



Universidad Austral de Chile

---

Escuela de Biología Marina

Facultad de Ciencias

**Escuela de Biología Marina**

**PROFESOR PATROCINANTE:**

**Dr. Jorge Navarro A.**

Instituto de Biología Marina

Facultad de Ciencias

**“RESPUESTA FISIOLÓGICA-ENERGÉTICA DEL BIVALVO *Mytilus chilensis*  
FRENTE A LA PRESENCIA DEL DINOFLAGELADO TÓXICO *Alexandrium  
catenella*”**

Tesis de grado presentado como  
parte de los requisitos para optar  
al título de Biólogo Marino

**Andrea Maud Contreras Garcés**

VALDIVIA-CHILE

2005

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mi profesor patrocinante, Dr. Jorge M. Navarro, quien con su infinita paciencia y buena disposición, me ayudó durante todo el transcurso de la tesis. Gracias profe por siempre tener tiempo para escucharnos y apoyarnos y por entregarnos día a día su alegría y sabiduría.

Gracias a mis queridos papas, que a pesar de la distancia siempre están conmigo, entregándome todo su cariño y amor. Por entender y apoyarme en las decisiones que he tomado, a pesar de que eso incluya estar lejos de ellos, pero es aquí donde me he dado cuenta que siempre los tendré conmigo y que pase lo que pase yo siempre seré su niñita.

Gracias a Rodrigo, quien siempre escucha mis penas y alegrías, que ha sabido entender y tener paciencia cuando tuve que dedicarle nuestro tiempo a la tesis....te amo mucho.

Gracias a mis queridos amigos, Vania, Maysa, Rodrigo Sh., Marcos, Bonina Poncho, Cholita, Margarita, Jimena, Anita y muchos más, que han hecho que mis años en la universidad sean los mejores de mi vida, en donde he conocido gente maravillosa, de la cual jamás me olvidaré. Quisiera también agradecer a Geysi, por todo lo que me enseñó y apoyó durante la parte práctica de la tesis, por todos sus consejos y soluciones a los miles de problemas que se me presentaron.

Y finalmente, gracias al proyecto Fondecyt 1030340 por el financiamiento para la realización de esta tesis.

## Índice

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
1. Material y Método	12
1.1 Área de Estudio	12
1.2 Recolección de los ejemplares	12
1.3 Aclimatación	14
1.4 Diseño experimental	14
1.4.1 Cultivo de microalgas y preparación de sedimento	14
1.4.2 Dietas	16
1.5 Determinación de la toxicidad en las dietas y tejidos de los animales experimentales	18
1.6 Mediciones fisiológicas	20
1.6.1 Tasa de aclaramiento (TA)	21
1.6.2 Tasa de ingestión total (TIT) y tasa de ingestión orgánica (TIO)	22
1.6.3 Eficiencia de absorción (EA) y tasa de absorción (T ab)	23
1.6.4 Consumo de oxígeno (CO)	24
1.6.5 Tasa de excreción (TE)	26
1.6.6 Crecimiento potencial (CP)	26
1.7 Análisis estadístico	27
2. Resultados	28
2.1 Dietas experimentales	28

2.2 Toxicidad en los tejidos blandos de <i>Mytilus chilensis</i>	31
2.3 Mediciones fisiológicas	32
2.3.1 Tasa de aclaramiento	32
2.3.1.1 Experimentos largos	32
2.3.1.2 Experimentos cortos	33
2.3.2 Tasa de ingestión total	39
2.3.2.1 Experimentos largos	39
2.3.2.2 Experimentos cortos	40
2.3.3 Tasa de ingestión orgánica	44
2.3.3.1 Experimentos largos	44
2.3.3.2 Experimentos cortos	45
2.3.4 Eficiencia de absorción	48
2.3.5 Tasa de absorción	50
2.3.6 Consumo de oxígeno	52
2.3.7 Tasa de excreción	53
2.3.8 Crecimiento potencial	56
3. Discusión	58
4. Bibliografía	68

## Resumen

Debido a que los fenómenos de floraciones algales nocivas (FAN) se han ido sucediendo con mayor periodicidad (casi anual), abordando nuevas zonas geográficas de nuestro país donde la extracción de recursos del mar constituye la base económica del lugar, como por ejemplo la Isla de Chiloé, es necesario evaluar el efecto de la toxina paralizante sobre la fisiología de algunas especies claves de los ecosistemas de este lugar. Para este propósito se ha tomado como modelo de estudio al bivalvo filtrador *Mytilus chilensis* que habita la bahía de Yaldad, Chiloé, y que existe en forma natural formando bancos intermareales y además es cultivado en forma masiva en sistemas suspendidos.

El objetivo de este estudio es determinar la respuesta del bivalvo *Mytilus chilensis* frente a la presencia del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella*, mediante determinaciones de variables fisiológicas-energéticas, en condiciones de laboratorio. Para esto se midieron respuestas relacionadas con la adquisición (aclaramiento, ingestión, absorción) y utilización (excreción, respiración) de energía en el bivalvo expuesto a dietas con diferentes grados de toxicidad.

Los resultados obtenidos permiten concluir que las dietas contaminadas con *A. catenella* tuvieron un efecto negativo sobre la ganancia de energía de *Mytilus chilensis* solo durante los primeros días (2-3 días) de experimentación. Posteriormente a este periodo *M. chilensis* presenta la capacidad de aclimatación a las condiciones de dietas tóxicas, lo que resulta en valores de crecimiento potencial similares a los ejemplares controles. Este efecto negativo inicial estaría relacionado principalmente con la

presencia de *A. catenella* en la dieta y no con la toxina acumulada en el tejido de los bivalvos. La capacidad de *Mytilus chilensis* para aclimatarse a las distintas dietas entregadas, la hace una buena especie centinela para la detección a tiempo de eventos de marea roja perjudiciales para la salud humana. Su relativa insensibilidad al VPM hace que su conducta alimentaria se normalice en un periodo de tiempo muy corto, logrando que la acumulación de la toxina se produzca en muy poco tiempo. Es importante destacar que la capacidad de adaptación presentada por los individuos estudiados frente a la presencia de *A. catenella* estaría relacionada con la población natural a la cual pertenecen (Yaldad, Chiloé), localidad que se vio afectada por la floración tóxica de *Alexandrium* del año 2002.

## Abstract

Harmful algal events (HABs) have been happening more frequently (almost annually), in new geographical areas of our country where the extraction of resources of the sea constitutes the economic base of the place, region as example the Chiloé Island, so it is necessary to evaluate the effect of paralytic shellfish poison (PSP) on the physiology of some key species of those ecosystems. In this study we included the filter feeding bivalve *Mytilus chilensis* that inhabits the bay of Yaldad, Chiloé, in intertidal beds and is also cultivated in suspended systems.

The objective of this study is to determine the response of the bivalve *Mytilus chilensis* to the presence of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, by means of determinations of physiological variables, under laboratory conditions. Responses related with the acquisition (clearance rate, ingestion rate, absorption efficiency) and utilization (excretion rate, oxygen consumption) of energy were carried out in the bivalves exposed to diets with different toxicity grades.

The diets with *A. catenella* had a negative effect on the energy gain of *Mytilus chilensis* during the first days (2-3 days) of experimentation. After this period *M. chilensis* presents an acclimatization capacity to the conditions of toxic diets, approaching similar scope of growth to the control individuals. This initial negative effect would be related mainly to the presence of *A. catenella* in the diet and not to the toxin accumulated in the bivalves' tissue. *Mytilus chilensis* is able to presents capacity of acclimatization to the different experimental diets, which makes it a good sentinel species for the detection of harmful events of red tide for the human health. This relative

insensitivity to PSP makes that its feeding behavior normalized in a short period of time, achieving the accumulation of the toxin in a very short time. It is important to highlight that the capacity of acclimatization presented by the individuals studied in the presence of *A. catenella* would be related to the natural population to which they belong (Yaldad, Chiloé), a place that was affected by the toxic bloom of Alexandrium during year 2002.



## Introducción

El plancton que habita los mares del mundo esta formado por organismos de pequeño tamaño, animales y vegetales, que por lo limitado de sus mecanismos natatorios son transportados por las mareas y corrientes. El componente vegetal de estos organismos lo constituye el fitoplancton, que representa más del 90% de la producción de la materia orgánica marina, constituyendo la base alimentaria de la cadena trófica marina y aportando el oxígeno esencial para el desarrollo de la vida en el mar (Suárez & Guzmán, 1998). La composición y calidad de las microalgas que componen el fitoplancton varía a través del año según el ambiente y la latitud, influyendo factores lumínicos, disponibilidad de nutrientes, salinidad y temperatura entre otros.

La proliferación de estos microorganismos planctónicos puede alcanzar altas concentraciones (e.g.  $10^6$  cél/L), lo que origina las llamadas floraciones algales (Sar *et al.*, 2002). Esta alta densidad de microalgas puede modificar la coloración del agua y provocar, en algunos casos, eventos luminiscentes claramente observables durante la noche. Estos acontecimientos son naturales en la dinámica de los ecosistemas marinos y en la mayoría de los casos son beneficiosos para la acuicultura y la producción de los recursos marinos que se alimentan de estos organismos (Suárez & Guzmán, 1998). Por otro lado las floraciones algales nocivas (FAN) son causadas por un grupo poco numeroso de especies de microalgas, tan solo unas 60 especies de alrededor de las 4000 conocidas, en las que se encuentran principalmente dinoflagelados, algunas diatomeas, cianobacterias, crisófitas y microflagelados. Estos organismos pueden causar daño por agotamiento del oxígeno en el agua, por irritación

mecánica (Suárez & Guzmán, 1998) o también pueden ser tóxicas debido a la presencia de especies que producen en su metabolismo compuestos químicos de muy alta toxicidad (Yasumoto & Murata, 1993). Cabe mencionar que en este último caso, no es necesario que la concentración de especies tóxicas sea muy elevada para causar daño en el ambiente (Sar *et al.*, 2002) y en la salud pública.

Las toxinas marinas se han clasificado según el efecto tóxico que causan en los humanos. Se pueden distinguir las paralizantes, neurotóxicas y ciguatéricas que alteran los canales del sodio a nivel celular, las diarreicas que inhiben la proteína fosfatasa esencial para el control de la permeabilidad del epitelio intestinal y las amnésicas que producen pérdida de memoria (Suárez & Guzmán, 1998). Las microalgas responsables del veneno paralítico de los mariscos (VPM) son dinoflagelados, entre los cuales encontramos especies de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*. Las especies *Alexandrium catenella* y *Alexandrium tamarense* se distribuyen tanto en el Océano Atlántico como en el Pacífico, aguas británicas y fuera de las costas de Japón (Bricelj & Shumway, 1998).

En el ambiente marino estas toxinas se encuentran en diferentes niveles de la cadena alimentaria, pero es particularmente evidente en aquellos grupos de organismos que son capaces de concentrarla, tales como moluscos bivalvos, zooplancton, crustáceos y gastrópodos carnívoros (Halsted, 1978; Pitcher *et al.*, 2001). Estos organismos actúan como vectores, movilizandolas toxinas a niveles superiores de la cadena trófica, lo que produce las ya conocidas intoxicaciones en vertebrados, incluyendo a los humanos.

La contaminación de los bivalvos es facilitada por su rol trófico como consumidores primarios, movilidad limitada, habilidad para concentrar fitoplancton debido al gran volumen de agua bombeada por unidad de tiempo y a la relativa insensibilidad de algunas especies al VPM (Bricelj & Shumway, 1998). Los bivalvos filtradores ingieren las microalgas tóxicas desde el medio natural, ya que forman parte de la oferta de alimento (seston), acumulando la toxina en sus tejidos, especialmente en la glándula digestiva (Martin *et al.*, 1990; Shumway & Cucci, 1987).

Debido a la presencia de estas toxinas en el ambiente natural se ha observado una variedad de efectos subletales en bivalvos marinos, tales como cierres de valvas, reducción de tasas de filtración, bajas tasas metabólicas, aumento en la producción de mucus y una actividad cardíaca errática (Shumway *et al.*, 1985). Entre estos, uno de los efectos más comunes es la reducción de la exposición del molusco al ambiente contaminado, lo que implica la reducción de la actividad de filtración debido al aumento del tiempo que mantienen las valvas cerradas. Gainey & Shumway (1988) señalan que *Mytilus edulis* luego de ser expuesto al dinoflagelado tóxico *Protogonyaulax tamarensis*, presentó un cierre errático de las valvas seguido del cierre total de ellas, mientras que *Mercenaria mercenaria* presentó un cierre total. Esta reducción en la tasa de filtración también ha sido registrada en *Mytilus edulis* de Rhode Island, *Mya arenaria* (Shumway & Cucci, 1987), *Mercenaria mercenaria* (Dupuy & Sparkes, 1968), y *Crassostrea virginica* (Ray & Aldrich, 1967; Shumway & Cucci, 1987), sin embargo también se han observado incrementos en la tasa de filtración, como es el caso de *Ostrea edulis* (Shumway & Cucci, 1987). Al parecer existiría un efecto especie-específico frente a la presencia del VPM y también variadas respuestas a nivel poblacional (espacial),

tamaño o edad de los animales y en individuos previamente expuestos a la toxina (Bricelj & Shumway, 1998). Numerosas interrogantes existen con respecto a este tema ya que son escasos los estudios que han sido enfocados a determinar el efecto de los dinoflagelados tóxicos presentes en la dieta sobre la respuesta fisiológica de bivalvos filtradores. Es por esto que existe la necesidad de estudiar las respuestas fisiológicas de estos moluscos frente a eventos de marea roja tóxica de modo de poder entender la mecánica de cómo los afecta y el impacto específico de la misma sobre los diferentes procesos fisiológicos involucrados en el balance de energía. Este balance al ser afectado por la toxina, produciría una disminución en la energía destinada a crecimiento y reproducción, con el consecuente impacto negativo tanto sobre su estado de condición y el riesgo de sobrevida poblacional como sobre el proceso productivo de los centros que se dedican a cultivar estas especies.

El crecimiento potencial (CP), se basa en la integración de todos los procesos fisiológicos relacionados con la adquisición y utilización de la energía (ingestión, absorción, respiración, excreción) por parte de un organismo (Widdows, 1985), lo que permite entregar información casi en forma instantánea para evaluar el proceso de crecimiento (Bayne & Newell, 1983; Widdows, 1985). Cuando presenta valores positivos el animal tiene energía disponible para crecer y producir gametos, por el contrario cuando es negativo, indica la presencia de estrés y la utilización de las reservas para mantener el metabolismo (Bayne *et al.*, 1985). Este índice se ha utilizado ampliamente para estudiar la condición fisiológica de algunos bivalvos, pero son muy escasos los estudios sobre su utilización en organismos contaminados con la toxina paralizante.

Los fenómenos de marea roja (floraciones algales tóxicas) han sido observados en Chile desde el siglo pasado, registrándose casos en aguas oceánicas y costeras. Desde 1972 a la fecha, se han sucedido cada vez con mayor frecuencia y extensión, en las zonas de Llanquihue, Aysén y Magallanes (Suárez & Guzmán, 1998). En el año 2002, se observó por primera vez la presencia de un florecimiento de gran magnitud de microalgas tóxicas en la zona de Chiloé, con concentraciones que alcanzaron 779000 cels/L (Clement *et al.*, 2002) y con altos valores de toxicidad de hasta 8554 µg de STX/100 g carne en ejemplares de *Mytilus chilensis* de la bahía de Yaldad y por sobre los 20000 µg de STX/100 g carne en otras bahías cercanas a Yaldad, tales como Huidad y Quellón Viejo (Servicio de Salud LLANCHIPAL, Laboratorio de Mareas Rojas, Castro, Chiloé). Debido a esta situación, el Servicio Nacional de Salud de la Región prohibió durante tres meses la extracción de mariscos desde los 42°18'S al sur. Esta prohibición tuvo gran impacto social y económico sobre la población que se dedica a la pesca artesanal, cultivo y procesamiento de mariscos (artesanal e industrial). En todos estos casos la presencia de toxina paralizante de los mariscos (VPM) se ha atribuido al florecimiento del dinoflagelado *Alexandrium catenella*, que produce saxitoxinas que se acumulan en el tejido de los mariscos.

Existen diversos estudios relacionados con blooms de algas tóxicas en Chile, abordando temas como la ecología y factores ambientales asociados a estos fenómenos (Lembeye, 1981), técnicas de detección rápida de VPM (Vélez *et al.*, 2001), estudios de biología molecular (Córdova & Muller, 2002), identificación de bacterias asociadas a *A. catenella* (Córdova *et al.*, 2003) como también aspectos sobre identificación y cuantificación de quistes en sedimento (Lembeye & Sfeir, 1999). Sin

embargo no existen estudios sobre el efecto del veneno paralizante sobre la respuesta fisiológica de invertebrados marinos, tales como bivalvos filtradores, los que habitan generalmente zonas donde ocurren los fenómenos de mareas rojas y donde su importancia económica desde el punto de vista de la acuicultura es cada vez más relevante.

Debido a que los fenómenos de mareas rojas se han ido sucediendo con mayor periodicidad (casi anual), abordando nuevas zonas geográficas de nuestro país donde la extracción de recursos del mar constituye la base económica del lugar, como por ejemplo la Isla de Chiloé, es de relevancia evaluar el efecto del veneno paralizante sobre la fisiología de algunas especies claves de los ecosistemas de Chiloé. Para este propósito se ha tomado como modelo de estudio al bivalvo filtrador *Mytilus chilensis* que habita la bahía de Yaldad, Chiloé, y que existe en forma natural formando bancos intermareales y además es cultivado en forma masiva en sistemas suspendidos. La bahía de Yaldad representa un lugar conveniente para ser estudiado ya que fue una de las zonas mas afectadas por el fenómeno en el año 2002. Sus producciones anuales de *M. chilensis* son un importante aporte dentro del desembarque anual del puerto de Quellón (cercano a la bahía de Yaldad) el cuál alcanzó las 8912 toneladas en el año 2003 (Sernap, 2003)

La hipótesis del presente estudio postula que “Las floraciones algales tóxicas producidas por el dinoflagelado *Alexandrium catenella* afecta la respuesta fisiológica del bivalvo *Mytilus chilensis*, con impactos negativos sobre su estado de condición a causa de la reducción de la energía destinada a crecimiento.” Esta hipótesis será puesta a prueba determinando la respuesta del bivalvo *M. chilensis* frente a la

presencia del dinoflagelado tóxico *A. catenella*, mediante determinaciones de variables fisiológicas-energéticas, en condiciones de laboratorio.

