

**VARIABILIDAD TEMPORAL DE CORTO PERIODO DE Ag, Cd Y Cu EN
Mytilus californianus Y LA EFECTIVIDAD DE ESTE ORGANISMO
COMO BIOMONITOR**

**SHORT-TERM TEMPORAL VARIABILITY OF Ag, Cd AND Cu IN
Mytilus californianus AND THE EFFECTIVENESS OF THIS ORGANISM
AS A BIOINDICATOR**

E.A. Gutiérrez-Galindo*

A. Muñoz-Barbosa

Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada, C.P. 22800, Baja California, México
* efrain@faro.ens.uabc.mx

Recibido en octubre de 2000; aceptado en marzo de 2001

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar la variabilidad temporal de corto periodo de la concentración de Ag, Cd y Cu en *Mytilus californianus* y de determinar la efectividad de este organismo como biomonitor de estos metales, del 24 de agosto al 23 de septiembre de 1995 se realizaron 11 muestreos simultáneos (uno cada tercer día) en un sitio contaminado y otro limpio de la Bahía de Todos Santos en Ensenada, Baja California, México. Las concentraciones de Ag y Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) fueron significativamente mayores en la estación contaminada (0.64–1.69 y 6.72–9.10, respectivamente) que en la estación limpia (0.05–0.27 y 5.48–7.00, respectivamente). Esto puede ser debido a que cerca de la estación contaminada se encuentra una descarga de aguas residuales municipales. Por el contrario, las concentraciones de Cd en la estación limpia (1.37–5.25) fueron significativamente mayores que las de la estación contaminada (0.60–2.13). La probable causa de lo anterior es la asociación de Cd a los fenómenos de surgencia, los cuales son comunes en la estación limpia en la época en que se realizó el muestreo en este estudio. Las relaciones entre la concentración cruda de los metales estudiados y la concentración normalizada por el índice de condición indican que *M. californianus* es mejor indicador de Ag y Cd que de Cu.

Palabras clave: *Mytilus californianus*, metales pesados, contaminación, biomonitor, Baja California (México).

ABSTRACT

In order to study the short-term temporal variability of the concentration of Ag, Cd and Cu in *Mytilus californianus* and to determine the effectiveness of this organism as a bioindicator of these metals, 11 simultaneous samplings (every other day) were conducted from 24 August to 23 September 1995 at one polluted site and one unpolluted site at Todos Santos Bay in Ensenada, Baja California,

Mexico. The concentrations of Ag and Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) were significantly greater at the polluted station (0.64–1.69 and 6.72–9.10, respectively) than at the unpolluted station (0.05–0.27 and 5.48–7.00, respectively), possibly due to the proximity of the polluted station to a wastewater discharge. The concentrations of Cd at the unpolluted station (1.37–5.25) were significantly greater than those at the polluted station (0.60–2.13), probably due to the association of Cd with upwelling, which is a common occurrence at the unpolluted station during the time the samplings were conducted. The relationships between the raw concentrations of the metals studied and the concentration normalized by the condition index indicate that *M. californianus* is a better indicator of Ag and Cd than of Cu.

Key words: *Mytilus californianus*, heavy metals, pollution, biomonitor, Baja California (Mexico).

INTRODUCCIÓN

Desde hace ya varias décadas y hasta la actualidad se ha propuesto el uso de mejillones del género *Mytilus* para evaluar las tendencias espaciales y temporales de algunos contaminantes en los ambientes costeros (Goldberg, 1975; Boalch *et al.*, 1981; Gault *et al.*, 1983; Borchardt *et al.*, 1988; Lauenstein *et al.*, 1990; Stephenson y Leonard, 1994; Beliaeff *et al.*, 1997). Se ha encontrado que estos organismos pueden acumular los contaminantes a partir de su alimento y del agua de mar en concentraciones que exceden considerablemente a aquellas encontradas en el ambiente; además, lo hacen proporcionalmente a las concentraciones encontradas en su alrededor (Phillips, 1976a, b).

Entre los contaminantes que pueden ser evaluados usando a los mejillones como biomonitores se encuentran los metales pesados. Desde que estos organismos se comenzaron a utilizar como biomonitores de estos elementos, también se han realizado investigaciones para conocer los factores o procesos que afectan la variabilidad de la concentración de metales en sus tejidos. La talla (Latouche y Mix, 1982), tasa de filtración (Janssen y Scholz, 1979), sexo (Latouche y Mix, 1982; Orren *et al.*, 1980) y época del año (Orren *et al.*, 1980; Boalch *et al.*, 1981; Ouellette, 1981) pueden ser importantes fuentes de variación en este tipo de estudios y, además, también existe la

INTRODUCTION

Mussels of the genus *Mytilus* have been used for several decades, and continue to be used, to evaluate the spatial and temporal trend of some pollutants in coastal environments (Goldberg, 1975; Boalch *et al.*, 1981; Gault *et al.*, 1983; Borchardt *et al.*, 1988; Lauenstein *et al.*, 1990; Stephenson and Leonard, 1994; Beliaeff *et al.*, 1997). These organisms are able to accumulate pollutants from food and seawater at concentrations that considerably exceed those found in the environment; furthermore, they do it proportionally to the concentrations found in their habitat (Phillips, 1976a, b).

Among the pollutants that can be evaluated using mussels as bioindicators are the heavy metals. Since these organisms began to be used as indicators of these elements, research has also been conducted to determine the factors or processes that affect the variability of metal concentrations in their tissues. Size (Latouche and Mix, 1982), filtration rate (Janssen and Scholz, 1979), sex (Latouche and mix, 1982; Orren *et al.*, 1980) and season (Orren *et al.*, 1980; Boalch *et al.*, 1981; Ouellette, 1981) can be important sources of variation in this type of studies, in addition to the variability not identified with any process, known as residual or inherent (Lobel *et al.*, 1989). This information has proved to be useful in the planning of studies of large-scale coastal pollution in space

variabilidad no identificada con ningún proceso, conocida como residual o inherente (Lobel *et al.*, 1989). Esta información ha demostrado su utilidad en la planeación de estudios de contaminación costera a gran escala en espacio y tiempo, pues permite minimizar los efectos de los procesos que se sabe tienen influencia en la variabilidad de la concentración de metales en mejillones (Gault *et al.*, 1983). Sin embargo, no todos los metales son afectados de la misma forma por los factores antes mencionados. Es probable que algunos metales sean afectados a tal grado que las concentraciones encontradas en los mejillones no sean reflejo de su concentración en el medio sino de otros factores que también afectan su variabilidad. Este caso puede ser el de los metales esenciales (e.g., Cu), los cuales pueden ser controlados homeostáticamente por los organismos (Bowen, 1972). Por otro lado, puede ser que otros metales sean tan poco afectados por los factores mencionados que la concentración del metal en el mejillón sea el reflejo de la concentración de ese metal en el medio. Este caso puede ser el de los metales no esenciales (e.g., Ag y Cd), los cuales al no ser regulados homeostáticamente, se acumulan más efectivamente en los tejidos de los organismos.

El presente trabajo tiene como objetivo conocer la variabilidad temporal de corto periodo de la concentración de Ag, Cd y Cu en *Mytilus californianus* en un lugar contaminado y otro limpio, así como determinar la efectividad de este organismo como indicador de estos metales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La Bahía de Todos Santos se localiza a aproximadamente 110 km al sur de la frontera de México y Estados Unidos (Tijuana, Baja

and time, because it allows the effects of the processes that are known to influence the variability of metal concentrations in mussels to be minimized (Gault *et al.*, 1983). However, not all metals are affected in the same way by these factors. Some metals may be affected to such an extent that the concentrations found in the mussels do not reflect their concentration in the environment but rather other factors that also affect their variability. This could be the case of the essential metals (e.g., Cu), which can be homeostatically controlled by the organisms (Bowen, 1972). Other metals, on the other hand, may be only slightly affected by these factors and the metal concentration in the mussel is an indication of the concentration of that metal in the environment. This could be the case of the nonessential metals (e.g., Ag and Cd), which accumulate more effectively in the tissues of the organisms as they are not regulated homeostatically.

