



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Jorge Navarro A.
Instituto de Biología Marina
Facultad de Ciencias

“Crecimiento y dinámica de intoxicación-detoxificación de juveniles de *Mytilus chilensis* (Bivalvia: Mytilidae) frente a la presencia del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella*”

**Tesis de grado presentada
como parte de los requisitos
para optar al Grado de
Licenciado en Ciencias
Biológicas.**

**Blanca Lidia Aguila Llanquilef
Fabiola Evelyn Machmar Hernández**

VALDIVIA-CHILE

2007

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer en primer lugar a nuestro profesor patrocinante Dr. Jorge Navarro, quien con su inmensa sabiduría nos guió durante todo el proceso de realización de nuestra tesis, gracias de verdad profe por su paciencia y sus enseñanzas.

A nuestros padres que nos dieron la oportunidad y confianza para poder desarrollarnos en esta gran universidad y de esta manera obtener las herramientas para desenvolvemos en el futuro. A nuestros hermanos por ser incondicionales y estar siempre a nuestro lado apoyándonos en las buenas y en las malas; a tantos otros familiares que hicieron de esta etapa algo hermoso de recordar.

A nuestros amigos por ser incondicionales a la hora de tomar conciencia y retomar el buen camino.

Queremos agradecer a aquellas personas que de alguna u otra forma ayudaron en la realización de nuestras tesis nos referimos a Pacita y Verito.

Especialmente queremos agradecer a una persona a la cual queremos y extrañamos mucho, ella siempre estuvo para ayudarnos, aconsejarnos y entregarnos su sabiduría y aunque ahora se encuentre a miles de kilómetros nos dejó su eterna amistad, gracias por todo Andrea.

Y finalmente al proyecto Fondecyt 1030340 que entregó los fondos necesarios para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
Abstract	3
2. INTRODUCCION	4
3. MATERIAL Y MÉTODO	10
3.1 Área de estudio	10
3.2 Recolección de los ejemplares	10
3.3 Aclimatación	12
3.4 Diseño experimental	12
3.4.1 Cultivo de Microalgas y preparación de sedimento	12
3.4.2 Marcaje de los individuos	14
3.4.3 Dietas	15
3.5 Determinación de la toxicidad en las dietas y en los tejidos de los individuos experimentales	17
3.6 Mediciones fisiológicas	20
3.6.1 Tasa de aclaramiento (TA)	20
3.6.2 Tasa de Ingestión	22
3.7 Determinación del crecimiento en longitud de la concha en juveniles de <i>Mytilus chilensis</i>	23
3.8 Análisis estadístico	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Dietas Experimentales	25

4.2 Dinámica de Intoxicación-Detoxificación en tejido blando de juveniles de <i>Mytilus chilensis</i>	27
4.3 Mediciones fisiológicas	29
4.3.1 Tasa de aclaramiento	29
4.3.2 Tasa de ingestión total y orgánica	32
4.4 Crecimiento	35
5. DISCUSIÓN	36
6. BIBLIOGRAFÍA	42

1. RESUMEN

Las floraciones algales nocivas (FAN) son fenómenos naturales que afectan directamente las cadenas alimentarias marinas. Dentro de este grupo de microorganismos se encuentra el dinoflagelado *Alexandrium catenella*, productor del veneno paralizante de los mariscos (VPM). En organismos con alimentación por filtración como el bivalvo *Mytilus chilensis* (chorito), la toxina es acumulada en sus tejidos, pudiendo afectar la actividad de alimentación y crecimiento de estos individuos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la toxina sobre la actividad de alimentación, tasa de crecimiento y dinámica de intoxicación-detoxificación de ejemplares juveniles de *M. chilensis* expuestos a dos dietas con diferentes concentraciones de *A. catenella*.

Los resultados obtenidos indican que la presencia de *A. catenella* en ambas dietas afecta la actividad de alimentación y por consecuencia la obtención de energía y el crecimiento de esta especie. La respuesta de *M. chilensis* es rápida frente a la presencia de *A. catenella*, concentrando la toxina paralizante desde el inicio del proceso de intoxicación con valores cercanos al máximo permitido por la norma de salud pública en los primeros 3 días. De la misma forma nuestros resultados nos permiten conocer que la capacidad de detoxificación es más lenta que la de intoxicación, la que se alcanza solo después de 10 o más días de detoxificación con valores bajo el máximo permitido por el Servicio de Salud Pública.

Esto demuestra la importancia del conocimiento aplicado a la dinámica de intoxicación/detoxificación en especies de importancia comercial expuestas a dietas conteniendo dinoflagelados productores de marea roja del tipo paralizante.

ABSTRACT

Harmful algal events (HABs) are natural phenomena that affect marine food chains directly. To this group belongs the dinoflagellate *Alexandrium catenella*, producer of the Paralytic Shellfish Poison (PSP). In suspension feeding organisms such as *Mytilus chilensis*, toxin is accumulated in their tissues, and can affect the feeding activity and growth of these individuals. The aim of the present study is to assess the impact of the toxin on the feeding activity, growth rate and intoxication-detoxification dynamics of the juvenile *M. chilensis* exposed to two diets with different concentrations of *A. catenella*.

Results obtained in both diets show that *A. catenella* affects feeding activity and consequently energy acquisition and the growth of *Mytilus chilensis*. This species has a fast response to the presence of *A. catenella* in their diet, concentrating the paralyzing toxin from the beginning of the intoxication process with values close to the maximum allowed by the Public Health Department in the first three days. The detoxification rate is slower than the intoxication rate, as values below the maximum allowed by the Public Health Department are attained only after ten or more days. This shows the importance of knowledge applied to the intoxication/detoxification dynamics in species of commercial relevance exposed to natural events of paralyzing-type red tide.

2. INTRODUCCIÓN

Las algas planctónicas en su conjunto constituyen el fitoplancton que a su vez es responsable del 90% de la producción de materia orgánica en el mar a través del proceso de fotosíntesis. De este modo contribuye a la producción de oxígeno y representa el alimento de organismos herbívoros, los que constituyen el primer eslabón de la cadena trófica.

Al producirse un aumento de los microorganismos del fitoplancton se producen las denominadas floraciones algales o “blooms”, causando cambios en la coloración del agua, debido a la presencia de pigmentos de variados colores como amarillo, verde, café y rojo, siendo el más frecuente éste último de donde proviene el nombre mundialmente conocido como marea roja. Las floraciones algales son fenómenos naturales las cuales constituyen el alimento de moluscos bivalvos filtradores como ostras, choritos, almejas, ostiones, entre otros. Existen grupos de microorganismos, como los dinoflagelados, diatomeas, crisófitas, microflagelados y cianobacterias, donde algunas de sus especies producen las denominadas FAN (floraciones algales nocivas), las que están representadas por más de 60 especies de las 4000 conocidas (Suárez & Guzmán, 1998).

La iniciación, desarrollo y disminución de estas floraciones se deben a múltiples factores biológicos, oceanográficos y meteorológicos que todavía son poco entendidos. Los principales grupos de venenos microalgales descritos son: el veneno paralizante de los mariscos (VPM), veneno diarreico de los mariscos (VDM), veneno amnésico de los mariscos (VAM), veneno ciguaterico de pescado (VCP) y veneno neurotoxico (VN)

(Yasumoto & Murata, 1993). *Alexandrium catenella* es un dinoflagelado que presenta una amplia distribución geográfica (Balech, 1995; Taylor *et al.*, 1995) y ha sido reconocido como fuente primaria del VPM en el sur de Chile. Fue citado por primera vez en 1972 para la región de Magallanes (Guzmán *et al.*, 1975; Guzmán & Campodónico, 1975,1978). Entre los años 1972 y 2000, en nuestro país se han presentado 387 intoxicados y 26 muertos, a causa del veneno paralizante de los mariscos. En lo que respecta a su descripción, *A.catenella*, posee dos caracteres que permiten identificarlo con facilidad, el primero es la formación de largas cadenas, y el segundo es su forma bastante irregular y aplastada antero posteriormente (Whedon & Kofoid, 1936). *A.catenella* produce toxinas muy potentes denominadas saxitoxinas las cuales se unen al poro del canal de sodio bloqueando los impulsos nerviosos, causando parálisis muscular en los intoxicados y llegando a ser mortal en algunos casos (Suárez & Guzmán, 1998; Bricelj *et.al.*, 2005). La dosis letal es de 1 a 4 mg de STX eq. (Levin, 1992).

La presencia de organismos con alimentación por filtración, tiene influencia sobre las cadenas alimentarias del mar. Dentro de este gran grupo de animales, se encuentran muchos moluscos bivalvos filtradores, los cuales son consumidores de fitoplancton y de detritus orgánico e inorgánico (Navarro, 1983). El VPM es acumulado por los bivalvos durante las floraciones de microalgas tóxicas, y distribuido de diferente manera en los tejidos blandos pudiendo ser transferida esta toxina a otros niveles de la cadena trófica (Blanco *et al.*, 1997). Las toxinas de VPM son solubles en agua, son neurotoxinas que actúan en células nerviosas de los mamíferos bloqueando los canales de sodio (Kwong *et al.*, 2006).

Se descubrió que en algunos mariscos la excitabilidad de nervios y músculos dependería de flujos de calcio a través de canales de calcio los que son insensibles a las toxinas paralizantes (Twarog & Yamaguchi, 1974).

