

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de

Doctora en Ciencias Biológicas

**Toxina Paralizante de Moluscos (TPM) en bivalvos
patagónicos de interés comercial**

Jésica Lis Tobke

Director de Tesis: Dra. Mónica Noemí Gil

Co-director de Tesis: Dra. Erica Giarratano

Laboratorio de Química Ambiental y Ecotoxicología (LAQUIAE)

Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR-CONICET)

Centro Nacional Patagónico, CCT CONICET- CENPAT

-2019-

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer enormemente a la Universidad Nacional del Litoral y específicamente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas que me permitieron realizar mi carrera de Doctorado. Destaco el gran profesionalismo de su secretaría de posgrado, así como también el alto nivel de los expertos encargados del seguimiento y evaluación de cada uno de los doctorandos. Agradezco al CONICET y a los miembros que lo conforman, por haber sugerido que mi persona era idónea para las metas propuestas. Claramente, agradezco a la Sociedad Argentina por financiar durante 5 años mi desarrollo profesional. Nada de esto podría consolidarse en la ausencia del Sistema de Educación Pública y Gratuita que defendemos en la Argentina. Es así como me comprometo, ante la sociedad que le da forma y sustenta a nuestra ciencia, a ser el profesional honesto y dedicado que este país necesita.

Durante los trabajos realizados en mi tesis he atravesado innumerables obstáculos, muy comunes y no tanto para todos los que han enfrentado este nivel académico. Muchas personas realmente valiosas han participado en la superación de los mismos. Muchísimas gracias a Mónica Noemí Gil directora de mi tesis. Ella fue la primera persona que confió en mi y aceptó mi propuesta de trabajo. Me abrió las puertas a su laboratorio y gracias a ella conocí a excelentes personas y profesionales que me acompañaron en el aprendizaje de las toxinas. Agradezco también a mi co-directora Erica Giarratano. No solo agradezco su aceptación de codirección en la recta final, sino también su ayuda personal durante momentos difíciles. Es una compañera excepcional cuyo aliento y reconocimiento me permitió superarme y crecer de forma invaluable.

Muchos profesionales abrieron sus puertas y corazones para aceptarme en su trabajo. En este momento en el que los rememoro y deseo honrarlos, doy cuenta de la gran lista y por tanto de lo afortunada que fui y soy. Conté con el soporte, ayuda y enseñanza de las personas del laboratorio de Salud: Germán Marino, Valeria Willers, Pablo Taibo y Belén Crespo. A cada uno un gigante GRACIAS. Agradezco la colaboración desinteresada de Darío y Agustín del Colegio N°721 de Camarones. A Norma Santinelli, Viviana Sastre y Leilén Gracia Villalobos, gracias por darme incondicionalmente su apoyo y permitirme trabajar con ustedes. A Nora Montoya, que no solo me enseñó excelentemente sobre las TPM sino también me brindó una lección de vida y muchas cosas en las que pensar. A Belén Mattera y Gemita Pizarro por procesar mis muestras y ser el soporte técnico de consulta siempre presente. A Patricia Dell'Arciprete, Julio Lancelotti y Martín Asorey por el apoyo estadístico. A Mauricio Faleschini por el soporte técnico en el laboratorio. Gracias a la paciencia interminable de Miriam Solís. Por supuesto, gracias a Julio Rúa por las excelentes campañas y la gran compañía.

Agradezco infinitamente a Jorge Navarro y a su gran equipo de personas, por su gran ayuda desinteresada y bondadosa. A Alejandro Ortiz, Paola Villanueva Riquelme, Carla Garrido y Victoria Haarmann gracias por su compañía y enseñanza. Tengo hermosos recuerdos junto a ustedes.

A mis compañeras de laboratorio y de equipo Agustina Ferrando, Julieta Sturla, Gabriela Williams, Carmen Marinho y a Maité Latorre. Quisiera hacer un especial agradecimiento a Mariana Serra, mi compañera de trabajo y maestra de la química y el laboratorio. Gracias por escucharme incansablemente y darme consejos de todo tipo.

Todo mi esfuerzo es gracias a mi mamá, Liliana Mazzoni. Le dedico esta tesis a ella, a mi hermana Estefanía y a mis abuelos que me critican desde el “más allá”. Y claro, a mi amorsito y compañero Gastón Arribere.

PUBLICACIONES

De la presente tesis se obtuvo la siguiente publicación.

JL Tobke, G Bigatti, G Soria, M Gil (2017) Ammonium removal during laboratory culture of the Tehuelche Scallop *Aequipecten tehuelchus*. *J Shellfish Res* 36 (3):633-640.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
Resumen.....	3
Summary.....	5
Resumen Gráfico	7
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
Importancia de la acuicultura en la Argentina y la implicancia de las biotoxinas para su desarrollo	8
OBJETIVO GENERAL.....	16
Objetivos Específicos.....	16
CAPÍTULO 1	
Acondicionamiento de bivalvos para la experimentación.....	17
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
Mantenimiento de bivalvos a escala de laboratorio	17
PRIMERA PARTE	
Reducción de amonio en cultivos de laboratorio para el mantenimiento de bivalvos.	19
INTRODUCCIÓN.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
<i>Biofiltro bacteriano</i>	20
<i>Macroalgas marinas como biofiltro</i>	20
<i>Recolección de las vieiras tehuelches</i>	21

<i>Diseño experimental</i>	22
<i>Análisis estadísticos</i>	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES	34
SEGUNDA PARTE	
Eliminación de amonio para el acondicionamiento de bivalvos en Sistemas de Recirculación Cerrada (SRC)	
	35
INTRODUCCIÓN.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
<i>Recolección de mejillones y preparación del experimento</i>	38
<i>Tasa de excreción (TE)</i>	39
<i>Consumo de oxígeno (CnsOD)</i>	41
<i>Relación O:N</i>	42
<i>Acumulación de TAN-N en un sistema cerrado con mejillón</i>	42
<i>Manejo integral de los niveles de compuestos nitrogenados para el mantenimiento de mejillones en SRC</i>	42
<i>Determinaciones químicas</i>	45
<i>Análisis estadísticos</i>	45
RESULTADOS	46
<i>Tasa de excreción del mejillón</i>	46
<i>Acumulación de TAN-N en un sistema cerrado con mejillón</i>	48
<i>Manejo integral para el mantenimiento de mejillones en SRC</i>	48
DISCUSIÓN.....	53

<i>Tasa de excreción del mejillón, consumo de oxígeno y relación O:N</i>	53
<i>Acumulación de TAN-N en un sistema cerrado con mejillón</i>	55
<i>Mantenimiento integral para el mantenimiento de mejillones en SRC.</i>	55
CONCLUSIÓN.....	59