This study aims to determine the short-term temporal variability of the concentrations of Ag, Cd and Cu in *Mytilus californianus* at one polluted site and one unpolluted site, and to determine the effectiveness of this organism as an indicator of these metals.

MATERIALS AND METHODS

Study area

Todos Santos Bay (31°55'–31°40'N, 116°45'–116°37'W) is located approximately 110 km south of the US-Mexico border (San Diego, California/Tijuana, Baja California) (fig. 1). It is a shallow bay, with an average depth of less than 50 m. The external coast of Punta Banda, in the southern part of the bay, is an exposed area, where weak to strong upwelling occurs during spring and summer (González-Morales and Gaxiola-Castro, 1991). The inner part of the bay, particularly the harbor, is influenced by the activity in the port

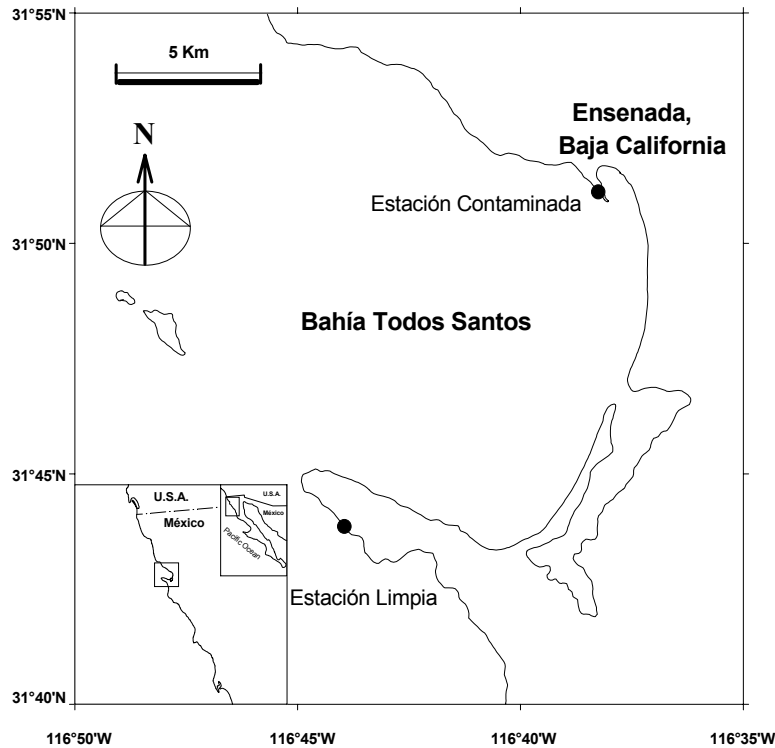


Figura 1. Área de estudio y localización de las estaciones de muestreo.
Figure 1. Study area and location of the sampling stations.

California/San Diego, California), entre los paralelos 31°55' y 31°40'N y 116°45' y 116°37'W (fig. 1). Es una bahía somera, cuya profundidad promedio es menor a 50 m. En la parte sur se encuentra Punta Banda, cuya costa externa es una zona expuesta en la que se presentan surgencias de débiles a intensas durante primavera y verano (González-Morales y Gaxiola-Castro, 1991). La parte interna de la bahía, particularmente el puerto, se encuentra influenciada por la actividad portuaria y la descarga de aguas residuales municipales, que aportan 19.9, 533 y 454 kg año⁻¹ de Cd, Cu y Pb, respectivamente (Muñoz-Arriola, 1994).

and by the municipal wastewater discharges, which contribute 19.9, 533 and 454 kg yr⁻¹ of Cd, Cu and Pb, respectively (Muñoz-Arriola, 1994).

Sampling

Eleven samplings of *M. californianus* were conducted from 24 August to 23 September 1995 (one every other day). The samples were collected simultaneously at two stations in Todos Santos Bay: an unpolluted station close to Punta Banda (henceforth referred to as EL) and a polluted station (referred to as EC) in the

Muestreo

Se realizaron 11 muestreos de *M. californianus* del 24 de agosto al 23 de septiembre de 1995 (uno cada tercer día). Los muestreos se efectuaron simultáneamente en dos estaciones de la Bahía de Todos Santos: una cerca de Punta Banda, la cual se denominó estación limpia (EL), y la otra en la parte externa del rompeolas del puerto, cerca de las descargas de aguas residuales municipales, la cual se nombró estación contaminada (EC) (fig. 1). En cada una de las estaciones se recolectaron 50 organismos de tamaño similar (40–60 mm), esto último para minimizar las diferencias en la acumulación de metales debidas a la edad, tamaño (Boyden, 1977) y variación en la velocidad de filtración. Los organismos fueron recolectados a un mismo nivel de marea para evitar las variaciones en la concentración de metales debidas a diferencias fisiológicas causadas por los diferentes grados de exposición al aire (Coleman, 1980). Los organismos se desprendieron del sustrato con un cuchillo de acero inoxidable, se almacenaron en bolsas de plástico limpias y se congelaron inmediatamente para su posterior análisis en el laboratorio.

Diseción

Los mejillones se descongelaron y lavaron con agua destilada desionizada para remover la arena y epibiota presente. Cada una de las muestras se separó en tres submuestras de 15 organismos cada una. Los organismos no se depuraron ni se separaron según el sexo porque en el caso de la depuración, aunque no afecta al Cd, ésta podría aumentar la concentración de Cu, y porque las diferencias de concentración de algunos metales debidas al sexo no son ni muy grandes (e.g., Cd) ni significativas (e.g., Cu) y pueden minimizarse mediante un muestreo aleatorio (Latouche y Mix, 1982). Enseguida, los organismos fueron medidos (largo,

external part of the breakwater, close to a wastewater discharge (fig. 1). At each station, 50 organisms were collected of similar size (40–60 mm) in order to minimize the differences in the accumulation of metals due to age, size (Boyden, 1977) and variation in the rate of filtration. The organisms were collected at the same tidal level to avoid variations in the metal concentrations due to physiological differences caused by different degrees of exposure to air (Coleman, 1980). The organisms were detached from the substrate with a stainless steel knife. They were stored in clean plastic bags and immediately frozen for subsequent analysis in the laboratory.

Dissection

The mussels were left to thaw and rinsed with deionized distilled water to remove the sand and epibiota. Each sample was separated into three subsamples of 15 organisms each. The organisms were not depurated or separated according to sex, because even though depuration does not affect Cd, it could increase the concentration of Cu, and because the differences in concentration of some metals relative to sex are neither very large (e.g., Cd) nor significant (e.g., Cu), and can be minimized with a random sampling (Latouche and Mix, 1982). The organisms were measured (length, width and height), and opened and dissected with a scalpel, separating the gonad and muscle. The gonads were removed to minimize the seasonal variations in weight of the soft tissue due to the reproductive stage of the organism (Cossa *et al.*, 1989). During dissection, the muscle of each organism was transferred to a wide-mouthed, 250-mL plastic flask and the individual weight was recorded. Finally, the tissue of the 15 organisms of the subsamples was homogenized using a Vitris 45 homogenizer equipped with titanium blades.

ancho y alto) y utilizando un bisturí, se abrieron y disectaron separando la gónada y el músculo. Las gónadas se separaron con el objeto de minimizar las variaciones estacionales de peso del tejido blando debido al estado reproductivo del organismo (Cossa *et al.*, 1989). Durante la disección, el músculo de cada uno de los organismos fue transferido a un frasco de plástico de boca ancha de 250 mL y se registró su peso individualmente. Al final, el tejido de las submuestras de 15 organismos fue homogeneizado con la ayuda de un homogeneizador Vitris 45 equipado con aspas de titanio.