Luego de la desaparición de las células tóxicas en el medio ambiente, los mariscos quedan tóxicos por un período variable de tiempo, dependiendo de la capacidad de detoxificación (Siu-Chung Li *et al.*, 2002). Los dinoflagelados tóxicos pueden afectar los procesos de alimentación de los bivalvos hasta llegar al cierre de las valvas, afectar la producción de bisos, el consumo de oxígeno y la actividad cardíaca (Shumway *et al.*, 1985). También se ha encontrado que el VPM producido por dinoflagelados tóxicos provoca un impacto negativo sobre el crecimiento de bivalvos marinos (Shumway & Cucci, 1987; Gainey & Shumway, 1988).

Como consecuencia de la reducción de la actividad de alimentación, la tasa de crecimiento de *Mytilus edulis* medida después de someter a los individuos a una dieta con dinoflagelados tóxicos fue inhibida por la presencia de estos en su dieta (Bricelj *et al.*, 1993). Bivalvos como *Placopecten magellanicus* y *Spisula solidissima*, presentan diferencias en la acumulación de toxinas en sus tejidos debido a la diferente respuesta en la dinámica de intoxicación y detoxificación de éstos (Cembella *et al.*, 1993). Estudios realizados con el dinoflagelado *Gyrodinium aureolum* y su impacto en la biología del bivalvo *Mytilus edulis* demuestran un estancamiento en el crecimiento de la concha, en la tasa de aclaramiento y daño a nivel intestinal (Nielsen & Stromgren, 1991).

Las grandes diferencias en la acumulación de las toxinas del VPM entre bivalvos *in vivo* han sido asociadas con los resultados obtenidos *in vitro* sobre la sensibilidad de

los nervios aislados frente a la STX, la toxina mas potente del VPM (Bricelj *et al.*, 2005). El ostión *Patinopecten yessoensis* alimentado con *Alexandrium tamarense* mostró que su toxicidad se mantiene alta después que el dinoflagelado tóxico desaparece debido a que *P. yessoensis* acumula la toxina en sus tejidos blandos (Sekiguchi *et al.*, 2001). Ejemplares del bivalvo *Perna viridis* alimentados con el dinoflagelado tóxico *A. fundyense* acumularon las toxinas de VPM excediendo los 80µg STX eq. /100 g de carne en el segundo día de experimento (Kwong *et al.*, 2006).

En lo que respecta a la dinámica de detoxificación de VPM, se demostró que se puede estudiar de mejor manera por un modelo de dos compartimientos (dos diferentes tejidos en el bivalvo), ya que el proceso va a ser diferente según el tejido en el que se realice el estudio (Moroño *et al.*, 1998). Las glándulas digestivas, músculos, gónadas y riñón difieren sustancialmente en la habilidad para acumular toxinas (Cembella *et al.*, 1993,1995), siendo la glándula digestiva de los bivalvos el tejido que muestra las mayores concentraciones de VPM (Kwong *et al.*, 2006).

La detoxificación en bivalvos puede deberse a dos procesos fundamentales: pérdidas fecales, eliminación de células tóxicas y de fragmentos celulares del sistema digestivo (Blanco *et al.*, 1997). Las variables ambientales como salinidad, temperatura, fluorescencia y transmisión de luz también pueden estar influyendo en la cinética de detoxificación (Moroño *et al.*, 1998). El aumento de la temperatura tiene un efecto positivo sobre la dinámica de detoxificación debido al incremento de la actividad fisiológica del bivalvo. Según Moroño *et al.*, (1998) la disminución en la salinidad afecta negativamente la detoxificación y aunque estos autores no mencionan las causas, se podría deber a la reducción de la actividad metabólica que ocurre a menores

salinidades (Navarro & González, 1998). Se ha encontrado que la cantidad del material particulado en suspensión (seston) tiene efecto en los procesos digestivos y en especial sobre las pérdidas metabólicas en *Mytilus galloprovincialis* y con respecto a la variable peso del cuerpo, ésta parece tener distintos efectos durante los diferentes períodos de detoxificación (Blanco *et al.*, 1997).

El dinoflagelado tóxico *A. tamarense* fue utilizado para determinar los efectos en la obtención de la energía y tasa de crecimiento de juveniles de *Ruditapes philippinarum* y *Perna viridis*. Tanto la tasa de aclaramiento como la de crecimiento fueron menores en *R. philippinarum* con respecto a *P. viridis*, indicando su mayor sensibilidad a la acumulación de VPM (Siu Chung Li *et al.*, 2002).

Sobre la base de lo anterior, es de importancia realizar estudios sobre el efecto que *A. catenella* podría tener sobre el crecimiento de organismos filtradores. En este sentido, el proceso de crecimiento en bivalvos puede ser cuantificado por medio de diferentes aproximaciones, tales como mediciones directas sobre su concha o indirectas, obtenidas mediante el cálculo de crecimiento potencial.

Las mareas rojas tóxicas han ocurrido con frecuencia casi anual en las regiones X, XI y XII de Chile y actualmente este fenómeno se ha extendido hasta la Isla de Chiloé X región, principal área de cultivo de bivalvos en nuestro país, provocando un efecto negativo sobre la economía de la región debido a que se obliga a clausurar las áreas de cultivo y de pesca, lo que determina una paralización temporal de estas actividades. Dentro del grupo de los bivalvos del sur de Chile encontramos a *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854), llamado comúnmente "chorito", su distribución geográfica va desde la IX región hasta el estrecho de Magallanes (Hernández & González, 1976). Se

encuentra en áreas protegidas y expuestas, fijados al sustrato mediante el biso (Ávila *et al.*, 1994). Además de su importancia económica y ecológica, esta especie representa un importante vector de las toxinas producidas por los diferentes organismos que se encuentran en los blooms de microalgas. En el presente estudio se utilizan juveniles de esta especie para evaluar el efecto de dietas conteniendo dinoflagelados tóxicos.

Para lo cual se postula como hipótesis que “La actividad de alimentación y el crecimiento de juveniles de *Mytilus chilensis* están influenciados negativamente por la presencia del dinoflagelado toxico *Alexandrium catenella*”. Por lo cual se hace necesario evaluar el efecto de la toxina paralizante en diferentes concentraciones sobre la actividad de alimentación, tasa de crecimiento y además analizar la dinámica de intoxicación y detoxificación de juveniles de *M. chilensis* frente a la presencia del dinoflagelado tóxico *A. catenella*.

En consecuencia el presente estudio es relevante para evaluar el efecto de la toxina sobre este bivalvo y además para entregar nueva información que aporte al desarrollo de nuevas medidas de control, frente a la presencia de eventos de marea roja toxicas del tipo paralizante.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Área de Estudio

Los ejemplares juveniles de *Mytilus chilensis* fueron colectados desde líneas de cultivo (long lines) ubicadas en la bahía de Yaldad, Chiloé (43°08'S y 73°44'W); (figura 1). Sus aguas se caracterizan por presentar temperaturas máximas de 15°C en el mes de enero, que disminuyen hasta alcanzar los 10 °C en invierno (Navarro & Jaramillo, 1994). La salinidad en este lugar presenta valores relativamente estables (25-30‰), el alimento particulado en suspensión (seston) para organismos filtradores presenta valores máximos durante primavera-verano y mínimos durante el resto del año. Variando la fracción orgánica entre 0.6- 1.6 mg/L y el seston inorgánico entre 0.3-3.6 mg/L (Navarro & Jaramillo, 1994).

3.2 Recolección de los ejemplares.

Los ejemplares de *Mytilus chilensis* se colectaron en agosto de 2005 y abril de 2006, se seleccionaron por tamaño (1.5 a 2.5 cm), luego se limpiaron de los epibiontes y cuidadosamente se les cortó el biso, para luego ser transportados en frío al Laboratorio de Ecofisiología del Instituto de Biología Marina de la Universidad Austral de Chile.



a



b

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

3.3 Aclimatación

Los ejemplares de *M.chilensis*, se mantuvieron en aclimatación durante una semana antes de comenzar los experimentos, a una temperatura de 14 ° C y a una salinidad de 30‰. En esta etapa se les alimentó tres veces al día con la microalga *Isochrysis galbana* y se mantuvieron en acuarios plásticos con agua de mar constantemente aireada (figura 2), la que era cambiada cada 3 días.



Figura 2. Juveniles de *Mytilus chilensis* en la etapa de aclimatación.

3.4 Diseño experimental

3.4.1 Cultivo de microalgas y preparación de sedimento

El dinoflagelado tóxico *A.catenella* cepa ACCO2, fue cultivado en agua de mar filtrada contenida en botellas con el medio de cultivo L1 (Guillard, 1995), a 14 °C de temperatura 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 con baja frecuencia de cadenas (< 7%).



Figura 3. Cultivo de *Alexandrium catenella*.

La microalga *Isochrysis galbana*, fue cultivada bajo luz artificial, en botellas conteniendo el medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975) y también utilizando la fase exponencial del cultivo (figura 4).



Figura 4. Cultivo de *Isochrysis galbana*.

El sedimento fino fue colectado desde la planicie mareal de Yaldad, tamizado a 40 μm , lavado en agua destilada y posteriormente quemado en la mufla por 12 horas a 500 $^{\circ}\text{C}$ para eliminar su fracción orgánica.

3.4.2 Marcaje de los individuos

Previo al inicio de los experimentos, se identificó la totalidad de los choritos experimentales mediante numeración correlativa, utilizando etiquetas plásticas (Opalithplättchen, Germany) adheridas a las valvas de cada individuo, con el pegamento Éster de Cianoacrilato (La Gotita). De esta manera fue posible seguir en forma individual el crecimiento en longitud de la concha y en peso de los tejidos blandos de los ejemplares juveniles de *Mytilus chilensis* (figura 5).