CAPÍTULO 2

TOXINA PARALIZANTE DE MOLUSCOS (TPM). Bivalvos sometidos a procesos de depuración <i>ex situ</i> y experiencias de intoxicación.....	60
--	----

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	60
---------------------------	----

Floraciones Algales Nocivas y TPM	60
---	----

<i>Implicancias ecológicas y sociales</i>	63
---	----

PRIMERA PARTE

TPM en Argentina. Depuración del bivalvo <i>Mytilus platensis</i>	65
---	----

INTRODUCCIÓN.....	65
-------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
---------------------------	----

<i>Experiencias de depuración ex situ (Dex) de mejillones de la costa de Chubut</i>	69
---	----

<i>Seguimiento de la depuración in situ (Din) de mejillones naturalmente intoxicados</i>	70
--	----

<i>Análisis de TPM</i>	70
------------------------------	----

<i>Análisis estadísticos</i>	74
------------------------------------	----

RESULTADOS	75
------------------	----

<i>Depuración ex situ de mejillones naturalmente intoxicados</i>	75
--	----

<i>Seguimiento de la depuración in situ de bivalvos naturalmente intoxicados</i>	79
--	----

<i>Toxicidad y patrones de depuración mediante el uso de HPLC-FLD</i>	79
---	----

<i>Composición tóxica</i>	83
---------------------------------	----

DISCUSIÓN.....	86
<i>Depuración de mejillones naturalmente intoxicados</i>	86
<i>Composición tóxica</i>	89
CONCLUSIÓN.....	93
SEGUNDA PARTE	
Intoxicación de bivalvos alimentados con el dinoflagelado <i>Alexandrium tamarense/catenella</i> ..	94
INTRODUCCIÓN.....	94
MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
<i>Ensayos preliminares de exposición aguda de M. platensis a una dieta tóxica</i>	97
<i>Intoxicación del mejillón M. platensis alimentado con el dinoflagelado A. tamarense/catenella</i>	98
<i>Intoxicación de la vieira tehuelche A. tehuelchus alimentada con el dinoflagelado A. tamarense/catenella</i>	101
<i>Análisis estadísticos</i>	102
RESULTADOS	103
<i>Ensayos preliminares de exposición aguda de M. platensis a una dieta tóxica</i>	103
<i>Intoxicación del mejillón M. platensis alimentado con el dinoflagelado A. tamarense/catenella</i>	104
<i>Intoxicación de la vieira tehuelche A. tehuelchus alimentada con el dinoflagelado A. tamarense/catenella</i>	111
DISCUSIÓN.....	113
<i>Intoxicación de M. platensis alimentado con A. tamarense/catenella</i>	113
<i>Intoxicación de la vieira tehuelche A. tehuelchus alimentada con A. tamarense/catenella</i>	117
CONCLUSIÓN.....	119
TERCERA PARTE	

Aplicabilidad del Quitosano en la depuración de TPM de bivalvos. Intoxicación y depuración de <i>Mytilus chilensis</i> alimentado con <i>Alexandrium catenella</i>	120
INTRODUCCIÓN.....	120
<i>Interacción de la miticultura con el medio ambiente.</i>	121
<i>Quitosano como facilitador en la depuración de TPM de bivalvos</i>	123
MATERIALES Y MÉTODOS.....	127
<i>Sitio de muestreo</i>	127
<i>Recolección y acondicionamiento de mejillones</i>	128
<i>Curva de tallas en relación al peso seco</i>	130
<i>Cálculo de la dieta tóxica, dieta control y concentración de QNO disuelto</i>	131
<i>Intoxicación y acumulación de TPM en mejillones alimentados con A. catenella</i>	132
<i>Experimentos de alimentación</i>	133
<i>Depuración de TPM en mejillón, utilizando QNO como facilitador</i>	136
<i>Análisis de TPM por HPLC-FLD</i>	136
<i>Análisis estadísticos</i>	138
RESULTADOS	139
<i>Fisiología de M. chilensis durante la Intoxicación.</i>	139
<i>Toxicidad y patrones de intoxicación y depuración de mejillones.</i>	142
<i>Toxicidad, concentración y perfil de TPM en el dinoflagelado A. catenella</i>	145
<i>Concentración y perfiles de TPM en mejillones durante la intoxicación y depuración</i>	146
DISCUSIÓN.....	151
<i>Fisiología de intoxicación</i>	151
<i>Toxicidad del mejillón durante la intoxicación y depuración de TPM</i>	152

<i>Toxicidad y perfil tóxico de A. catenella</i>	154
<i>Concentración y perfiles de TPM del mejillón</i>	155
CONCLUSIÓN.....	156

CAPÍTULO 3

Condición de bivalvos de interés comercial. Efectos del mantenimiento de bivalvos en condiciones <i>ex situ</i> sin suministro de alimento	157
--	-----

INTRODUCCIÓN.....	157
-------------------	-----

<i>Indicadores de condición de bivalvos</i>	157
---	-----

<i>Condición de bivalvos mantenidos en Sistemas de Recirculación Cerrados (SRC) sin ofrecimiento de alimento</i>	159
--	-----

MATERIALES Y MÉTODOS.....	161
---------------------------	-----

<i>Mantenimiento de la vieira tehuelche en SRC</i>	161
--	-----

<i>Mantenimiento del mejillón en SRC</i>	162
--	-----

<i>Índices de condición</i>	163
-----------------------------------	-----

<i>Composición bioquímica y análisis de ácidos grasos</i>	163
---	-----

<i>Análisis estadísticos</i>	164
------------------------------------	-----

RESULTADOS	165
------------------	-----

<i>Mantenimiento de la vieira tehuelche en SRC</i>	165
--	-----

<i>Mantenimiento del mejillón en SRC</i>	168
--	-----

DISCUSIÓN.....	174
----------------	-----

<i>Condición de las vieiras</i>	174
---------------------------------------	-----

<i>Condición de los mejillones</i>	175
--	-----

CONCLUSIÓN.....	179
-----------------	-----

CONCLUSIÓN GENERAL	180
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXO 1.....	219

ABREVIATURAS

%ERd: Porcentaje de eficiencia de reducción.

%Rd: Porcentaje de reducción.

%Rep.: Porcentaje de representatividad.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists - Asociación Oficial de Químicos Analíticos.

BR: Bioensayo en Ratón.

CA: Cerro Avanzado.

CAM: Camarones.

CCF: Control de Campo al Final de la depuración.

CCI: Control de Campo Inicial.