Digestión

Para realizar la digestión, se tomó una alícuota (~5.0 g de peso húmedo) del tejido homogeneizado de cada una de las submuestras y se colocó en un vaso de precipitado de 25 mL con 5 mL de HNO₃ grado metal traza al 70%; se cubrió con un vidrio de reloj y se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. A la mañana siguiente, la muestra fue calentada a 50°C durante dos horas aproximadamente. Después, se colocó en reflujo por cuatro horas, se llevó a sequedad y se le agregó 1 mL de agua destilada desionizada. Posteriormente, la muestra fue evaporada lentamente hasta que el residuo estuvo ligeramente húmedo. Enseguida se le agregaron 20 mL de HNO₃ al 1% y la solución fue transferida a un frasco de polietileno limpio de 30 mL. Para determinar el porcentaje de humedad de las muestras, se puso a secar aproximadamente una alícuota de un gramo de tejido húmedo a 70°C por 72 horas.

Análisis instrumental

Los análisis de los metales se llevaron a cabo con un espectrofotómetro de absorción atómica, Thermo Jarrel Ash Smith Hieftje 12, equipado con horno de grafito CTF 188. La Ag

Digestion

An aliquot (~5.0 g wet weight) was taken of the homogenized tissue of each subsample and placed in a 25-mL beaker with 5 mL of HNO₃ (trace metal grade 70%). It was covered with a watch glass and left at room temperature overnight. The next morning, the sample was heated at 50°C for approximately two hours. It was placed in ebb flow for four hours and allowed to dry, and then 1 mL of deionized distilled water was added to the sample. The sample was slowly evaporated until the residual was slightly damp; 20 mL of HNO₃ (1%) were added and the solution was transferred to a clean, 30-mL polyethylene flask. To determine the wet percentage of the samples, one aliquot of one gram of wet tissue was dried at 70°C for 72 hours.

Instrumental analysis

The metals were analyzed with an atomic absorption spectrophotometer, Thermo Jarrel Ash Smith Hieftje 12, equipped with a CTF 188 graphite furnace. Ag was determined using graphite furnace, and Cd and Cu with air-acetylene flame. To evaluate the quality of the analytical procedure used, for each 15 samples, one oyster tissue was analyzed, SRM-1566a (table 1) of the U.S. National Institute of Standards and Technology, as well as a procedural blank.

Evaluation of the effectiveness of *M. californianus* as an indicator of metals

The variations in Cd content in the genus *Mytilus* due to external factors such as temperature, salinity, position in the water column and condition of the organism, can be eliminated by relating shell weight to Cd content in the soft tissue of the mussel. The use of this index

Tabla 1. Análisis del material de referencia, tejido de ostión SRM 1566, certificado por el National Institute of Standards and Technology (media \pm intervalo de confianza al 95%).

Table 1. Analysis of the reference material, oyster tissue SRM 1566, certified by the National Institute of Standards and Technology (mean \pm 95% confidence interval).

	Medido	Certificado
Ag	1.56 \pm 0.24	1.68 \pm 0.15
Cd	3.9 \pm 0.35	4.15 \pm 0.38
Cu	62.2 \pm 5.21	66.3 \pm 4.3

se determinó usando horno de grafito, y Cd y Cu con flama aire-acetileno. Para evaluar la calidad del procedimiento analítico empleado, por cada 15 muestras se analizó una de tejido de ostión, SRM-1566a (tabla 1) de la National Institute of Standards and Technology (EE.UU.), y un blanco de procedimiento.

Evaluación de la efectividad de *M. californianus* como biomonitor de metales

Se ha encontrado que las variaciones en la concentración de Cd en el género *Mytilus* debidas a factores externos, tales como temperatura, salinidad, posición en la columna de agua y condición del organismo, pueden ser eliminadas relacionando el peso de la concha con el contenido de Cd en el tejido blando del mejillón. El uso de este índice (contenido de Cd en tejido blando/peso de la concha) elimina los efectos de los factores externos mencionados, los cuales no están relacionados con la concentración de Cd en el ambiente (Fisher, 1983).

En un experimento para evaluar la capacidad de *M. californianus* como biomonitor de Cd y Pb en el ambiente marino, Lares y Orians (1997) aplicaron, a sus datos, la normalización propuesta por Fisher (1983) y usando el índice de condición (IC) propuesto por Lobel *et al.* (1991):

(soft tissue Cd content/shell weight) eliminates the effects of the external factors mentioned, which are not related to Cd concentrations in the environment (Fisher, 1983).

In an experiment to evaluate the ability of *M. californianus* as an indicator of Cd and Pb in the marine environment, Lares and Orians (1997) applied the normalization proposed by Fisher (1983) to their data, and using the condition index (CI) proposed by Lobel *et al.* (1991):

$$CI = \frac{\text{Dry weight of soft tissue}}{\text{Length (cm)} \times \text{Height (cm)} \times \text{Width (cm)}} = \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

they carried out another normalization (NORM), multiplying this index by the concentrations of Cd and Pb:

$$\text{NORM} = \text{metal concentration in soft tissue } (\mu\text{g/g}) \times \text{CI } (\text{g/cm}^3) = \mu\text{g/cm}^3.$$

These authors found a significant correlation between both normalizations for both metals. Hence, they report that the high correlations, together with the fact that the variability of their data decreased, suggest that both normalizations reduce the effects of the external factors and the nutritional condition of the mussels, and can therefore be used in equivalent form.

$$IC = \frac{\text{Peso seco de tejido blando}}{\text{Largo (cm)} \times \text{Alto (cm)} \times \text{Ancho (cm)}} = \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

realizaron otra normalización (NORM) multiplicando este índice por las concentraciones de Cd y Pb:

$$\text{NORM} = \text{concentración de metal en tejido blando } (\mu\text{g/g}) \times IC (\text{g/cm}^3) = \mu\text{g/cm}^3.$$

Estos autores encontraron una correlación significativa entre ambas normalizaciones para ambos metales. Con base en esto, afirman que las altas correlaciones, junto con el hecho de que la variabilidad de sus datos disminuyó, sugieren que ambas normalizaciones reducen los efectos de los factores externos y el estado nutricional de los mejillones y, por tanto, pueden ser usadas de forma equivalente.