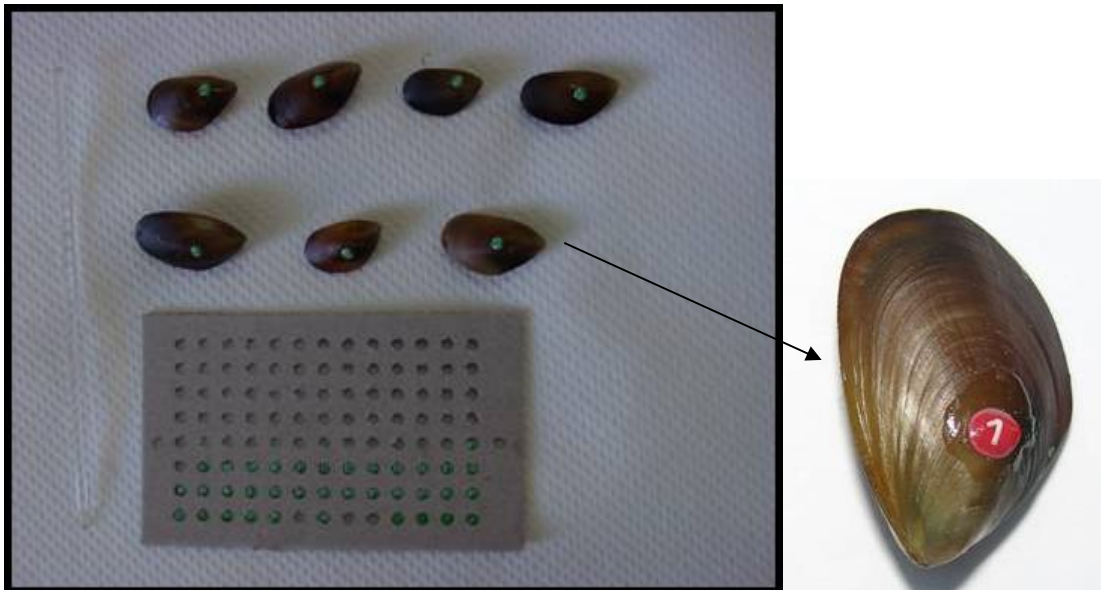


Figura 5. Juveniles de *M. chilensis*, enumerados con las etiquetas plásticas (Opalithplättchen, Germany).

3.4.3 Dietas

Las dietas experimentales fueron preparadas con dos diferentes concentraciones de *A.catenella*. La dieta 1 estuvo compuesta por 30% de *Alexandrium catenella*, 50% de *Isochrysis galbana* y 20% de sedimento inorgánico. Los bivalvos experimentales (266 individuos, 3 réplicas) se mantuvieron en acuarios de 4L de capacidad y fueron expuestos durante 18 días a una dieta mixta de *Isochrysis galbana*, sedimento inorgánico y *Alexandrium catenella* en las proporciones antes mencionadas. La dieta se suministró en forma continua mediante una bomba peristáltica Masterflex L/S modelo 7519-05, siempre dentro de un rango de concentraciones de partículas similares al seston natural de las bahías del sur de Chile (1.5-2.5mg/l). Diariamente se adicionó una

cantidad de alimento correspondiente al 6% del peso seco de cada individuo experimental. Paralelamente, se mantuvo un acuario control con 266 ejemplares de igual tamaño, a los que se les suministró de la misma forma una dieta libre de toxinas (80% *I. galbana* y 20% sedimento inorgánico) mediante una bomba peristáltica, bajo condiciones de temperatura y salinidad controlada (14 °C y 30‰) (figura 6).

La dieta 2 estuvo compuesta de 50% *A.catenella*, 30% *I. galbana*, y 20% de sedimento inorgánico y también se adicionó una cantidad de alimento diaria equivalente al 6% del peso seco de los tejidos blandos de cada individuo. A los ejemplares experimentales (266 individuos, 3 réplicas), se les suministró durante 9 días una dieta mixta de *A. catenella*, *I. galbana* y sedimento inorgánico, manteniéndose paralelamente tres acuarios controles, a los cuales se les suministró una dieta libre de toxinas (80% *I.galbana*, y 20% sedimento inorgánico), mediante una bomba peristáltica Masterflex L/S modelo 7519-05 bajo condiciones de temperatura y salinidad controlada (14 °C y 30‰).

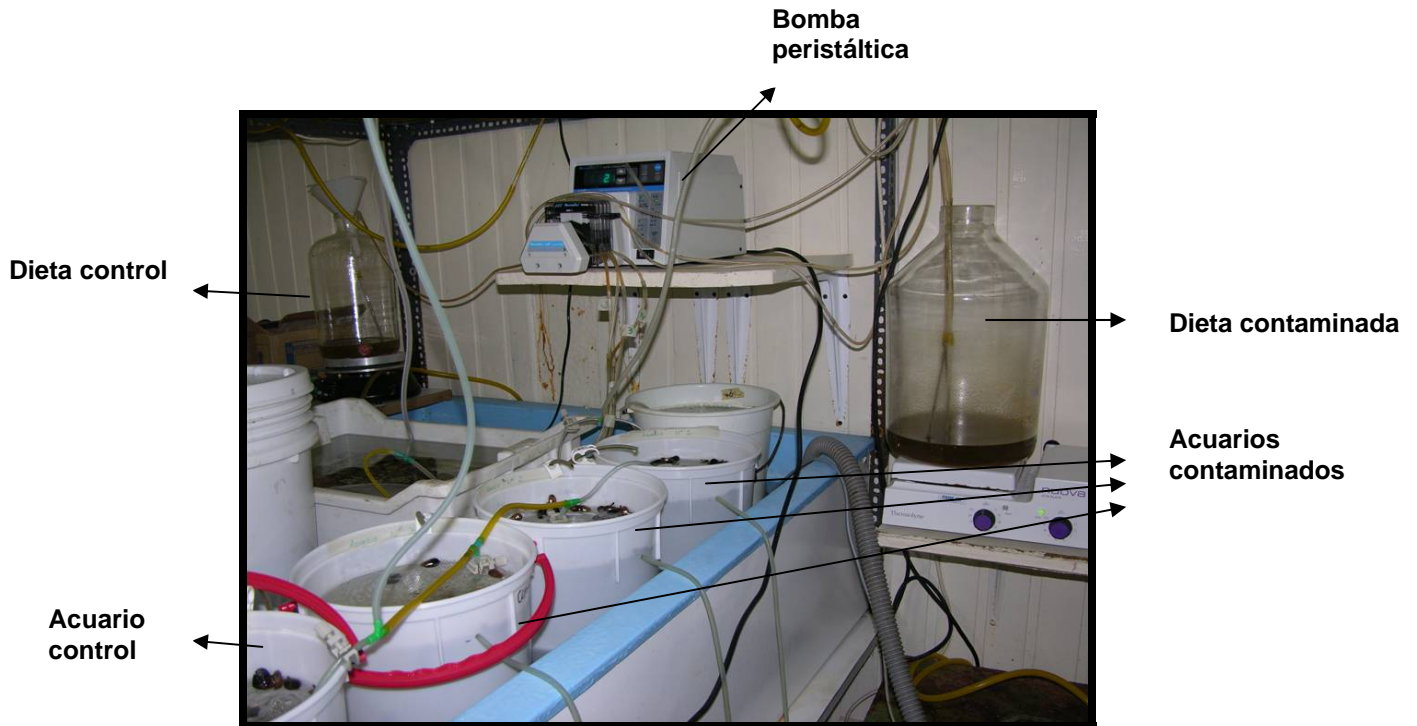


Figura 6. Representación del sistema utilizado en el proceso de intoxicación/detoxificación con VPM de ejemplares juveniles de *Mytilus chilensis*.

3.5 Determinación de la toxicidad en las dietas y en los tejidos de los individuos experimentales.

Para la determinación de la toxicidad de la dieta 1 se obtuvieron muestras del alimento contaminado los días 0, 2, 7, 12 y 18. Las que fueron centrifugadas y mantenidas a -30°C para la posterior extracción de la toxina (Figura 7). En la dieta 2, las muestras del alimento se obtuvieron durante los días 0, 2, 5 y 9.

Para el análisis de la toxina contenida en los tejidos blandos de los bivalvos experimentales de la dieta 1, se retiraron 27 individuos de cada acuario contaminado y el mismo número de choritos desde el acuario control, durante los días 0, 2, 7, 12 y 18 (período de intoxicación). De la misma manera se tomaron muestras de *M. chilensis* durante el proceso de detoxificación los días 20, 23, 28 y 38. En la dieta 2 también se

retiraron 27 individuos de cada uno de los 3 acuarios contaminados, como también de cada acuario control durante los días 0, 2, 5 y 9 (intoxicación); y durante los días 13 y 17 (detoxificación). De estos 27 individuos se obtenía la cantidad de tejido necesaria (5 g peso húmedo) para el análisis de toxina (Figura 8).

La medición de la toxicidad de ambas dietas, como de los tejidos blandos de los individuos experimentales, se realizó mediante un ensayo electrofisiológico, el cual mide el efecto bloqueador directo de las saxitoxinas sobre las corrientes de sodio a través de canales de sodio expresados establemente en una línea celular en cultivo por una técnica de patch clamp (Vélez *et al.*, 2001). El 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. 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 de STX se logra por una curva de calibración que se obtiene con perfusión externa de concentraciones conocidas de STX purificada. En lo que respecta al ensayo electrofisiológico éste ha tenido validez probando extractos ácidos de mariscos, en el cual el contenido de STX había sido determinado previamente por bioensayo de ratón.



