754       | 2.639                      |                                        |                 |             |                            |



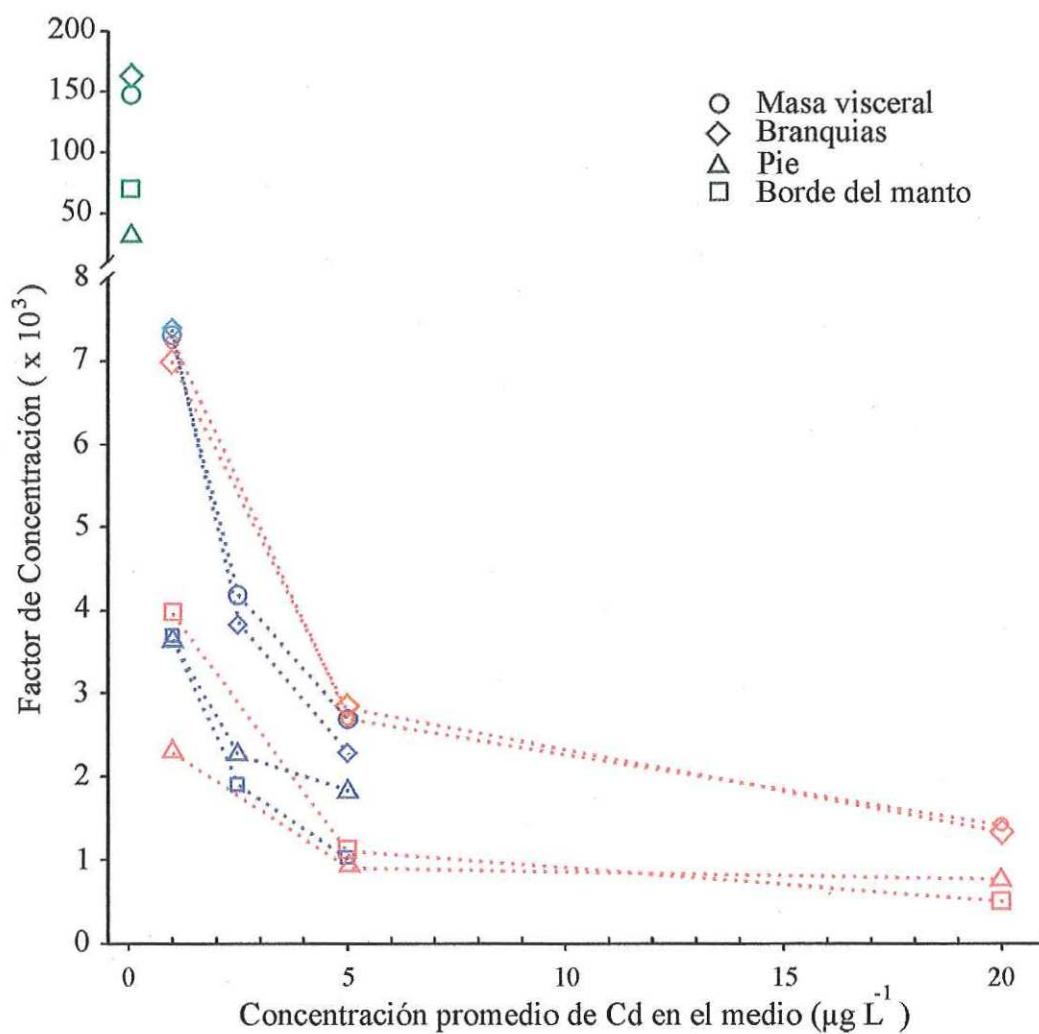


Figura 4. Factor de concentración de Cd en los tejidos del mejillón *Mytilus californianus*. Los organismos fueron sometidos a concentraciones promedio diarias de 1, 2.5, 5 y 20  $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ . Los símbolos de color rojo representan los tejidos de los organismos del medio estable, azul los del medio variable y verde los del medio de control.

Con el objetivo de determinar diferencias significativas entre el FC de Cd alcanzado por cada uno de los tejidos del organismo debido a los distintos tratamientos de los medios (estable, variable y control), se realizaron pruebas de ANOVA de una vía. Estos mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en todos los casos por lo que se procedió a realizar pruebas de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Los resultados del análisis (Tabla VII) nos muestran que todos los tejidos de los organismos del control alcanzaron el FC significativamente más alto en comparación con las del ME y MV. En el ME las branquias, pie y borde del manto presentaron diferencias significativas en el FC al comparar el tratamiento 1 vs. 5 y 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , pero el factor fue el mismo al comparar el 5 vs. 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; solamente la masa visceral mostró diferencias significativas entre cada tratamiento. En el MV el pie no presentó diferencias significativas en el FC aun cuando las concentraciones de los tratamientos aumentaron, la masa visceral mostró diferencias al comparar la concentración 1 vs. 2.5 y 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , el FC en las branquias y el borde del manto fue diferente entre todos los tratamientos.

Para determinar si existían diferencias en el FC comparando el medio estable con el variable, se realizaron ANOVA de dos vías entre los tratamientos 1 ME vs. 1 MV y 5 ME vs. 5 MV para cada uno de los tejidos, ya que sólo estas comparaciones son relevantes. Los análisis anteriores no señalaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), por lo que se asume que el FC no se modificó por la forma como se adicionó el Cd al agua.