A partir de lo anterior y mediante una correlación, se puede determinar de cuáles metales es mejor biomonitor el mejillón *M. californianus*. Al normalizar la concentración de cualquier metal en mejillones con respecto al índice de condición, se eliminó la variabilidad no debida a la concentración del metal en el medio. Si correlacionamos la concentración cruda contra la concentración normalizada y obtenemos un coeficiente de correlación significativo, indica que la normalización con respecto al índice de condición no eliminó una cantidad considerable de variabilidad. Esto muestra que los factores externos no afectan de manera importante la variabilidad de la concentración de ese metal en el mejillón y, por tanto, la concentración del metal en sus tejidos puede considerarse como un buen reflejo de la concentración del mismo metal en el ambiente. Por otro lado, si el coeficiente de correlación entre la concentración normalizada y la cruda no es significativo, indica que la normalización eliminó una cantidad de variabilidad suficiente como para que las variabilidades de las concentraciones cruda y normalizada difieran

Based on the above, together with a correlation, it is possible to determine the metals for which *M. californianus* is a better indicator. When the concentration of any metal in mussels was normalized in relation to the condition index, the variability not due to the metal concentration in the environment was eliminated. When the raw concentration was correlated with the normalized concentration and a significant coefficient of correlation was obtained, then the normalization with regard to the condition index did not eliminate a considerable amount of variability. This indicates that the external factors do not significantly affect the variability of the concentration of that metal in the mussel and, therefore, the concentration of metal in the tissues can be considered a good indication of the concentration of that same metal in the environment. On the other hand, if the coefficient of correlation between the normalized and raw concentrations is not significant, then the normalization eliminated enough variability for the variabilities of the raw and normalized concentrations to differ considerably. This indicates that external factors intervene significantly in the variability and, therefore, the concentration of that metal in the mussel is not a good indication of the concentration of that same metal in the environment. This could help to determine if the metal concentration in mussel tissues is really due to the metal concentration in the environment or to other physiological or external factors.

Statistical analysis

To detect significant statistical differences between the concentrations found at EC and EL, the Mann-Whitney non-parametric U test was used. To determine the degree of association between the variabilities of the raw concentration of metals in *M. californianus* and the concentration normalized by the condition

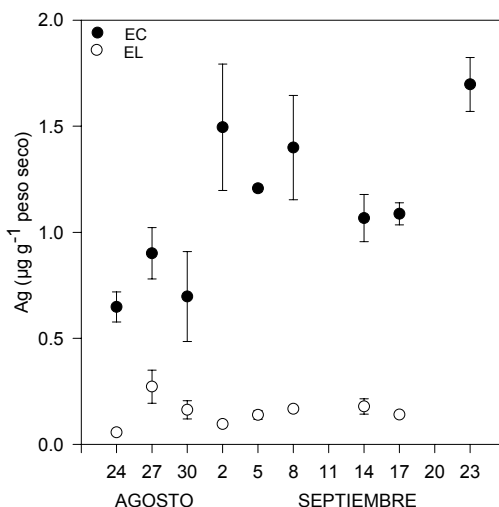


Figura 2. Variación temporal de corto plazo de la concentración de Ag en *Mytilus californianus* en una estación contaminada (EC) y una estación limpia (EL). Las barras verticales representan ± 1 error estándar y cada punto es la media de tres réplicas de 15 organismos cada una. En algunos puntos las barras de error son menores a los símbolos.

Figure 2. Short-term temporal variation in the concentration of Ag in *Mytilus californianus* at a polluted station (EC) and an unpolluted station (EL). Vertical bars represent ± 1 standard error and each point is the mean of three replicates of 15 organisms each. At some points the error bars are smaller than the symbols.

considerablemente. Esto muestra que los factores externos intervienen de manera determinante en la variabilidad y, por tanto, la concentración de ese metal en el mejillón no es un buen reflejo de la concentración del mismo metal en el medio. Lo anterior podría ayudar a tener mayor certidumbre con respecto a si la concentración de metales en el tejido de mejillones es realmente debida a la concentración de los metales en el medio o a otros factores como podrían ser los fisiológicos y/o los externos.

Análisis estadístico

Para detectar diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones encontradas en EC y EL, se usó la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney. Para observar

index, the Pearson Product-Momentum analysis of correlation was used.

RESULTS

Silver

The concentration of Ag ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in *M. californianus* at EL presented very little variability and no definite trend (fig. 2). The minimum value was recorded on 24 August (0.05) and the maximum value on 27 August (0.27). At EC, Ag tended to increase as the time series advanced. The minimum concentration was recorded on 24 August (0.64) and the maximum on 23 September (1.69). The concentrations recorded at EC were significantly greater than those at EL ($p < 0.001$).

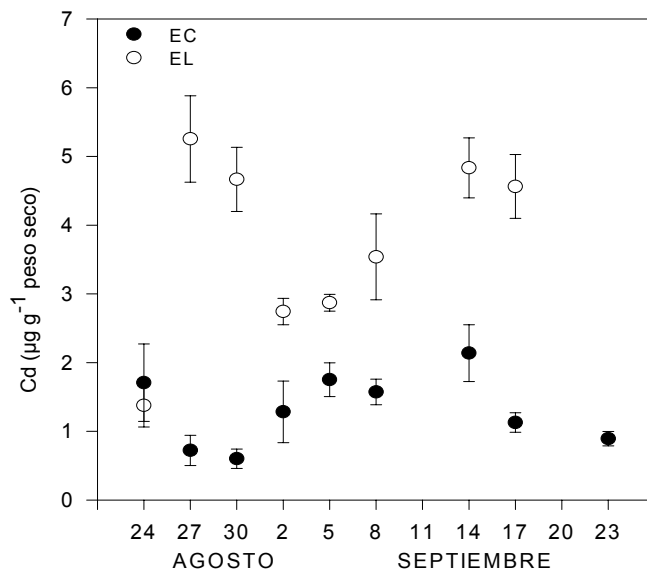


Figura 3. Variación temporal de corto plazo de la concentración de Cd en *Mytilus californianus* en una estación contaminada (EC) y una estación limpia (EL). Las barras verticales representan ± 1 error estándar y cada punto es la media de tres réplicas de 15 organismos cada una. En algunos puntos las barras de error son menores a los símbolos.

Figure 3. Short-term temporal variation in the concentration of Cd in *Mytilus californianus* at a polluted station (EC) and an unpolluted station (EL). Vertical bars represent ± 1 standard error and each point is the mean of three replicates of 15 organisms each. At some points the error bars are smaller than the symbols.

el grado de asociación entre las variabilidades de la concentración cruda de metales en *M. californianus* y la concentración normalizada por el índice de condición, se usó el análisis de correlación Producto-Momento de Pearson.

RESULTADOS

Plata

La concentración de Ag ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) en *M. californianus* en EL presentó muy poca variabilidad y no se observó ninguna tendencia definida (fig. 2). El valor mínimo se registró el 24 de agosto (0.05) y el máximo el 27 del mismo mes (0.27). En EC, Ag observó una

Cadmium

Except on 24 August, Cd concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) at EL were high at the beginning and end of the sampling, and relatively low during the intermediate days (fig. 3). The minimum value was recorded on 24 August (1.37) and the maximum on 27 August (5.25). Particularly noteworthy is that the maximum variation of the sampling (3.88) occurred in three days (24 to 27 August). At EC, the minimum concentration was recorded on 30 August (0.60) and the maximum on 14 September (2.13). The Cd concentrations in *M. californianus* recorded at EL were significantly greater than those found at EC ($p < 0.001$).

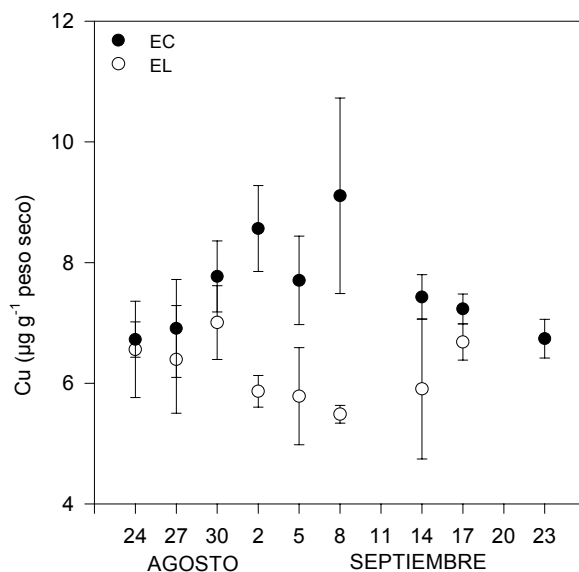


Figura 4. Variación temporal de corto plazo de la concentración de Cu en *Mytilus californianus* en una estación contaminada (EC) y una estación limpia (EL). Las barras verticales representan ± 1 error estándar y cada punto es la media de tres réplicas de 15 organismos cada una. En algunos puntos las barras de error son menores a los símbolos.