CN: Control Negativo.

CNRC-NRC: National Research Council of Canada-Institute for Marine Biosciences - Consejo Nacional de Investigación del Instituto de Biociencias Marinas de Canadá.

CnsOD: Consumo de oxígeno disuelto.

CP: Control Positivo.

DE.: Desvío estándar.

Dex: Depuración *ex situ*.

Din: Depuración *in situ*.

D: Día de experimentación.

EA: Eficiencia de Absorción.

FAN: Floración Algal Nociva.

FD: Fin de la Depuración.

GTX: Gonyautoxinas.

HPLC-FLD: High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection - Cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia.

IC: Índice de Condición.

INIDEP: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.

Inter.: Intermareal.

NS: Nivel de Seguridad para la protección de la salud humana = 800 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$.

pc: Peso Corporal.

PH: Peso Húmedo.

PS: Peso Seco.

QNO: Quitosano.

QR: Quinta Rossi.

RT: Rada Tilly.

SAE: Servicio del Acuario Experimental.

SRC: Sistema de Recirculación Cerrada.

SRCN^o: Experimento realizado con la vieira en un Sistema de Recirculación Cerrada.

STX: Saxitoxinas.

Sub.: Submareal.

TA: Tasa de Aclaramiento.

Tab: Tasa de Absorción.

TAM: Toxina Amnésica de Molusco.

TAN: Total dissolved ammonium nitrogen - amonio disuelto total.

TDM: Toxina Diarreica de Molusco.

TE: Tasa de Excreción.

TEF: Toxicity Equivalency Factor - Factores de Toxicidad Equivalente.

TPM: Toxina Paralizante de Moluscos.

UR: Unidades Ratón.

Resumen

En la provincia del Chubut, la marisquería de bivalvos sostiene un sistema productivo artesanal de gran valor social, enfocado principalmente en la obtención, comercialización y consumo de dos especies, la vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) y el mejillón (*Mytilus platensis*). El mejillón, ha sido el bivalvo modelo de la acuicultura en la región y hasta el día de hoy continúa su producción a mediana escala en el sur de la provincia. La inocuidad de los organismos filtradores se ve amenazada por la presencia estacional y permanencia variable de Floraciones Algales Nocivas (FAN) productoras de toxinas. Los bivalvos, al alimentarse de las microalgas tóxicas, acumulan y biomagnifican el potencial nocivo de las mismas. Entre las biotoxinas que pueden suceder en las costas del mar chubutense, las Toxinas Paralizantes de Moluscos (TPM) significan el mayor riesgo para la salud humana, debido a su potencial letalidad por consumo de bivalvos contaminados. Con el fin de proteger a la población, el Código Alimentario Argentino normalizó el nivel de seguridad (NS) de TPM en organismos en $\leq 800 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ en los tejidos blandos. Este valor es utilizado como base para establecer vedas para la comercialización y consumo de productos marinos, periodos que conllevan un impacto socio-económico no evaluado formalmente hasta el momento. El estudio de las biotoxinas no solo consolida el potencial productivo de nuestra región, sino que también aporta a la comprensión de una temática de preocupación mundial. Hasta el momento no se han hecho en la Argentina estudios en condiciones controladas de laboratorio que permitan dilucidar las principales características de la cinética de las TPM en los bivalvos. Por ello, el objetivo general de esta tesis fue analizar de forma *ex situ*, cualitativa y cuantitativamente la intoxicación y depuración de TPM en bivalvos patagónicos. En primera instancia, se realizaron experimentos para lograr el mantenimiento de bivalvos en condiciones óptimas de cultivo. Se midieron la tasa de excreción del mejillón *M. platensis* y la tasa de acumulación de productos nitrogenados excretados por la vieira y el mejillón en sistemas cerrados. Además, se compararon los métodos de biofiltración por macroalgas (*Undaria pinnatifida* y *Ulva* spp.) y bacterias para la remoción de componentes nitrogenados en acuarios. De tales experimentos se concluyó que para el tipo de sistema de recirculación utilizado para la depuración *ex situ* de TPM en bivalvos, el biofiltro bacteriano responde eficientemente a las demandas de calidad de agua analizadas. Como segunda etapa se evaluaron cualitativa y cuantitativamente las TPM utilizando para ello el método de Bioensayo en Ratón (BR) y el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con derivatización post columna y Detección de Fluorescencia (HPLC-FLD) en bivalvos. A raíz de no detectarse TPM en vieiras durante el desarrollo de la presente tesis, no pudieron realizarse depuraciones con este bivalvo. Se realizaron 3 depuraciones de mejillones (*M. platensis*) naturalmente intoxicados en condiciones *ex situ* sin ofrecimiento de alimento, evitándose la re-intoxicación por ingesta de fitoplancton

nocivo evidenciado en el medio natural. En dos de las depuraciones se observó una reducción exponencial de las TPM en más del 70% respecto a la concentración inicial. Los tiempos y forma de depuración *ex situ* se compararon con la evolución de las TPM de mejillones *in situ* y se registraron los diferentes tiempos de eliminación y metabolización de varios de los análogos constituyentes de las TPM. Por otra parte, se realizó la intoxicación experimental de *M. platensis* alimentado con *Alexandrium tamarense/catenella*, dinoflagelado productor de TPM de las costas del Chubut. Se observó que, a pesar de la baja concentración de exposición, luego de 25 días de intoxicación los mejillones fueron capaces de acumular las toxinas, aunque sin superar el NS utilizando el BR como método de cuantificación. Las biotransformaciones de las toxinas en los tejidos del bivalvo se evaluaron teniendo como referencia el perfil observado en el dinoflagelado. El ensayo fue repetido para la vieira tehuelche de forma exploratoria, considerando solo la toxicidad total. En el estudio de las TPM también se llevó a cabo la evaluación del quitosano como facilitador de la depuración de bivalvos. Para ello, se realizaron experimentos de intoxicación y depuración del mejillón *Mytilus chilensis* alimentado con *Alexandrium catenella* evaluando, además, parámetros fisiológicos relacionados a la asimilación de las microalgas tóxicas. Se concluyó que los mejillones fueron relativamente sensibles a la presencia de *A. catenella* y que, para las condiciones experimentales ensayadas, la presencia de quitosano en el agua de mar no ofrecería mejores condiciones de depuración para los mejillones. Como tercera y última instancia, se evaluó el efecto del mantenimiento *ex situ* sin ofrecimiento de alimento, en la condición y estado de salud de los mejillones (*M. platensis*) y vieiras tehuelche. Utilizando 8 índices de condición, la cuantificación de componentes bioquímicos generales y la composición de ácidos grasos, no se logró reunir suficiente evidencia que indicara un efecto en mejillones consecuente al periodo de inanición. Contrario a ello, las vieiras fueron más sensibles ya que mostraron un consumo de reservas nutricionales. Mediante lo estudiado en la presente tesis se amplió el conocimiento sobre los parámetros de cultivo de bivalvos de la región del Chubut y del país. Se logró contribuir a la comprensión de las TPM, principalmente aquello relativo a su composición en el dinoflagelado tóxico, sus biotransformaciones y acumulación en los tejidos de los bivalvos y la dinámica de depuración en los mismos. Además, se avanzó en la búsqueda de estrategias paliativas ante los periodos prolongados de vedas, tales como la posibilidad de mantener bivalvos de forma *ex situ* y la adición de facilitadores para la depuración.