### **Generalidades sobre *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854)**

*Mytilus chilensis* llamado comúnmente “chorito”, es un molusco bivalvo filtrador de plancton y detritus, perteneciente a la familia Mytilidae. En Chile se puede encontrar desde la desembocadura del río Tirúa (IX Región) hasta el Estrecho de Magallanes (Hernández & González, 1976). Esta especie forma densos bancos sobre fondos duros o fondos de fango con subfondo sólido, siendo común encontrarla en estuarios y fiordos de la región sur-austral de Chile, habitando desde el intermareal hasta aproximadamente 20-25 m de profundidad (Viviani, 1979; Brattstrom & Johanssen, 1983). Presenta sexos separados y fecundación externa. Si las condiciones de temperatura y alimentación en el medio son las adecuadas, los adultos maduraran sexualmente en primavera. Después de múltiples divisiones celulares, el cigoto pasa a ser una larva trocófora y luego una larva véliger. Pasados unos 25-30 días en el plancton, las larvas descienden en la columna de agua, se asientan y forman biso para adherirse al sustrato. Luego de la fijación ocurre la metamorfosis, la cual origina un juvenil con apariencia de adulto. Pasados 15-18 meses en cultivo suspendido, los choritos alcanzan la talla comercial de 5 cm. (Clasing *et al.*, 1998).

## 1. Material y Método

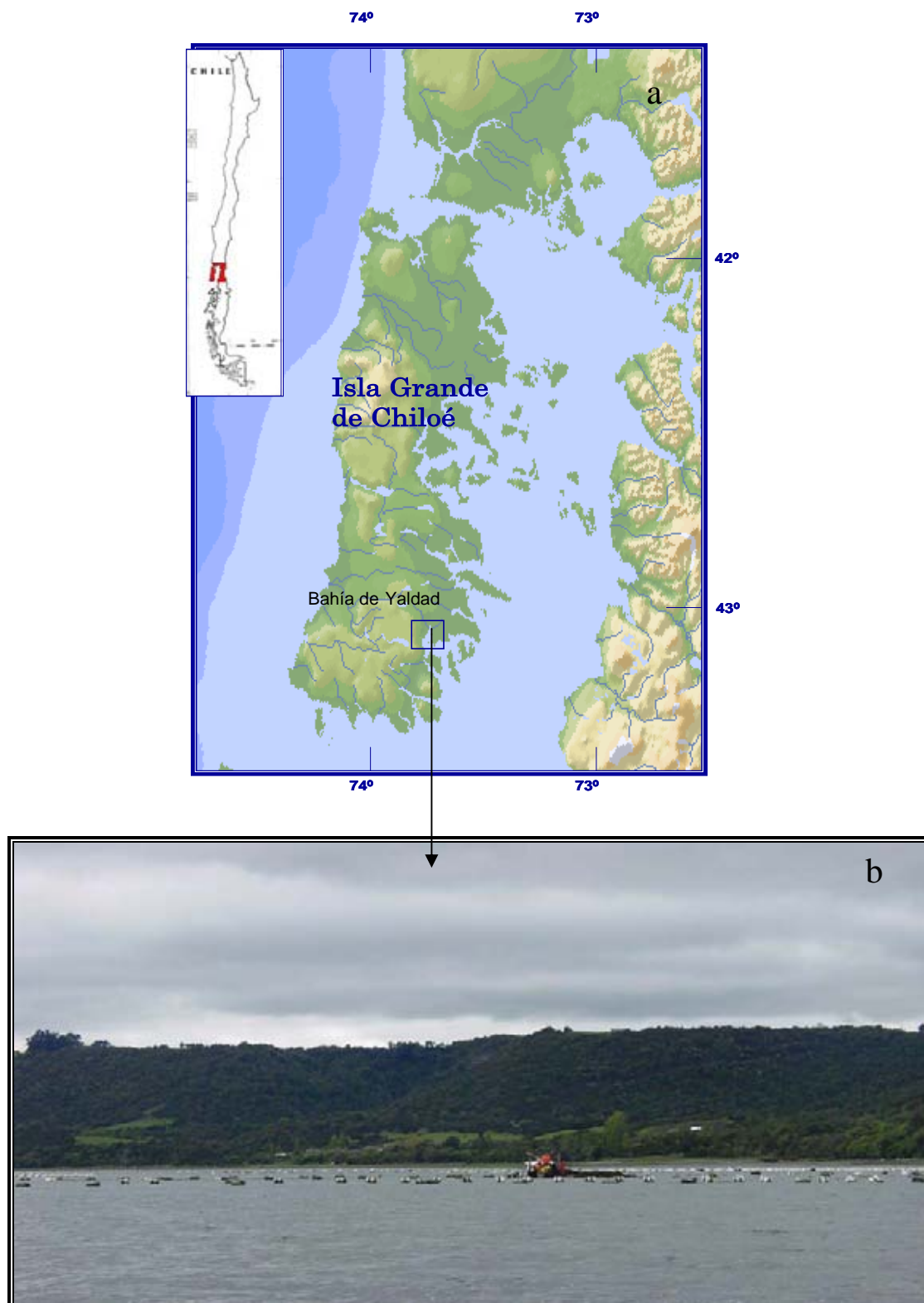
### 1.1 Área de Estudio

La bahía de Yaldad se ubica en el sur de Chile, en la Isla de Chiloé a los 43°08'S y 73°44'W (figura 1). Sus aguas se caracterizan por presentar temperaturas máximas en enero con valores cercanos a los 15°C que disminuyen hasta alcanzar los 10°C en invierno. La salinidad es estable, con valores alrededor de 30‰. La oferta alimentaria (seston) para los organismos filtradores tiene un patrón estacional bien definido, con máximos valores durante primavera-verano y mínimos durante el resto del año. En la zona de balsas de cultivo, el seston orgánico varía entre 0.6-1.6 mg/L y el seston inorgánico entre 0.3 – 3.6 mg /L (Navarro y Jaramillo, 1994).

### 1.2 Recolección de los ejemplares

Se colectaron los individuos de *Mytilus chilensis* desde cuerdas de cultivo suspendidas (balsas), en noviembre de 2003 y en mayo y agosto de 2004. Se seleccionaron por tamaño (5,4-5,6 cm longitud), se limpiaron de epibiontes y recortaron cuidadosamente las fibras de biso para luego ser transportados en frío al Laboratorio de Ecofisiología del Instituto de Biología Marina de la Universidad Austral de Chile.





**Figura 1.** Área de estudio. **a.** Mapa de Chiloé. **b.** Balsas de cultivo de *M. chilensis* en la bahía de Yaldad.

### 1.3 Aclimatación

Los individuos experimentales se aclimataron por una semana a 14 °C y a 30‰ de salinidad. Durante este periodo se les alimentó tres veces al día con la microalga *Isochrysis galbana* y se mantuvieron en acuarios con agua de mar constantemente aireada, la que fue cambiada cada tres días (figura 2).



**Figura 2.** Ejemplares de *Mytilus chilensis* durante el periodo de aclimatación.

### 1.4 Diseño experimental

#### 1.4.1 Cultivo de microalgas y preparación de sedimento

El dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* cepa ACC02, fue cultivado en agua de mar filtrada a 0.45  $\mu\text{m}$  conteniendo el medio de cultivo L1 (Guillard, 1995), a una temperatura de 14°C y fotoperíodo de 14:10 luz:oscuridad (figura 3). Estos cultivos

fueron utilizados en su fase de crecimiento logarítmico, cuando los dinoflagelados se encuentran en forma unicelular observándose formación de cadenas en bajos porcentajes (menor al 7%).



**Figura 3.** Cultivo de *Alexandrium catenella* bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

En el caso de la microalga *I. galbana*, ésta fue cultivada bajo luz artificial las 24 horas del día en el medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975). Para todos los experimentos se utilizó la fase exponencial del cultivo (figura 4).



**Figura 4.** Cultivo de *Isochrysis galbana*.

El sedimento fino fue colectado desde el primer centímetro del estrato de la planicie mareal de Yaldad, tamizado a 40  $\mu\text{m}$ , lavado con agua destilada y quemado en la mufla por un período de 12 horas a 500°C para eliminar su fracción orgánica.

#### 1.4.2 Dietas

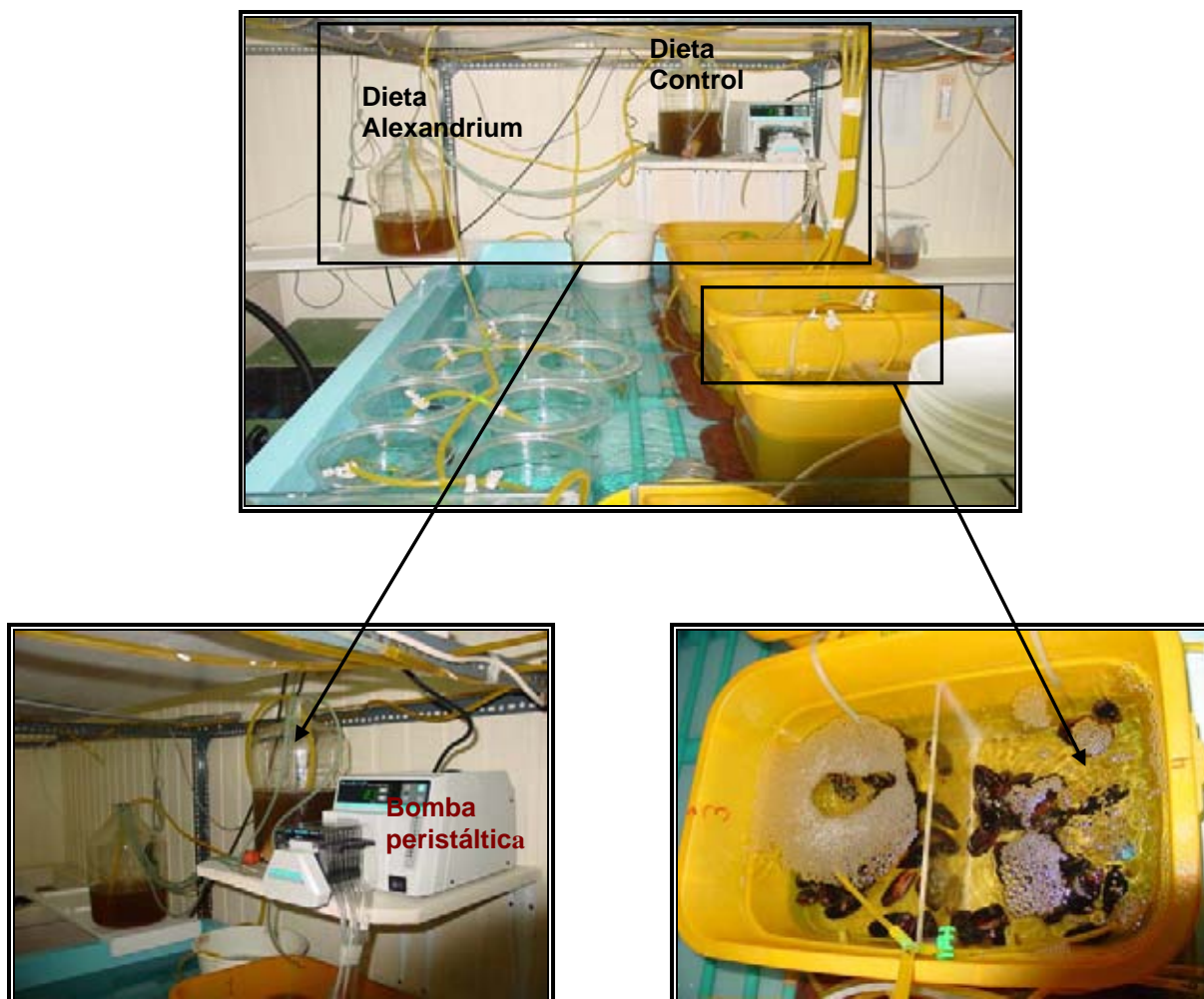
Las dietas experimentales fueron preparadas con diferentes proporciones (en peso seco) de *Alexandrium catenella*. La dieta 1 estaba compuesta de 10% de *A. catenella*, 30% de *Isochrysis galbana* y 60% de sedimento fino inorgánico. La dieta control contenía 40% de *Isochrysis galbana* y 60% de sedimento fino. Diariamente se adicionó una cantidad de alimento correspondiente al 3% del peso seco carne de cada individuo experimental alimentado con esta dieta (31 mg/día).

La dieta 2 estaba compuesta de 30% de *A. catenella*, 10% de *I. galbana* y 60% de sedimento fino y la dieta control por 40% de *I. galbana* y 60% de sedimento fino. Diariamente se adicionó una cantidad de alimento correspondiente al 2% del peso seco carne de los mitílidos experimentales alimentados con esta dieta (23 mg/día).

La dieta 3 estaba compuesta de 50% de *A. catenella*, 10% de *I. galbana* y 40% de sedimento fino y la dieta control por 60% de *I. galbana* y 40% de sedimento. A cada individuo experimental alimentado con esta dieta se le adicionó diariamente el 2% de su peso seco carne, lo que correspondió a 23 mg/día.

La dieta 4 estaba compuesta de 100% de *A. catenella* y la dieta control por 100% de *I. galbana*. También se le adicionó diariamente a cada ejemplar el 2% de su peso seco carne lo que correspondió a 23 mg/día.

Se mantuvieron 7 acuarios experimentales, de los cuales cuatro fueron alimentados con dieta contaminada con Alexandrium y tres fueron mantenidos como control. Todas las dietas fueron entregadas en forma continua por medio de una bomba peristáltica Masterflex L/S modelo 7519-05 bajo condiciones de temperatura y salinidad controladas (14°C y 30‰ respectivamente) (figura 5).



**Figura 5.** Diseño experimental utilizado en la alimentación de *Mytilus chilensis* con cada dieta experimental. Bivalvos se mantienen con alimentación y aireación continua.

### 1.5 Determinación de la toxicidad en las dietas y tejidos de los animales experimentales

Para determinar la toxicidad de las dietas experimentales 1 y 3 se tomaron muestras del alimento contaminado durante los días 0, 3, 8, 14 y 21, las cuales fueron centrifugadas para la posterior extracción de la toxina. Con respecto a la toxicidad de las dietas 2 y 4, esta fue determinada solo en los días 0, 1 y 2.

Para el análisis de toxina de tejidos blandos de los animales experimentales, se retiraron dos individuos de cada acuario alimentado con las dietas contaminadas 1 y 3 durante los días 0, 1, 3, 4, 8, 14 y 21 del experimento, asumiendo que la mayor acumulación se produciría durante los primeros días. En estas mediciones también se incluyeron los acuarios controles en los que se tomó el mismo número de muestras. Se utilizaron dos individuos de cada acuario para obtener suficiente tejido para los análisis de toxina (5 g de peso húmedo, aproximadamente.).

Tanto para la medición de la toxicidad de las dietas como de tejidos blandos de los individuos estudiados, se empleó un ensayo funcional electrofisiológico que mide el efecto bloqueador directo de saxitoxinas sobre las corrientes de sodio a través de canales de sodio expresados establemente en una línea celular en cultivo por técnica patch clamp (Vélez *et al.*, 2001). Este ensayo utiliza una línea de células en cultivo (HEK 293; HEK: Human Embryonic Kidney cells), que expresan de manera estable canales de sodio de músculo esquelético de rata sensibles a STX (denominados  $\mu 1$ ). En condiciones de registro electrofisiológico de tipo "patch-clamp", este ensayo permite la determinación directa y rutinaria del contenido de STX equivalentes en muestras de extractos de mariscos. La concentración equivalente de STX se estima por medio de curvas de calibración que se obtienen con perfusión externa de concentraciones conocidas de STX purificada. El ensayo electrofisiológico ha sido validado probando extractos ácidos de mariscos cuyo contenido de STX había sido determinado previamente por medio de desplazamiento de ( $^3\text{H}$ ) STX o por bioensayo de ratón. Se ha encontrado una muy buena correlación entre los ensayos ( $R= 0,96$ ). Se determinó que el límite práctico de cuantificación de 0,1 nM STX es equivalente a 0,042  $\mu\text{g}$

STX/100g o 19100 veces mas bajo que el límite regulatorio y 8550 veces más bajo que el límite de detección del ensayo de ratón. La concentración de las toxinas (VPM) de las muestras fue analizada mediante este método por el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **1.6 Mediciones fisiológicas**

Todos los procesos fisiológicos (tasa de aclaramiento, tasa de ingestión, eficiencia de absorción, consumo de oxígeno, tasa de excreción y crecimiento potencial) fueron medidos en forma individual, sobre ejemplares elegidos al azar de cada acuario experimental. Estas mediciones se realizaron para las dietas 1 y 3 durante los días 0, 3, 8, 14 y 21, en agua de mar filtrada a 0.45  $\mu\text{m}$ , a una temperatura de 14°C y salinidad de 30‰, tanto para animales contaminados con la toxina como para los alimentados con la dieta control. A estas mediciones se les llamó “experimentos largos”.

Finalizados los “experimentos largos”, se realizaron mediciones de tasa de aclaramiento e ingestión para las dietas 1, 2, 3 y 4 durante la mañana y la tarde de los días 0, 1 y 2, con el fin de completar y mejorar la resolución de los resultados obtenidos, a estas mediciones se les llamó “experimentos cortos” .



### 1.6.1 Tasa de aclaramiento (TA)

Se define como el volumen de agua liberado de partículas suspendidas, mayores de 4  $\mu\text{m}$  de diámetro (retenidas con una eficiencia del 100%), por unidad de tiempo (Bayne *et al.*, 1985). Esta fue medida en un sistema estático en el que se monitorea periódicamente la disminución de la densidad de partículas en cada acuario experimental (Widdows, 1985); para esto se utilizó un contador de partículas (Elzone 180XY) equipado con un tubo de recuento de 120  $\mu\text{m}$  de apertura (figura 6). Los experimentos se realizaron por un período de 3 a 4 horas con mediciones cada 20-30 minutos, lo cual permitió conocer la variabilidad individual sobre un número de réplicas adecuado para estudios ecofisiológicos. Se utilizó como control un acuario adicional sin bivalvos, para corregir cualquier error por sedimentación o división celular.

Para calcular la tasa de aclaramiento (L/h) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{TA} = V (\log_e C_1 - \log_e C_2) / t$$

Donde V = volumen del acuario (L) y  $C_1$  y  $C_2$  = concentración de partículas al comienzo y al final del intervalo de tiempo t (h).



**Figura 6.** Cámaras experimentales para medir tasa de aclaramiento bajo diferentes concentraciones de toxina paralizante.