Figure 4. Short-term temporal variation in the concentration of Cu in *Mytilus californianus* at a polluted station (EC) and an unpolluted station (EL). Vertical bars represent ± 1 standard error and each point is the mean of three replicates of 15 organisms each. At some points the error bars are smaller than the symbols.

tendencia al incremento conforme se avanza en la serie de tiempo. La concentración mínima se observó el 24 de agosto (0.64) y la máxima el 23 de septiembre (1.69). Las concentraciones registradas en EC fueron significativamente mayores que las de EL ($p < 0.001$).

Cadmio

Con excepción del 24 de agosto, las concentraciones de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) en EL fueron altas al inicio y al final del muestreo y relativamente bajas en los días intermedios (fig. 3). La concentración mínima se presentó el 24 de agosto (1.37) y la máxima el 27 de agosto (5.25). Como una característica sobresaliente, se observó que en tres días (del 24 al

Copper

The concentration of Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) at EL presented a decreasing trend from 24 August to 8 September (fig. 4). However, all the values of the series fell within a relatively narrow range of variation. The minimum concentration was recorded on 8 September (5.5) and the maximum on 30 August (7.0). At EC, a slight increasing trend was observed from 24 August to 8 September, after which the concentrations decreased slightly from 14 to 23 September. The minimum value was recorded on 24 August (6.7) and the maximum on 8 September (9.1). The Cu concentrations in *M. californianus* recorded at EC were significantly greater than those found at EL ($p < 0.001$).

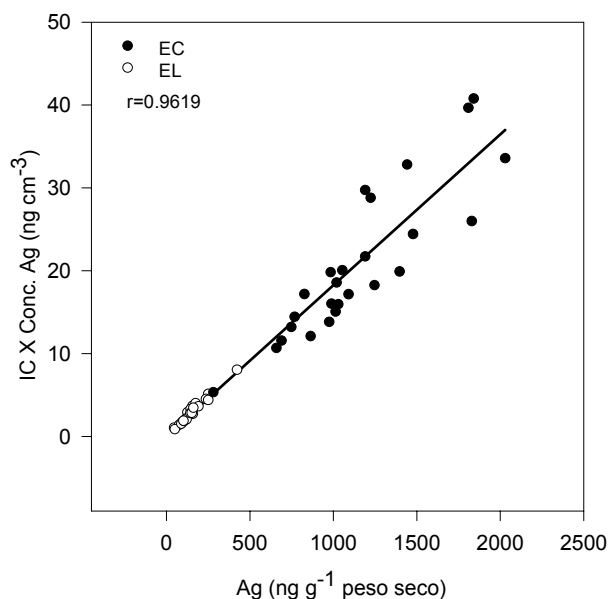


Figura 5. Relación entre la concentración cruda y la normalizada por el índice de condición de Ag en *Mytilus californianus*. Se incluyen las réplicas de la estación contaminada (EC) y la estación limpia (EL).

Figure 5. Relationship between the raw Ag concentration and that normalized by the condition index in *Mytilus californianus*. The replicates of the polluted station (EC) and unpolluted station (EL) are included.

27 de agosto) se presentó la variación máxima del muestreo (3.88). La concentración mínima en EC se registró el 30 de agosto (0.60) y la máxima el 14 de septiembre (2.13). Las concentraciones de Cd en *M. californianus* registradas en EL fueron significativamente mayores que las observadas en los mejillones de EC ($p < 0.001$).

Cobre

La concentración de Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) de *M. californianus* en EL presentó una muy ligera tendencia a disminuir del 24 de agosto al 8 de septiembre (fig. 4). Sin embargo, todos los valores de la serie se encontraron dentro de un intervalo de variación relativamente estrecho. La concentración mínima se registró el 8 de

Evaluation of the effectiveness of *M. californianus* as an indicator of metals

The coefficient of correlation ($r = 0.9619$) between the raw Ag concentration and that normalized by the condition index was significant ($p < 0.001$) (fig. 5), and the same occurs for Cd ($r = 0.9766$) (fig. 6). However, in the case of Cu, even though the correlation ($r = 0.7221$) was significant ($p < 0.001$), it was also relatively lower than that of Ag and Cd (fig. 7).

DISCUSSION

The high Ag concentrations in bioindicator organisms from California, USA, and Baja California, Mexico, are related to the municipal wastewater discharges of highly populated

septiembre (5.5) y la máxima el 30 de agosto (7.0). En EC, se observó una ligera tendencia al aumento del 24 de agosto al 8 de septiembre; posteriormente, y también en forma muy ligera, las concentraciones disminuyeron del 14 al 23 de septiembre. El valor mínimo se registró el 24 de agosto (6.7) y el máximo el 8 de septiembre (9.1). Las concentraciones de Cu en *M. californianus* registradas en EC fueron significativamente ($p < 0.001$) mayores que las observadas en EL.

Evaluación de la efectividad de *M. californianus* como biomonitor de metales

El coeficiente de correlación ($r = 0.9619$) entre la concentración de Ag cruda y la normalizada por el índice de condición fue significativo ($p < 0.001$) (fig. 5); lo mismo sucede con el Cd ($r = 0.9766$) (fig. 6). Sin embargo, en el caso de Cu, a pesar de que la correlación ($r = 0.7221$) fue significativa ($p < 0.001$), también fue relativamente menor que la de Ag y Cd (fig. 7).

DISCUSIÓN

Las altas concentraciones de Ag en organismos biomonitores de California, EUA, y Baja California, México, se encuentran asociadas a las descargas municipales de zonas densamente pobladas (Martin *et al.*, 1988; Muñoz-Barbosa *et al.*, 2000). En este estudio se encontró que las concentraciones de Ag en *M. californianus* de EC fueron significativamente mayores que las encontradas en EL ($p < 0.001$) (fig. 2). EC es un lugar altamente contaminado y el punto de recolección se encuentra muy cerca de una descarga de aguas residuales. Por otro lado, EL es un lugar relativamente limpio, alejado de la influencia del puerto y descargas de aguas residuales. Esto sugiere que la descarga de aguas residuales es la responsable de que los organismos en EC

areas (Martin *et al.*, 1988; Muñoz-Barbosa *et al.*, 2000). In this study, the Ag concentrations in *M. californianus* at EC were significantly greater than those found at EL ($p < 0.001$) (fig. 2). The former is a highly polluted site and the sampling station is located very close to the wastewater discharge, whereas the latter is a relatively unpolluted site, removed from the influence of the harbor and wastewater discharges. This indicates that wastewater discharges are responsible for the significantly higher concentrations of Ag in organisms from EC than from EL. On the other hand, the coefficient of correlation ($r = 0.9619$) between the raw Ag concentration and that normalized by the condition index is significant ($p < 0.001$) (fig. 5), indicating that normalization eliminated a minimum amount of variability of the raw concentration and, therefore, the concentration of Ag in the tissue of the organism is due more to the concentration of that same metal in the environment than to external or physiological factors. Also, despite the normalization, the differences between the concentrations from EC and EL persist. This indicates that the concentration of Ag in the organism reflects the concentration of this metal in the environment, thus supporting the conclusions reached based on these results. The concentrations recorded at EL and EC are similar to those found by Muñoz-Barbosa *et al.* (2000) at other unpolluted and polluted sites on the northwestern coast of Baja California. However, they are up to two orders of magnitude lower than those found at polluted sites in California (Martin *et al.*, 1988).