Summary

The seafood production in Chubut province supports an important artisan fishing activity with crucial social value. The tehuelche scallop (*Aequipecten tehuelchus*) and the blue mussel (*Mytilus platensis*) are the two bivalve species most commercialized and consumed in the local market. The mussels have been cultured over the region and, at present, the production is focused in the south of the province. The seasonal presence and prevalence of Harmful Algae Blooms (HAB) of toxigenic species threaten the seafood safety. Bivalves, by feeding on toxigenic microalgae, accumulate and biomagnify their harmful potential. Among the biotoxins listed in coasts of Chubut, the Paralytic Shellfish Toxins (PST) represent the greatest risk to human health because of their potential lethality by the ingestion of polluted bivalves. In order to ensure human health, the Argentinian Food Code has normalized the PST safety level in $\leq 800 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ of fresh tissue of bivalve. When the toxicity of seafood overcome that level, areas are closed for fishing to prevent commercialization for human consumption. Until now, the resulting socio-economic impact has not been formally evaluated. The study of biotoxins not only reinforces the potential and productivity of the region, but also contributes to the global knowledge of the problematic. So far, studies in controlled laboratory conditions have not been carried out in Argentina elucidating the main characteristics of the PST kinetics in bivalves. Therefore, the central objective of this thesis was to analyze *ex situ*, qualitatively and quantitatively the intoxication and depuration of PST by Patagonian bivalves. Firstly, experiments were carried out to achieve the maintenance of bivalves under optimal culture conditions. The excretion rate of the mussel *M. platensis* and the accumulation rate of excretion products in closed systems with tehuelche scallops and mussels were measured. In addition, biofiltration methods by macroalgae (*Undaria pinnatifida* and *Ulva* spp.) and bacteria were compared. From these experiments, it was concluded that for the type of recirculation system used for the *ex situ* depuration of PST in bivalves, the bacterial biofilter responds more efficiently to the water quality demands analyzed than macroalgae. Secondly, PST was evaluated qualitatively and quantitatively using the Mouse Bioassay (MB) method and the High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (HPLC-FLD) in bivalves. Since PST was not detected in scallops, no depuration experiment could be performed with this bivalve species. Three depurations of naturally intoxicated mussels in *ex situ* conditions and without offering food were done. In two depurations, an exponential reduction of the PST of more than 70% was observed with respect to the initial concentration. During this time, re-intoxication due to the ingestion of harmful phytoplankton evidenced in the natural environment was also avoided. The times and form of *ex situ* depuration were compared with natural dynamics of PST from *in situ* mussels. Furthermore, different elimination and metabolization times of several toxins were described. The intoxication of *M. platensis* fed with *Alexandrium tamarense/catenella*, PST-

producing dinoflagellate from the coasts of Chubut, was also performed. Despite mussels were exposed to low dinoflagellate concentrations, they could accumulate toxins after 25 days of the experiment, without exceeding the safety levels. In this experiment, the biotransformations of toxins in the mussels' tissues were detected by comparing with the toxic profile of dinoflagellates. The assay was repeated with the tehuelche scallop, but considering only the total toxicity. In the PST study, the chitosan was evaluated as a facilitator of bivalve clearance. For this purpose, intoxication and depuration experiments with *Mytilus chilensis* fed with *Alexandrium catenella* were performed, where physiological parameters related to toxigenic microalgae uptake were also studied. The results showed that mussels were relatively sensitive to the presence of *A. catenella* and the chitosan in seawater did not improve the depuration process of bivalves under the experimental conditions assayed. Thirdly and finally, the effect of the *ex situ* maintenance without offering of food was evaluated in the condition and health of mussels (*M. platensis*) and Tehuelche scallops. Eight condition indices, quantification of general biochemical components and fatty acid composition did not reveal an effect of starvation on mussels' condition. Conversely, scallops were more sensitive than mussels since they showed a diminishment of nutritional reserves. This thesis contributes to the knowledge of culture standards of bivalves from Chubut region in particular and Argentina in general. It was possible through this work to contribute to the understanding of the PST produced by *A. tamarense/catenella*, mainly that related to their composition in the dinoflagellate, their biotransformations and accumulation in the tissues of the bivalves, and the dynamics of depuration on them. In addition, progress was made in the search for palliative strategies in the face of prolonged periods of closure, such as the possibility of maintaining bivalves *ex situ* and the addition of enablers such as chitosan for depuration.

Resumen Gráfico

CAPÍTULO 1

Acondicionamiento de bivalvos para la experimentación

Vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*)

Evaluación de diferentes biofiltros para la reducción de TAN-N Acuarios 3 I

* Macroalgas *Ulvaria pinnatifida* *Ulva* spp.

* Biofiltro bacteriano
* Filtración mecánica + *Ulva* spp.

Mejillón (*Mytilus platensis*)

En mejillones de intermareal y submareal Medición de:

- * Tasa de excreción.
- * Tasa de consumo de oxígeno.
- * Cálculo del índice O.N.
- * Tasa de acumulación de TAN-N en sistemas cerrados en intermareal y submareal.

Evaluación integral. Seguimiento de TAN-N y N-(NO₂- + NO₃-) Sistemas de Recirculación Cerrada (SRC) de 300 l

Biofiltración por:

- * *Ulva* spp.
 - * Biofiltro bacteriano
- Seleccionado para las depuraciones

CAPÍTULO 2

Estudio cualitativo y cuantitativo de Toxinas Paralizantes de Moluscos (TPM) en bivalvos patagónicos

Depuración *ex situ* de mejillones naturalmente intoxicados

Depuraciones en SRC sin ofrecimiento de alimento

Dex1 (Rada Tilly - primavera 2015)

Dex2 (Rada Tilly - verano 2016)

Dex3 (Quinta Rossi - primavera 2016)

Concentración y toxicidad de TPM. Perfiles tóxicos.