### **1.6.2 Tasa de ingestión total (TIT) y tasa de ingestión orgánica (TIO)**

Representa la cantidad de material consumido por unidad de tiempo (mg/h). Para su calculo se tomaron tres muestras de las dietas utilizadas y se concentraron en filtros de fibra de vidrio GF/C de 47 mm de diámetro y 1.2  $\mu\text{m}$  de poro previamente lavados, quemados y pesados (filtros pretratados), lavándose posteriormente con una solución isotónica de formiato de amonio para eliminar las sales. Se secaron a 70  $^{\circ}\text{C}$  por 48 horas y se pesaron para calcular el peso seco total de material particulado por litro de agua de mar. Los filtros se quemaron por tres horas a 450  $^{\circ}\text{C}$  y se pesaron nuevamente para estimar el material orgánico particulado (MOP). La cantidad de alimento suministrado (1.7-2.0 mg/L) se encuentra por debajo del umbral de producción de seudofecas para esta especie por lo que conocida la tasa de aclaramiento y la

concentración de partículas suspendidas en el agua, se calculó la TI según Bayne *et al.* (1985):

$$\text{TIT} = \text{TA} \times (\text{seston mg/L})$$

La tasa de ingestión orgánica representa la cantidad de material orgánico consumido por unidad de tiempo (mg/h) y se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{TIO} = \text{TA} \times (\text{seston orgánico mg/L})$$

### 1.6.3 Eficiencia de absorción (EA) y tasa de absorción (Tab)

La eficiencia de absorción se define como la fracción de material orgánico ingerido que es absorbido por un organismo (%). Se calculó de acuerdo al método gravimétrico de Conover (1966), el cual asume la absorción exclusiva de la materia orgánica del alimento. Para esto se filtró un volumen conocido de dieta a través de un filtro GF/C pre-tratado y las fecas acumuladas durante la tasa de aclaramiento también fueron retenidas a través de filtros del mismo tipo y lavadas con formiato de amonio (figura 7). Tanto las muestras de dieta como de fecas fueron secadas a 70°C por 48 horas y quemadas a 450°C durante tres horas para determinar la fracción de materia orgánica en la dieta y de las fecas producidas por los individuos. Se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{EA} = (\text{A}-\text{F}) / [(\text{1}-\text{F}) \times \text{A}]$$

Donde A = relación peso materia orgánica : peso total en el alimento y F = relación peso materia orgánica : peso total en las fecas.



**Figura 7.** Fecas de *Mytilus chilensis* retenidas en filtro de vidrio para estimar la eficiencia de absorción de este bivalvo.

La tasa de absorción corresponde al material ingerido que es absorbido por unidad de tiempo (mg/h) y se calculó según la ecuación descrita por Bayne *et al.* (1985):

$$\text{Tab} = \text{EA} \times \text{TIO}$$

Donde TIO = tasa de ingestión orgánica (mg/h)

#### **1.6.4 Consumo de Oxígeno (CO)**

Para determinar el consumo de oxígeno (ml O<sub>2</sub>/h) los bivalvos se mantuvieron individualmente en cámaras de respiración (volumen conocido) herméticamente cerradas, conteniendo agua de mar saturada de oxígeno (figura 8). Permanecieron sin ser perturbados durante 60 minutos a 14° C, evitando que la concentración de oxígeno

llegue a valores menores al 70% de saturación con el fin de evitar una posible respuesta oxiconforme por parte de esta especie. Se empleó como control una cámara de iguales características pero sin animal. La concentración de oxígeno al inicio y al final del experimento se midió con un oxigenómetro YSI modelo 55. El consumo de oxígeno se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$CO = (ml O_2/ L \text{ al inicio} - ml O_2/ L \text{ al final}) / t$$

Donde t = intervalo de tiempo (h)



**Figura 8.** Cámaras de respiración y oxigenómetro para medir consumo de oxígeno.

### 1.6.5 Tasa de Excreción (TE)

Corresponde a la proporción total de energía absorbida que es liberada como desechos metabólicos (amonio) vía los órganos de excreción ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N/h}$ ). Se midió individualmente en acuarios de vidrio tapados que contenían un volumen conocido de agua de mar filtrada. Se mantuvo un acuario sin animal como control para determinar el amonio presente en el agua de mar utilizada en los experimentos. Trascorridas 2 horas, se tomaron muestras del agua y se las analizó mediante el método colorimétrico de Solórzano (1969), para esto se prepara un set de soluciones con concentraciones de amonio conocidas (curva de calibración) que junto con las muestras de agua de los acuarios son leídas en un espectrofotómetro UV-vis 0277 LaboMed. Inc. Mediante la ecuación lineal obtenida de la curva de calibración se pueden calcular las concentraciones de amonio presentes en las muestras de agua, luego se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{TE} = (28 \times X \times V) / t$$

Donde X = concentración de amonio ( $\text{NH}_4\text{-N/h}$ ); V = volumen experimental (L);

t = intervalo de tiempo (h).

### 1.6.6 Crecimiento Potencial (CP)

Corresponde a la energía disponible para crecimiento somático y producción de gametos después de sustraer las pérdidas por respiración y excreción desde la energía absorbida. Se determinó a las diferentes condiciones experimentales, con el fin de conocer la respuesta de esta especie a la presencia de la toxina paralizante en la oferta

de alimento (seston). Para calcular el crecimiento potencial las mediciones fisiológicas se transformaron a equivalentes energéticos (J/h); 1 ml O<sub>2</sub> = 19.9 J, 1 µg NH<sub>4</sub>-N = 0.0249 J (White, 1987) y 1 mg de materia orgánica de la dieta = 21 J (McLusky, 1989). Luego se utilizó la fórmula de Widdows (1985):

$$CP = A - (R + E)$$

Donde A= Absorción (J/h); R= Respiración (J/h); E= Excreción (J/h).

Al finalizar las mediciones fisiológicas, el tejido de los individuos fue removido y secado a 70°C por 48 horas para normalizar las tasas fisiológicas a 1 g de peso seco.

### **1.7 Análisis estadístico:**

Las respuestas fisiológicas de *Mytilus chilensis* para las distintas dietas experimentales normalizadas a 1 g de peso seco carne fueron analizadas mediante el programa STATISTICA 4.2. Se compararon las medias mediante análisis de varianza a 1 vía (ANOVA) con posterior test de Tuckey, transformando los datos con log(x) o arcseno(x) cuando éstos no cumplían los supuestos a posteriori (normalidad y homogeneidad de varianza). También se realizaron regresiones entre dos variables analizando la significancia del coeficiente de correlación.

## 2. Resultados

### 2.1 Dietas experimentales

Las dietas experimentales 1, 2 y 3 contaminadas en distintas proporciones con el dinoflagelado *Alexandrium catenella*, promediaron  $1,74 \pm 0,04$  mg/L de peso seco total y las dietas controles utilizadas durante cada experimento (*Isochrysis galbana* + sedimento), promediaron  $1,81 \pm 0,1$  mg/L. La dieta experimental 4 contaminada en un 100% con *A. catenella* como la dieta control preparada en un 100% con *I. galbana*, tuvieron un promedio de 2 mg/L (tabla 1). El número de células de *A. catenella* presente en las dietas contaminadas, varió según la proporción establecida para cada dieta experimental. La dieta 1 (10% de *A. catenella*) fue preparada con 36950 cél/L, la dieta 2 (30%) con 88599 cél/L, la dieta 3 (50%) con 154185 cél/L y la dieta 4 (100%) con 262475 cél/L. El número de células de *Isochrysis galbana* presente en las dietas contaminadas también varió según la proporción establecida para cada una. La dieta 1 (30% de *I. galbana*) contenía  $25,4 \times 10^6$  cél/L y las dietas 2 y 3 (ambas preparadas con 10% de *I. galbana*) contenían  $8 \times 10^6$  cél/L aproximadamente. Las dietas controles 1 y 2 (40% de *I. galbana*) fueron preparadas con  $33,1$  y  $36,4 \times 10^6$  cél/L respectivamente, la dieta 3 (60%) con  $54,7 \times 10^6$  cél/L y la dieta 4 (100%) con  $67,1 \times 10^6$  cél/L (ver tabla 1).

Las dietas 1 y 2 contaminadas con *A. catenella* y preparadas con una mayor proporción de sedimento fino, presentaron  $42,09\% \pm 8,16$  y  $36,09\% \pm 1,48$  de materia orgánica respectivamente. La dieta 3 contaminada con la toxina y preparada con una menor proporción de sedimento fino inorgánico, presentó un valor de materia orgánica de  $53,81\% \pm 2,24$ . Las dietas controles que se componen de las mismas proporciones



de sedimento fino inorgánico que las contaminadas respectivas, promediaron  $37,43\% \pm 8,01$  de materia orgánica en la dieta 1,  $45,12\% \pm 6,11$  en la dieta 2 y  $59,94\% \pm 10,00$  en la dieta 3. La dieta 4 presentó  $88,9\%$  de materia orgánica en el alimento contaminado y  $94,04\%$  en el alimento control (tabla 1).

La cantidad de saxitoxina equivalente contenida en la dieta 1 fue de  $12,7 \pm 4,6$  pmoles/L, en la dieta 2 fue de  $223,3 \pm 144,9$  pmoles/L, en la dieta 3 de  $925,5 \pm 564,2$  pmoles/L y en la dieta 4 fue de  $1607,2 \pm 105,8$  pmoles/L.

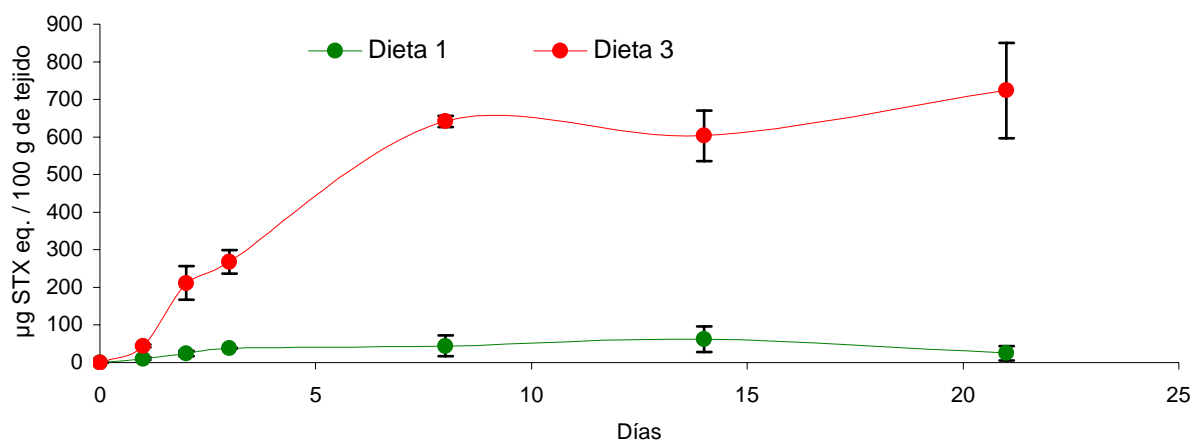
**Tabla 1:** Caracterización de las dietas experimentales (contaminadas y controles) utilizadas en las mediciones fisiológicas de *Mytilus chilensis*.

	Dieta Contaminada			Dieta Control		
			DE			DE
<b>Peso seco total</b> mg/L	1	1,74	0,19	1	1,70	0,21
	2	1,71	0,11	2	1,87	0,19
	3	1,78	0,13	3	1,87	0,25
	4	2,00		4	2,00	
<b>Peso seco</b> <b>Materia orgánica</b> mg/L	1	0,72	0,08	1	0,63	0,09
	2	0,62	0,05	2	0,85	0,19
	3	0,93	0,08	3	1,10	0,12
	4	1,78	0,05	4	1,87	0,05
<b>Materia orgánica</b> %	1	42,09	8,16	1	37,43	8,01
	2	36,09	1,48	2	45,12	6,11
	3	53,81	2,24	3	59,94	10,00
	4	88,84	2,11	4	94,04	2,57
<b>Número de células</b> <b>de <i>Alexandrium</i></b> <b><i>catenella</i></b> cél/L	1 (10%)	36950	3850			
	2 (30%)	88599	5496			
	3 (50%)	154185	11059			
	4 (100%)	262475	17282			
<b>Peso seco de</b> <b><i>Alexandrium</i></b> <b><i>catenella</i></b> mg/L	1 (10%)	0,17	0,02			
	2 (30%)	0,51	0,03			
	3 (50%)	0,89	0,06			
	4 (100%)	2,00				
<b>Número de células</b> <b>de <i>Isochrysis</i></b> <b><i>galbana</i></b> cél/L	1 (30%)	25414634	2739288	1 (40%)	33121951	1333769
	2 (10%)	8328458	516612	2 (40%)	36471911	499635
	3 (10%)	8696232	623769	3 (60%)	54709815	623768
				4 (100%)	67175980	12047722
<b>Peso seco de</b> <b><i>Isochrysis</i></b> <b><i>galbana</i></b> mg/L	1 (30%)	0,52	0,06	1 (40%)	0,68	0,08
	2 (10%)	0,17	0,01	2 (40%)	0,75	0,07
	3 (10%)	0,18	0,01	3 (60%)	1,12	0,01
				4 (100%)	2,00	
<b>Toxicidad</b> pmoles/L	1	12,7	4,6			
	2	223,3	144,9			
	3	925,5	564,2			
	4	1607,2	105,8			

## 2.2 Toxicidad en los tejidos blandos de *Mytilus chilensis*

Los análisis de toxina en los individuos alimentados con la dieta 1 (figura 9) muestran que las concentraciones de saxitoxina equivalente acumuladas en sus tejidos no superan el límite de seguridad para el consumo humano (80  $\mu\text{g}$  de stx eq. /100gr de tejido) y que además los niveles de toxina no muestran diferencias significativas entre los muestreos realizados ( $p > 0.05$ ).

Los animales alimentados con la dieta 3 (figura 9), contienen concentraciones de saxitoxina equivalente ( $\mu\text{g}$  de stx equiv /100g de tejido) significativamente más altas ( $p < 0.05$ ) que los individuos alimentados con la dieta 1. También se puede distinguir que durante la intoxicación de los bivalvos con la dieta 3, la concentración de toxina aumenta en el tiempo, estableciendo diferencias significativas entre los primeros (del día 0 al 4) y últimos muestreos (del día 8 al 21). Esta especie alcanza un máximo nivel de contaminación en el día 8, no registrándose valores mayores durante el resto del experimento.



**Figura 9.** Concentración de toxina en los tejidos blandos de *Mytilus chilensis* alimentado con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar.

## **2.3 Mediciones fisiológicas**

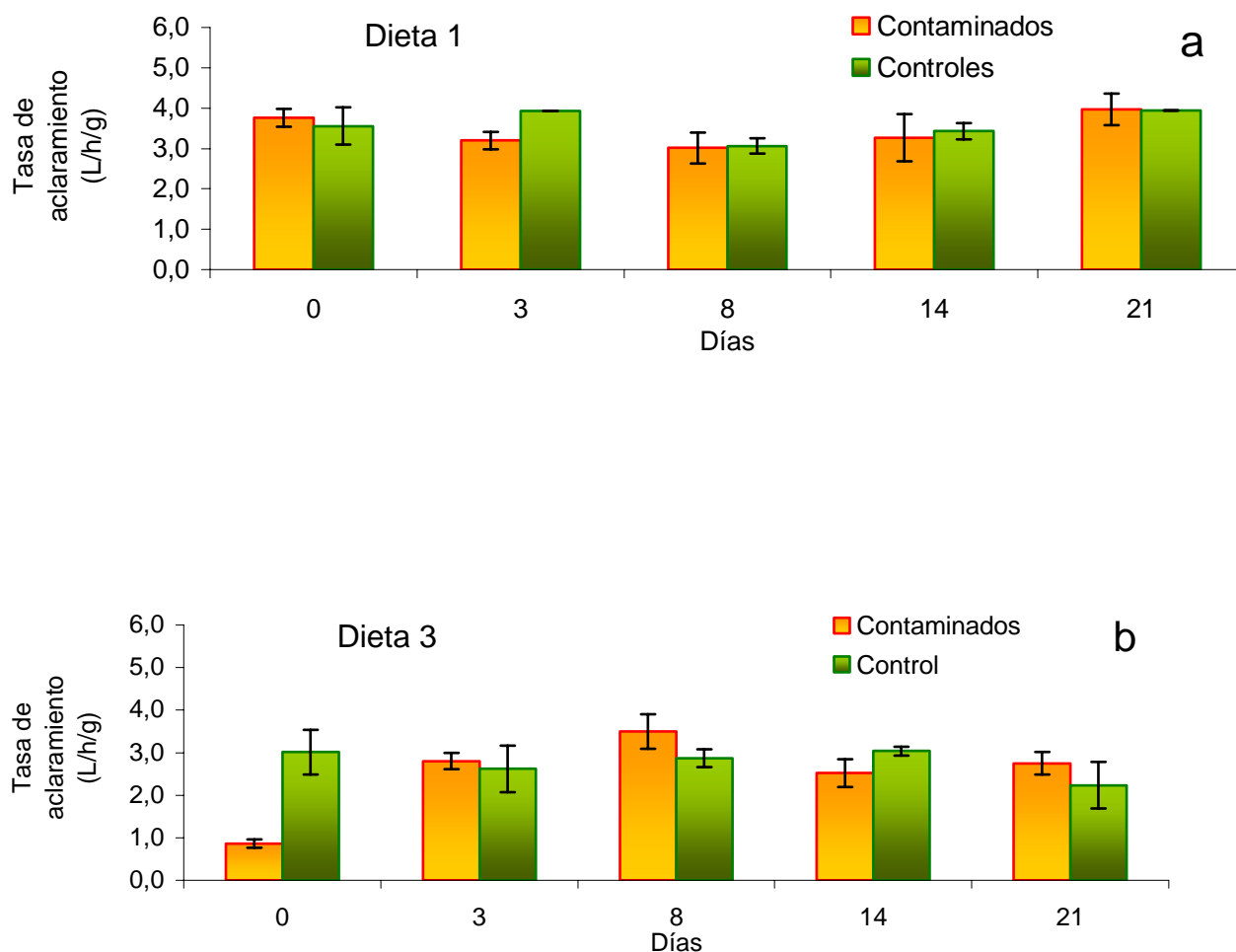
### **2.3.1 Tasa de aclaramiento**

#### **2.3.1.1 Experimentos largos**

La tasa de aclaramiento de *Mytilus chilensis* alimentado con la dieta 1 no muestra diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) a lo largo de todo el experimento (figura 10a) tanto en los ejemplares alimentados con la dieta tóxica, como en los ejemplares control. Al comparar en forma diaria las tasas de aclaramiento de individuos contaminados y controles, tampoco existen diferencias significativas entre ellos.

Los resultados obtenidos de los individuos intoxicados con la dieta 3 (figura 10b), muestran que las tasas de aclaramiento del día 0 son significativamente más bajas que las demás medidas durante el experimento. En el muestreo del día 3, se observa un incremento en la actividad de alimentación de estos individuos contaminados, con valores similares a lo largo del experimento. Los individuos controles de esta dieta experimental no presentan diferencias significativas entre las mediciones realizadas durante el tiempo muestreado. El día 0 es el único muestreo que presenta diferencias significativas entre animales contaminados y controles.

Las mayores tasas de aclaramiento se midieron en el día 21 de la dieta 1 en animales controles y contaminados, con un valor promedio de 3.97 y 3.95 L/h/g, respectivamente. Los valores más bajos se registraron en el día 0 de la dieta 3 donde los animales alimentados con dieta contaminada mostraron un promedio de 0.86 L/h/g.