Unlike Ag, significantly higher Cd concentrations ($p < 0.001$) were recorded at EL than at EC (fig. 3). According to Bruland (1983), Cd presents a process of regeneration in the ocean similar to that of organic matter, and upwelling affects its concentration in the coastal area in the same way that it affects nutrients (Stephenson *et al.*, 1979). In the coastal region

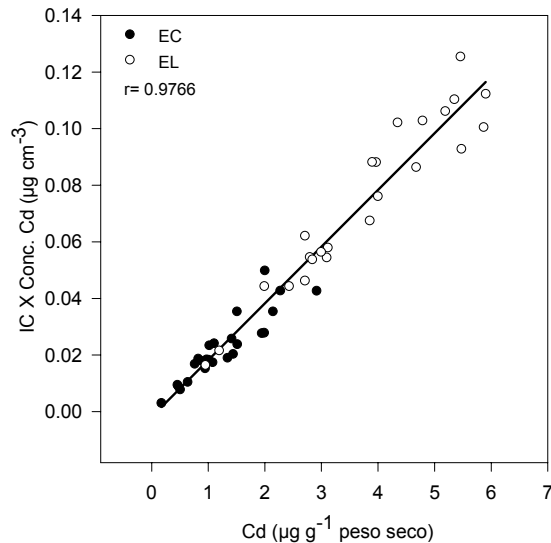


Figura 6. Relación entre la concentración cruda y la normalizada por el índice de condición de Cd en *Mytilus californianus*. Se incluyen las réplicas de la estación contaminada (EC) y la estación limpia (EL).

Figure 6. Relationship between the raw Cd concentration and that normalized by the condition index in *Mytilus californianus*. The replicates of the polluted station (EC) and unpolluted station (EL) are included.

presenten concentraciones de Ag significativamente más altas que en EL. Por otro lado, el coeficiente de correlación ($r = 0.9619$) entre la concentración de Ag cruda y la normalizada por el índice de condición es significativo ($p < 0.001$) (fig. 5). Esto indica que la normalización eliminó una cantidad mínima de variabilidad de la concentración cruda y, por tanto, la concentración de Ag en el tejido del organismo se debe más a la concentración del mismo metal en el ambiente que a factores externos o fisiológicos. Más aún, a pesar de la normalización, se puede observar que las diferencias entre las concentraciones de EC y las de EL persisten. Esto indica que la concentración de Ag en el organismo es un reflejo de la concentración del mismo elemento en el ambiente y, por tanto, apoya las conclusiones a las cuales se llegue con base en estos resultados. Las

of Baja California, it has been found that high concentrations of Cd in the water are associated with physical phenomena such as upwelling (Segovia-Zavala *et al.*, 1998). Also, whereas wastewater discharges contribute 1% of the Cd found in the water, physical phenomena contribute 99% (Sañudo-Wilhelmy and Flegal, 1991, 1996). Lares and Orians (1997), in a study with *M. californianus* from Vancouver Island, reported that the concentration of Cd in the mussel was related to variations in the dissolved Cd due to upwelling. EL is located in an exposed area, where upwelling occurs throughout the year but is strongest in summer (González-Morales and Gaxiola-Castro, 1991). EC, on the other hand, is located in the inner bay and is a relatively protected area, where the effects of upwelling are null or much weaker than at EL (Millán-Núñez *et al.*, 1981). The

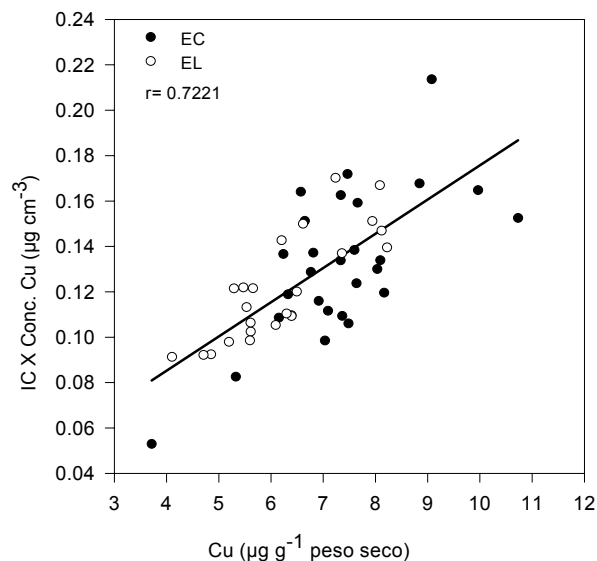


Figura 7. Relación entre la concentración cruda y la normalizada por el índice de condición de Cu en *Mytilus californianus*. Se incluyen las réplicas de la estación contaminada (EC) y la estación limpia (EL).

Figure 7. Relationship between the raw Cu concentration and that normalized by the condition index in *Mytilus californianus*. The replicates of the polluted station (EC) and unpolluted station (EL) are included.

concentraciones encontradas en EL y EC son similares a las encontradas por Muñoz-Barbosa *et al.* (2000) en lugares limpios y contaminados, respectivamente, de la costa noroccidental de Baja California. Sin embargo, son hasta dos órdenes de magnitud menores que las encontradas en lugares contaminados de California (Martin *et al.*, 1988).

A diferencia de la Ag, el Cd presenta concentraciones significativamente más altas ($p < 0.001$) en EL que en EC (fig. 3). De acuerdo con Bruland (1983), el Cd presenta un proceso de regeneración en el océano similar al de la materia orgánica y los fenómenos de surgencia afectan su concentración en la zona costera de la misma manera que afectan a los nutrientes (Stephenson *et al.*, 1979). En la zona costera de Baja California, se ha encontrado que las altas concentraciones de Cd en el agua

presence of upwelling during the sampling in this study may explain the differences between the Cd concentrations recorded at EL and EC. The results obtained herein coincide with those reported by Romero-Vargas Márquez (1995), who found high total Cd concentrations ($0.42 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) in sediments from a sampling station close to EL, which this author attributes to upwelling, and relatively low concentrations ($0.06 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) close to EC. Like Ag, there is a significantly high coefficient of correlation between the raw Cd concentration and that normalized by the condition index ($p < 0.05$) (fig. 6). This implies that the concentration of Cd in the mussel is due more to the concentration of Cd in the environment than to external or physiological factors. The highest Cd concentrations found at EL ($4.56\text{--}5.25 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) are within the