Figura 7. Extracción de toxinas por centrifugación.



Figura 8. Recolección de tejido blando de juveniles de *Mytilus chilensis* para análisis de toxinas.

3.6 Mediciones fisiológicas

Los procesos fisiológicos fueron medidos en ejemplares elegidos aleatoriamente desde cada acuario, tanto en los contaminados como en el control. En la dieta 1 se midió la respuesta fisiológica en los días 0, 2, 7, 12 y 18 de la etapa de intoxicación y para la etapa de detoxificación las mediciones fueron realizadas los días 2, 10 y 20. En la dieta 2 los procesos fisiológicos fueron medidos durante los días 0, 2, 5 y 9 para intoxicación y los días 4 y 8 para la etapa de detoxificación. Todas las mediciones se realizaron con agua de mar filtrada a 0.45 μm , a una temperatura de 14°C y salinidad de 30‰.

3.6.1 Tasa de aclaramiento (TA)

La tasa de aclaramiento se define como el volumen de agua liberada de partículas suspendidas, mayores a 4 μm , por unidad de tiempo (Bayne *et al.*, 1985). Se midió en dos individuos de cada acuario mediante un sistema estático en el que se monitorea periódicamente la disminución de la concentración de las partículas en cada acuario experimental (Widdows, 1985); para lo cual se utilizó un contador de partículas Elzone 180XY. Los experimentos se realizaron por un período de 3 a 4 horas con mediciones cada 30 minutos. Además se utilizó un acuario control sin bivalvos tanto para el grupo de acuarios contaminados como para los acuarios conteniendo los ejemplares controles (figura 9).

Para calcular la tasa de aclaramiento (L/h) se utilizó la siguiente ecuación descrita por Coughlan (1969).

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

Donde V = volumen del acuario experimental (L) y C₁ y C₂ = concentración de partículas al comienzo y al final del intervalo de tiempo t (h).

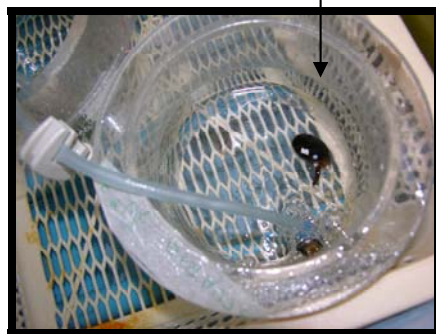
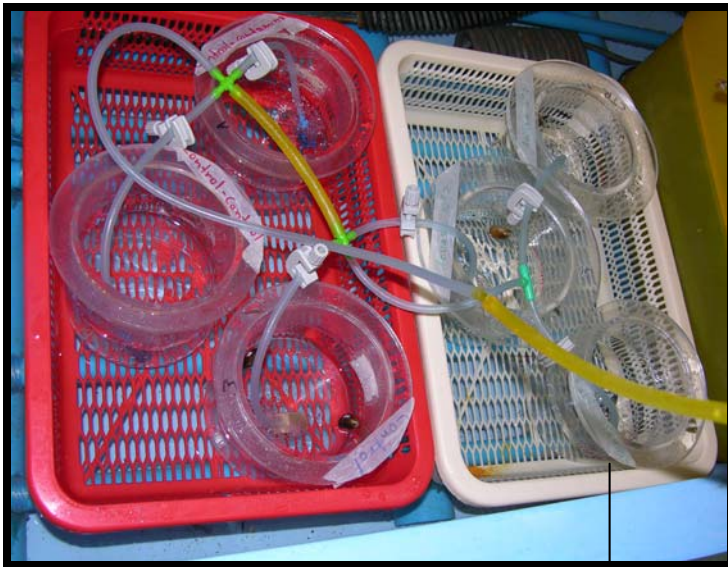


Figura 9. Acuarios experimentales utilizados en la medición de la tasa de aclaramiento durante el proceso de intoxicación/detoxificación y bajo diferentes concentraciones de toxina paralizante.

3.6.2 Tasa de ingestión

Representa la cantidad de material consumido por unidad de tiempo (mg/h). Para calcular la tasa de ingestión total (TIT) se tomaron muestras de cada una de las dietas utilizadas en el experimento y se concentraron en filtros de fibra de vidrio GF/C de 47mm de diámetro y 1.2 µm de poros previamente lavados, quemados y pesados. Luego se lavaron con una solución isotónica de formiato de amonio (3%) para la eliminación de las sales del agua de mar. Se secaron a 100°C por 24 horas y se pesaron para calcular el peso seco total del material particulado. Posteriormente los filtros se quemaron por 3 horas a 450°C y se pesaron nuevamente para estimar el material orgánico particulado. La tasa de ingestión orgánica (TIO) representa la cantidad de material orgánico consumido por unidad de tiempo (mg/h) y al igual que la tasa de ingestión total se calculó según Bayne *et al.*, (1985):

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

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

3.7 Determinación del crecimiento en longitud de la concha en juveniles de *Mytilus chilensis*

En la dieta 1 se midió cada uno de los juveniles de *Mytilus chilensis* en los días 0, 2, 7, 12 y 18 para la etapa de intoxicación y los días 2, 10 y 20 para la etapa de detoxificación, siguiendo de esta manera el crecimiento en longitud de la concha de cada individuo (figura 10).



Figura 10. Medición de longitud de concha de juveniles de *M. chilensis*.

3.8 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos de las respuestas fisiológicas de los juveniles de *Mytilus chilensis* se utilizó el programa estadístico STATISTICA 6.0. Los datos obtenidos para cada variable se sometieron a pruebas de normalidad y homocedasticidad mediante los test de Shapiro-Wilks y test de Levene. En los casos en que los datos resultaron negativos a la normalidad, se transformaron con Ln o raíz cuadrada para luego hacer análisis de varianza a 1 vía (ANOVA) seguido del test a posteriori, Tuckey. En el caso en que no se cumpla la normalidad ó la homocedasticidad se debió utilizar estadística no paramétrica, aplicándose el test de Kruskal-Wallis.

4. Resultados

4.1 Dietas experimentales

La dieta experimental 1 contaminada con 30% del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella*, mostró un promedio de $1,69 \pm 0,35$ mg/ L de peso seco total. Por su parte, la dieta 1 control (conteniendo solo *Isochrysis galbana*) presentó valores promedios de $1,66 \pm 0,40$ mg/ L (tabla 1).

La dieta experimental 2 contaminada con 50% de *A.catenella* tuvo un promedio de $2,54 \pm 0,75$ mg/L y la dieta control 2 uno de $2,42 \pm 0,94$ mg/ L.

En lo que respecta al número de células de *A.catenella*, este varió dependiendo de las proporciones utilizadas para cada tratamiento. La dieta 1 preparada con un 30% de *A.catenella* contenía 101182 cél/L, la dieta 2 preparada con un 50% de *A.catenella* contenía 254004 cél/L.

La proporción de *Isochrysis galbana* también varió para cada dieta utilizada. La dieta contaminada 1 y 2 contenían $28,1 \times 10^6$ cél/L y $25,4 \times 10^6$ cél/L respectivamente. En lo que respecta a la dieta control 1, ésta contenía $44,2 \times 10^6$ cél/L de *Isochrysis galbana* y la dieta 2; $64,5 \times 10^6$ cél/L (tabla 1).

La dieta 1 contaminada presentó $84,72\% \pm 11,71$ de materia orgánica y la dieta 2; $81,40\% \pm 13,03$ de materia orgánica. En el caso de la dieta control 1, esta presentó un valor de $89,77\% \pm 7,23$ y la dieta control 2 valores de $88,03\% \pm 8,44$ de materia orgánica .

La cantidad de saxitoxina equivalente en la dieta 1 fue de 388,5 pmoles/L y en la dieta 2 fue de 975,4 pmoles/L (tabla 1).

Tabla 1: Caracterización de las dietas contaminadas y controles utilizadas durante el proceso de intoxicación/detoxificación y en las mediciones fisiológicas de juveniles de *Mytilus chilensis*.

		Dieta Contaminada			Dieta Control	
			DE			DE
Peso seco total mg/L	1	1,69	0,35	1	1,66	0,40
	2	2,54	0,75	2	2,42	0,94
Peso seco Materia orgánica mg/L	1	1,36	0,49	1	1,37	0,38
	2	2,01	0,82	2	2,02	0,71
Materia orgánica %	1	84,72	11,71	1	89,77	7,23
	2	81,38	13,03	2	88,03	8,44
Numero de células de <i>Alexandrium</i> <i>catenella</i> cél/L	1 (30%)	101182	20827			
	2 (50%)	254004	74927			
Peso seco de <i>Alexandrium</i> <i>catenella</i> mg/L	1 (30%)	0,51	0,10			
	2 (50%)	1,27	0,37			
Número de células de <i>Isochrysis</i> <i>galbana</i> cél/L	1 (50%)	28178158	5800024	1 (80%)	44260885	10725551
	2 (30%)	25465510	7511894	2 (80%)	64547124	25066035
Peso seco de <i>Isochrysis</i> <i>galbana</i> mg/L	1 (50%)	0,84	0,17	1 (80%)	1,33	0,32
	2 (30%)	0,76	0,22	2 (80%)	1,93	0,75
Toxicidad pmoles/L	1	388,5	80,0			
	2	975,4	287,7			

4.2 Dinámica de intoxicación/detoxificación en tejido blando de juveniles de *Mytilus chilensis*.

Los análisis de toxina en los ejemplares alimentados con la dieta 1 (30% de *A.catenella*), muestran que las concentraciones de saxitoxina equivalente acumuladas en sus tejidos, alcanzan niveles críticos para el consumo humano en el día 5 (sobre 80 μg de stx eq. /100gr de tejido). Los niveles de toxina muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el inicio y el final del período de intoxicación (días 0 y 2 versus día 18). También se observan diferencias significativas entre los días 0 (intoxicación) y 2 (detoxificación) (figura 11a). A partir de los siguientes días desde que se alcanzó los niveles críticos para el consumo humano, la concentración de saxitoxina se eleva hasta alcanzar valores máximos el día 18, con un promedio ca. 600 μg STX eq/100 g de tejido.