Tabla VII. Análisis de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar diferencias entre los factores de concentración (FC) de Cd en cada uno de los tejidos del mejillón *Mytilus californianus* en los distintos tratamientos del medio estable y variable. Donde: [Cd] medio = concentración promedio diaria de Cd en el agua. Los organismos del control se mantuvieron a una concentración natural de Cd medida en el agua de  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores en "negritas" representan las comparaciones significativas de los tratamientos.

| MEDIO ESTABLE                          |        |        |        | MEDIO VARIABLE                         |        |        |        |
|----------------------------------------|--------|--------|--------|----------------------------------------|--------|--------|--------|
| <i>Masa visceral</i>                   |        |        |        | <i>Masa visceral</i>                   |        |        |        |
| [Cd] medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | 1      | 5      | 20     | [Cd] medio<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | 1      | 2.5    | 5      |
| control                                | <0.001 | <0.001 | <0.001 | control                                | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| 1                                      |        | <0.001 | <0.001 | 1                                      |        | 0.010  | 0.001  |
| 5                                      |        |        | 0.022  | 2.5                                    |        |        | 0.170  |
| <i>Branquias</i>                       |        |        |        | <i>Branquias</i>                       |        |        |        |
|                                        | 1      | 5      | 20     |                                        | 1      | 2.5    | 5      |
| control                                | <0.001 | <0.001 | <0.001 | control                                | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| 1                                      |        | 0.003  | <0.001 | 1                                      |        | <0.001 | <0.001 |
| 5                                      |        |        | 0.191  | 2.5                                    |        |        | 0.004  |
| <i>Pie</i>                             |        |        |        | <i>Pie</i>                             |        |        |        |
|                                        | 1      | 5      | 20     |                                        | 1      | 2.5    | 5      |
| control                                | <0.001 | <0.001 | <0.001 | control                                | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| 1                                      |        | 0.044  | 0.028  | 1                                      |        | 0.400  | 0.234  |
| 5                                      |        |        | 0.929  | 2.5                                    |        |        | 0.896  |
| <i>Borde del manto</i>                 |        |        |        | <i>Borde del manto</i>                 |        |        |        |
|                                        | 1      | 5      | 20     |                                        | 1      | 2.5    | 5      |
| control                                | <0.001 | <0.001 | <0.001 | control                                | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| 1                                      |        | 0.002  | <0.001 | 1                                      |        | <0.001 | <0.001 |
| 5                                      |        |        | 0.452  | 2.5                                    |        |        | 0.009  |

\*Los valores de la tabla son los valores *p*



#### IV DISCUSIÓN

Los diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus* mostraron una tendencia de acumulación lineal de Cd tanto en el medio estable (ME) como en el variable (MV) conforme aumentaba la concentración del contaminante en el agua. Los organismos del medio de control (MC) aun cuando se mantuvieron a concentraciones naturales de Cd en el agua ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ), presentaron en sus tejidos valores muy cercanos a los que se registraron en los dos primeros medios en el tratamiento de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . En la actualidad existen trabajos que reportan un comportamiento de asimilación lineal de Cd tanto con respecto a las concentraciones en el medio como en el tiempo en *M. edulis* (George y Coombs, 1977; Janssen y Scholz, 1979; Scholz, 1980; Köhler y Riisgård, 1982; Everaarts, 1990) y en *M. galloprovincialis* (Odžak *et al.*, 1994; Bebianno y Serafim, 1998), pero son escasos los estudios de metales en *M. californianus* (Goldberg *et al.*, 1983; Farrington *et al.*, 1983; Farrington, 1983; Lauenstein *et al.*, 1990). La mayor parte de estos estudios han sido enfocados a mediciones de campo y existen muy pocos trabajos de laboratorio con esta especie.

En algunos estudios sobre acumulación de metales no esenciales (e.g. Cd, Pb y Hg), los cuales no pueden ser regulados por el organismo, se han reportado que la respuesta es una asimilación continua con respecto al tiempo y concentración del metal en el medio (Schulz-Baldes, 1974; Eganhouse y Young, 1978; Everaarts, 1990; Brock, 1993; Odžak *et al.*, 1994). Sin embargo, los realizados con metales esenciales (e.g., Cu y Zn), para funciones específicas, indican que el organismo presenta una capacidad de regulación. Esto es, aun cuando éste permanezca largo tiempo en un ambiente con altos niveles de metal no

incrementa sus concentraciones proporcionalmente (George y Pire, 1980; Luten *et al.*, 1986; Amiard *et al.*, 1987).

La masa visceral y las branquias fueron los tejidos que acumularon una mayor cantidad de cadmio en cada uno de los tratamientos del ME y MV, en comparación con el pie y el borde del manto (Tabla II). Janssen y Scholz (1979) reportan para *M. edulis* (expuestos 21 días a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) valores altos de Cd, en peso seco, en la glándula digestiva ( $541 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y branquias ( $461 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y bajos en el manto ( $269 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y pie ( $99 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Fowler y Benayoun (1974) obtuvieron los porcentajes más altos de contenido de Cd en vísceras y branquias (44.1 y 14.5 % del contenido total, respectivamente) de *M. galloprovincialis* cuando expusieron a los organismos a  $100 \mu\text{g CdCl L}^{-1}$  por 60 días. Si comparamos los resultados de Scholz (1980), quien expuso a *M. edulis* por 18 días a  $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ , con los obtenidos en el ME en el tratamiento de mayor concentración ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ), nos podemos dar cuenta que a pesar de que Scholz utilizó menor cantidad de Cd y tiempo que nosotros, sus valores de concentración decrecieron en el mismo orden, pero encontró valores más altos en el intestino ( $42 \mu\text{g g}^{-1}$ ) que nosotros en la masa visceral ( $28.82 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Lares y Orians (2001) encontraron que *M. trossulus* y *M. californianus* tienen diferente cinética de asimilación y eliminación de metales, por lo que la diferencia de concentraciones puede ser interespecífica.