están asociadas con fenómenos físicos como las surgencias (Segovia-Zavala *et al.*, 1998); además, mientras que las decargas de aguas residuales contribuyen con el 1% del Cd presente en el agua, los fenómenos físicos lo hacen con el 99% (Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996). Lares y Orians (1997) encontraron, en un estudio con *M. californianus* residentes de la Isla de Vancouver, que la concentración de Cd en el mejillón estuvo asociada con las variaciones del Cd disuelto debidas a la surgencias. EL está en una zona expuesta, en donde se presentan surgencias durante todo el año, ocurriendo en el verano los eventos más fuertes (González-Morales y Gaxiola-Castro, 1991). Por el contrario, EC se encuentra en el interior de la bahía, la cual es una zona relativamente protegida donde los efectos de las surgencias son nulos o se presentan con una menor intensidad que en EL (Millán-Núñez *et al.*, 1981). La presencia de surgencias durante los muestreos en este estudio puede explicar las diferencias entre las concentraciones de Cd encontradas en EL y EC. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por Romero-Vargas Márquez (1995), quien encontró concentraciones altas de Cd total ($0.42 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) en sedimentos de una estación de muestreo cercana a EL, las cuales atribuye a surgencias, y concentraciones relativamente bajas ($0.06 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) cerca de EC. De la misma forma que en el caso de Ag, entre la concentración cruda de Cd y la normalizada por el índice de condición se presenta un coeficiente de correlación significativamente alto ($p < 0.05$) (fig. 6). Esto implica que la concentración de Cd en el mejillón se debe más a la concentración de Cd en el medio que a factores externos o fisiológicos. Las concentraciones de Cd más altas detectadas en EL ($4.56\text{--}5.25 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) se encuentran dentro del intervalo de concentraciones registradas durante un evento de surgencia (Lares y Orians, 1997). Sin embargo, son menores que

range of concentrations recorded during an upwelling event (Lares and Orians, 1997); however, they are lower than those found by Stephenson *et al.* (1979) for the San Miguel and Santa Barbara islands off California, also attributed to upwelling events. Ruelas-Inzunza and Páez-Osuna (2000) found scant temporal variability in Cd concentrations in the mussel *Mytella strigata* and oyster *Crassostrea corteziensis* ($0.5\text{--}1.0$ and $0.0\text{--}2.0 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight, respectively); these levels are within the same order of magnitude as the levels found in this study, although they are relatively lower than the concentrations found at EL.

Even though the Cu concentrations found at EC were significantly greater ($p < 0.05$) than those recorded at EL, the differences were not as clear as in the case of Ag and Cd (fig. 4). This was also found by Romero-Vargas Márquez (1995) for stations close to EL and EC, who reported similar total Cu concentrations in sediments (8.01 and $8.69 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight, respectively). It has been found that mussels are not good indicators of Cu. Phillips (1967a) showed that the net uptake of Cu by *Mytilus edulis* is affected by the occurrence and change in the concentration of Zn, Cd and Pb, whereas Zn, Cd or Pb do not seem to be affected by the presence of other metals. The occurrence of this effect in *M. edulis* suggests that the organism is not suitable as an indicator of pollution by Cu (Phillips, 1976b). On the other hand, Muñoz-Barbosa *et al.* (2000), in a study on spatial variability (along ~ 300 km) on the northwestern coast of Baja California, found smaller ranges of variation in the concentration of Cu in *M. californianus* than those detected in this study. This indicates that any spatial trend that may be found in their work lacks validity as, according to this study, variations of the same magnitude can occur in the order of days. Furthermore, the index of correlation between the raw Cu concentration and that normalized by the condition index is

las encontradas por Stephenson *et al.* (1979) para las islas San Miguel y Santa Barbara en California, atribuidas también a eventos de surgencia. Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna (2000) encontraron una variabilidad temporal escasa en la concentración de Cd en el mejillón *Mytella strigata* y en el ostión *Crassostrea corteziensis* (0.5–1.0 y 0.0–2.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco, respectivamente); estos niveles se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que los niveles de este estudio, aunque también son relativamente menores que las concentraciones encontradas en EL.

A pesar de que las concentraciones de Cu encontradas en EC fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que las de EL, estas diferencias no fueron tan claras como en el caso de Ag y Cd (fig. 4). Algo similar a lo anterior encontró Romero-Vargas Márquez (1995) para estaciones cercanas a EL y EC, quien reportó concentraciones de Cu total en sedimentos muy parecidas (8.01 y 8.69 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco, respectivamente). Se ha encontrado que los mejillones no son muy buenos indicadores de Cu. Phillips (1976a) mostró que la asimilación neta de Cu por *Mytilus edulis* es afectada por la ocurrencia y cambio en la concentración de Zn, Cd y Pb. Por el contrario, Zn, Cd o Pb no parecen ser afectados por la presencia de otros metales. La existencia de este efecto en *M. edulis* sugiere que el organismo no es apropiado como indicador de contaminación por Cu (Phillips, 1976b). Por otro lado, Muñoz-Barbosa *et al.* (2000), en un estudio de variabilidad espacial (a lo largo de 300 km aproximadamente) en la costa noroccidental de Baja California, encontraron intervalos de variación en la concentración de Cu en *M. californianus* menores a los que se detectaron en este estudio. Esto indica que cualquier tendencia espacial que pudiera encontrarse en su trabajo carece de validez pues, de acuerdo con este estudio, en el orden de días se pueden presentar variaciones de la misma magnitud.

considerably lower than that of Ag and Cd (fig. 7). This suggests that, unlike Ag and Cd, normalization eliminated a considerable amount of the variability in the raw concentration, indicating that in the case of Cu, external or physiological factors could be more important than the concentration of the metal in the environment. It should be taken into account that Cu is an essential metal for live organisms, and through its association with enzymes, it is involved in many metabolic processes (Dixon and Webb, 1979). This involvement in the metabolism may be the reason that the organism bioregulates the concentration of Cu in its tissues, thus altering its use as a bioindicator. This variability caused by physiological factors may explain why mussels are not good bioindicators of Cu in the ocean. Ruelas-Inzunza and Páez-Osuna (2000) recorded Cu concentrations in *Mytella strigata* and *Crassostrea corteziensis* from Mazatlán Bay two and three times higher, respectively, than those found in this study. The difference in these concentrations is too large to be able to attribute it to the fact that they are not the same species; it is possible that the bioavailability of Cu in Mazatlán Bay is very high even compared to the most polluted areas of Todos Santos Bay.

The results of this study indicate that the high Ag and Cu concentrations at EC may be caused by the wastewater discharges close to the sampling site. The high levels of Cd at EL suggest that they are affected by upwelling. However, according to the relationship between the raw concentration and that normalized by the condition index, the Ag and Cu data obtained may better reflect the concentrations of these metals in the environment than the Cu data, which may contain additional variability (caused by external or physiological factors) not due to the concentration of Cu in the environment. Thus, these results indicate that the mussel *M. californianus* is a better indicator of Ag and Cd than of Cu.

Además, el índice de correlación entre la concentración cruda de Cu y la concentración normalizada por el índice de condición es considerablemente más baja que la de Ag y Cd (fig. 7). Esto sugiere que, a diferencia de Ag y Cd, la normalización eliminó una cantidad considerable de la variabilidad de la concentración cruda, lo cual indica que en el caso de Cu, los factores externos y/o fisiológicos podrían ser más importantes que la concentración del metal en el medio. Se debe tener en cuenta que el Cu es un metal esencial para los organismos vivos y mediante su asociación con enzimas, está involucrado en muchos procesos metabólicos (Dixon y Webb, 1979). Este involucramiento en el metabolismo puede ser la causa de que el organismo biorregule la concentración de Cu en sus tejidos, alterando de esta manera su funcionamiento como biomonitor. Esta variabilidad adicional, causada por factores fisiológicos, puede ser la razón de que los mejillones no sean efectivos como biomonitores de Cu en el océano. Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna (2000) encontraron en las especies *Mytella strigata* y *Crassostrea corteziensis* de la Bahía de Mazatlán, concentraciones de Cu de hasta dos y tres órdenes de magnitud mayores, respectivamente, que las de este estudio. La disparidad entre estas concentraciones y las encontradas en el presente estudio es muy grande para atribuirlo sólo al hecho de que son diferentes organismos; es muy probable que la biodisponibilidad de Cu en la Bahía de Mazatlán sea muy alta comparada aun con las zonas más contaminadas de Bahía de Todos Santos.