**Figura 10.** Tasa de aclaramiento de *Mytilus chilensis* alimentado con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella* ("experimentos largos"). Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar.

### 2.3.1.2 Experimentos cortos

Las tasas de aclaramiento de los individuos contaminados con la dieta 1 no presentan un patrón definido durante este experimento (figura 11a), observándose diferencias significativas solo entre la hora 6 y las mediciones de las horas 0, 24 y 54.

Los individuos controles, no presentan diferencias significativas entre las mediciones realizadas durante el tiempo experimental. Al realizar la comparación entre individuos contaminados y controles en los distintos muestreos, se puede observar que existen diferencias significativas en las mediciones de las horas 6 y 30.

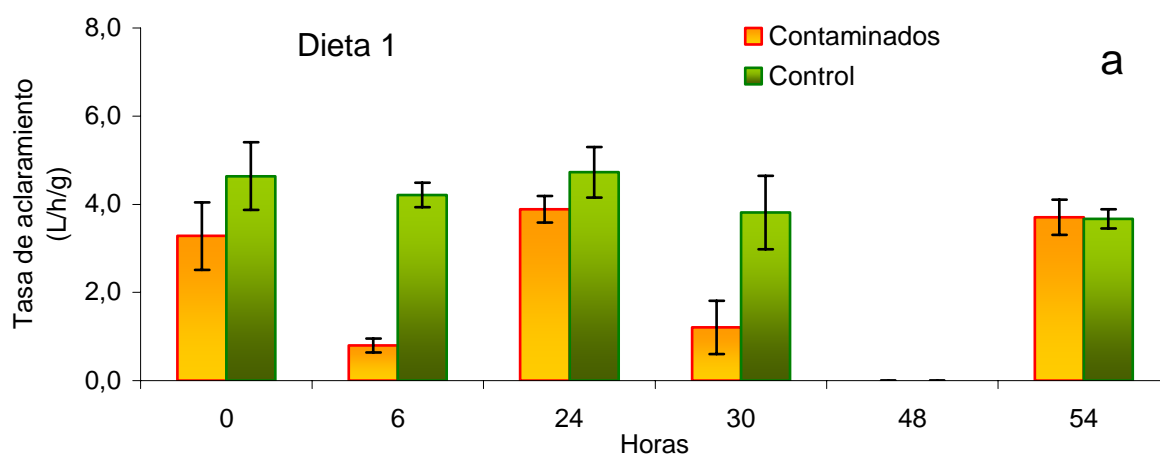
La figura 11b muestra que las tasas de aclaramiento de la hora 0 de los individuos contaminados con la dieta 2 es similar a la de su respectivo control, pero estas disminuyen significativamente en la hora 6, para volver a aumentar progresivamente durante las demás mediciones hasta alcanzar valores similares a las tasas de los individuos controles de las horas 48 y 54. Por su parte los animales controles, no presentan diferencias significativas entre las mediciones realizadas durante todo el experimento. Al comparar los resultados obtenidos para individuos alimentados con las dietas contaminadas y controles se observan diferencias significativas en las horas 6, 24 y 30.

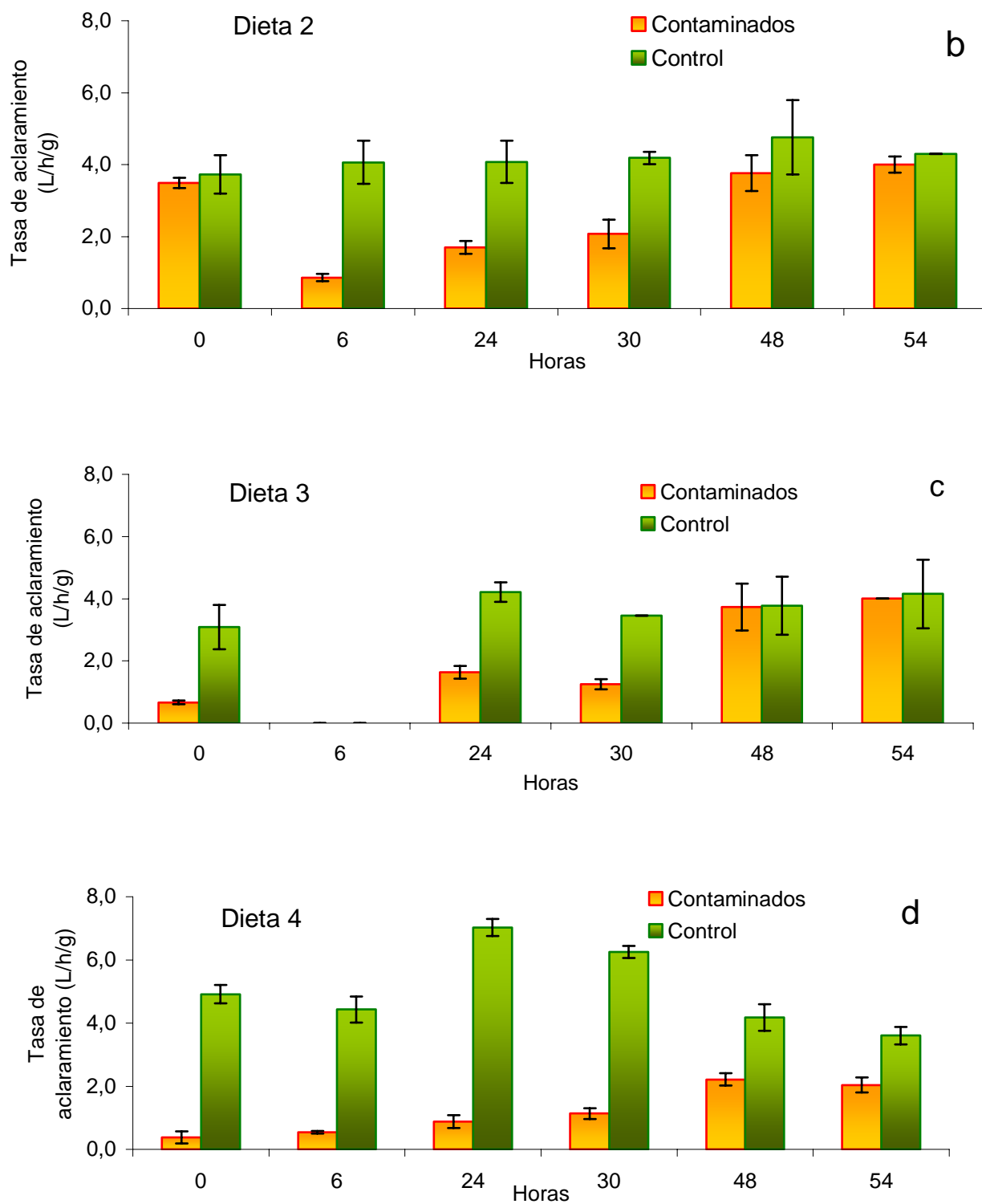
En cuanto a la dieta 3 (figura 11c), los individuos alimentados con *A. catenella* muestran tasas de aclaramiento significativamente menores al comienzo del experimento (hora 0) pero en los siguientes muestreos, horas 24 y 30, incrementan su alimentación, aunque siendo siempre significativamente menor a la de los individuos controles. Hacia el final del experimento, horas 48 y 54, las tasas de aclaramiento de los individuos intoxicados no presentan diferencias significativas con las de sus respectivos controles. Durante todo el experimento los individuos controles se alimentaron sin presentar diferencias significativas entre los muestreos realizados.

La dieta 4 compuesta solamente por *A. catenella* (figura 11d), muestra que las tasas de aclaramiento de los individuos contaminados son significativamente diferentes

al comparar las horas 0, 6, 24 y 30 con las mediciones de las horas 48 y 54, observándose un aumento de esta respuesta fisiológica en el tiempo. Durante todo el experimento los individuos intoxicados presentaron respuestas significativamente menores a las de los individuos controles. En cuanto a estos últimos, se observaron tasas de aclaramiento significativamente mayores en las horas 24 y 30 con respecto a las demás horas de muestreo.

Los mayores valores se registraron en la hora 24 en individuos controles alimentados con la dieta 3 promediando 4,21 L/h/g. Los valores más bajos se midieron en individuos alimentados con la dieta 4 durante la hora 0 del experimento promediando 0,38 L/h/g.

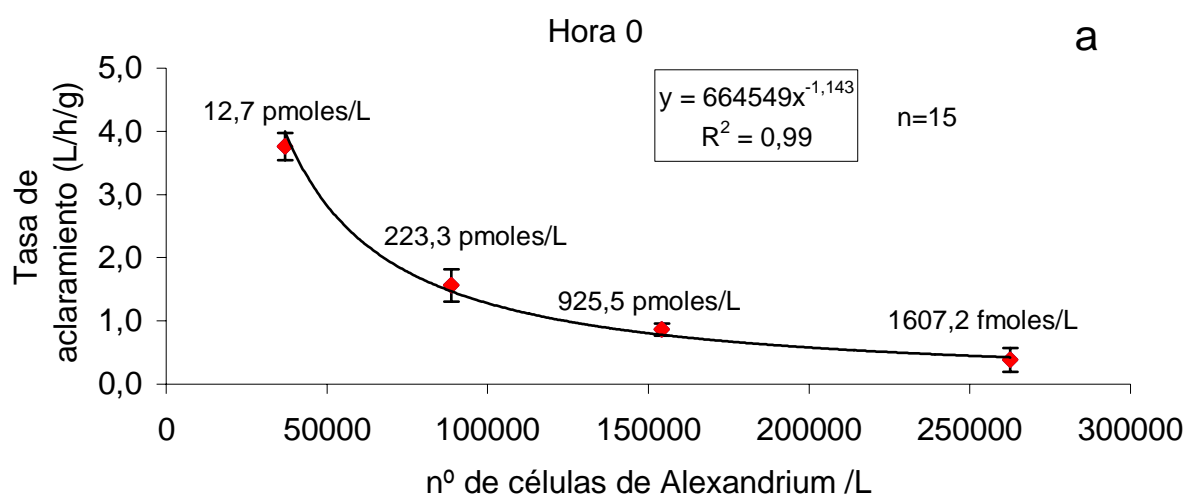


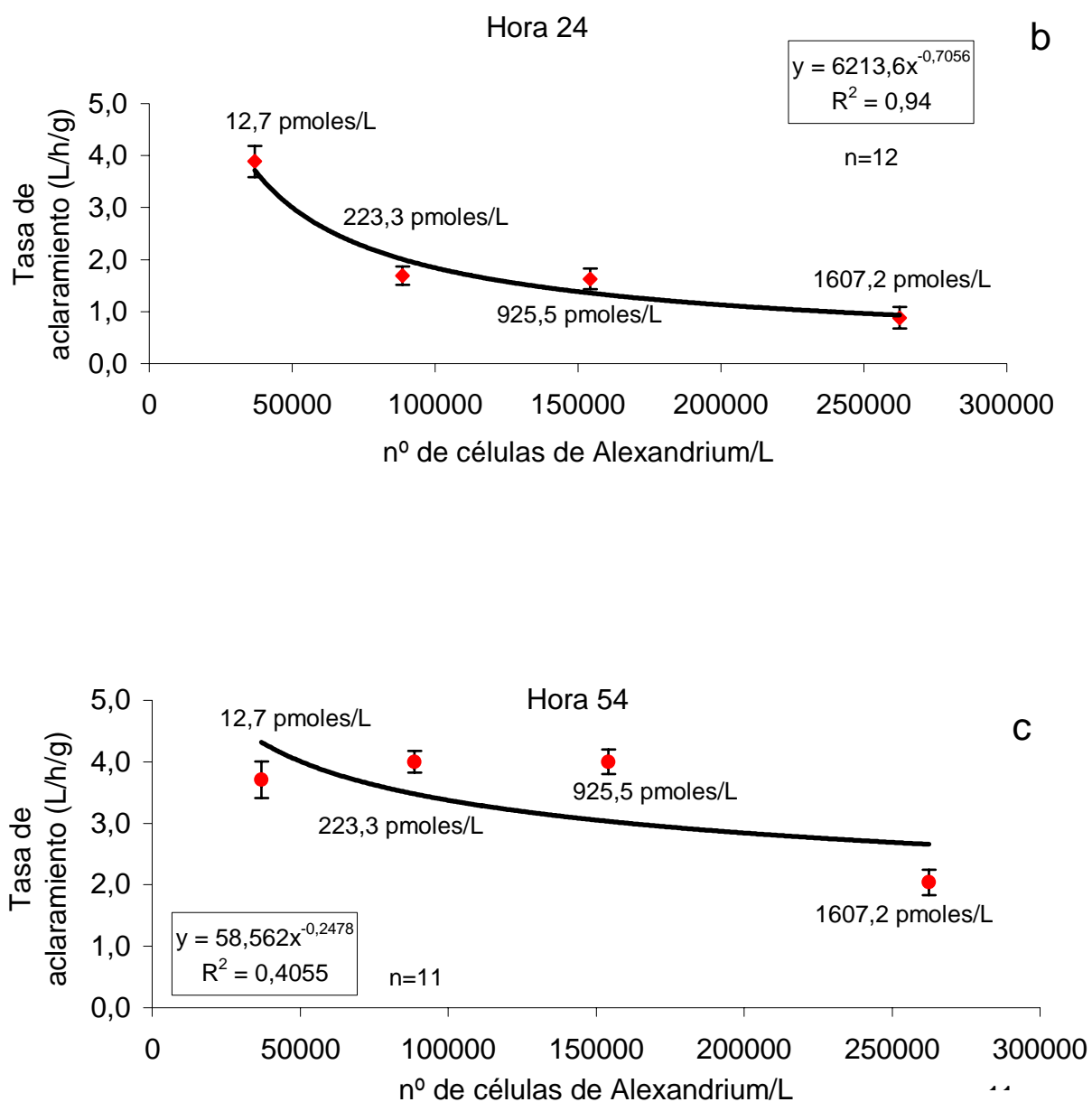


**Figura 11:** Tasa de aclaramiento de *Mytilus chilensis* alimentados con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella* ("experimentos cortos"). Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar.



También se relacionó la tasa de aclaramiento con la concentración de la toxina y el número de células de *Alexandrium* entregadas en las dietas experimentales. En la hora 0 y 24 existió una alta correlación ( $R^2 = 0,98$  y  $0,93$  respectivamente), observándose que a medida que aumenta el número de células de *Alexandrium* en la dieta disminuye la tasa de aclaramiento de *Mytilus chilensis* (figuras 12a y 12b). En los demás muestreos no se registra una significativa relación entre estas variables ( $p > 0.05$ ), observándose  $R^2$  muy bajos, como por ejemplo el de la hora 54 (figura 12c).





**Figura 12:** Tasa de aclaramiento de *Mytilus chilensis* versus el número de células de *Alexandrium* entregadas como alimento (experimentos cortos). Valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

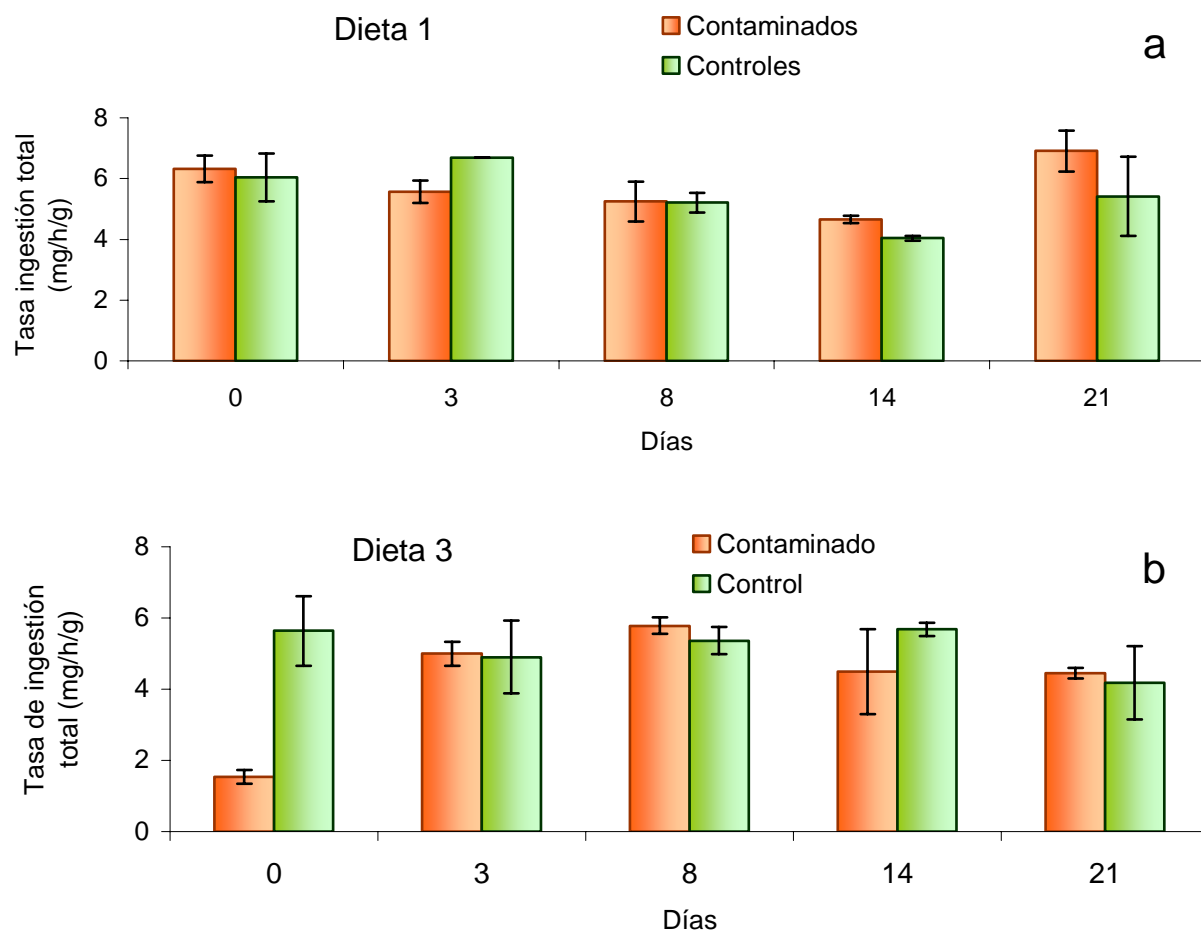
## 2.3.2 Tasa de ingestión total

### 2.3.2.1 Experimentos largos

El análisis de la tasa de ingestión total a lo largo del experimento muestra que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los individuos alimentados con la dieta 1 contaminada (figura 13a). Tampoco se encontraron diferencias entre los individuos controles durante el experimento. La comparación de la tasa de ingestión total entre individuos contaminados y controles para cada muestreo, indica que no existen diferencias significativas entre ellos.