Estudios anteriores han mencionado que aún cuando los diferentes tejidos de *M. edulis* son afectadas por el Cd presente en el medio, coinciden que las vísceras, branquias y glándula digestiva lo absorben primero (George y Coombs, 1977; Cunningham, 1979; Scholz, 1980; Everaarts, 1990; Bebianno y Serafim, 1998), para después distribuirse a las

gónadas, músculo, riñón y otras estructuras por el sistema circulatorio (Cunningham, 1979; Adema, 1980).

De manera general, la masa visceral y las branquias se pudieron identificar como los tejidos que asimilaron a la misma razón en los tres medios (estable, variable y control), estadísticamente se comprobó que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de ambos tejidos sometidos a concentraciones iguales (Tabla III). Solamente en el tratamiento 5 del MV cada uno de los tejidos presentó valores de asimilación diferentes. Posiblemente los tejidos se ven más afectados cuando el metal se presenta de manera inconsistente aun cuando no sea alta la concentración en el agua, por lo que podemos suponer que si el nivel de contaminación aumentara las diferencias de asimilación entre los tejidos podrían ser más notables. El borde del manto y el pie se comportaron diferente en comparación a los dos primeros tejidos en todos los casos (Tabla III).

Los resultados de asimilación de Cd en cada una de los tejidos nos demuestran la habilidad que tiene cada uno de ellos para obtener, retener y desechar el metal. Los tejidos que funcionan como sitios de asimilación de metales como las branquias, intestino y glándula digestiva también son los que a menudo muestran los niveles más altos (Cunningham, 1979; Roesijadi y Robinson, 1994).

Algunos trabajos demuestran que la facilidad que tienen los organismos para asimilar los metales se basa en la cantidad de depósitos intracelulares que contengan las tejidos para enlazarlos. Las metalotioninas (MT), proteínas con gran afinidad por los cationes (e.g., Ag, Cu, Hg, Zn y Cd), son las encargadas de este mecanismo (Bebianno y Serafim, 1998). Las MT son responsables de regular la concentración de metales esenciales que entran y de desintoxicar al organismo de los no esenciales, son fuertemente inducidas



en aquellos tejidos que tienen la habilidad de asimilar, almacenar y excretar los metales (i.e., intestino, glándula digestiva y riñón) cuando se presentan valores elevados del contaminante en el medio (Roesijadi y Robinson, 1994). Así, podemos decir que los valores altos de Cd encontrados en la masa visceral y branquias cuando estuvieron expuestas a las mayores concentraciones quizás se debieron a que estos tejidos produjeron cantidades mayores de MT.

La razón de incorporación de Cd en los tejidos del mejillón *M. californianus* fue similar entre los tratamientos de menor contaminación (control y  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), pero las diferencias se empezaron a observar a partir de que la contaminación promedio en el medio fue de  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  (MV; Tabla IV). Probablemente este comportamiento nos esté indicando que existe un límite natural para el organismo; cuando los tejidos se encontraban en un medio con niveles bajos de contaminación ( $\leq 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) asimilaron el Cd a la misma razón, a pesar del aumento de concentración en el agua, pero cuando los niveles en el medio aumentaron, todos los tejidos excepto el pie incorporaron más.

Los valores altos de Cd registrados tanto en la masa visceral como en las branquias en los tres medios (ME, MV y MC), demuestran que estos tejidos tienen un mecanismo eficiente para asimilar el metal disuelto en comparación con el pie y el borde del manto, aun cuando se encontraron en medios con concentraciones bajas (Tabla III). Odzak *et al.*, (1994) reportaron que las branquias, en comparación con el pie, acumularon ligeramente más Cd ( $0.5$  y  $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$  peso húmedo, respectivamente) a pesar de que permanecieron un corto tiempo (7 días) a  $1.56 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ , por lo cual las define como sensibles a medios contaminados. Se ha señalado, que las branquias de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* son las

primeras en acumular el Cd mientras que otros tejidos como la glándula digestiva, riñón y manto tienen una asimilación retardada (Scholz, 1980; Everaarts, 1990).

Los valores de concentración de Cd en pie y borde del manto revelan un sistema de respuesta diferente para ambos tejidos. En el ME el pie solamente mostró valores significativamente altos de asimilación de Cd en el tratamiento más contaminado ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sin embargo, el borde del manto resultó sensible a menor concentración ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Tabla IV). En el MV estas mismas estructuras fueron aún más sensibles, ambas registraron alta asimilación de Cd desde el tratamiento de  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Con este cambio de comportamiento nos damos cuenta que la frecuencia como se presente el contaminante en el medio, puede ser más determinante para la asimilación del metal para algunos tejidos.

En este estudio se esperaba que los organismos del MV registraran en sus tejidos valores de asimilación de Cd menores que los del ME, ya que trabajos anteriores han demostrado que *M. californianus* tiene la capacidad de disminuir en un corto tiempo los niveles de metal de su tejido cuando se transfiere a un sistema limpio (Lares y Orians, 2001). Sin embargo, los análisis estadísticos de los resultados mostraron que las comparaciones de las concentraciones de Cd entre los dos medios no fueron significativamente diferentes para todas los tejidos. Lares y Orians (2001), demostraron que *M. californianus* a pesar que registró un incremento significativo (de  $3.24$  a  $5.64 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) en todo su tejido al estar en un medio con  $1 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ , después de un 1 día de depuración a niveles del control logró disminuir significativamente su concentración hasta  $4.00 \mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco); *M. trossulus* no fue capaz de alcanzar los mismos valores cuando permaneció en un medio a baja concentración ( $1 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ ), pero al someterse a uno con  $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$  no solamente aumentó su concentración sino que no logró disminuir sus niveles.