BR
HPLC-FLD

Seguimiento *in situ* de mejillones intoxicados

Din (Cerro Avanzado - primavera 2016)

Intoxicación experimental con *Alexandrium tamarense/catenella*

Mejillón

Ensayos preliminares

Experimentos de intoxicación en sistemas cerrados con ofrecimiento de alimento diario.

Medición de concentración y toxicidad de TPM
* *Alexandrium tamarense/catenella*
* *M. platensis*

Evaluación del Quitosano como facilitador de la depuración *Mytilus chilensis* alimentado con *Alexandrium catenella*

Intoxicación

Depuración

- * Tasa de aclaramiento
- * Eficiencia de absorción
- * Tasa de absorción
- * Acumulación de TPM (concentración y toxicidad)
- * Reducción de TPM (concentración y toxicidad)

CAPÍTULO 3

Condición de bivalvos

Condición de bivalvos luego de un periodo *ex situ* sin alimento

* Índices de Condición

- C-I: PS tejido blando/PS valvas * 100
- C-II: PH tejido blando/PS valvas * 100
- C-III: PH tejido blando/PH total del bivalvo * 100
- C-IV: PH tejido blando/longitud de las valvas * 100
- C-V: PS tejido blando/longitud de las valvas * 100
- C-VI: PS tejido blando/PS total del animal * 100
- C-VII: PS tejido blando/PH tejido blando * 100
- C-VIII: PS tejido blando/longitud de la valva $\wedge 3 * 100$

* Composición Bioquímica

Carbohidratos
Lípidos
Proteínas
Cenizas

* Ácidos Grasos

Vieira tehuelche Mejillón

SRC1 (Verano 2015)

SRC2 (Otoño 2015)

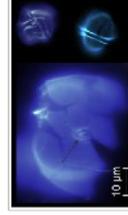
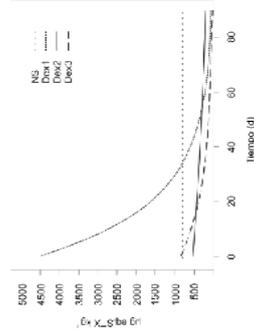
Dex1

Dex2

Dex3

Condición de mejillones en bancos naturales

Playa Los Algueros
Hatchery Camarones
Cerro Avanzado
Rada Tilly
Quinta Rossi



INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia de la acuicultura en la Argentina y la implicancia de las biotoxinas para su desarrollo

Los productos marinos para consumo alimenticio son reconocidos globalmente como de gran calidad nutricional. “A escala mundial existe una tendencia en reconocer que para alcanzar el desarrollo sustentable de los países y sus economías, sobre todo de aquellas basadas en el uso y explotación del ambiente y sus recursos, es necesario alcanzar simultáneamente objetivos de crecimiento económico, sustentabilidad ambiental y equidad” [1]. En ese contexto, la disminución en las capturas de organismos marinos a causa de la sobreexplotación [2], sumado a que la demanda mundial de productos pesqueros va en aumento y ya ha superado los límites de extracción, enfatizan la necesidad de fortalecer el sector de acuicultura para lograr el abastecimiento poblacional [3]. Mundialmente, la acuicultura va cobrando mayor relevancia y se reconoce un ritmo de crecimiento del 10% anual desde 1970 [4]. Entre los productos marinos, los bivalvos son una fuente alimenticia de gran importancia, con una producción mediante cultivo de 14 millones de toneladas por año. Hasta el día de hoy, China se consolida como el mayor productor de bivalvos del mundo (~80% del total) [5-7], aunque su principal destino es el consumo interno [6,7].

Actualmente, 200 mil toneladas de mejillones se comercializan internacionalmente cada año, siendo Chile y España los principales exportadores y responsables de más de la mitad del comercio total [8,6]. Dentro de los bloques importadores de bivalvos producidos en Latinoamérica, Europa es el mercado destinatario más importante de ostras, vieiras y mejillones, absorbiendo 84% de la producción para el año 2005 (Francia 67,6%, Bélgica 8%, España 6,7%, Italia 1,7%). Para ese mismo año, Estados Unidos importaba el 7,4% y Canadá el 3,1% [5]. Para el año 2011 se registra entre los meses de enero y septiembre 48288,73 toneladas netas de mejillones exportadas a la Unión Europea, principalmente mejillones como producto elaborado [9].

En la Argentina, la pesca comprende aproximadamente el 3,3% de las exportaciones totales y continúa incrementándose en los últimos años [10]. En el primer semestre de 2018 registró un aumento del 14,1%. En dicho periodo, las ventas al exterior ascendieron a un total de 978 millones de dólares del cual, el 74% correspondió a crustáceos y moluscos y el 24,5% a pescados frescos y congelados [11]. Estas proporciones varían en relación a años anteriores [12], de acuerdo a la disponibilidad y cotización de los recursos, por ejemplo, la abundancia de langostino [13,10]. Los principales destinos de las exportaciones en los últimos años de pescados frescos y congelados fueron Mercosur (45 millones de dólares), la Unión Europea (41 millones de dólares) y NAFTA (Tratado de Libre Comercio de América del Norte) (38 millones de dólares), mientras que los crustáceos y moluscos fueron exportados principalmente a la Unión Europea (249 millones de

dólares), China (223 millones de dólares), ASEAN (Asociación de Naciones del Sudeste Asiático) (64 millones de dólares) y NAFTA (53 millones de dólares) [11]. Dentro de los moluscos, el único bivalvo exportado corresponde a la vieira patagónica (*Zygochlamys patagonica*), de la cual se han extraído en el pasado hasta 50000 toneladas por año [14]. En el 2017 se registran exportadas ~5418 toneladas en callos, siendo su principal destino Estados Unidos (42% de la producción) [15].

La acuicultura en Argentina es dirigida fundamentalmente a la producción de peces, principalmente el pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (88,53%) [3,16], mientras que la acuicultura de moluscos bivalvos aún se encuentra en una etapa inicial de desarrollo. En los años '90, Zampatti et al. [17] posicionaban a la Argentina como uno de los pocos países latinoamericanos que no tenía desarrollada el área de los cultivos marinos. Sin embargo, en los últimos años, la situación acuícola productiva demuestra signos de crecimiento e importantes avances, sobre todo impulsada por la sobreexplotación y merma de los recursos naturales [18,19]. De esta manera se consolidan estrategias de fortalecimiento reflejadas en la sanción de la ley 27231/2015 que persigue regular, administrar, controlar y fomentar toda actividad relacionada a la acuicultura. A su vez, particularmente en la provincia del Chubut, se presentó recientemente la ley provincial "Política Provincial de Desarrollo Productivo Pesquero y Acuícola" la cual permitiría regular la exploración, explotación, administración y conservación de los recursos pesqueros y acuícolas en aguas de jurisdicción chubutense [20]. Sumado a lo anterior, se consiguió la conformación de un clúster de pesca que tiene como objetivo potenciar el proceso de comercialización, incorporar nuevos eslabones en la cadena productiva y mejorar la competitividad del sector marisquero artesanal de los golfos Nuevo, San José y San Matías [21,12,22-24].