Los análisis de toxina en la dieta 2 (50% de *A. catenella*), muestran que ya en el día 2 del experimento, los individuos presentaron concentración de toxinas por sobre los niveles críticos para el consumo humano (116 μg STX eq/ 100 g de carne). Los niveles de toxinas no presentan diferencias significativas entre los días de muestreo ($p > 0,05$). El nivel más alto de concentración de toxina se registró el día 9 alcanzando 1235 μg de STX eq/100 g de carne. Posteriormente se aprecia una baja en las concentraciones debido a que a partir del día 10, los ejemplares iniciaron el proceso de detoxificación, donde fueron alimentados durante ocho días con una dieta libre de *A.catenella* (figura 11b). Durante este período de detoxificación solo se redujo la concentración de toxina a niveles cercanos a 700 μg de STX eq/100 g de carne.

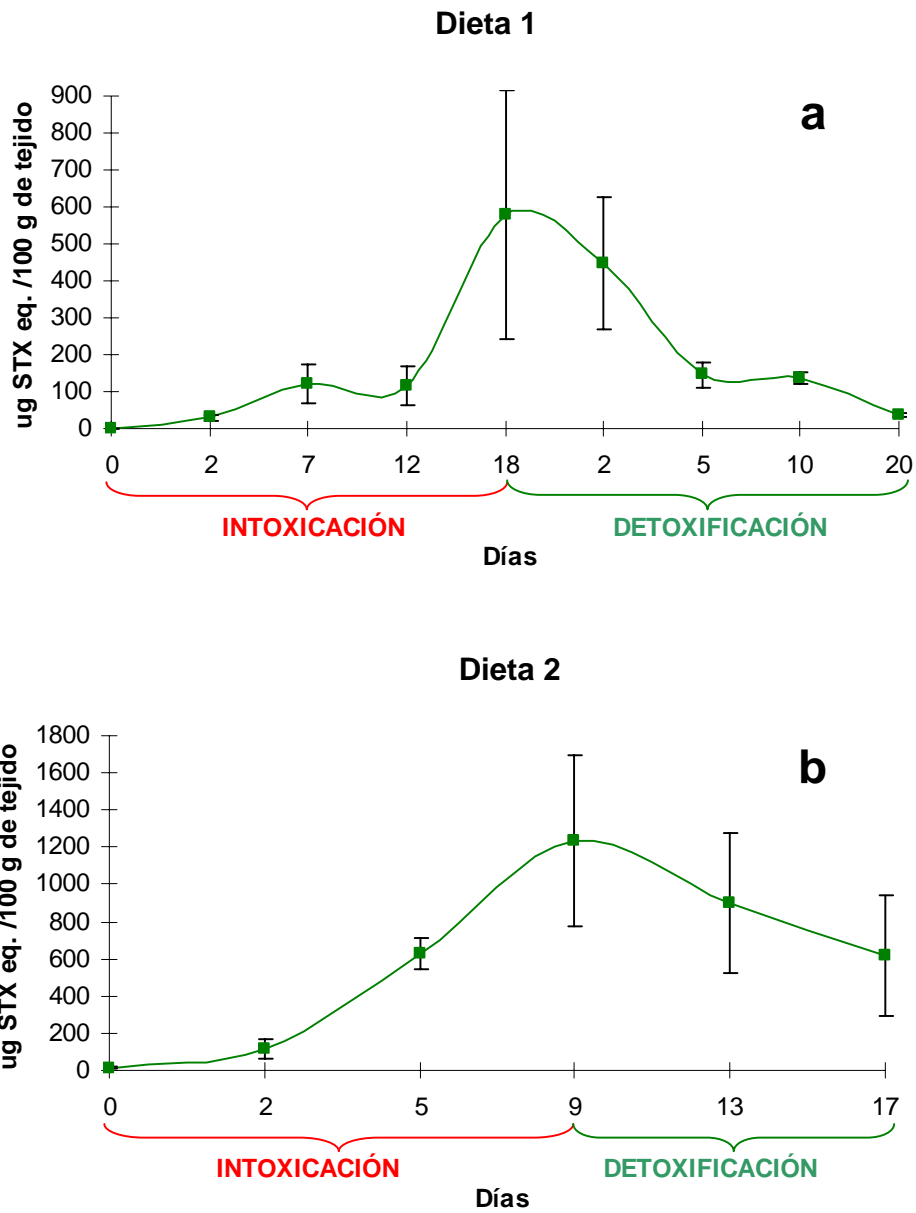


Figura 11. Dinámica de intoxicación y detoxificación de juveniles de *Mytilus chilensis* alimentados con diferentes concentraciones de *Alexandrium catenella* (a = 30% y b = 50%). Los valores representan el promedio \pm el error estándar.

4.3 Mediciones fisiológicas

4.3.1 Tasa de aclaramiento

La tasa de aclaramiento de *Mytilus chilensis* alimentados con la dieta 1 contaminada, muestra que existen diferencias significativas entre los días de muestreo ($p < 0,05$) las cuales se presentan entre los días 0 (intoxicación) y 2 (detoxificación) y entre los días 0 (intoxicación) y 10 (detoxificación). En la dieta 1 control se presentó diferencias significativas ($p < 0,05$), siendo el día 0 diferente a los días 2, 12 y 18, y el día 7 diferente al día 18. También se observaron diferencias significativas durante el período de detoxificación, donde el día 2 fue diferente a los días 10 y 20 (figura 12a).

Entre ejemplares contaminados y ejemplares control, se presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) en los días 2 y 12 (intoxicación) y en el día 2 (detoxificación).

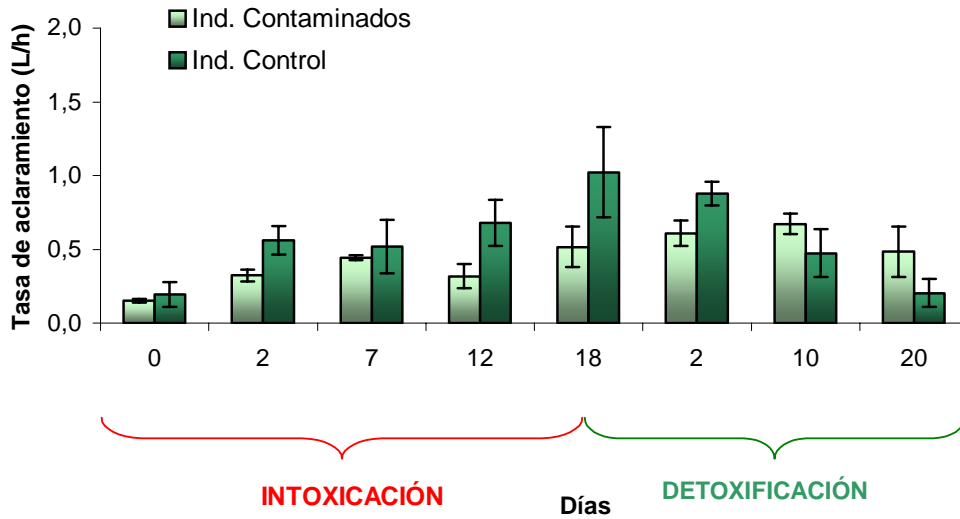
Desde el inicio de los experimentos de intoxicación los ejemplares contaminados con *A.catenella* mostraron valores menores que los individuos control. Durante el período de detoxificación se observó una recuperación de los individuos contaminados, mostrando valores de tasa de aclaramiento incluso más altos que los del grupo control. Se pudo apreciar que hay un aumento de la tasa de aclaramiento en los ejemplares contaminados, hasta alcanzar el valor máximo en el día 28, para mantenerse con valores levemente mayores a los del control hasta el final del período experimental (día 38) (figura 12a).

En los ejemplares contaminados con la dieta 2, la tasa de aclaramiento muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) los días 5 y 9 versus el día 0 (intoxicación); entre los días 4 y 8 (detoxificación). Durante la etapa de detoxificación (día 4), se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) de la tasa de aclaramiento de los individuos

contaminados, que la hace diferente a la que fue medida los días 0, 2, 5 y 9 de la etapa de intoxicación (figura 12b). En los ejemplares control, la tasa de aclaramiento no muestra diferencias significativas ($p < 0,05$). Diferencias significativas en la tasa de aclaramiento entre ejemplares contaminados y controles, sólo se obtuvieron al inicio del experimento, día 0 ($p < 0,05$).