Anteriormente, Lares y Orians (1997) realizando un trabajo en una zona de surgencia reportaron que las branquias obtuvieron las máximas concentraciones de Cd y el borde del manto las menores, a su vez comprobaron que los mejillones sí respondían a las variaciones de Cd disuelto aportado por los eventos de surgencias. Este último estudio se puede llegar a relacionar con las condiciones que se presentaron en el medio variable de nuestro experimento, y en el cual se encontró el mismo tipo de distribución para los tejidos anteriores. Por otro lado, Ritz *et al.* (1982) mencionan que *M. edulis* asimiló menos Cd cuando permaneció en un medio con contaminación cíclica que en uno siempre contaminado (50 días a una contaminación promedio de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Cuando se realizaron las comparaciones de incorporación de Cd entre los tejidos del ME vs. MV (tratamientos 1 y  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para identificar las diferencias de asimilación, los resultados mostraron que éstas solamente fueron notables en el pie y branquias en el tratamiento de mayor concentración ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), lo que nos confirma una vez más que los tejidos se ven más afectados cuando se encuentran en medios altamente contaminados (Tabla V). Las branquias fueron los únicos tejidos del MV que acumularon significativamente menos metal ( $11.44 \mu\text{g g}^{-1}$ ) en comparación con las del ME ( $14.21 \mu\text{g g}^{-1}$ ), aun cuando en promedio permanecieron a la misma concentración ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Lo que nos indica que los organismos del MV lograron desechar solo por las branquias, parte del Cd previamente asimilado, cuando se encontraron en un medio sin contaminación.

Sorpresivamente, el pie fue el único tejido que acumuló más Cd cuando permaneció en el MV ( $9.16 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en comparación con el ME ( $4.61 \mu\text{g L}^{-1}$ ) a una concentración promedio de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Probablemente la razón de asimilación se volvió más lenta cuando se



encontraba en un medio constantemente contaminado reflejando así valores de Cd bajos, mientras cuando las condiciones fueron variables, el tiempo que permaneció en un sistema limpio (1 día), no fue suficiente para desechar parte del metal asimilado y por el contrario lo siguió incorporando. Se ha demostrado que *M. edulis planulatus*, después de permanecer 20 días a  $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ , al trasladarse a un sistema de concentraciones base (por 20 días) continuó asimilando el metal, pero a una menor razón que cuando se encontraba en un medio contaminado (Ritz *et al.*, 1982). Everaarts (1990) contrariamente a los resultados que nosotros obtuvimos, demostró que el pie de *M. edulis* después de permanecer 17 días en un sistema limpio desechó más rápido el metal que el manto (62.4 y 14.1 %, respectivamente), cuando anteriormente se habían mantenido los organismos 43 días a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . Con esto podemos suponer que el pie requiere de más tiempo de depuración que cualquier otra estructura para lograr obtener un descenso en su concentración final de Cd; probablemente al encontrarse en un MV produjo más proteínas, semejantes a las MT, para destoxificarse que los demás tejidos, lo que a su vez le provoco seguir acumulando ó bien no desechar el metal aun cuando las concentraciones fueron bajas. Gundacker (1999) menciona que se producen grandes cantidades de MT en tejidos de organismos bivalvos como el pie, en respuesta a altos contenidos de Cd.

Por el contrario, con el comportamiento de las branquias podemos suponer que aun cuando producen importantes cantidades de MT (Roesijadi y Robinson, 1994) que le ayudan a acumular grandes cantidades de Cd, por tratarse de un tejido de filtración tiende a limpiarse más rápido y esto le da oportunidad de desechar el metal asimilado cuando se encuentra en un medio limpio.

Los análisis obtenidos demuestran que sólo algunos tejidos pueden reflejar las variaciones de concentración de Cd que se presentan en el medio ambiente. Coleman *et al.* (1986) en un estudio en el que analizaron el tejido blando completo proponen que se tenga cuidado al considerar a *M. edulis planulatus* como un organismo que integra las concentraciones de metal en el tiempo. En su trabajo mencionan que el mejillón no asimiló la misma cantidad de Cd cuando se traslado de un medio con altas concentraciones de metal a uno de menor, que cuando se realizó de forma contraria; a pesar que las concentraciones en promedio fueron las mismas.

Algunos autores han propuesto utilizar las branquias y el pie de *M. galloprovincialis* para cuantificar el grado de contaminación por Cd en sistemas marinos (Odzak *et al.*, 1994); otros mencionan que las branquias de *M. edulis* (Cossa, 1989) y el borde del manto de *M. californianus* (Lares y Orians, 1997) pueden revelar confiablemente los cambios de concentración del metal en un corto tiempo. Con los resultados obtenidos en este estudio se propone que las branquias y el pie de *M. californianus*, sean empleadas en conjunto con los demás tejidos como indicadores de las variaciones de Cd en el medio, ya que resultaron ser sensibles a los cambios de concentración en el ambiente. Al no encontrarse diferencias de concentración en la masa visceral y el borde del manto, podemos considerarlos como capaces de integrar el contaminante en el tiempo.

En general tanto para el medio estable, variable y control el contenido de Cd decreció en el orden de masa visceral, branquias, borde del manto y pie (Tabla VI). Esto indica que la masa visceral y las branquias aportaron más Cd al contenido total del organismo en comparación con el pie y el borde del manto.