Dentro de las principales especies comerciales de bivalvos en la Argentina, se pueden mencionar el mejillón (*Mytilus platensis* y *Mytilus chilensis*), la vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*), la vieira patagónica (*Z. patagonica*), la cholga (*Aulacomya atra*), la almeja blanca (*Ameghinomya antiqua*), la navaja (*Ensis macha*), la panopea (*Panopea abbreviata*), la ostra plana (*Ostrea puelchana*), la ostra cóncava (*Crassostrea gigas*) y la almeja púrpura (*Amiantis purpurata*) [25,16,14,26-30,2,31-35]. La mayoría de estas especies son obtenidas de bancos naturales. En particular, la vieira tehuelche posee un gran valor económico, no obstante, a causa de la sobre explotación, se reconoce como un recurso en estado crítico [36]. En el año 2015, los relevamientos confirmaban un grave estrés poblacional que conllevó un bajo cupo de captura [12], situación que no ha podido ser revertida hasta el presente. Por otra parte el mejillón, de menor valor comercial que la vieira, ha sido objeto de mayor demanda por parte del sector privado interesado en cultivos [17,35] siendo el principal destino el mercado y consumo internos [28,29,37,16].

Los primeros ensayos de cultivos de mejillón *M. platensis* se realizaron por Trancart entre los años 1976 y 1977 en el golfo San José, provincia del Chubut [38]. A partir de los años '90, a causa del decaimiento de poblaciones naturales, se refuerza la producción de mejillón por cultivo. Ello permitió incrementar la producción total, además de renovar parcialmente el recurso natural [30,38,25]. Actualmente, se reconocen 19 sitios de la Patagonia en donde se desarrollan o se han desarrollado cultivos marinos. Entre estos sitios se destacan los cultivos de mejillones (*M. chilensis*) de inversión privada en Puerto Almanza (Tierra del Fuego) y 3 criaderos (hatcheries) de moluscos: el Criadero Patagónico de Especies Marinas (CRIAR-IBMPAS) en Las Grutas (San Antonio Oeste, Río Negro) [39], el Colegio 721 "Caleta Horno" en Bahía Camarones (Chubut) y el Criadero de Peces y Moluscos de Aguas Frías (Agencia Comodoro Conocimiento) en Comodoro Rivadavia (Chubut) [28,29,40,41]. Además, el criadero "Caleta Horno" incluye una planta de procesamiento de bivalvos habilitada por SENASA (Comunicación Personal Cesar Gentile, Coordinador de la Red de Fortalecimiento para la Maricultura Costera Patagónica).

La productividad de los bivalvos varía con los años y según los sitios [12]. Los cultivos australes generan los mayores volúmenes de producción, con registro promedio de 17 toneladas entre los años 2003 y 2009 y un máximo de 33,3 toneladas en el año 2007 [37]. Para el año 2015, se registró una producción de 16 toneladas de mejillón (*M. platensis* y *M. chilensis*) y cholga por acuicultura, principalmente en la costa de Tierra del Fuego [16]. Lamentablemente, no existen cifras certeras de la productividad de la provincia del Chubut ya que las estadísticas oficiales del Ministerio de Agroindustria de la Nación no tienen continuidad y, en general, no representan los volúmenes capturados, especialmente al tratarse de la producción por acuicultura artesanal [12].

Los pescadores artesanales del país mejor organizados son los de Puerto Madryn (provincia del Chubut), habiendo constituido la Asociación de Pescadores Artesanales de Puerto Madryn (APAPM). Cada vez más, la presión de los mercados fomenta la competencia, dando importancia a las aptitudes de quienes realizan la captura, procesamiento y comercialización. El primer Encuentro de Pescadores Artesanales de Chubut se llevó a cabo en Puerto Madryn en 1999, reuniendo a 35 participantes incluyendo recolectores costeros, pescadores con red desde la playa y buzos comerciales, además de personal científico [42]. Desde entonces se han hecho esfuerzos desde diferentes sectores (gobierno municipal, científicos, universidades y organizaciones no gubernamentales) para acompañar a esta organización, necesaria para la sustentabilidad de las pesquerías artesanales locales [43]. A pesar de los avances en su consolidación, este sector enfrenta una serie de problemáticas, como ser el peligro social por la falta de planificación para el futuro de los grupos, la ausencia general de seguridad social, la inequitativa y poco clara asistencia social por parte del estado, la falta de políticas educativas específicas y las necesidades básicas insatisfechas [31]. Además, la situación se ve agravada por la pesca furtiva,

que pone en riesgo la sustentabilidad de la actividad y la salud pública de los consumidores a causa de la ausencia de controles sanitarios [12,44,19].

La producción acuícola en sistemas emplazados en el mar, como los utilizados actualmente en la Argentina, depende de la calidad del agua y su inocuidad. En la costa atlántica, la extracción del recurso se ve restringida por la presencia estacional de biotoxinas, las cuales pueden ser acumuladas por los bivalvos filtradores y alcanzar concentraciones insalubres para su consumo. Esta condición afecta particularmente a los sectores marisqueros artesanales quienes deben suspender la extracción, el consumo y la comercialización de sus productos por tiempos impredecibles [45]. Las vedas en la actividad extractiva afectan a varias especies, se registran en diferentes partes del país y su permanencia incluso puede extenderse durante años [46,47,37,12,48]. Ya que no existen estrategias paliativas por parte del estado, la situación se torna preocupante para el sector marisquero [37,19]. Gracia Villalobos [19] señala que la presencia de biotoxinas por encima del límite permitido para consumo, durante varios meses del año, puede afectar gravemente a una pesquería. La autora enfatiza la necesidad de evaluar el impacto socio-económico del evento sobre la actividad marisquera y ratifica la ausencia de un cálculo formal y serio de las pérdidas económicas por cierre de extracción o eliminación de lotes completos por detección de toxinas.