Dieta 1

a



Dieta 2

b

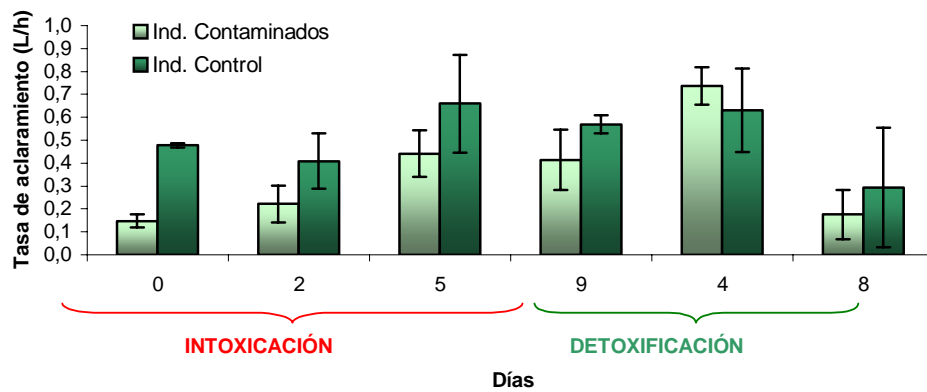


Figura 12: Tasa de aclaramiento durante el proceso de intoxicación y detoxificación en juveniles alimentados con dieta conteniendo diferentes concentraciones de *A.catenella*. Los valores corresponden a promedios \pm desviación estándar.

4.3.2 Tasa de ingestión total y orgánica

Las tasas de ingestión total y orgánica tanto para la dieta 1 como para la 2 en los individuos contaminados muestran el mismo patrón que la tasa de aclaramiento, ya que representan el resultado del producto entre la cantidad de dieta ofrecida (total y orgánica, respectivamente) y la tasa de aclaramiento (figura 13a). De esta forma, las diferencias estadísticas para estos dos procesos fisiológicos son las mismas que las descritas para la tasa de aclaramiento.

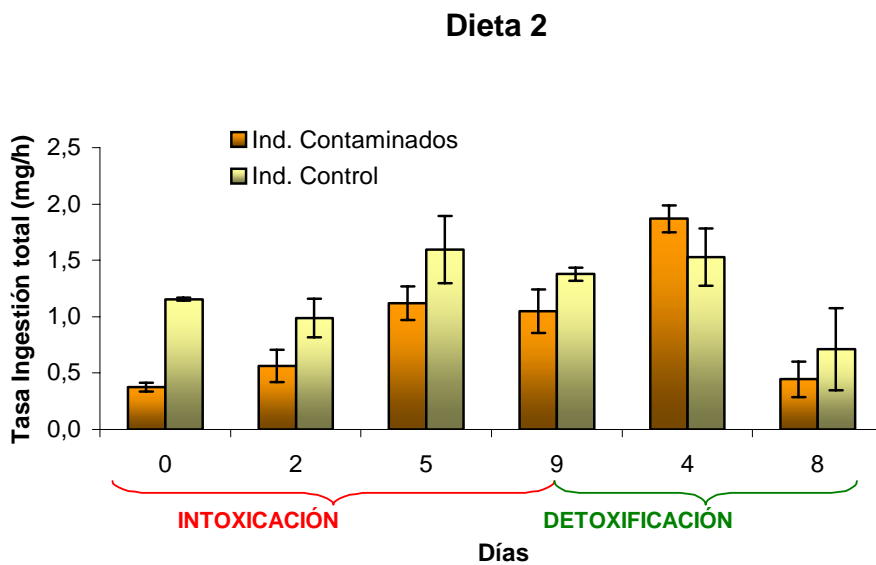
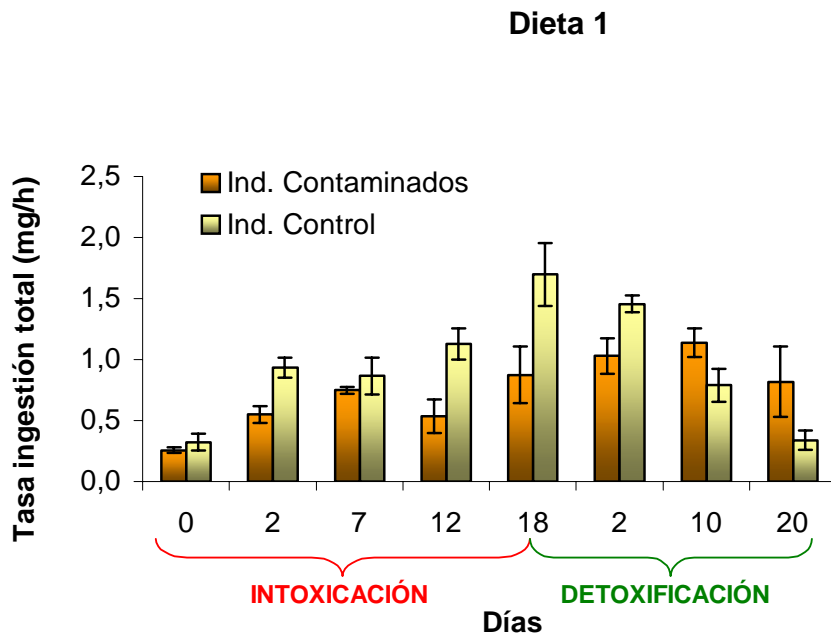


Figura 13: Tasa de ingestión total de *Mytilus chilensis* alimentados con dietas conteniendo diferentes proporciones de *A.catenella*. Los valores representan promedios \pm error estándar.

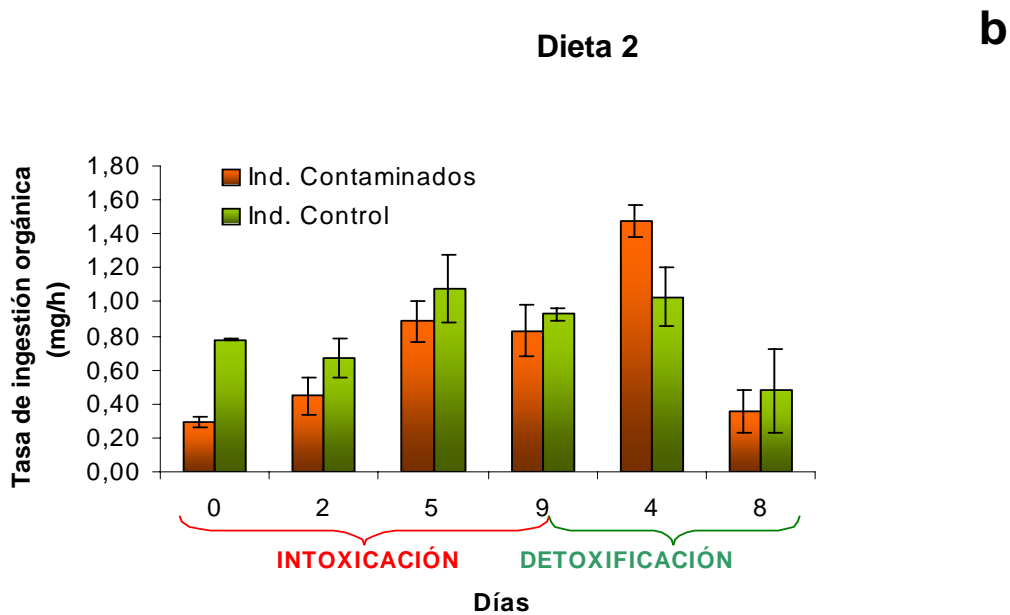
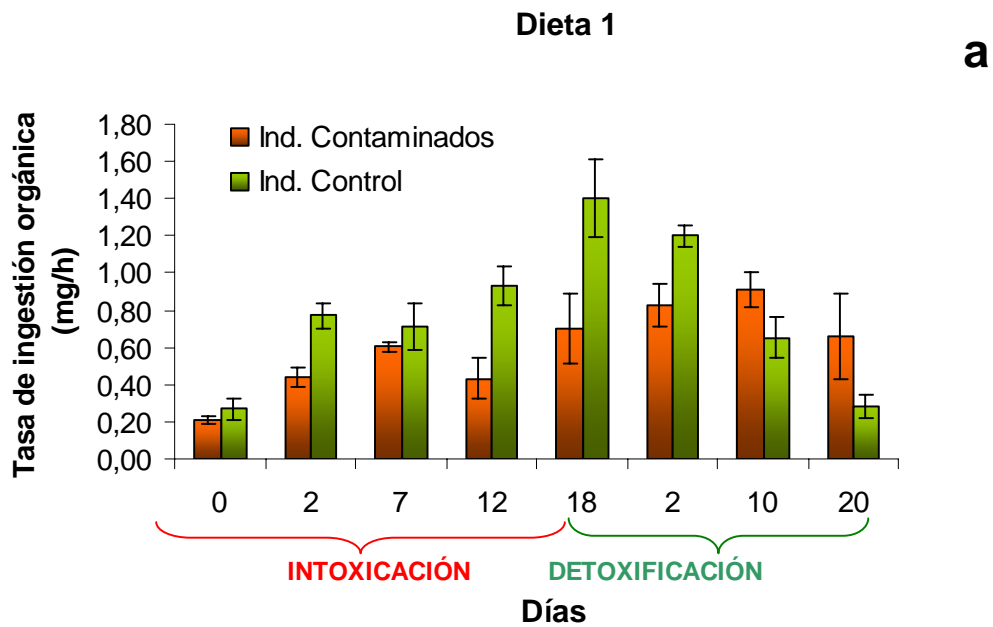


Figura 14: Tasa de ingestión orgánica de juveniles de *Mytilus chilensis* alimentados con diferentes proporciones de *A.catenella*. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar.