El factor de concentración (FC) de Cd en los diferentes tejidos, presentó una relación inversamente proporcional con la concentración del metal en el medio, mientras la concentración del contaminante aumentó el FC disminuyó (Fig. 4). De manera general, tanto en el ME, MV y el control la masa visceral y las branquias mostraron una mayor capacidad de concentración en cada uno de los tratamientos, en comparación con el borde del manto y el pie (Fig. 4), lo que nos indica que aun cuando los niveles de Cd varíen en el medio los dos primeros tejidos concentraran más que los otros. Los tejidos del control presentaron los más altos índices de FC. Existen trabajos que mencionan que el factor de concentración en la concha del organismo también tiende a disminuir conforme aumenta la concentración del Cd en el medio [Sturesson, 1978 (*M. edulis*) y Quiroz-Quiroz, 2000 (*M. californianus*)]. Cabe hacer mención que las conchas de *M. californianus* analizadas por Quiroz-Quiroz (2000) corresponden a los organismos estudiados en este trabajo. Así, podemos decir que tanto el tejido como la concha del mejillón se comportan de manera similar.

Probablemente el mejillón tiene la capacidad de regular la asimilación de Cd a concentraciones cercanas a lo natural (i.e.,  $\leq 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) porque ya presenta una cantidad necesaria de MT y la concentración en el ambiente no es suficientemente alta para inducir la producción de más MT y poder así seguir acumulando una mayor cantidad de metal. A pesar de que el incremento en la concentración ( $1 \text{ a } 5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) aparentemente produjo un aumento en las MT ya que las concentraciones en el mejillón aumentaron significativamente, probablemente el incremento no fue suficiente para mantener su capacidad de concentración (i.e., su factor de concentración disminuyó).



## V CONCLUSIONES

Los diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus* mostraron una tendencia de incorporación lineal de Cd tanto en el medio estable como en el variable, conforme aumentaba la concentración del contaminante en el agua.

La masa visceral y las branquias asimilaron una mayor cantidad de Cd disuelto en los dos medios experimentales y el control, lo que nos demuestra que tienen un mecanismo eficiente para asimilar el metal disuelto, aun a bajas concentraciones, en comparación con el pie y el borde del manto.

La masa visceral y el borde del manto no mostraron diferencias significativas en sus concentraciones entre el medio estable vs. medio variable. Las branquias y el pie sí mostraron diferencias pero sólo a concentraciones altas. Las branquias acumularon menos Cd en el medio variable que en el estable. El pie por el contrario acumuló más Cd en el medio variable que en el estable.

La utilización de las branquias o el pie (tejidos sensibles a la variabilidad ambiental) en conjunto con la masa visceral o el borde del manto (tejidos integradores en el tiempo) abre la posibilidad de obtener un panorama más completo de la forma en que el Cd está siendo incorporado al ambiente.

## VI RECOMENDACIONES

Dada la escasez de estudios sobre el mejillón *Mytilus californianus* y en particular de incorporación de Cd en diferentes tejidos, se recomienda para futuras investigaciones sobre cinética y comparación de asimilación de cadmio en diferentes tejidos de esta especie y con base en nuestros resultados:

1. Realizar ensayos experimentales con un mayor número de comparaciones entre concentraciones.
2. Realizar estudios similares con las diferentes especies del género *Mytilus* para comparar mecanismos de respuesta entre ellas.
3. Dado que en anteriores investigaciones los análisis se han enfocado más al comportamiento de tejidos como la masa visceral, branquias y manto dejándose a un lado el pie, por los resultados obtenidos en este último tejido, se recomienda investigar más detalladamente su respuesta a las variaciones de concentración en el ambiente.

## LITERATURA CITADA

- Adema, D. M. M., 1980. Determination of bio-accumulation and bio-elimination degradability, ecotoxicology and bioaccumulation. Government Publishing Office. The Hauge. p II- 255-272.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet C., Berthet B. y Metayer C., 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and costal organims. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 106, 73-79.
- Arizpe-Covarrubias, O., 1992. Los moluscos y su importancia comercial en el Pacífico Mexicano. Libros universitarios 1. Universidad Autónoma de Baja California Sur, 219 p.
- Bebianno, M. J. y Serafim M. A., 1998. Comparison of the metallothionein induction in response to cadmium en the gllis of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. The Science of the Total Environment, 214, 123-131.
- Borchardt, T., 1983. Influence of food quantity on the kinetics of cadmium uptake and loss via food and seawater in *Mytilus edulis*. Marine Biology, 76, 67-76.
- Brock, V., 1993. Effects of mercury on physiological condition and content of the biomarker ALA in the oyster *Ostrea edulis*. Marine Pollution Progress Series, 96, 169-175.
- Cáceres-Martínez, J., 1997. Mussel fishery and culture in Baja California, Mexico: History, present status, and future. NOAA, Technical Report NMFS, 128, 41-55.



- Coleman, N., 1980. The effect of emersion on cadmium accumulation by *Mytilus edulis*. Marine Pollution Bulletin, 11, 359-362.
- Coleman, N., Mann T. F., Mobley M. y Hickman N., 1986. *Mytilus edulis planulatus*: an “integrator” of cadmium pollution?. Marine Biology, 92, 1-5.
- Cossa, D., Bourget E. y Piuze J., 1979. Sexual maturation as a source of variation in the relationship between cadmium concentration and body weight of *Mytilus edulis* L. Marine Pollution Bulletin, 10, 174-176.
- Cossa, D., 1989. A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in costal waters. Oceanologica Acta, 12 (4): 417-432.
- Da Costa-Gomez, C. E. B. y Valle-Diaz N. A., 1989. Disponibilidad biológica de metales traza en el mejillón *Modiolus capax* del mar de Cortéz. Tesis de Licenciatura, UABC, Facultad de Ciencias Marinas, 77 p.
- Cunningham, P. A., 1979. En Marine pollution: functional responses. Ed. Vernberg W.B., Thurberg F. P., Calabrese A. y Vernberg F. J. Academic Press. New York, San Francisco y London.
- McDonald, J. H. y Koehn R. K., 1988. The mussel *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. Marine Biology, 99, 111-118.
- Eganhouse, R. P. y Young D. R., 1978. *In situ* uptake of mercury by the intertidal mussel, *Mytilus californianus*. Marine Pollution Bulletin, 9, 214-217.
- Everaarts, J. M., 1990. Uptake and release of cadmium in various organs of the common mussel, *Mytilus edulis* (L.). Bulletin Environment, Contamination and Toxicology, 45, 560-567.