En Argentina, se distinguen 3 tipos de biotoxinas producidas por diferentes organismos fitoplanctónicos, nombradas a partir de sus efectos nocivos en mamíferos: la Toxina Amnésica de Moluscos (TAM) [19,49], la Toxina Diarreica de Moluscos (TDM) [50] y la Toxina Paralizante de Moluscos (TPM) [51]. Entre ellas, las TPM son de preocupación global ya que se percibe un aumento en intensidad, duración y expansión de las áreas afectadas por los eventos tóxicos [52-57]. Tienen un potencial letal y son reconocidas mundialmente como las responsables de la mayoría de las fatalidades humanas asociadas a intoxicación por biotoxinas [58], no siendo menos importante su peligrosidad para la fauna [59-64]. De acuerdo al riesgo que implica la presencia de estas toxinas, el gobierno nacional, a través del Artículo 275 tris del Código Alimentario Argentino, normalizó el nivel de TPM en organismos en $\leq 800 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ en los tejidos blandos enteros o partes comestibles por separado [65].

Durante los últimos años, las investigaciones realizadas en el país sobre TPM y otras biotoxinas, han comenzado a recibir mayor atención [66,19,67,49,68,69]. A pesar de ello, no existe claridad en la frecuencia e intensidad de los eventos nocivos [70] y se posee poca información sobre las variaciones de los perfiles tóxicos desde el organismo causativo a los diferentes consumidores en la cadena trófica [19]. Tampoco se han reportado en la bibliografía científica experiencias de laboratorio que permitan avanzar en la comprensión de la cinética de captación y eliminación de las toxinas por parte de los bivalvos u otros vectores en la zona costera del país. En general, la dinámica de depuración de bivalvos naturalmente intoxicados con TPM es poco conocida [71].

Tal como la perspectiva de fomento en acuicultura promulga, los pocos centros de cultivo existentes en la actualidad deben ser apoyados para su crecimiento y consolidación en un mercado nacional e internacional, por lo que el conocimiento del recurso debe ser el sustento de su estructura. En el marco del Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación “Argentina Innovadora 2020”, el Núcleo Socio Productivo Estratégico (NSPE) “Producción y Procesamiento de Recursos Oceánicos” destaca la ausencia de desarrollos tecnológicos locales vinculados a la acuicultura y la necesidad de una adecuada gestión ambiental que incluya, entre otros, aspectos sanitarios relativos a las biotoxinas [72]. A raíz de ello, el desarrollo de la temática puede ser focalizado en el conocimiento de las TPM tanto en fitoplancton como en diferentes organismos consumidores. Además, se debe perseguir como meta la determinación de la tasa de eliminación de toxinas para reducir al máximo el período de veda, la predicción de la dinámica de biotoxinas y el desarrollo de estrategias paliativas o de remediación durante un evento tóxico [73]. Incluso, debe considerarse la aplicación de nuevas tecnologías de detección temprana y cuantificación de toxinas y el estudio de diversos métodos para su eliminación en bivalvos [74].

El género *Mytilus* comprende un grupo de especies que se distribuyen en el mar argentino, ocupando una gran variedad de ambientes, tanto del intermareal como del submareal [75] apud [18] [76-78]. Estos bivalvos presentan gran plasticidad fenotípica [79,80], lo que les permite adecuarse a un amplio rango de condiciones ambientales. Por lo tanto, debido a que su recolección y mantenimiento resultan relativamente sencillos y económicos, los mejillones son idóneos para el estudio a escala de laboratorio. Además de ser el grupo cultivado por excelencia en Argentina, han sido utilizados ampliamente para la detección temprana de biotoxinas en la costa del Chubut [19]. Por otra parte, la vieira tehuelche como recurso de gran importancia socio-económica para la región [36], se ve afectada no solo por la merma de las poblaciones sino también por la presencia de las biotoxinas. Es por ello que es particularmente significativo el desarrollo de investigaciones dirigidas a explorar mejores condiciones para el cultivo y aprovechamiento de esta especie.

El estudio de las biotoxinas no solo contribuye a consolidar el potencial productivo de nuestra región, sino que también aporta a la comprensión de una temática de preocupación mundial. La información desprendida a escala de laboratorio puede ser replicada con otras especies y regiones, para optimizar el proceso de la depuración de biotoxinas. Este tipo de estudios experimentales requiere del mantenimiento de los organismos de forma que se asegure su buen estado de salud, tanto en relación a la presencia de sustancias potencialmente tóxicas como en aspectos nutricionales. En particular, debe considerarse que los productos metabólicos como las excreciones nitrogenadas, pueden acumularse cuando se utilizan sistemas cerrados y alcanzar concentraciones que resulten tóxicas para los bivalvos allí mantenidos [81] apud [82] [83-86,82,87,88]. La aplicación en los acuarios de algún tipo de biofiltración permite controlar tales

riesgos, con una eficiencia y desempeño que dependerá tanto de las características del sistema como de los organismos en mantenimiento [84]. De allí la importancia de ajustar los parámetros de calidad de agua para cada caso en particular. Por otro lado, conocer la condición de los organismos al finalizar el periodo de experimentación también es importante como parte de la evaluación del método utilizado, ya que permite detectar el posible decaimiento, indicativo de la respuesta a una situación estresante [89]. El estado de salud o condición de los bivalvos está vinculado a una gran variedad de factores [90]. Entre ellos, los periodos de inanición pueden provocar cambios en la constitución del organismo dependientes de las demandas metabólicas [91] y consecuente consumo diferencial de las reservas [92]. Este es un aspecto a considerar ya que, de acuerdo a los objetivos de experimentación, los organismos podrán ser alimentados o no [91,93-99].

La presente tesis se focaliza principalmente en el estudio de la depuración *ex situ* de bivalvos patagónicos intoxicados naturalmente con TPM, teniendo en cuenta no solo las condiciones de mantenimiento en acuarios, sino también sus implicancias en la condición de los organismos. Siendo la vieira tehuelche y el mejillón las dos especies de mayor importancia marisquera y desarrollo en la acuicultura, el esfuerzo de experimentación se orientó a estos dos bivalvos. Aun cuando no fue factible estudiar la depuración de vieiras por ausencia de intoxicaciones naturales durante el período de desarrollo de esta tesis, la experimentación relativa a su mantenimiento en acuarios igualmente se llevó adelante. De esta manera, futuras investigaciones de depuración *ex situ* asociadas a esta especie contarán con la información de base para su desarrollo. En esta tesis también se realizaron experiencias de intoxicación en laboratorio, como etapa preliminar para futuros estudios que permitan optimizar la comprensión de las cinéticas de depuración de estas especies e iniciar la búsqueda de estrategias mejoradas de depuración. En ese marco, se presentan los primeros resultados sobre intoxicación-depuración en laboratorio, con la introducción de un facilitador químico en la etapa de depuración.