Los resultados de este estudio indican que las altas concentraciones de Ag y Cu en EC podrían estar causadas por las descargas municipales adyacentes al sitio de muestreo. Por su parte, los altos niveles de Cd en EL sugieren que éstos están afectados por surgencias. Sin embargo, de acuerdo con la relación entre la concentración cruda y la normalizada por el índice de condición, los datos obtenidos de Ag

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Universidad Autónoma de Baja California and Instituto de Investigaciones Oceanológicas for financial support of this study.

English translation by Christine Harris.

y Cd podrían estar reflejando de una mejor manera las concentraciones de los mismos metales en el medio, mientras que los datos de Cu podrían contener variabilidad adicional (causada por factores externos o fisiológicos) no debida a la concentración de Cu en el medio. Es decir, el mejillón *M. californianus*, de acuerdo con estos resultados, es indicador más efectivo de Ag y Cd que de Cu.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Autónoma de Baja California y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas el financiamiento para la realización de este estudio.

REFERENCIAS

- Beliaeff, B., O'Connor, T.P., Daskalakis, D.K. and Smith, P.J. (1997). U.S. mussel watch data from 1986 to 1994: Temporal trend detection at large spatial scales. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 1411-1415.
- Boalch, R., Chan, S. and Taylor, D. (1981). Seasonal variation in the trace metal content of *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.*, 12: 276-280.
- Borchardt, T., Burchert, S., Hablitzel, H., Karbe, L. and Zeitner, R. (1988). Trace metal concentrations in mussels: Comparison between estuarine, coastal and offshore regions in the southeastern North Sea from 1983 to 1986. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 42: 17-31.

- Bowen, H.J.M. (1972). The biochemistry of trace elements. In: Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences. Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 393–405.
- Boyden, C.R. (1977). Effect of size upon metal content of shellfish. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 57: 675–714.
- Bruland, K.W. (1983). Trace elements in sea-water. In: J.P. Riley and R. Chester (eds.), *Chemical Oceanography*. Academic Press, London, pp. 157–220.
- Coleman, N. (1980). The effect of emersion on cadmium accumulation by *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.*, 11: 359–362.
- Cossa, D., Bourget, E. and Piuze, J. (1989). Sexual maturation as a source of variation in the relationship between cadmium concentration and body weight of *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.*, 10: 174–176.
- Dixon, M. and Webb, E.C. (1979). *Enzymes*. 3rd ed. Longman, London.
- Fisher, H. (1983). Shell weight as an independent variable in relation to cadmium content of molluscs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 12: 59–75.
- Gault, N.F.S., Tollandand, E.L.C. and Parker, J.G. (1983). Spatial and temporal trends in heavy metal concentrations in mussels from Northern Ireland coastal waters. *Mar. Biol.*, 77: 307–316.
- Goldberg, E.D. (1975). The mussel watch: A first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.*, 6: 111.
- González-Morales, A.T. y Gaxiola-Castro, G. (1991). Variación día a día de características fisicoquímicas, biomasa y productividad primaria del fitoplancton en una zona de surgencia costera de Baja California. *Ciencias Marinas*, 17(3): 21–37.
- Janssen, H.H. and Scholz, N. (1979). Uptake and cellular distribution of cadmium in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 55: 133–141.
- Lares, M.L. and Orians, K.S. (1997). Natural Cd and Pb variations in *Mytilus californianus* during the upwelling season. *Sci. Total Environ.*, 197: 177–195.
- Latouche, Y.D. and Mix, M.C. (1982). The effects of depuration, size and sex on trace metal levels in bay mussels. *Mar. Pollut. Bull.*, 13: 27–29.
- Lauenstein, G.G., Robertson, A. and O'Connor, T.P. (1990). Comparison of trace metal data in mussels and oysters from a mussel watch programme of the 1970's with those from a 1980's programme. *Mar. Pollut. Bull.*, 21: 440–447.
- Lobel, P.B., Belkhole, S.P., Jackson, S.E. and Longerich, H.P. (1989). A universal method for quantifying and comparing the residual variability of element concentrations in biological tissues using 25 elements in the mussel *Mytilus edulis* as a model. *Mar. Biol.*, 102: 513–518.
- Lobel, P.B., Bajdik, C.D., Belkhole, S.P., Jackson, S.E. and Longerich, H.P. (1991). Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape and chronological age. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 21: 409–414.
- Martin, M., Stephenson, M.D., Smith, D.R., Gutiérrez-Galindo, E.A. and Flores-Muñoz, G. (1988). Use of silver in mussels as a tracer of domestic wastewater discharge. *Mar. Pollut. Bull.*, 9: 512–520.
- Millán-Núñez, E., Ortiz-Cortez, F.J. y Álvarez-Borrego, S. (1981). Variabilidad temporal y espacial de nutrientes y fitoplancton en una laguna costera, a finales de verano. *Ciencias Marinas*, 7: 103–126.
- Muñoz-Arriola, F. (1994). Variabilidad de Cd, Cu y Pb en los aportes de aguas residuales del Arroyo El Gallo a la Bahía de Todos Santos durante el periodo mayo–diciembre de 1991. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, 69 pp.
- Muñoz-Barbosa, A., Gutiérrez-Galindo, E.A. and Flores-Muñoz, G. (2000). *Mytilus californianus* as an indicator of heavy metals on the northwest coast of Baja California, Mexico. *Mar. Environ. Res.*, 49: 123–144.
- Orren, M.J., Eagle, G.A., Henning, H. and Green, A. (1980). Variations in trace metal content of the mussel *Choromytilus meridionalis* (Kr.) with season and sex. *Mar. Pollut. Bull.*, 11: 253–257.
- Ouellette, T.R. (1981). Seasonal variation of trace metals in the mussel *Mytilus californianus*. *Environ. Conserv.*, 8: 53–58.
- Phillips, D.J.H. (1976a). 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. *Mar. Biol.*, 38: 59–69.
- Phillips, D.J.H. (1976b). The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. II. Relationship of metals in the mussel to those discharged by industry. *Mar. Biol.*, 38: 71–80.
- Romero-Vargas Márquez, I.P. (1995). Metales pesados y sus fracciones químicas en sedimentos de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, 86 pp.
- Ruelas-Inzunza, J.R. y Páez-Osuna, F. (2000). Comparative bioavailability of trace metals using three filter-feeder organisms in a subtropical coastal environment (southeast Gulf of California). *Environ. Pollut.*, 107: 437–444.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1991). Trace element distributions in coastal waters along the US-Mexican boundary: Relative contributions of natural processes vs. anthropogenic inputs. *Mar. Chem.* 33: 371–392.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1996). Trace metal concentrations in the surf zone in coastal waters off Baja California. *Environ. Sci. Technol.*, 30: 1575–1580.
- Segovia-Zavala, J.A., Delgadillo-Hinojosa, F. and Álvarez-Borrego, S. (1998). Cadmium in the coastal upwelling area adjacent to the California-Mexico border. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, 46: 475–481.
- Stephenson, M.D. and Leonard, G.H. (1994). Evidence for the decline of silver and lead and the increase of copper from 1977 to 1990 in the coastal marine waters of California. *Mar. Pollut. Bull.*, 28: 148–153.
- Stephenson, M.D., Martin, M., Lange, S.E., Flegal, A.R. and Martin, J.H. (1979). Trace metal concentrations in the California mussel *Mytilus californianus*. *Water Quality Monitoring Rep.*, Vol. III, 102 pp.