- Farrington, J. W., 1983. Bivalves as sentinels of coastal chemical pollution: The mussel (and oyster) watch. *Oceanus*, 26 (2): 18-26.
- Farrington, J. W., Goldberg E. D., Risebrough R. W., Martín J. H. y Bowen V. T., 1983. U.S. "Mussel Watch" 1976-1978: An overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon, and artificial radionuclide data. *Environmental Science and Technology*, 17 (8): 490-496.
- Fowler, S. W. y Benayoun G., 1974. Experimental studies on cadmium flux through marine biota. In: *Comparative Studies of Food and Environmental Contamination* (IAEA-SM 175/10). International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria, 159-178.
- George, S. G. y Coombs T. L., 1977. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 39, 261-268.
- George, S. G. y Pirie B. J. S., 1980. Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus edulis* (L.): a combined ultrastructural and biochemical study. *Journal of Marine Biology Ass. U.K.* 60: 575-590.
- Goldberg, E. D., Koide M., Hodge V., Flegal A. R. y Martín J., 1983. U.S. Mussel Watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 16, 69-93.
- Gundacker, C., 1999. Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha pollas*. *Chemosphere*, 38 (14): 3339-3356.
- Janssen, H. H. y Scholz N., 1979. Uptake and cellular distribution of cadmium in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 55, 133-141.

- Köhler, K. y Riisgard H. U., 1982. Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*. Marine Biology, 66, 53-58.
- Lares Reyes, M. L. C., 1988. Variación temporal de cadmio y mercurio biodisponibles en una zona de surgencia costera. Tesis de Maestría, CICESE, 99 p.
- Lares Reyes, M. L. C., 1995. Mussels as indicators of cadmium and lead in the marine environment. Doctor of Physiology Tesis. The University of British Columbia, 153 p.
- Lares, M. L. y Orians K. J., 1997. Natural Cd and Pb variations in *Mytilus californianus* during the upwelling season. The Science of the Total Environment, 197, 177-195.
- Lares, M. L. y Orians K. J., (2001). Differences in Cd elimination from *Mytilus californianus* and *Mytilus trossulus* soft tissues. Environmental Pollution, 112, 201-207.
- Latouche, Y. D. y Mix M. C., 1982. The effects of depuration, size and sex on trace metal levels in bay mussels. Marine Pollution Bulletin, 13 (1): 27-29.
- Lauenstein, G. G., Robertson A. y O'Connor T. P., 1990. Comparison of trace metal data in mussel and oysters from a mussel watch programme of the 1970s with those from a 1980s programme. Marine Pollution Bulletin, 21 (9): 440-447.
- Lee, J. G. y Morel F. M. M., 1995. Replacement of zinc by cadmium in marine phytoplankton. Marine Ecology Progress Series, 127, 305-309.
- Lee, B-G., Wallace W. G. y Luoma S. N., 1998. Uptake and loss kinetics of Cd, Cr and Zn in the bivalves *Potamocorbula amurensis* and *Macoma balthica*: effects of size and salinity. Marine Ecology Progress Series, 175, 177-189.



- Libes, S. M., 1992. An introduction to marine biogeochemistry. John Wiley & Sons, Inc. New York, 734 pp.
- Lobel, P. B., Belkhole S. P., Jackson S. E. y Longerich H. P., 1991. Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, 409-414.
- Luten, J. B., Bouquet W., Burggraaf M. M. y Rus J., 1986. Accumulation, elimination, and speciation of cadmium and zinc in mussels, *Mytilus edulis*, in the natural environment. *Bulletin Environment, Contamination and Toxicology*, 45, 579-586.
- Muñoz-Barbosa, A., 1997. Variabilidad espacial y temporal de metales pesados en la costa noroccidental de Baja California mediante el uso de *Mytilus californianus* como bioindicador. Tesis de Maestría, UABC, Facultad de Ciencias Marinas, 106 p.
- Odžak, N., Martinčić D., Zvonarić T. y Branica M., 1994. Bioaccumulation rate of Cd and Pb in *Mytilus galloprovincialis* foot and gills. *Marine Chemistry*, 46, 119-131.
- Olguin-Espinoza, G., 1989. Metales traza en moluscos del Valle de Mexicali y Alto Golfo de California. Tesis de Licenciatura, UABC, Facultad de Ciencias Marinas, 61 p.
- Orren M. J., Eagle G. A., Hennig H. F-K. O. y Green A., 1980. Variations in trace metal content of the mussel *Choromytilus meridionalis* (Kr.) with season and sex. *Marine Pollution Bulletin*, 11, 253-257.
- Oullet, R. T., 1981. Seasonal variation of trace-metals in the mussel *Mytilus californianus*. *Env. Con.*, 8 (1): 53-58.