4.4 Crecimiento

El crecimiento se cuantificó con la dieta 1, midiendo la longitud de la concha de los individuos contenidos en 4 acuarios; 3 acuarios con los ejemplares contaminados y 1 con ejemplares controles. El crecimiento fluctuó entre 15 y 60 $\mu\text{m}/\text{día}$ (figura 14). En el día 2, se presentó un alto valor inicial en ambos grupos experimentales, para luego continuar con valores levemente menores en el grupo alimentado con el dinoflagelado tóxico *A.catenella* a través de todo el período experimental. En el día 2 del período de detoxificación se observa la mayor diferencia entre el grupo control y contaminado que corresponde al período de transición entre intoxicación y detoxificación (figura 15).

En los promedios finales de crecimiento entre ambos grupos (contaminados y control), se observó que el grupo control presenta una tasa de crecimiento significativamente mayor ($p < 0,05$) que el grupo contaminado, siendo de 27,88 y 22,65 $\mu\text{m}/\text{día}$, respectivamente.

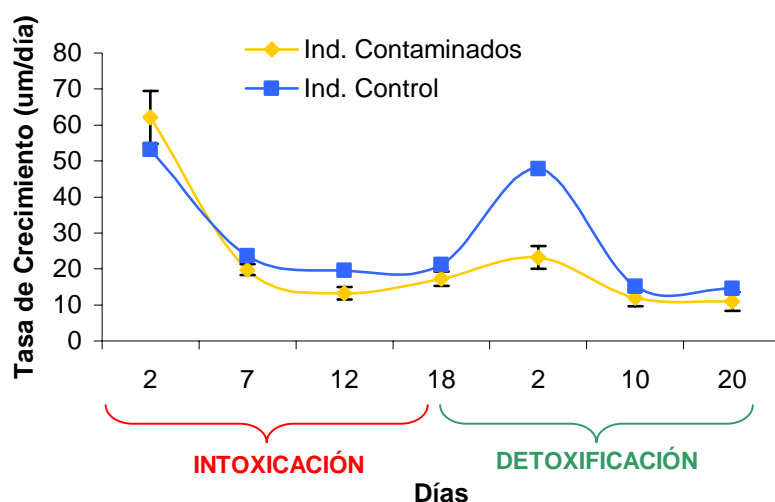


Figura 15: Crecimiento de juveniles de *Mytilus chilensis* durante experimentos de intoxicación y detoxificación alimentados con dieta conteniendo 30% de *A.catenella*.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que juveniles de *Mytilus chilensis*, alimentados con diferentes proporciones de *Alexandrium catenella* en su dieta, son capaces de acumular la toxina paralizante en sus tejidos; no obstante estos valores fueron menores a los registrados en el sector de Faro Mauchil, Quellón, el 18 de Marzo del 2002, donde la toxicidad máxima fue de 8554 μg de STX eq/ 100 g de tejido (Servicio de Salud LLANCHIPAL, Laboratorio de Mareas Rojas, Castro, Chiloé). Esta toxicidad fue producida por una alta concentración natural de *Alexandrium catenella*, que alcanzó a 779000 cél/L (Clement *et al.*, 2002).

En ambas dietas experimentales se observó que los juveniles de *Mytilus chilensis* expuestos a diferentes concentraciones del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella*, acumularon concentraciones de STX superiores a las permitidas por el Servicio de Salud Pública. Se alcanzaron valores máximos para la dieta 1 en el día 18, con una concentración de 600 μg de STX eq / 100 g de tejido. En la dieta 2 la máxima concentración se obtuvo el día 9, la cual llegó a 1235 μg de STX eq/ 100 g de tejido. Estas diferencias se explican por la mayor concentración de células de *A. catenella* que existe en la dieta 2. Estos resultados coinciden con los estudios realizados en el mitílido del hemisferio norte *Mytilus edulis*, donde se demostró que la toxicidad en los tejidos se relaciona fuertemente con la abundancia relativa del dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamarense* en la dieta (Hae- Ok Lee *et al.*, 2001). La toxicidad puede ser diferente dependiendo de las especies de bivalvos marinos, donde además se pueden observar diferentes efectos subletales, tales como disminución en la producción de biso, cierre de valvas, alteraciones en el consumo de oxígeno y en los procesos de alimentación de

las diferentes especies. Nuestros resultados indican que la capacidad de detoxificación es más lenta que la de intoxicación bajo las dos dietas experimentales utilizadas, ya que solo después de 10 o más días de detoxificación se alcanzan valores bajo el máximo permitido por el servicio de salud pública. Cembella *et al.*, (1993), reportaron que las especies *Placopecten magellanicus* y *Spisula solidissima* presentaban diferencias en la acumulación de toxinas debido a una clara diferenciación en la dinámica de intoxicación y detoxificación. De acuerdo a Blanco *et al.* (1997), la disminución de la toxina en los tejidos no es constante en el tiempo, siendo la detoxificación mayor durante el inicio para ir descendiendo lentamente a cero después de varias semanas.

Estudios realizados con el ostión *Patinopecten yessoensis* concluyeron que existe una marcada diferencia individual en la acumulación de la toxina producida por el dinoflagelado tóxico *A. tamarense*, debido a la diferencia en la conducta de alimentación del bivalvo (Sekiguchi *et al.*, 2001). Así como también existen otros estudios realizados en esta misma especie y en *Mytilus edulis* que demostraron gran insensibilidad frente a altas concentraciones de STX. Por el contrario la ostra *Crassostrea virginica* mostró una sensibilidad muy alta con un bloqueo de los impulsos nerviosos, mientras que la almeja *Mya arenaria* tuvo una sensibilidad intermedia. Una explicación de las diferentes respuestas a la presencia de STX se debería a que existen canales de sodio de muy diferente afinidad a la STX (Twarog *et al.*, 1972; Twarog & Yamaguchi, 1974).

Existen estudios donde se ha comparado la resistencia de varias especies de bivalvos a la STX, midiendo el bloqueo del potencial de la acción de los canales de

sodio y se concluyó que *Mytilus edulis* fue la especie más resistente a la toxina. Sin embargo se destacó que la exposición previa de los ejemplares a eventos de marea roja marca la diferencia entre las respuestas medidas sobre los ejemplares estudiados (Twarog *et al.*, 1972). La almeja *Mya arenaria* de áreas expuestas en forma frecuente a eventos naturales de marea roja, son más resistentes a las toxinas del VPM, acumulando estas toxinas a una mayor tasa que las almejas sensitivas de las áreas no expuestas a estos eventos (Bricelj *et al.*, 2005).

El género *Mytilus* es conocido por su relativa insensibilidad a las células tóxicas, lo que resulta en altos niveles de toxicidad a corto plazo (Ichimi *et al.*, 2001). Esto se debe a que no hay una disminución en la tasa de filtración de estos bivalvos en comparación con otros como *Crassostrea gigas* y *Mya arenaria* que alcanzan concentraciones relativamente bajas de toxinas debido a que son altamente sensibles al VPM, mostrando mecanismos que evitan la exposición a las células tóxicas (Blasco *et al.*, 2003).

En el presente estudio se observó que las dietas 1 y 2 contaminadas con distintas proporciones con *Alexandrium catenella* producen un efecto negativo inicial de corto plazo sobre las tasas de aclaramiento, ingestión total y orgánica de juveniles de *Mytilus chilensis*, lo cual es reversible en el tiempo. Estos resultados coinciden con lo obtenido para los ejemplares adultos de esta misma especie de bivalvo alimentados con estas mismas dietas (Navarro *et al.*, 2007). Durante el período de detoxificación con la dieta 1 los individuos contaminados mostraron una recuperación alcanzando valores de tasa de aclaramiento por sobre las del grupo control. En tanto en la dieta 2 se observó una mayor diferencia en los primeros días entre individuos contaminados y

control lo que se explica por la mayor concentración de *Alexandrium catenella* en esta dieta, sin embargo, también se observa una recuperación de los individuos contaminados durante la etapa de detoxificación.

Al igual que el presente estudio, Nielsen & Stromgren (1991) mostraron el impacto que produce el dinoflagelado *Gyrodinium aureolum* sobre la biología de *Mytilus edulis*, donde se aprecia una reducción en la tasa de aclaramiento del bivalvo. En la comparación de la fisiología de ejemplares juveniles de *Ruditapes philippinarum* (almeja) y *Perna viridis* (mejillón), Siu-Chung Li *et al.* (2002) demostraron que la tasa de aclaramiento para la primera especie declinó significativamente con el aumento de la carga de toxina en su dieta producida por el dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamarense*. Para el caso de *Perna viridis*, no tuvo mayor implicancia sobre su tasa de aclaramiento (Siu- Chung Li *et al.*, 2002). Adultos de *Mytilus edulis* alimentados con *G. aureolum* mostraron una declinación en su tasa de aclaramiento después de un corto periodo de exposición (menor a 24 horas) a este dinoflagelado (Widdows *et al.*, 1979).