Al inicio del experimento con la dieta 3 (figura 13b), se observan tasas de ingestión total significativamente menores a las de los siguientes días muestreados, mientras que los individuos controles no presentan diferencias significativas al comparar todas las mediciones realizadas. Solo existen diferencias significativas entre individuos contaminados y controles al inicio del experimento (día 0).

Las tasas de ingestión total más altas se registraron durante el día 21 de la dieta 1 las cuales promediaron 6.91 mg/L/g en individuos contaminados, mientras que los valores más bajos se observaron durante el día 0 de la dieta 3 con un promedio de 1.54 mg/L/g en individuos alimentados con *A. catenella*.



**Figura 13.** Tasa de ingestión de *Mytilus chilensis* alimentados con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella* (experimentos largos). Valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

### 2.3.2.2. Experimentos cortos

Los individuos alimentados con la dieta 1 contaminada con *A. catenella* (figura 14a) muestran tasas de ingestión total significativamente menores ( $p < 0.05$ ) durante las horas 6 y 30 en comparación a los demás muestreos, mientras que los individuos controles no presentan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las mediciones

realizadas durante todo el experimento. La comparación de la tasa de ingestión entre bivalvos contaminados y controles en cada muestreo da como resultado diferencias significativas solo a las horas 6 y 30 del experimento.

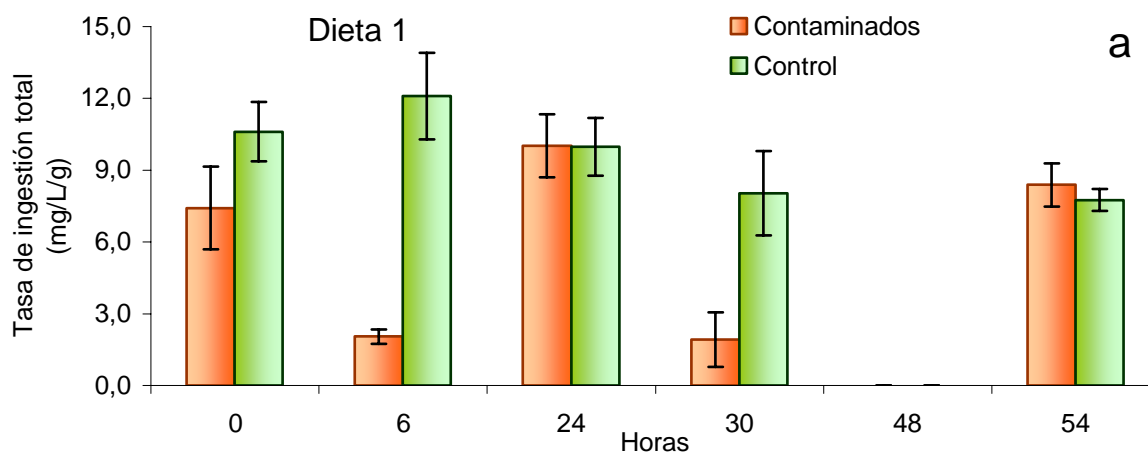
Al comenzar la alimentación (día 0) de los individuos con la dieta 2 contaminada (figura 14b), las tasas de ingestión total son similares a las de los individuos alimentados con la dieta control, sin embargo al muestreo siguiente (hora 6) esta respuesta cambia disminuyendo significativamente en los animales contaminados, para volver a aumentar progresivamente durante las demás mediciones, hasta alcanzar valores similares a los de los individuos controles en los dos últimos muestreos (horas 48 y 54). El análisis estadístico muestra que los valores de las horas 6 y 24 son significativamente menores que los muestreos de las horas 0, 48 y 54, mientras que el muestreo de la hora 30 es distinto solo a la medición de la hora 48. Los individuos controles no presentaron diferencias significativas entre los muestreos realizados durante todo el experimento. La comparación diaria indica que existen diferencias significativas entre individuos contaminados y controles en las horas 6, 24 y 30.

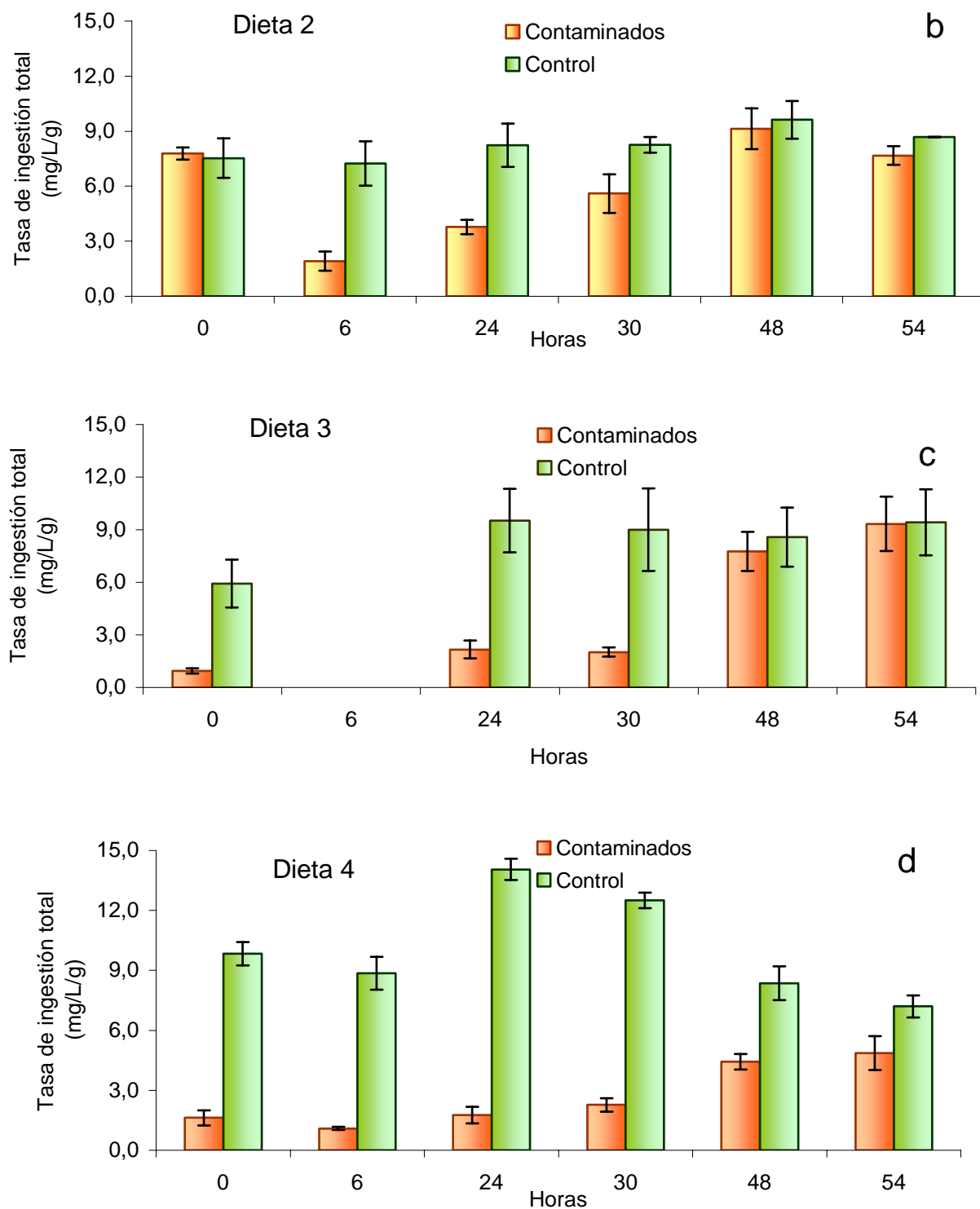
Los individuos intoxicados con la dieta 3 (figura 14c), muestran que las tasas de ingestión total son significativamente más bajas al comienzo del experimento (horas 0, 24, y 30) que hacia el final de éste (horas 48 y 54). Los individuos controles no presentaron diferencias significativas entre los muestreos realizados durante este experimento. Al comparar las tasas de ingestión total entre individuos contaminados y controles, diferencias significativas en la tasa de ingestión ocurre a las horas 0, 24 y 30.

La dieta 4 (figura 14d), muestra que las tasas de ingestión total de los individuos alimentados con la dieta contaminada en un 100% con *A. catenella*, fueron

significativamente menores en las primeras horas de exposición aumentando progresivamente en el tiempo. Se observaron diferencias significativas entre los cuatro primeros muestreos (horas 0, 6, 24 y 30) y los dos últimos (horas 48 y 54), con valores siempre significativamente menores a los individuos controles. Estos últimos presentaron diferencias significativas entre los muestreos de las horas 24 y 30 y las demás mediciones controles.

Las tasas de ingestión total más altas alcanzaron en promedio 12.09 mg/L/g (hora 6) en individuos alimentados con la dieta control 1. Los valores mas bajos llegaron a promediar 0.94 mg/L/g en individuos alimentados con la dieta 3 contaminada (hora 0).





**Figura 14:** Tasa de ingestión total de *Mytilus chilensis* alimentados con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella* ("experimentos cortos"). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

### **2.3.3 Tasa de ingestión orgánica**

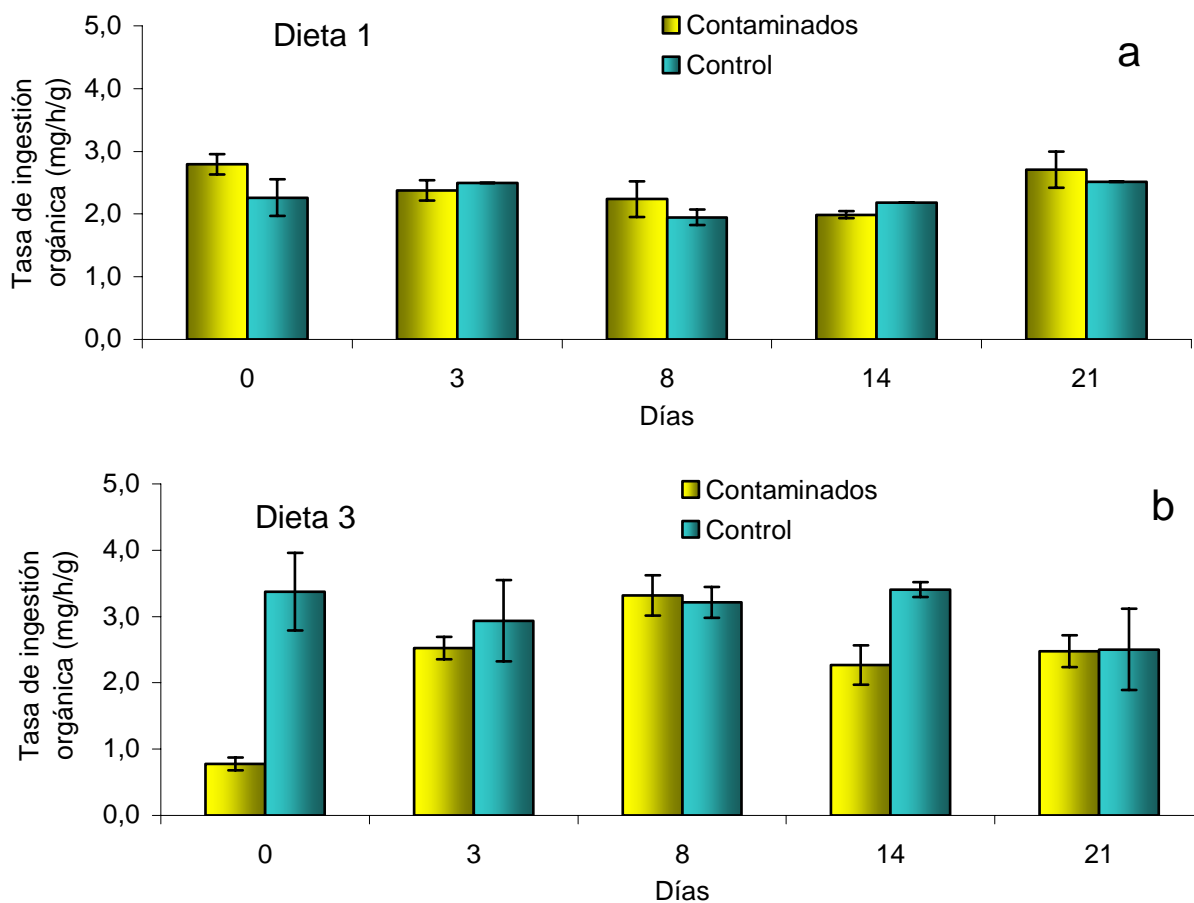
#### **2.3.3.1 Experimentos largos**

La tasa de ingestión orgánica de los ejemplares contaminados es muy estable a lo largo del experimento, sin presentarse diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los muestreos (figura 15a). En el caso de los individuos alimentados con la dieta control, éstos tampoco presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) durante el experimento. Al comparar la tasa de ingestión orgánica en cada muestreo, entre individuos contaminados y controles, no existen diferencias significativas entre ellos.

Los resultados obtenidos con la dieta 3 (figura 15b) muestran que los bivalvos alimentados con el dinoflagelado tóxico presentan tasas de ingestión orgánica significativamente más bajas al comienzo del experimento (día 0) en comparación con las demás mediciones realizadas. En el caso de los individuos controles, estos no presentaron diferencias significativas durante todo el experimento. Al comprar en cada muestreo individuos contaminados y controles, solo existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las mediciones del día 0 y 14.

Las mayores tasas de ingestión orgánica se registraron durante los experimentos con la dieta 3, con un promedio de 3,38 y 3,40 mg/h/g en el día 0 y 14 respectivamente, en individuos alimentados con la dieta control. Los valores más bajos se observaron en individuos alimentados con la dieta 3 contaminada (día 0), con un valor promedio de 0,78 mg/h/g.





**Figura 15:** Tasa de ingestión orgánica de *Mytilus chilensis* alimentados con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella* (experimentos largos”). Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar.

### 2.3.3.2 Experimentos Cortos

La tasa de ingestión orgánica de los individuos alimentados con la dieta 1 contaminada con *Alexandrium catenella* no presentan un patrón definido (figura 16a), siendo el muestreo de la hora 6 significativamente menor al de las horas 0, 24 y 54, y el muestreo de la hora 30 sólo significativamente más bajo al de la hora 24. Los ejemplares alimentados con la dieta control no presentan diferencias significativas entre los muestreos realizados durante el experimento. La comparación de los valores

obtenidos en cada muestreo revela que los individuos contaminados presentan respuestas más erráticas y significativamente más bajas que los controles a las horas 6 y 30.

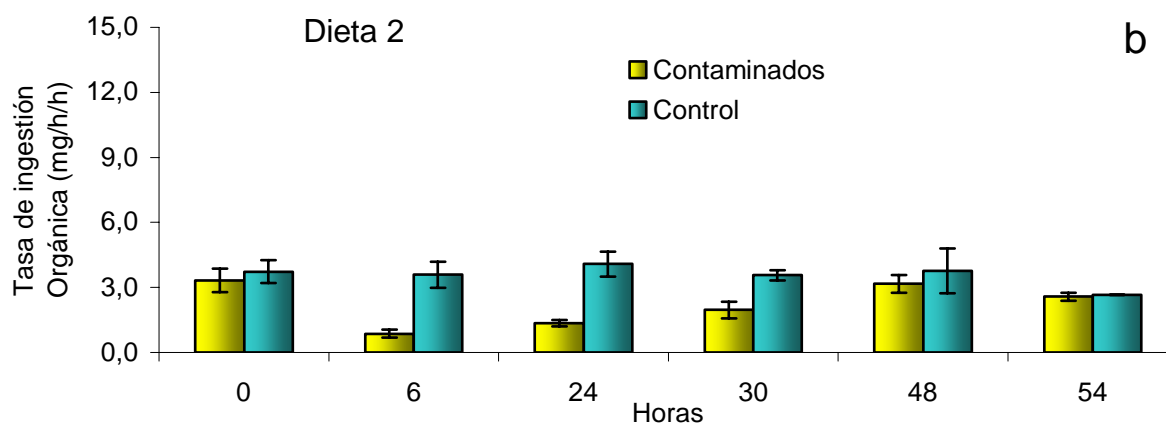
Los individuos contaminados con la dieta 2 (figura 16b) disminuyeron significativamente sus tasas de ingestión orgánica en la hora 6 con respecto a la hora 0, y a medida que aumenta el tiempo de intoxicación esta respuesta fue aumentando hasta alcanzar valores similares a los individuos controles (48 y 54). No se observaron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos para los ejemplares controles en todos los muestreos realizados. La comparación entre individuos contaminados y controles mostró valores significativamente menores en los ejemplares contaminados en las horas 6, 24, y 30 de este experimento.

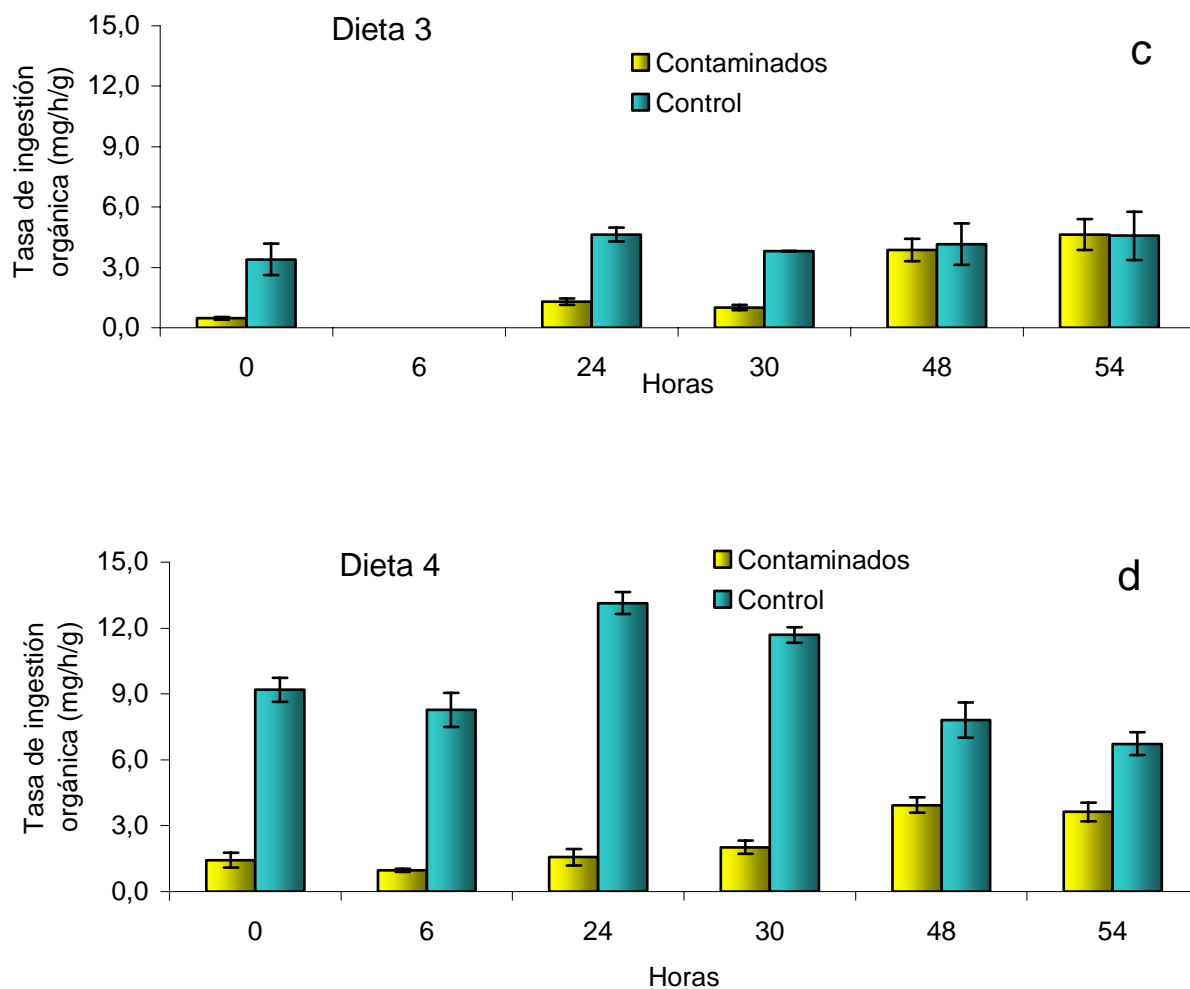
Los experimentos con la dieta 3 contaminada (figura 16c) muestran tasas de ingestión orgánica significativamente menores al comienzo de la alimentación (horas 0, 24, y 30) en comparación con las dos últimas mediciones realizadas (horas 48 y 54). Los individuos alimentados con la dieta control, no presentaron diferencias significativas entre las mediciones realizadas durante el experimento. Valores significativamente menores ( $p < 0.05$ ) fueron observados en los individuos contaminados a las horas 0, 24 y 30.