- Phillips, D. J. H., 1976. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Marine Biology*, 38, 59-69.
- Price, N. M. y Morel F. M. M., 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature*, 344, 658-660.
- Quiroz-Quiroz, L., 2000. Incorporación de Cd en la capa nacarosa de la concha de *Mytilus californianus*. Tesis de Maestría, CICESE., 55 p.
- Reynoso Nuño, H. E. y Jorajuria A., 1988. Distribución de metales pesados en la costa occidental de la península de Baja California, usando *Mytilus californianus* como organismos centinelas. *Ciencias Marinas* 14(4):101-116.
- Ritz, D. A., Swain R. y Elliott N. G., 1982. Use of the mussel *Mytilus edulis planulatus* (Lamarck) in monitoring heavy metal levels in seawater. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 33, 491-506.
- Roesijadi, G. y Robinson W. E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. Chapter 9. En Malins D. C. y Ostrander G. K., *Aquatic Toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*. Editorial Lewis Publisher, 387-420.
- Romero-Vargas, I. P. M., 1995. Metales pesados y su fracción química en sedimentos de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México. Tesis de Maestría, UABC, Facultad de Ciencias Marinas, 86 pp.
- Sarver, S. K. y Foltz D. W., 1993. Genetic population structure of a species complex of blue mussels (*Mytilus* spp.). *Marine Biology*, 117, 105-112.

- Scholz, N., 1980. Accumulation, loss and molecular distribution of cadmium in *Mytilus edulis*. Helgoländer Meeresunters, 33, 68-78.
- Schulz-Baldes, M., 1974. Lead uptake from sea water and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis*. Marine Biology, 25, 177-193.
- Seed, R. 1968. Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 48, 561-584.
- Seed, R. y Suchanek T. H., 1992. Population and community ecology of *Mytilus*. Chapter 4. En Gosling E. 1992. Developments in aquaculture and fisheries science, vol. 25. "The mussel *Mytilus*": ecology, physiology, genetics and culture. Editorial Elsevier, 87-169.
- Sturesson, U. 1978. Cadmium enrichment in shells of *Mytilus edulis*. Ambio, 5, 253-256.
- Walsh, A. R. y O'Halloran J., 1998. Accumulation of chromium by a population of mussels (*Mytilus edulis* (L)) exposed to leather tannery effluent. Environmental Toxicology and Chemistry, 17 (7): 1429-1438.



# A N E X O S

## ANEXO A

### INCONSISTENCIA DE LOS RESULTADOS DEL “MEDIO ESTABLE” EN EL TRATAMIENTO DE $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$

El tratamiento de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  del medio estable constó de tres réplicas (cubetas) cada una con 15 mejillones del género *M. californianus*. En este medio la inoculación de Cd fue diaria manteniéndose de esta manera condiciones estables de contaminación del medio durante los 60 días del experimento.

La tabla A.I muestra los resultados obtenidos para las tres réplicas de este tratamiento. Como se puede observar, los mejillones que permanecieron en la cubeta 9 obtuvieron valores bajos (aproximadamente la mitad) de concentración de Cd en la masa visceral y el pie, en comparación con las concentraciones en los mismos tejidos de los mejillones de las cubetas 7. Al estudiar los resultados de las replicas de los otros tratamientos (ver Tabla II) se observa que el pie sí puede mostrar una gran variabilidad pero no así la masa visceral ya que en ningún otro tratamiento se presenta una diferencia tan marcada entre las réplicas de esta estructura, por esta razón se sospecha que la adición de Cd no fue la misma en las tres réplicas del tratamiento. Por otro lado, en los mejillones de la cubeta 7 la concentración de la masa visceral ( $38.453 \mu\text{g g}^{-1}$ ) fue muy alta en comparación con la concentración en las branquias ( $16.937 \mu\text{g g}^{-1}$ ) de los mejillones de la misma réplica. Si comparamos todos los valores de concentración obtenidos para la masa visceral y branquias de todas las réplicas de cada uno de los tratamientos (Tabla II) se puede observar que el valor de concentración de las branquias es siempre muy similar a la masa visceral de

la misma réplica. Con base en esto, se puede pensar en 2 posibilidades para explicar la inconsistencia en los resultados de esta réplica (cubeta 7).

- 1) Que la muestra de la masa visceral haya sido contaminado durante el análisis en el laboratorio.
- 2) Que se haya perdido una parte de muestra de las branquias durante el proceso de digestión.

Dado que los blancos de digestión correspondientes a la fecha de análisis fueron bajos [ $0.015 \pm 0.001$  ppm ( $n=2$ )] así como el promedio de todos los blancos [ $0.015 \pm 0.001$  ppm ( $n=30$ )] la posibilidad de contaminación se puede descartar por lo que una pérdida parcial de la muestra resulta la explicación más viable. Debido a que es imposible determinar con exactitud el problema con este tratamiento así como corregirlo se tomó la decisión de eliminar estos resultados del análisis.

Se sugiere establecer precaución al momento de adicionar el contaminante durante el bioensayo, revisando que sea la concentración exacta del tratamiento, así como extremar el cuidado en la fase de la digestión del tejido en el laboratorio.



Tabla A.I Concentración de Cd ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) en distintos tejidos del mejillón *Mytilus californianus* pertenecientes al tratamiento de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  del medio estable.

|                 | Masa visceral | Branquias | Pie    | Borde del manto |
|-----------------|---------------|-----------|--------|-----------------|
| <i>Cubeta 7</i> | 35.453        | 16.937    | 14.637 | 7.036           |
| <i>Cubeta 8</i> | 23.994        | 28.353    | 11.353 | 8.171           |
| <i>Cubeta 9</i> | 17.747        | 18.856    | 7.702  | 7.744           |

## ANEXO B

### RESULTADOS GENERALES DEL ANÁLISIS DE Cd EN LAS ESTRUCTURAS DEL MEJILLÓN *Mytilus californianus*

Tabla B.I Concentración de Cd en diferentes tejidos del mejillón *Mytilus californianus* en el medio estable, variable y de control.  
Donde: P. S. = peso seco del tejido, [Cd] tejido = concentración de Cd en el tejido.