Estudios realizados en adultos de *Mytilus chilensis* demostraron que la presencia del dinoflagelado *A. catenella* afecta significativamente la tasa de aclaramiento, ingestión total y orgánica en los primeros días de experimento (Navarro *et al.*, 2007). Al igual que en el presente estudio, Navarro *et al.*, (2007) expusieron a los ejemplares adultos a dietas conteniendo diferentes concentraciones de *A. catenella* (10%, 30%, 50% y 100%). En el caso de la alimentación con 50% y 100% de *A. catenella*, estos autores observaron una reacción negativa de *M.chilensis* en los primeros días de experimentos, para lograr posteriormente con ambas dietas igualar la tasa de aclaramiento a la de los acuarios control (en diferentes tiempos, dependiendo de

concentración de *A. catenella*). De acuerdo a sus resultados, estos autores concluyen que la acumulación de la toxina en los tejidos no estaría afectando la actividad de alimentación de esta especie. En lo que respecta al crecimiento de la longitud de las valvas de *M.chilensis*, los individuos contaminados mostraron un menor valor de crecimiento, el que se hace mas diferente al control en el día 20, que corresponde al período de transición entre la etapa de intoxicación y detoxificación. Sin embargo la tasa de crecimiento se iguala entre ambos grupos durante el resto del período de detoxificación. Lo que nos hace concluir que el dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* presente en la dieta de juveniles de *Mytilus chilensis* afecta el crecimiento de esta especie, pero una vez ausente; el bivalvo es capaz de recuperar sus tasas de crecimiento. Estos resultados coinciden con los descritos para *Mytilus edulis*, donde la tasa de crecimiento medida en término del aumento de la longitud de la concha fue reducida después de alimentarlos con algas toxicas (Nielsen & Stromgren, 1991).

Siu- Chung Li *et al.*, (2002), describieron que la tasa de crecimiento de los juveniles de *R. philippinarum* medidas como un aumento del peso del tejido seco sobre un período de 15 días, fueron significativamente mas bajas durante la alimentación con dinoflagelados tóxicos, que las de almejas alimentadas con la diatomea *Thalassiosira pseudonama*. Diferente es la respuesta de los juveniles de *Perna viridis*, los que mostraron similares tasas de crecimiento después de ser alimentados con dinoflagelados tóxicos y diatomeas no toxicas (Siu-Chung Li *et al.*, 2002). Bricelj *et al.*, (1993) indicaron que las tasas de crecimiento del bivalvo *Mytilus edulis* fue inhibida después de 32 días de ser expuestos a dinoflagelados tóxicos. Cuando ejemplares de *Mytilus edulis* se expusieron a algas no tóxicas, tales como *Isochrysis galbana* y

Tetraselmis suecica estas no afectaron la tasa de crecimiento (Nielsen & Stromgren, 1991). También se ha descrito un efecto negativo de la STX sobre otros grupos de invertebrados, como es el caso del gastrópodo *Haliotis midae* de la costa de Sudáfrica, donde la toxina fue acumulada por mas de siete meses, produciendo una disminución de su tasa de crecimiento (Etheridge *et al.*, 2003). Según Nielsen & Stromgren, (1991) la rápida reducción en la tasa de crecimiento encontrada en experimentos realizados en *M. edulis* fue debido a efectos tóxicos en los procesos metabólicos relacionados a crecimiento de la concha y no a la reducción del alimento consumido. Es de importancia reconocer que el crecimiento en longitud de la valva integra diversos procesos fisiológicos y las diferentes toxinas afectan distintos sitios en el organismo del bivalvo, reduciendo la tasa de crecimiento la que esta relacionada con el efecto tóxico, con el cierre de las valvas y la disminución en la filtración.

Cabe señalar entonces la importancia de desarrollar nuevas medidas de control para disminuir la posible transferencia de las toxinas a otros niveles tróficos. Los estudios en bivalvos filtradores han demostrado que son buenas especies para el monitoreo a corto plazo del efecto del veneno paralizante de los mariscos producido por dinoflagelados tóxicos. *Mytilus chilensis* es una especie de importancia ecológica y comercial en nuestro país, su producción se ha expandido exponencialmente en la última década convirtiéndose en la industria de mayor potencial después de los salmones, por ende la importancia de este tipo de estudios relacionados a esta especie.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ávila, M., Seguel, M., Plaza, H., Bustos, E. And Otaíza, R. (1994) Estado de situación y perspectivas de la Acuicultura en Chile. Informe CORFO-IFOP.
- Balech, E. (1995) The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Special Publication. Cork, Ireland, 151 pp.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A. And Widdows, J. (1985) The effects of stress and Pollution on Marine Animals. Praeger, Greenwood Press, 384 pp.
- Blanco, J., Moroño, A., Franco, J., And Reyero, M.I. (1997) PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One and two compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar Ecol Prog Ser.*, 158: 165-175.
- Blasco, B.L., Levasseur, M., Bonneau, E., Gelinás, R. And Packard, T.T. (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.
- Bricelj, V.M., Greene, M. And Cembella, A. (1993) Growth of the blue mussel *M. edulis* on toxic *A. fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells, in: Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier Science, New York, USA, Smayda, T.Y. And Shimizu, Y (eds), pp. 371-376.

- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., MacQuarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A. And Trainer, V.L. (2005) Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increase risk of PSP. *Nature*, 434 (7034): 763-767.
- Cembella, A.D., Shumway, S.E. And Lewis, N.I. (1993) Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the gulf of marine. *Journal of Shellfish Research.*, 12(2): 389-403.
- Clement, A., Aguilera, A. And Fuentes, C. (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.
- Etheridge, S.M., Pitcher, G.C. And Roesler, C.S. (2003) Depuration and transformation of PSP toxins in the South African abalone *Haliotis midae*. Proceedings of the Tenth, International conference for Harmful Algal Blooms.
- Gainey, L.F. And Shumway, S.E. (1988) A compendium of the responses of bivalve mollusc to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research.*, 7(4): 623-628.
- 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.

- Guzmán, L. And Campodónico, I. (1975) Marea roja en la Región de Magallanes. *Publ.Inst.Pat.Ser.Monogr.*, Punta Arenas(Chile) 9:44p.
- Guzmán, L. And Campodónico, I. (1978) Mareas rojas en Chile. *Interciencia.*, 3: 144-151.
- Hernández, J.M. And González, L.E. (1976) Observaciones sobre el comportamiento de mitílidos chilenos en cultivo suspendido. I Chorito (*Mytilus chilensis*), Hupé, 1854. *Inv. Pesq. Chile.*, 22: 1-50.
- Ichimi, K ., Suzuki, T. And Yamasaki, M. (2001) Non-selective retention of PSP toxins by the mussel *Mytilus galloprovincialis* fed with the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*. *Toxicon*, 39: 1917-1921.
- Kwong, R.W., Wang, W.X., Lam, P.K. And Yu, P.K. (2006) The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. *Aquat.Toxicol.* , 80: 82-91.
- Lee, H.O., Jeon, H.J. And Han, M.S. (2001) Paralytic shellfish toxins in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* and the mussel *Mytilus edulis* from Chinhae Bay , Korea in the spring of 1996 and 1997, in: Harmful Algae Blooms, Hallegraef *et al* eds (UNESCO), pp. 348-351.
- Levin, S.A. (1992) The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology.*,73(6) 1943-1967.
- Li, S.C., Wang, W.X. And Hsieh, D.P.H. (2002) Effects of toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Marine Environmental Research.*, 53: 145-160.

- Moroño, A., Fernandez, M.L., Franco, J.M., Martinez, A., Reyero, M.I., Míguez, A., Cacho, E., And Blanco, J. (1998) PSP and DSP detoxification kinetics in mussel, *Mytilus galloprovincialis*: effect of environmental parameters and body weight, in: Harmful Algae, Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. And Wyatt, T eds (UNESCO), pp. 445-448.
- 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. And Jaramillo, R. (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.
- Navarro, J.M. And Gonzales, C.M. (1998) Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture.*, 167:315-327.
- Navarro, J.M., Contreras, A.M., And Chaparro, O.R. (2007) Short-term feeding response of the mussel *Mytilus chilensis* exposed to diets containing the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Revista Chilena de Historia Natural* (en prensa).
- Nielsen, M.V And Stromgren, T. (1991) Shell growth response of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to toxic microalgae. *Marine Biology.*, 108: 263-267.
- Sekiguchi, K., Sato, S., Ogata, T., Kaga, S., And Kodama, M. (2001) Accumulation and depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* fed *Alexandrium tamarense*. *Mar Ecol Prog Ser.*, 220: 213-218

- Shumway, S.E., Cucci, T.L., Newell, R.C. And Yentsch, C.M. (1985) Particle selection ingestion and absorption in filter-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 91:77-92.
- Shumway, S.E. And Cucci, T.L. (1987) The effects of dinoflagellate *Protogaulax tamarensis* on the feeding and behavior of bivalve mollusc. *Aquatic Toxicology.*, 10: 9-27.
- Suarez, B. And Guzmán, L. (1998) Mareas rojas y toxinas marinas, Floraciones de algas nocivas. Editorial Universitaria, 77 pp.
- Taylor, F. J., Fukuyo, Y. And Larsen, J. (1995) Taxonomy of Harmful Dinoflagellates. En: G. M. Allegraef; D. M. Anderson & A. D. Cembella. (Eds). Manual on Harmful marine Micro.
- Twarog, B.M., Hidaka ,T. And Yamaguchi, H. (1972) Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalve mollusc. *Toxicon.*, 10: 273-278
- Twarog,B.M. And Yamaguchi, H. (1974) Resistance to paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs, in: Proceedings of the First International Conference on toxic Dinoflagellate Blooms, Boston-Massachusetts Science and Technology Foundation, Wakefield, M A, pp 382-393.
- Vélez, P., Sierralta, J., Alcayaga, C., Fonseca, M., Loyola, H., Johns, D.C., Tomaselli, G.F. And B.A Suárez-Isla. (2001) A functional assay for paralytic shellfish toxins that uses recombinant sodium channels. *Toxicon.*, 39: 929- 935.

Widdows, J. , Moore,M.N., Lowe, D.M. And Salkeld, P.N. (1979) Some effects of a dinoflagellate bloom (*Gyrodinium aureolum*) on the mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.*, 59: 522-524.

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

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