Los ejemplares contaminados con la dieta 4 muestran un progresivo incremento en sus tasas de ingestión orgánica durante el tiempo experimental (figura 8d), con diferencias significativas entre los muestreos de las horas 0, 6, 24, y 30 y los de las horas 48 y 54. Los individuos controles presentan valores significativamente más altos en las horas 24 y 30 con respecto a los demás muestreos realizados durante el

experimento. En todas las horas muestreadas se observaron diferencias significativas entre individuos contaminados y controles.

Las tasas de ingestión orgánica más altas fueron medidas a la hora 24 con la dieta 4 en individuos controles (13,14 mg/h/g). Los valores más bajos registrados promediaron 0,47 mg/h/g en la hora 0 de la dieta 3 (individuos contaminados).





**Figura 16:** Tasa de ingestión orgánica de *Mytilus chilensis* alimentado con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella* (experimentos cortos). Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar.

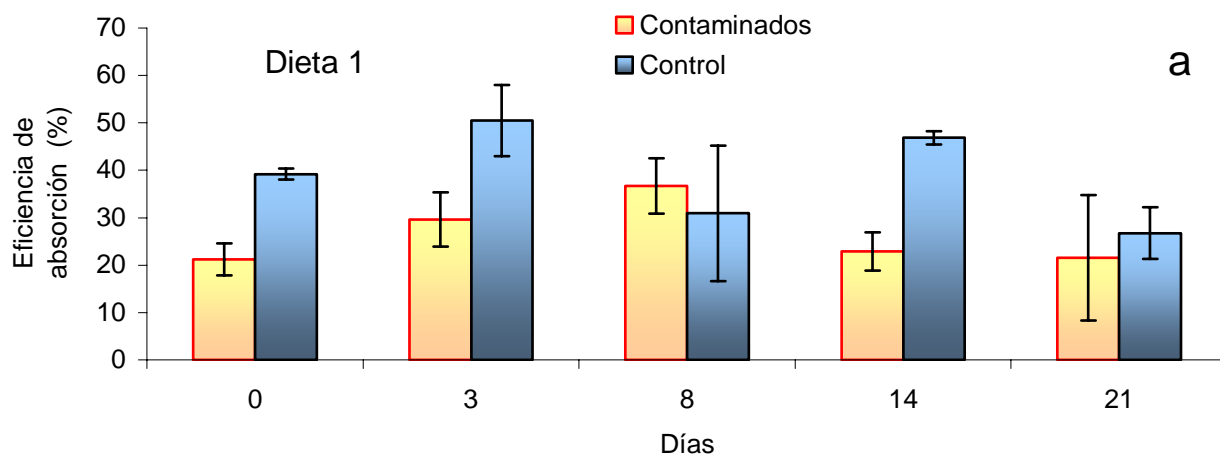
### 2.3.4 Eficiencia de Absorción

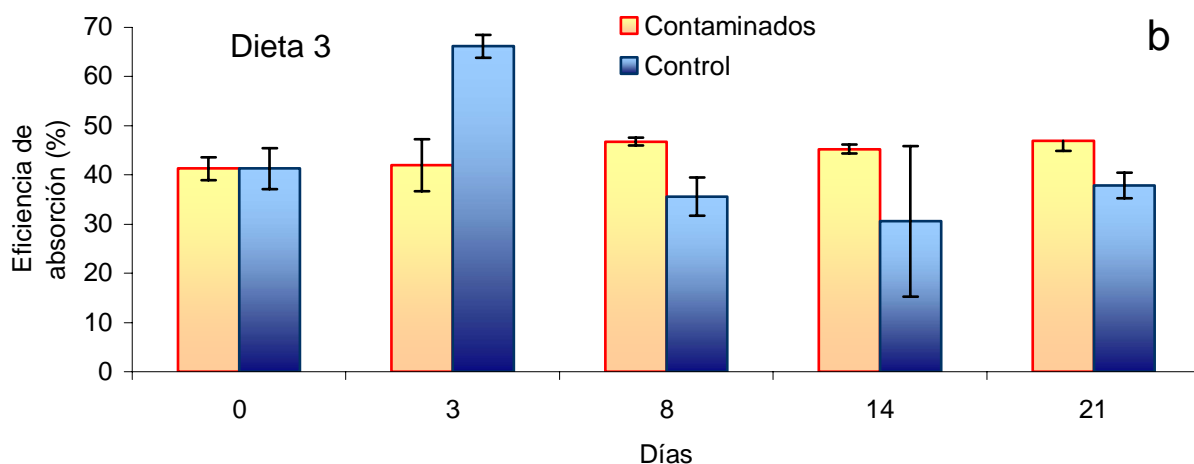
No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la eficiencia de absorción de *Mytilus chilensis* medida durante el experimento con la dieta 1 contaminada (figura 17a). Tampoco se observan diferencias significativas entre las mediciones realizadas en los individuos alimentados con la dieta control. Al comparar los resultados

diariamente si existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre individuos intoxicados y controles durante los días 0 y 14.

La eficiencia de absorción medida en los animales contaminados con la dieta 3 (figura 17b) no presenta diferencias significativas entre los diferentes días de muestreo. En el caso de los individuos controles, solo los valores del día 3 son significativamente mas altos que los obtenidos en los demás muestreos. Al comparar los resultados diariamente se encontraron diferencias significativas entre individuos contaminados y controles durante los días 3, 8 y 21.

Los mayores valores de eficiencia de absorción fueron obtenidos en el día 3 con la dieta 3 (66.17%) en individuos controles. Los valores mas bajos fueron medidos en individuos contaminados en el día 0 de la dieta 1 (21.23 %).





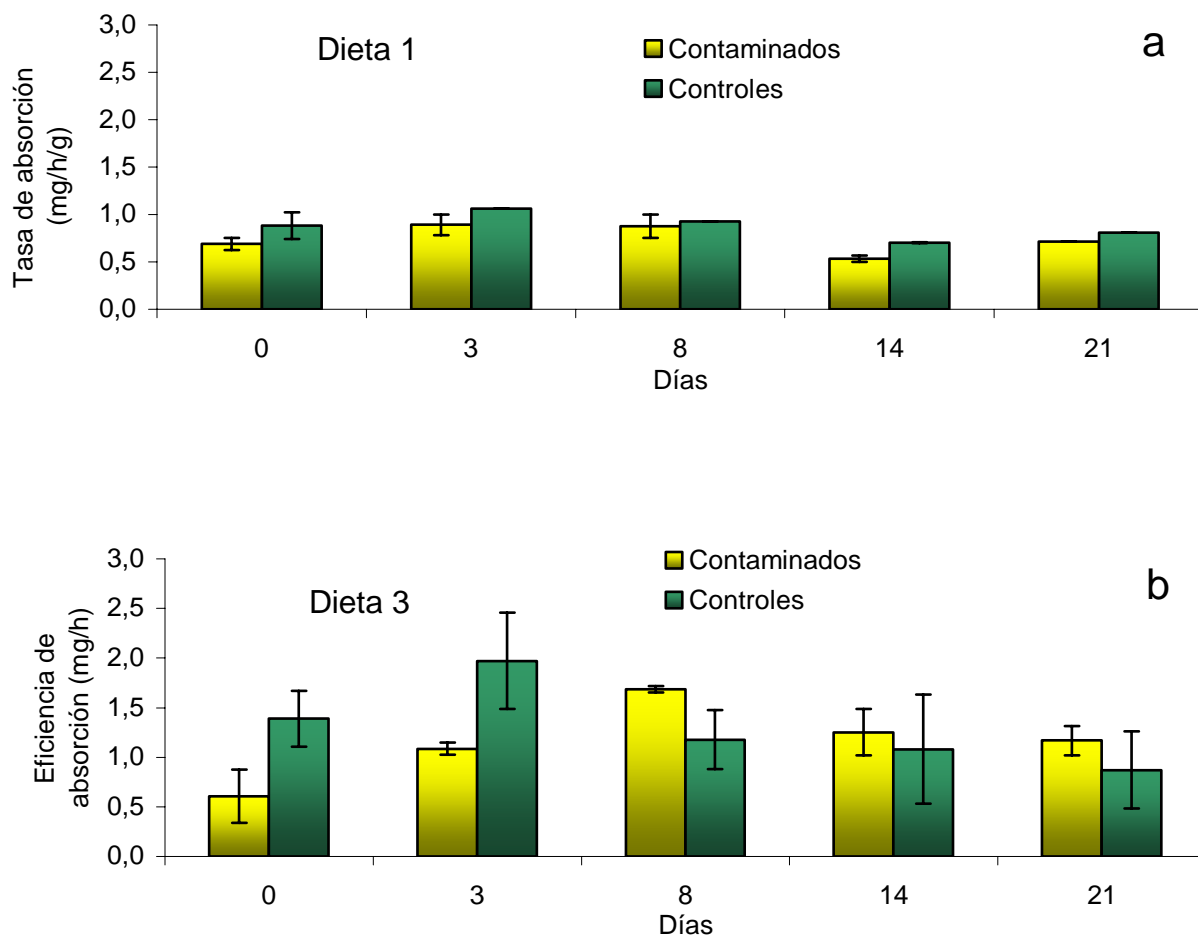
**Figura 17.** Eficiencia de absorción de *Mytilus chilensis* alimentados con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar.

### 2.3.5 Tasa de absorción

Tanto los individuos contaminados como los controles no presentan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en sus tasas de absorción al ser alimentados con la dieta 1 (figura 18a). La comparación diaria de esta respuesta fisiológica, indica que tampoco existen diferencias entre animales contaminados y controles.

Los individuos contaminados con la dieta 3 presentan tasas de absorción significativamente más bajas en el día 0 que las medidas durante el día 8 de alimentación a lo largo del periodo experimental (figura 18b). Los controles no presentan diferencias significativas entre las mediciones realizadas en este experimento. Tampoco se observaron diferencias significativas entre individuos contaminados y controles durante los distintos muestreos realizados.

Las mayores tasas de absorción ocurrieron en el día 3 (dieta 3) con valores que promediaron 1,97 mg/h en individuos controles. Los valores más bajos fueron medidos en el día 0 de la dieta 3, los que promediaron 0,53 mg/h en individuos contaminados.



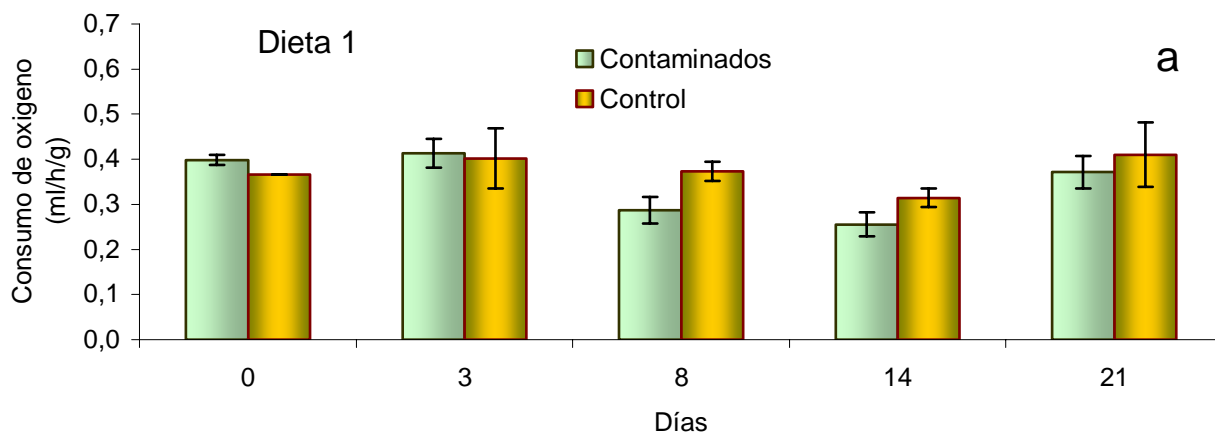
**Figura 18.** Tasa de absorción de *Mytilus chilensis* alimentados con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar.

### 2.3.6 Consumo de oxígeno

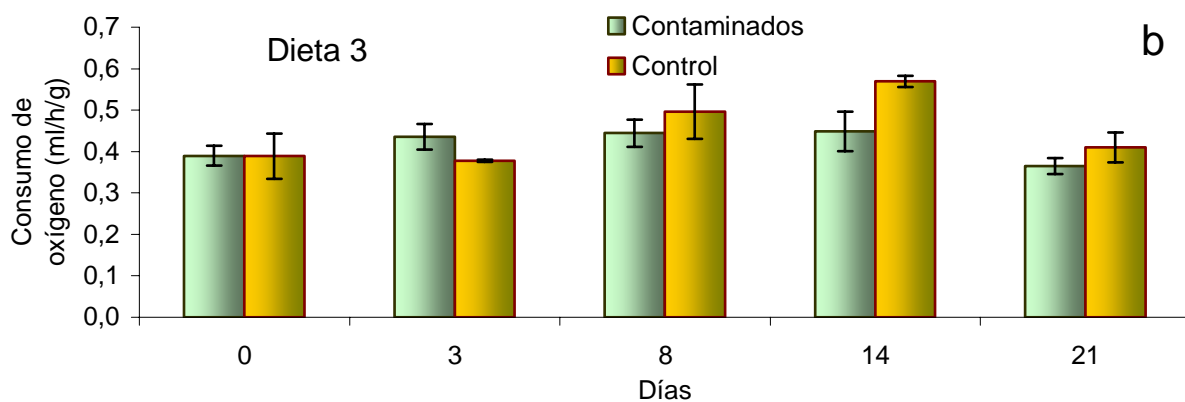
El consumo de oxígeno medido en los individuos contaminados con la dieta 1 (figura 19a), es significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en los días 8 y 14. En cuanto a los individuos controles, estos no presentan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los muestreos realizados. El consumo de oxígeno no fue significativamente diferente al comparar ejemplares contaminados y controles en los distintos muestreos realizados.

El consumo de oxígeno medido tanto en individuos contaminados como en controles alimentados con la dieta 3 (figura 19b) no presenta diferencias significativas a lo largo del experimento. Al comparar esta respuesta fisiológica en cada muestreo, no se observaron diferencias significativas entre individuos contaminados y controles.

El mayor consumo de oxígeno registrado tuvo un promedio de 0.57 ml/h en individuos controles durante el día 14 de la dieta 3 y los menores valores alcanzaron en promedio 0.26 ml/h en individuos contaminados durante el día 14 de la dieta 1.







**Figura 19.** Consumo de oxígeno de *Mytilus chilensis* alimentados con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar.