| MEDIO<br>Tratamiento<br>1 $\mu\text{g L}^{-1}$<br>cubetas | ESTABLE<br>TEJIDO | Tratamiento<br>5 $\mu\text{g L}^{-1}$<br>cubetas |                                    |                 |              | Tratamiento<br>20 $\mu\text{g L}^{-1}$<br>cubetas |                 |              |                                    |
|-----------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------|--------------|---------------------------------------------------|-----------------|--------------|------------------------------------|
|                                                           |                   | P. S.<br>(g)                                     | [Cd]tejido<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | TEJIDO          | P. S.<br>(g) | [Cd]tejido<br>$\mu\text{g g}^{-1}$                | TEJIDO          | P. S.<br>(g) | [Cd]tejido<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ |
| C 1                                                       | Masa visceral     | 0.601                                            | 7.732                              | Masa visceral   | 0.676        | 12.156                                            | Masa visceral   | 0.693        | 35.502                             |
| C 1                                                       | Pie               | 0.276                                            | 1.531                              | Pie             | 0.298        | 2.944                                             | Pie             | 0.325        | 18.107                             |
| C 1                                                       | Borde del manto   | 0.807                                            | 3.822                              | Borde del manto | 0.746        | 5.288                                             | Borde del manto | 0.864        | 9.78                               |
| C 1                                                       | Branquias         | 0.487                                            | 5.919                              | Branquias       | 0.679        | 13.52                                             | Branquias       | 0.664        | 27.424                             |
| C 2                                                       | Masa visceral     | 0.774                                            | 6.566                              | Masa visceral   | 0.653        | 13.884                                            | Masa visceral   | 0.727        | 24.057                             |
| C 2                                                       | Pie               | 0.367                                            | 2.357                              | Pie             | 0.367        | 7.403                                             | Pie             | 0.322        | 14.213                             |
| C 2                                                       | Borde del manto   | 0.848                                            | 3.103                              | Borde del manto | 0.908        | 5.085                                             | Borde del manto | 0.952        | 11.8                               |
| C 2                                                       | Branquias         | 0.565                                            | 6.263                              | Branquias       | 0.618        | 14.409                                            | Branquias       | 0.669        | 25.737                             |
| C 3                                                       | Masa visceral     | 0.78                                             | 7.381                              | Masa visceral   | 0.679        | 14.298                                            | Masa visceral   | 0.535        | 26.896                             |
| C 3                                                       | Pie               | 0.279                                            | 3.051                              | Pie             | 0.243        | 3.487                                             | Pie             | 0.231        | 13.149                             |
| C 3                                                       | Borde del manto   | 0.751                                            | 5.038                              | Borde del manto | 0.527        | 6.326                                             | Borde del manto | 0.738        | 9.248                              |
| C 3                                                       | Branquias         | 0.425                                            | 8.788                              | Branquias       | 0.484        | 14.702                                            | Branquias       | 0.566        | 28.148                             |

Tabla B.I Continuación.

| MEDIO                                    | VARIABLE        | Tratamiento |              |                                    |                                     | Tratamiento     |              |                                    |                                   |                 |       |
|------------------------------------------|-----------------|-------------|--------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|--------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-------|
|                                          |                 | TEJIDO      | P. S.<br>(g) | [Cd]tejido<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$<br>cubetas | TEJIDO          | P. S.<br>(g) | [Cd]tejido<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | 5 $\mu\text{g L}^{-1}$<br>cubetas |                 |       |
| <i>Tratamiento</i>                       |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
| <i>1 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></i> |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
| <i>cubetas</i>                           |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
| C 13                                     | Masa visceral   |             | 0.527        | 7.907                              | C 16                                | Masa visceral   | 0.753        | 8.365                              | C 19                              | Masa visceral   | 0.746 |
| C 13                                     | Pie             |             | 0.244        | 5.394                              | C 16                                | Pie             | 0.329        | 9.274                              | C 19                              | Pie             | 0.369 |
| C 13                                     | Borde del manto |             | 0.603        | 4.142                              | C 16                                | Borde del manto | 0.817        | 5.031                              | C 19                              | Borde del manto | 1.011 |
| C 13                                     | Branquias       |             | 0.59         | 7.668                              | C 16                                | Branquias       | 0.691        | 10.824                             | C 19                              | Branquias       | 0.892 |
| C 14                                     | Masa visceral   |             | 0.487        | 8.175                              | C 17                                | Masa visceral   | 0.734        | 10.629                             | C 20                              | Masa visceral   | 0.643 |
| C 14                                     | Pie             |             | 0.302        | 2.171                              | C 17                                | Pie             | 0.298        | 3.663                              | C 20                              | Pie             | 0.314 |
| C 14                                     | Borde del manto |             | 0.824        | 3.477                              | C 17                                | Borde del manto | 0.806        | 4.475                              | C 20                              | Borde del manto | 0.799 |
| C 14                                     | Branquias       |             | 0.549        | 7.177                              | C 17                                | Branquias       | 0.654        | 9.771                              | C 20                              | Branquias       | 0.768 |
| C 15                                     | Masa visceral   |             | 0.779        | 5.876                              | C 18                                | Masa visceral   | 0.512        | 12.407                             | C 21                              | Masa visceral   | 0.546 |
| C 15                                     | Pie             |             | 0.298        | 3.316                              | C 18                                | Pie             | 0.284        | 4.083                              | C 21                              | Pie             | 0.341 |
| C 15                                     | Borde del manto |             | 0.907        | 3.443                              | C 18                                | Borde del manto | 0.684        | 4.724                              | C 21                              | Borde del manto | 0.857 |
| C 15                                     | Branquias       |             | 0.591        | 7.33                               | C 18                                | Branquias       | 0.573        | 8.097                              | C 21                              | Branquias       | 0.677 |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |
|                                          |                 |             |              |                                    |                                     |                 |              |                                    |                                   |                 |       |