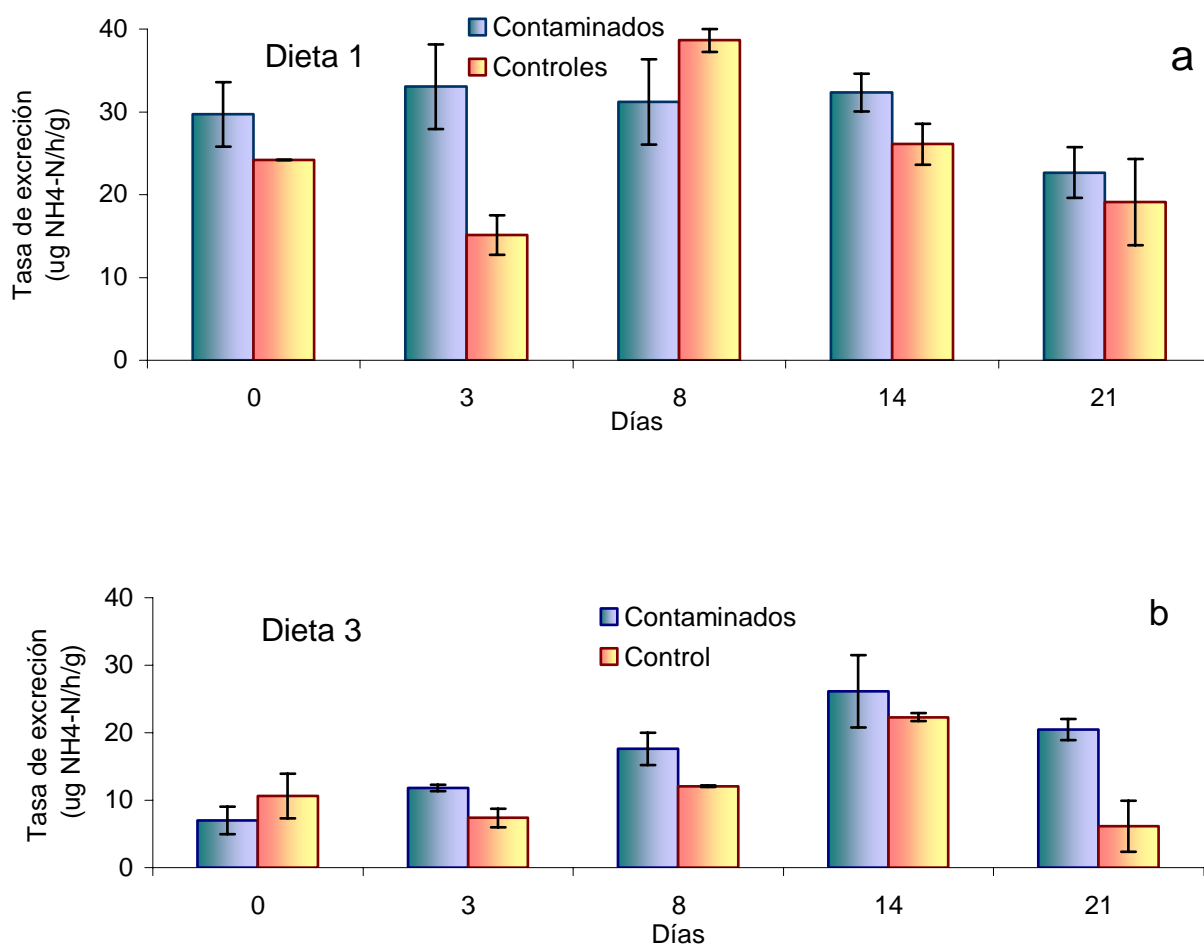
### 2.3.7 Tasa de excreción

Durante el tiempo de alimentación con la dieta 1, los individuos contaminados no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en sus tasas de excreción medidas durante el experimento (figura 20a). La tasa de excreción de los individuos controles tampoco presentó diferencias significativas a lo largo del periodo experimental. La comparación en cada muestreo de la tasa de excreción entre bivalvos controles y contaminados muestra que solo en el día 3 existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La tasa de excreción de los individuos contaminados con la dieta 3 (figura 20b) incrementa en el tiempo, siendo las mediciones de los días 0 y 3 significativamente menores a las de los días finales del experimento. Los individuos alimentados con la dieta control, presentan en el día 14 tasas de excreción significativamente más altas que las demás mediciones. Los resultados de cada muestreo indican que los individuos

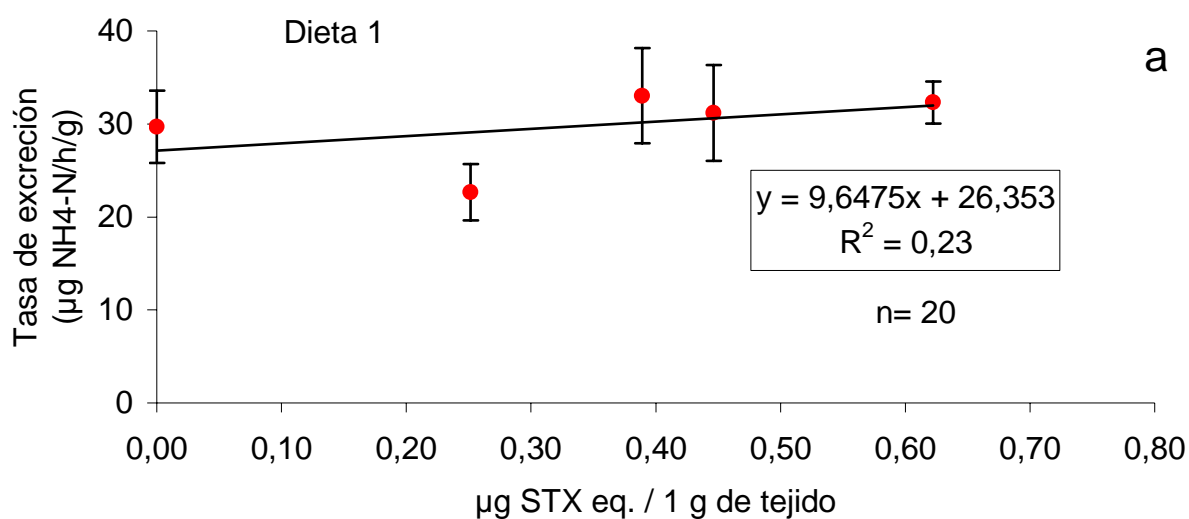
contaminados presentan respuestas significativamente más altas que los individuos controles en los días 3, 8 y 21.

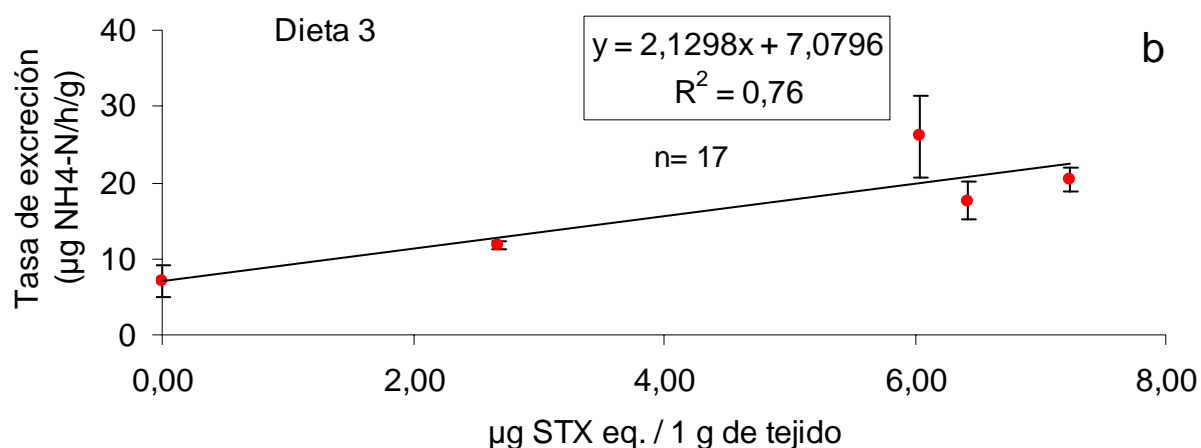
El valor promedio más alto de tasa de excreción se registró con la dieta 1 (día 8), alcanzando  $38.62 \mu\text{g NH}_4\text{-N/h/g}$  en individuos controles mientras que los valores mas bajos se midieron con la dieta 3 (día 0) en individuos contaminados ( $7.02 \mu\text{g NH}_4\text{-N/h/g}$ ).



**Figura 20.** Tasa de excreción de *Mytilus chilensis* alimentados con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar.

Al relacionar las tasas de excreción con la acumulación de la toxina en los tejidos de los animales contaminados, se puede observar que en la dieta 3 existe una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) entre estas dos variables ( $R^2 = 0,76$ ). A medida que aumenta la acumulación de STX en los tejidos de *Mytilus* también lo hace la tasa de excreción, siguiendo ambas la misma dinámica en el tiempo (figura 21b). En la dieta 1 no se observa correlación significativa ( $p > 0.05$ ) entre estas dos variables (figura 21a). No se observó este tipo de relación entre las demás tasas fisiológicas y la acumulación de la toxina en los tejidos (tabla 2).





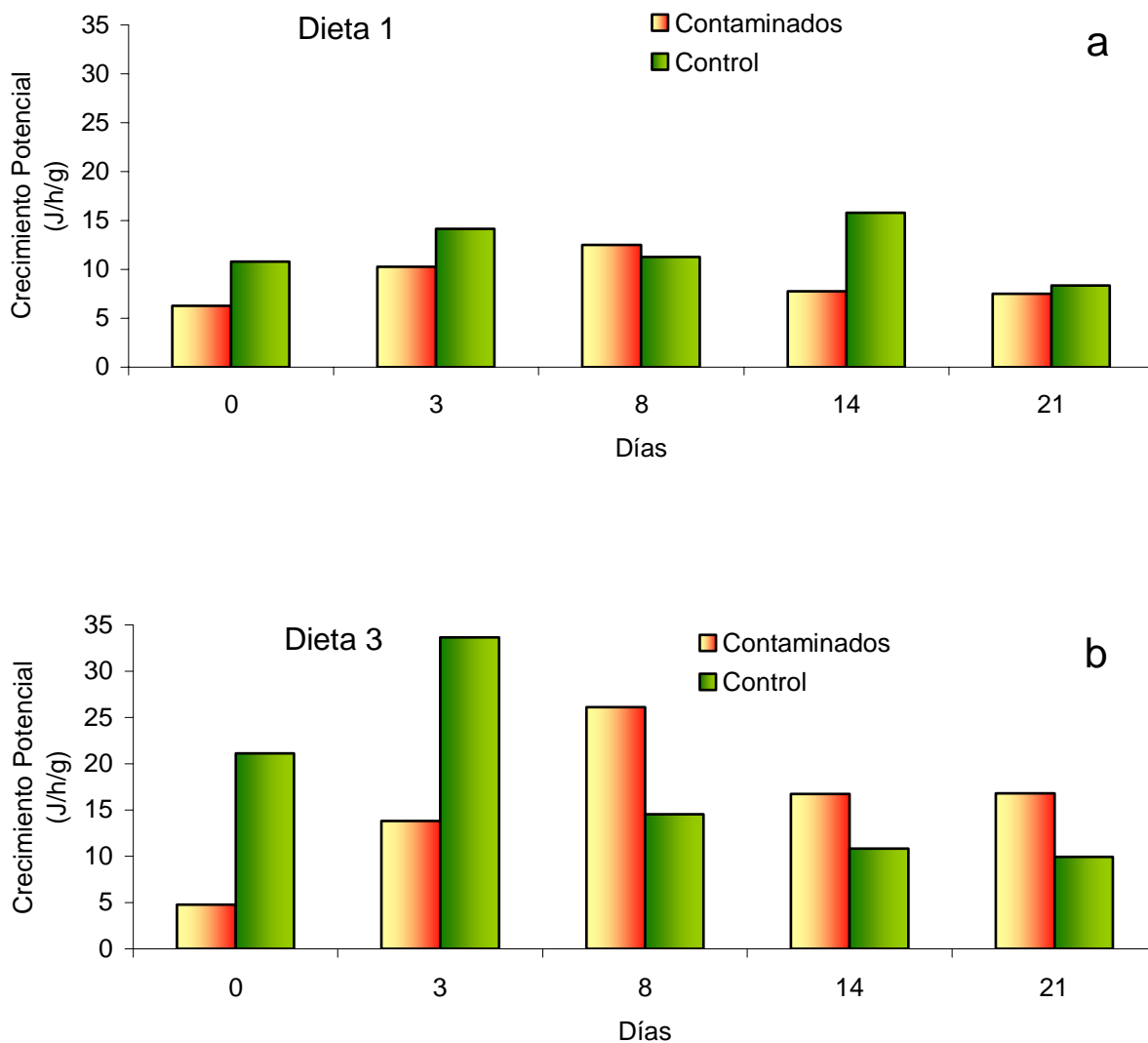
**Figura 21:** Tasa de excreción versus concentración de STX en los tejidos de *Mytilus chilensis* alimentado con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella*. Valores representan el promedio  $\pm$  error estándar.

### 2.3.8 Crecimiento potencial

Los ejemplares contaminados y controles alimentados con la dieta 1 presentan valores de crecimiento potencial muy similares durante este experimento (figura 22a). Al observar el comportamiento diario, también se aprecian valores similares en los muestreos, a excepción del día 14.

El crecimiento potencial de los individuos contaminados con la dieta 3, es menor en el día 0 del experimento, pero en los siguientes muestreos se observa un aumento de esta respuesta, la cual se mantiene estable a excepción del día 8 en el cual el crecimiento potencial es más alto que en los demás muestreos (figura 22b). Los individuos controles presentan en el día 3 un crecimiento potencial mayor en relación a las demás mediciones realizadas. En los días 0, 3 y 8 existen las mayores diferencias entre ejemplares contaminados y controles.

El mayor crecimiento potencial fue de 33,68 J/h/g y se midió en individuos controles alimentados con la dieta 3 (día 3). El menor valor se midió en individuos contaminados en el día 0 de la dieta 3 (4,77 J/h/g).



**Figura 22.** Crecimiento potencial de *Mytilus chilensis* alimentado con dieta conteniendo diferentes proporciones de *Alexandrium catenella*. Valores representan el promedio.

**Figura 2.** Variables fisiológicas medidas en individuos de *Mytilus chilensis* contaminados con diferentes concentraciones de STX en sus tejidos. Valores corresponden al promedio.

<b>Dieta</b>	<b>Día</b>	<b>TA</b> L/h/g	<b>TIT</b> mg/h/g	<b>TIO</b> mg/h/g	<b>EA</b> %	<b>T ab</b> mg/h/g	<b>CO</b> ml/h/g	<b>TE</b> ug NH4- N/h/g	<b>CP</b> J/h/g	ug STX eq/ 1 gr de tejido	ug STX eq/100gr de tejido
1	0	3,76	6,32	2,79	21,23	0,69	0,40	29,70	6,38	0,07	6,75
1	3	3,20	5,57	2,38	29,61	0,89	0,41	33,03	10,28	0,39	38,92
1	8	3,01	5,24	2,24	36,65	0,88	0,29	31,19	12,52	0,45	44,62
1	14	2,68	4,66	1,99	22,85	0,53	0,26	32,33	7,77	0,62	62,23
1	21	3,97	5,85	2,71	21,54	0,71	0,37	22,66	7,53	0,25	25,16
3	0	0,86	1,54	0,78	41,30	0,60	0,39	7,02	4,77	0,00	0,00
3	3	2,80	5,00	2,52	41,98	1,09	0,44	11,80	13,83	2,67	267,38
3	8	3,50	5,78	3,32	46,77	1,69	0,44	17,62	26,14	6,42	641,93
3	14	2,52	4,49	2,27	45,27	1,25	0,45	26,11	16,72	6,04	603,50
3	21	2,75	4,45	2,47	46,93	1,17	0,36	20,48	16,78	7,24	723,74

## Discusión

La toxicidad acumulada en los tejidos de *Mytilus chilensis* alimentados con las dietas 1 y 3 fue menor que la registrada en el evento de marea roja del año 2002 en la bahía de Yaldad, Chiloé, en donde individuos de la misma especie alcanzaron una toxicidad de 8554  $\mu\text{g}$  de STX eq. /100 g tejido (Servicio de Salud LLANCHIPAL, Laboratorio de Mareas Rojas, Castro, Chiloé). Esto es explicado por la composición de las dietas experimentales, las que contenían una menor cantidad de células de *Alexandrium catenella*, en comparación con las 779000 células/L encontradas en la naturaleza durante el evento tóxico de ese año (Clement *et al.*, 2002). En el presente estudio se observa que *M. chilensis* en 8 días de exposición a una dieta que contenía sobre 150000 células/L de *A. catenella*, acumula concentraciones de saxitoxina superiores al límite de seguridad para la salud humana (80  $\mu\text{g}$  de STX eq. /100 g carne). Bricelj *et al.* (1990), Bricelj & Shumway (1998), Blasco *et al.* (2003) señalan que el género *Mytilus* es conocido por ser relativamente insensible a las células tóxicas, lo que resulta en altos niveles de toxicidad en un periodo de tiempo muy corto, puesto que no hay reducción en las tasas de filtración en comparación a otros bivalvos, como por ejemplo ostras (e.g. *Crassostrea gigas*) y almejas (e.g. *Mya arenaria*) que alcanzan concentraciones relativamente bajas de toxina debido a que son altamente sensibles al VPM y muestran mecanismos que evitan la exposición a las células tóxicas.

Es conocido que las proliferaciones de algas tóxicas producen numerosos efectos subletales en diferentes especies de bivalvos marinos, los cuales influyen en

el cierre de las valvas, en las tasas de filtración, producción de bisco, consumo de oxígeno y actividad cardíaca y neurológica (Gainey & Shumway, 1988). Es importante destacar que estos efectos varían según la especie estudiada, la localidad de donde proviene y el nivel de exposición que ha tenido a los eventos previos de proliferaciones de microalgas tóxicas. En el presente estudio se observó que los valores de tasa de aclaramiento medidos sobre individuos de *Mytilus chilensis* contaminados y controles, son en su mayoría más altos que los observados por Widdows (1978a) en *Mytilus edulis*. La relación entre la concentración celular y la tasa de aclaramiento de bivalvos filtradores puede depender de las especies del fitoplancton y de la naturaleza de la materia orgánica presente en el seston, siendo esta tasa fisiológica relativamente fluctuante a lo largo del año (Navarro y Thompson, 1996). Schulte (1975) demostró una significativa disminución en la tasa de aclaramiento a altas concentraciones de alimento entre  $10^7$  y  $10^8$  células/L. En el presente trabajo se observó que las dietas experimentales 2, 3 y 4 contaminadas en distintas proporciones con *A. catenella* producen un efecto negativo inicial de corto plazo sobre las tasas de aclaramiento, ingestión total y orgánica de *M. chilensis*, el cuál es reversible en el tiempo. Bricelj *et al.* (1990) observó una conducta similar en individuos juveniles de *Mytilus edulis* donde la tasa de aclaramiento se redujo luego de 3 a 4 horas de exposición a las células tóxicas, mientras que en individuos adultos alimentados con la misma dieta durante 17 días no se presentaron diferencias con los controles. En el experimento realizado con la dieta 1, la toxicidad presente en el alimento ofrecido (toxicidad;  $12,7 \pm 4,6$  pmoles/L) no afecta significativamente la tasa de aclaramiento, ingestión total y orgánica medida sobre ejemplares de *M. chilensis*,



los cuales acumularon niveles de toxina bajo 80 µg de STX eq. / 100 g de tejido. Li *et al.* (2002) tampoco observó un efecto significativo sobre la tasa de aclaramiento en individuos de *Perna viridis* contaminados con concentraciones de toxina menores a 80 µg de STX eq. / 100 g de tejido. En la dieta 2 (toxicidad; 223,3 ± 144,9 pmoles/L) se observa que durante el primer contacto de *Mytilus* con *A. catenella* no hay una disminución de estas tasas fisiológicas, sin embargo luego de 6 horas de exposición a la toxina los individuos disminuyen su actividad de alimentación, lo que supone una reacción negativa frente al dinoflagelado tóxico presente en su dieta. Es importante señalar que en tan solo 48 horas, los individuos alimentados con la dieta 2 fueron capaces de adaptarse a la dieta que contiene células de *Alexandrium catenella*, por lo tanto la acumulación de la toxina en sus tejidos no estaría afectando la actividad de alimentación de esta especie ya que a medida que aumenta la concentración de la toxina en los tejidos, aumenta también la tasa de aclaramiento, alcanzando valores similares a los ejemplares controles en un corto tiempo. En los experimentos realizados con la dieta 3 (toxicidad; 925,5 ± 564,2 pmoles/L), la reacción negativa de *M. chilensis* se observa desde el primer instante de contacto con el alimento contaminado. Esta conducta observada en los ejemplares de *M. chilensis* respondería al elevado número de células del dinoflagelado tóxico presente en la dieta, como también el mayor tamaño de *A. catenella* (30.0-38.0 µm de longitud) en comparación a la microalga *Isochrysis galbana* utilizada como alimento durante el periodo de aclimatación y e los experimentos controles (3,9-6,0 µm de diámetro). Al igual que en la dieta 2, los individuos contaminados con la dieta 3 igualan su actividad de alimentación a los valores de los controles antes de 48 horas de exposición a la

toxina. Twarog *et al.* (1972) comparó la resistencia a la STX de varias especies de bivalvos, midiendo el bloqueo del potencial de acción de los canales de sodio y concluyó que *Mytilus edulis* fue la especie más resistente a la toxina, sin embargo destacó que la exposición previa de los ejemplares a eventos de floraciones algales tóxicas marca la diferencia entre las respuestas medidas sobre los individuos estudiados. Ejemplo de esto es el trabajo de Shumway & Cucci (1987) quienes señalan que individuos de *Mytilus edulis* provenientes de lugares en los que nunca se han registrado blooms tóxicos, resultan ser más sensibles al VPM que aquellos individuos que habitan zonas con reiteradas floraciones de algas tóxicas. En los experimentos realizados con la dieta 4 se corrobora en forma más marcada lo observado en la dieta 3, ya que el efecto negativo sobre la tasa de aclaramiento, ingestión total y orgánica también se observa desde el primer muestreo con el alimento contaminado. Este efecto desaparece más lentamente, sin poder obtenerse la aclimatación total de esta especie a la concentración de STX ofrecida en el alimento ( $1607,2 \pm 105,8$  pmoles/L) durante las 54 horas de experimentación. No está claro si los efectos descritos anteriormente son producidos por el tamaño, número o toxicidad de las dietas ofrecidas como alimento. La significativa correlación negativa ( $b = -1,143$ ;  $R^2 = 0,98$ ) entre la tasa de aclaramiento y el número de células de *Alexandrium* presentes en las dietas en el muestreo del día 0, demuestra que durante el primer contacto de los individuos con la dieta contaminada, las tasas de aclaramiento son significativamente afectadas por la cantidad de células tóxicas presentes en las dietas. Sin embargo se considera necesario realizar experimentos adicionales con cepas de *Alexandrium* no tóxicas para lograr esclarecer cuál es la causa de la disminución de

estas variables fisiológicas, si es la toxina presente en la dieta, la cantidad y tamaño de las células tóxicas o el conjunto de todas ellas.

La eficiencia y tasa de absorción de los bivalvos marinos está muy relacionada con la fracción orgánica de la dieta y puede ser afectada por la cantidad y calidad de la misma. Cuando existe mayor contenido orgánico en el alimento, mayor es el tiempo de retención de éste en el tracto digestivo, para obtener una prolongada acción enzimática y una mayor eficiencia de absorción (Bayne *et al.*, 1987). Es por esto que se observó en los experimentos con la dieta 1, compuesta por una mayor fracción de materia inorgánica (57,91%), eficiencias y tasas de absorción menores que en los individuos alimentados con la dieta 3, la cual contenía una menor fracción de materia inorgánica (46,19%) . Los valores medidos con las dietas 1 y 3 están por debajo de lo observado por Bricelj *et al.* (1990) en individuos de *Mytilus edulis* alimentados con distintas concentraciones de *Alexandrium fundyense*, pero estas diferencias se podrían deber a la mayor proporción de materia orgánica presente en la dieta ofrecida a *M. edulis* (100% *A. fundyense*). Por otro lado, Li *et al.* (2002) observó que bajas concentraciones de STX en los tejidos de *Perna viridis* (9 µg de STX eq. / 100 g de tejido) producían una disminución en la eficiencia de absorción de estos bivalvos. Existen otros estudios que señalan la capacidad de algunas especies para absorber de forma diferenciada microalgas tóxicas de las no tóxicas. Li *et al.* (2001) observó que la almeja *Ruditapes philippinarum* absorbía de forma más eficientemente la diatomea no tóxica *Thalassiosira pseudonana* que el dinoflagelado tóxico *A. tamarense* mientras que el ostión *Chlamys nobilis* presentó una mayor capacidad de absorber células tóxicas que los individuos de *R. philippinarum*, pero en ambas

especies siempre fue menor la eficiencia de absorción sobre *A. tamarense* (500 células/ml) en comparación con la de las diatomeas. En el presente estudio no se pudo establecer una relación clara entre la eficiencia de absorción de los individuos contaminados y la toxina acumulada en los tejidos, ya que los bajos valores de estas respuestas medidas en los individuos alimentados con la dieta 1 no se deberían a la presencia de la toxina en los tejidos sino a la calidad del alimento entregado. Esto es corroborado con las respuestas medidas sobre los individuos alimentados con la dieta 3, los que a pesar de alcanzar altas toxicidades en los tejidos, mostraron mayor eficiencia de absorción de materia orgánica que en la dieta 1.

Los valores de consumo de oxígeno obtenidos con las dietas 1 y 3 son similares a los observados por Navarro & Winter (1982) y Winter *et al.* (1982) para esta misma especie. Widdows (1978a) demostró un marcado ciclo estacional para el consumo de oxígeno en *Mytilus edulis*, relacionado con el estado gametogénico de este bivalvo, donde los mayores gastos de energía se producen en primavera-verano cuando la gónada del animal contiene gametos en desarrollo y maduros. Los individuos de *Mytilus chilensis* alimentados con las dietas 1 y 3 no muestran diferencias en su estado reproductivo, lo cual explicaría la similitud de valores de consumo de oxígeno medidos sobre ejemplares recolectados en distintas épocas del año. También se observó que las concentraciones de STX presentes en las dietas 1 y 3 como la acumulación de ésta en los tejidos de *Mytilus chilensis* no estarían afectando el consumo de oxígeno medido sobre esta especie. Li *et al.* (2002) observó la misma respuesta en individuos de *Perna viridis* expuestos a dietas con distintas concentraciones de *Alexandrium tamarense*. Por otra parte, Shumway & Cucci (1987)

observaron en ejemplares de *Mytilus edulis* sin exposición previa a eventos de floraciones algales tóxicas incrementos en el consumo de oxígeno, lo cual representa un signo de estrés; mientras que la misma especie proveniente de otro lugar conocido por floraciones algales recurrentes, no mostró cambios en esta respuesta fisiológica. De esta forma, la respuesta similar observada entre ejemplares de *M. chilensis* contaminados y los controles a lo largo del periodo experimental se explicaría por la exposición previa que ha tenido esta especie a eventos de floraciones de *A. catenella* en su habitat natural (bahía de Yaldad).

Widdows (1978a) demuestra que la tasa de excreción está relacionada con el ciclo reproductivo del animal, presentando valores mínimos en otoño y comienzos de invierno, época en la cual el bivalvo se encuentra sin gametos maduros en el manto. En el presente estudio no se observan diferencias en el estado reproductivo de los ejemplares alimentados con las dieta 1 y 3, por lo que las diferencias observadas en la tasa de excreción medida en ambas épocas del año no sería explicado por el estado gametogénico de los bivalvos. Se observó que la tasa de excreción de los ejemplares expuestos a la dieta 3 presenta una significativa correlación positiva ( $b=7,08$ ;  $R^2=0,76$ ) con la acumulación de la toxina en los tejidos de *M. chilensis*, observándose que a medida que aumenta la cantidad de toxina en los tejidos también aumenta la tasa de excreción. Esto podría suponer que la degradación de la toxina, al ser una rica fuente de nitrógeno (Pérez, 1998) produce altas concentraciones de amonio, las cuales necesitan ser eliminadas vía órganos de excreción para mantener el equilibrio osmótico del animal. Mediante esta respuesta, *M. chilensis* estaría controlando el exceso de nitrógeno exógeno aportado por la toxina, lo cual le permitiría seguir

fisiológicamente estable en medio de condiciones adversas producidas por altas concentraciones del dinoflagelado tóxico en su dieta.

El crecimiento potencial es la energía disponible para crecer y reproducirse y evalúa de forma rápida y cuantitativa el estatus energético de un animal. Navarro & Winter (1982) y Widdows (1978b) obtuvieron valores de crecimiento potencial de 10 y 15 J/h/g para individuos de *M. chilensis* y *M. edulis* respectivamente, bajo condiciones de laboratorio y alimentados con monocultivos. En el presente trabajo los valores de crecimiento potencial variaron entre las dos dietas experimentales, sin embargo la mayoría de los resultados son cercanos a los observados por los autores antes mencionados. El crecimiento potencial de los individuos alimentados con la dieta 1, no fue afectado ni por la presencia de *A. catenella* en el alimento ofrecido ni por la toxina acumulada en los tejidos de *Mytilus chilensis*. Contrario a este estudio, Li *et al.* (2002) observó una disminución del crecimiento potencial en *Perna viridis* y *Ruditapes philippinarum* a medida que incrementaba la concentración de toxina en sus tejidos (< 17 µg de SXT eq. / 100 g de tejido). En la dieta 3 se observó que el crecimiento potencial de los individuos contaminados fue menor en el día 0 y 3, debido a que en estos días la tasa de aclaramiento y de ingestión total fueron menores en comparación a los demás muestreos. Las diferencias observadas entre individuos contaminados y controles en estos días, son producto del efecto negativo pero reversible de la dieta contaminada sobre la tasa de aclaramiento. En general el crecimiento potencial medido en los individuos alimentados con la dieta 1 es más bajo que el de aquellos alimentados con la dieta 3, principalmente por la calidad del alimento entregado. La dieta 3 al estar compuesta por una mayor proporción de

materia orgánica, produce una mayor eficiencia de absorción, lo que se ve reflejado finalmente en mayores valores de crecimiento potencial.

Los resultados del presente estudio permiten rechazar parcialmente la hipótesis planteada ya que las dietas contaminadas con el dinoflagelado tóxico *A. catenella* tuvieron un efecto negativo sobre la ganancia de energía de *Mytilus chilensis* solo durante los primeros días (2-3 días) de experimentación. Posteriormente a este periodo *M. chilensis* presenta la capacidad de aclimatación a las condiciones de dietas tóxicas, lo que resulta en valores de crecimiento potencial similares a los ejemplares controles. Esto permite concluir que el incremento de toxina en los tejidos no tiene un efecto negativo sobre la ganancia de energía por parte de *M. chilensis*. Así el efecto negativo inicial estaría relacionado principalmente con la presencia de *A. catenella* en la dieta y no con la presencia de la toxina en el tejido del bivalvo. Esta conducta de *M. chilensis* la hace una buena especie centinela para la detección a tiempo de eventos de marea roja perjudiciales para la salud humana. Su relativa insensibilidad al VPM después de los primeros días de intoxicación, hace que su actividad de alimentación se normalice en un periodo de tiempo muy corto, logrando que la máxima acumulación de la toxina se produzca en 8 días. Es importante destacar que la capacidad de aclimatación presentada por los individuos estudiados frente a la presencia de *A. catenella* estaría relacionada con la población a la cual pertenecen (Yaldad, Chiloé), localidad que se vio afectada por un bloom tóxico de esta especie en el año 2002. Bricelj *et al.* (2005) observó en individuos de *Mya arenaria* expuestos a eventos tóxicos recurrentes, la mutación natural de un aminoácido que evita la unión de la saxitoxina con el poro del canal de sodio, permitiendo la normal

conductancia de los impulsos nerviosos de las células y una mayor resistencia de estos ejemplares a la toxina. Es por esto que se hace interesante conocer en futuros estudios el efecto que producirían estas condiciones experimentales en individuos de otras poblaciones de esta especie que no han estado expuestos con anterioridad a la toxina.



## Bibliografía

- Bayne, B.L. & R.C. Newell. 1983. Physiological Energetics of Marine Mollusc. *Mollusca*, 4: 409-515.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A. & J. Widdows. 1985. The effects of stress and Pollution on Marine Animals. Praeger, Greenwood Press, 384 pp.
- Bayne, B.L., Hawkins, A.J.S. & E. Navarro. 1987. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalves: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 111: 1-22.
- Blasco, D., Levasseur, M., Bonneau, E., Gelinas, R & T.T. Packard. 2003. Patterns of paralytic shellfish toxicity in the St. Lawrence region in relationship with the abundance and distribution of *Alexandrium tamarense*. *SCI. Mar.*, 67(3): 261-278.
- Brattstrom, H. & A. Johanssen. 1983. Ecological and regional zoogeography of the marine benthic fauna of Chile. *Sarsia*, 68: 239-289.
- Bricelj, V.M., Lee, J.H., Cembella, A.D. & D.M. Anderson. 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 63: 117-188.
- Bricelj, V.M. & S.E. Shumway. 1998. Paralytic Shellfish Toxins in Bivalve Molluscs: Occurrence, Transfer Kinetics, and biotransformation. *Reserve in Fisheries Science*, 6 (4): 315-383.

- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., MacQuarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A., Trainer, V.L. 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increase risk of PSP. *Nature*, 434 (7034): 763-767.
- Clasing, E., Oñate, A. & H. Arriagada. 1998. Cultivo de Choritos en Chile. Dirección de Investigación y Desarrollo, Universidad Austral de Chile. Imprenta Universitaria S.A., 36 pp.
- Clement, A., Aguilera, A., & C. Fuentes. 2002. Análisis de marea roja en Archipiélago de Chiloé, contingencia verano 2002. XXII Congreso de Ciencias del Mar, 28-30 de mayo de 2002, Valdivia, Chile.
- Conover, R.J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol.Oceanogr.*, 11: 338- 345.
- Córdova, J.L. & I. Muller. 2002. Use for PCR and partial sequencing of the large-subunit rRNA gene to identify *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) from the south of Chile. *Harmful Algae*, 32: 1-8.
- Córdova, J.L., Escudero, C. & J. Bustamante. 2003. Bloom inside the bloom: intracellular bacteria multiplication within toxic dinoflagellates. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 38(2): 57-67.
- Dupuy, J.L. & A.K. Sparks. 1968. *Gonyaulax washingtonensis*, its relationship to *Mytilus californianus* and *Crassostrea gigas* as a source of paralytic shellfish toxin in Sequien Bay, Washington. *Proc. Nat. Shellfish Assn.*, 58:2.
- Gainey, L.F. & S.E. Shumway. 1998. A compendium of the responses of bivalve mollusc to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research*, 7(4): 626-628.

- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of Marine Invertebrate Animals. In: W. L. Smith and M. H. Chanley, (Eds.). Plenum Press, N.Y., pp 29-60.
- Guillard, R.R.L. 1995. Culture methods. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. (eds). Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33 UNESCO , Paris, pp 45-62.
- Halstead, B.W. 1978. Poisonous and Venomous Marine Animals of the world. Darwin Press, Inc, Princeton, New Jersey, pp 49-78.
- Hernández, J.M. & L.E. González. 1976. Observaciones sobre el comportamiento de mitílidos chilenos en cultivo suspendido. I Chorito (*Mytilus chilensis*), Hupé, 1854. Inv. Pesq. Chile, 22: 1-50.
- Lembeye, G. 1981. Estructura del fitoplancton asociado a la presencia del veneno paralítico de los mariscos en seno unión y áreas adyacentes (Magallanes, Chile) 1981. Ans. INST. PAT., Punta Arenas (Chile). Vol. 12.
- Li, S.C., Wang, W.X. & D.P.F. Hsieh. 2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by two marine bivalves from the South China Sea. Marine Biology, 139: 617-624.
- Li, S.C., Wang, W.X. & D.P.F. Hsieh. 2002. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. Marine Environmental Research., 53: 145-160.
- Martin, L.J., White, A.W., & J.J. Sullivan. 1990. Anatomical distribution of paralytic shellfish toxins in soft-shell clams. Marine Phytoplankton Toxic, pp. 379-384
- McLusky, D.S. 1989. The Estuarine Ecosystem. 2<sup>o</sup> edition, Blackie.

- Navarro, J.M. & J.E. Winter. 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentration. *Marine Biology*, 67: 255-266.
- Navarro, J.M. 1983. Balance energético de *Mytilus chilensis* Hupe, (Bivalvia, Mytilidae) en base a experimentos de laboratorio. *Mems. Asoc. Latinoam. Acuicult.*, 5(2): 189-202.
- Navarro, J.M. & R. Jaramillo. 1994. Evaluación de la oferta alimentaria natural disponible a organismos filtradores de la bahía de Yaldad (43°08';73°44'), sur de Chile. *Rev. Biol. Mar.*, Valparaíso 29 (1):57-75.
- Pérez, M. 1998. Efecto de las distintas concentraciones y fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y toxicidad de *Alexandrium catenella* (Whedon & Kapsch) Balech 1985. Tesis escuela de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Pitcher, G.C., Franco, J.M., Doucette, G.J. Powell, C. L. & A. Mouton. 2001. Paralytic Shellfish Poison in the Abalone *Haliotis midae* on the west coast of South Africa. *Journal of Shellfish Research*, 20(2): 895-904.
- Ray, S.M. & D.V. Aldrich. 1967. Ecological interactions of toxic dinoflagellates and Molluscs in the Gulf of Mexico. In Russel, F. E. & R. P. Saunders (eds). *Animal Toxins* Pergamon Press, N. Y., pp.75-83.
- Sar, E. A., Ferrario, M. E. & B. Reguera. 2002. Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía. 311 pp.
- Shulte, E.H. 1975. Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 30: 331-342.

- Shumway, S.E., Cucci, T. L., Newell, R.C. & C.M Yentsch. 1985. Particle selection ingestion and absorption in filter- feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 91: 77-92.
- Shumway, S.E. & T.L. Cucci. 1987. The effects of dinoflagellate *Protogaulax tamarensis* on the feeding and behavior of bivalve mollusc. *Aquatic Toxicology*, 10: 9-27.
- Solórzano, L. 1969. Determination ammonia in natural water by the Hypochlorite method. *Limnol.Oceanogr.*, 14: 799- 801.
- Suárez, B. & L. Guzmán. 1998. Mareas rojas y toxinas marinas, Floraciones de algas nocivas. Editorial Universitaria, 77 pp.
- Twarog, B.M., Hidaka, T. & H. Yamaguchi. 1972. Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalve mollusk. *Toxicon*, 10: 273-278.
- Vélez,P., Sierralta,J., Alcayaga,C., Fonseca,M., Loyola,H., Johns,D.C., Tomaselli,G.F. & B.A Suárez-Isla. 2001. A functional assay for paralytic shellfish toxins that uses recombinant sodium channels. *Toxicon*, 39: 929- 935.
- Viviani, C.A. 1979. Ecogeografía del litoral chileno. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 14: 65-123.
- White, J. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231-241.
- Widdows, J. 1978a. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 58: 109-124.
- Widdows, J. 1978b. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 58: 125-142.

Widdows, J. 1985. Physiological Responses to Pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 16 (4): 129-134.

Winter, J., Navarro, J.M., Roman, C & O. Chaparro. 1982. Programa de explotación de mitílidos. Investigación científica básica: 2º parte. Corporación de fomento de la producción Chile. 311pp.

Yasumoto, T. & M. Murata. 1993. Marine Toxins. *Chemical Reviews*, 93: 1897-1909.