Según lo expuesto, y con el fin de dar respuesta a los objetivos planteados, se desarrollaron 3 capítulos divididos en partes. En el primer capítulo se aborda el mantenimiento de bivalvos *ex situ* en sistemas de recirculación cerrada. Para ello se evaluaron diferentes parámetros del agua de mar que permitieron establecer las condiciones deseadas para mantener los organismos durante su cautividad. La primera parte aborda la evaluación de diferentes tipos de biofiltros para optimizar la calidad de agua utilizando la vieira tehuelche como bivalvo de experimentación. En la segunda parte, se escala la aplicación de los resultados obtenidos a un sistema de recirculación de mayor volumen y con mejillones, a fin de establecer el mejor mecanismo de biofiltración para el proceso de depuración. En el segundo capítulo, se evalúa la depuración e intoxicación de TPM en bivalvos patagónicos. La primera parte se enfoca en el proceso de depuración *ex situ* de mejillones *M.*

platensis naturalmente intoxicados. La segunda parte corresponde al estudio de la intoxicación por TPM del mejillón alimentado con el dinoflagelado tóxico, siendo las primeras experiencias de este tipo que se realizan a escala de laboratorio en nuestro país. También se presentan los resultados de los primeros experimentos de intoxicación de la vieira tehuelche. La tercera parte explora un ciclo de intoxicación-depuración en laboratorio, donde se investiga el potencial del quitosano como facilitador de depuración en el mejillón *M. chilensis*. En el tercer y último capítulo se evalúan los efectos del mantenimiento y depuración *ex situ* en el estado de salud del mejillón *M. platensis*, así como del mantenimiento en acuarios de la vieira. Se utilizaron para ello diversos indicadores de condición. Estos indicadores también fueron determinados en organismos de bancos naturales para evaluar la variación natural del estado de salud de las poblaciones bajo estudio.

A continuación, se presenta un mapa general de la Patagonia en donde se señalan los diferentes sitios vinculados y mencionados en el desarrollo de la presente tesis.

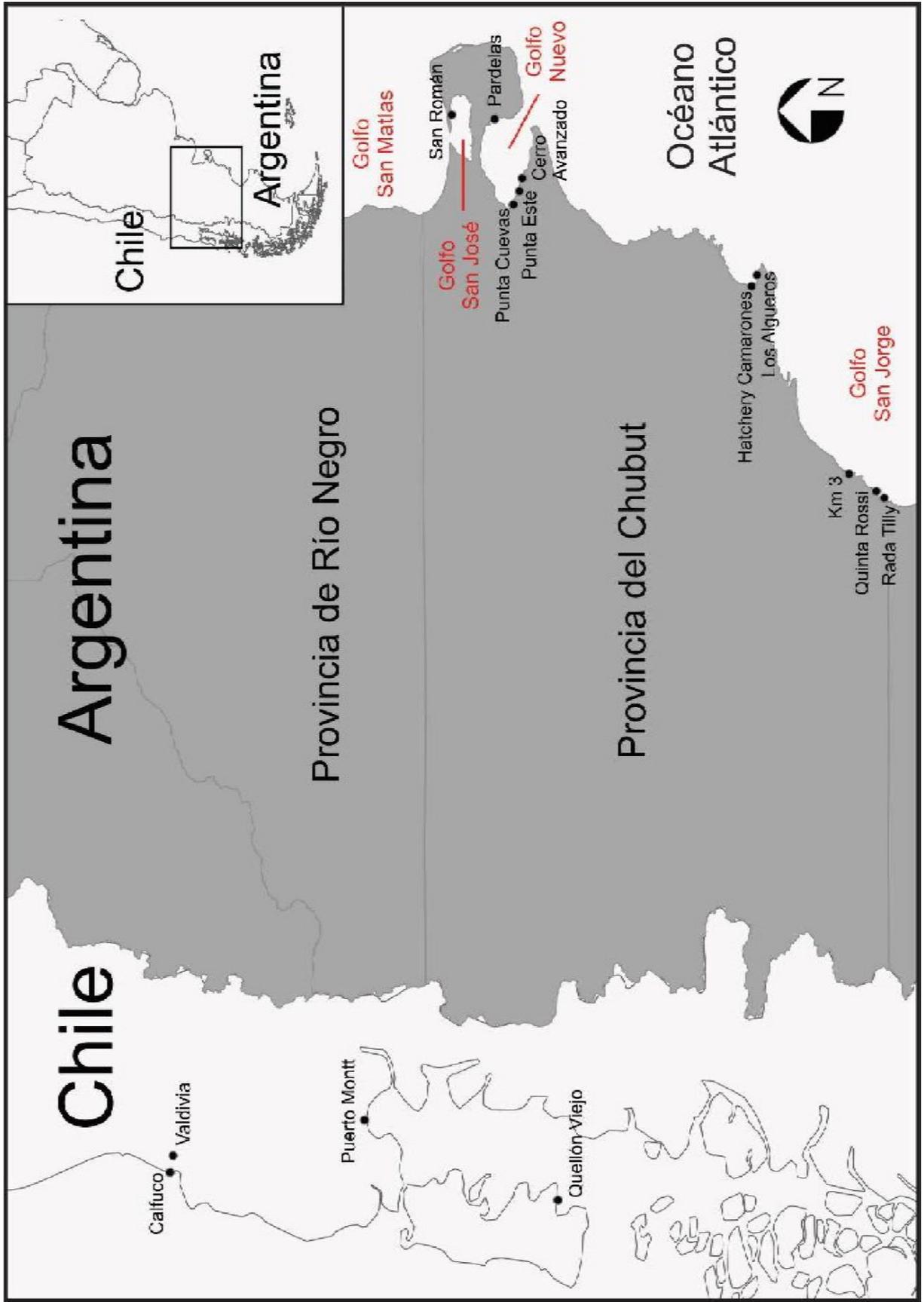


Figura 1. Mapa de la Patagonia con los diferentes sitios vinculados y mencionados en el desarrollo de la presente tesis.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar cuantitativa y cualitativamente las Toxinas Paralizantes de Moluscos (TPM) durante la intoxicación y depuración de bivalvos patagónicos y comparar métodos experimentales de depuración *ex situ*.

Objetivos Específicos

1. Diseñar y estabilizar un sistema de recirculación cerrada para mantenimiento de bivalvos comparando diferentes alternativas de biofiltración.
2. Realizar experiencias de depuración *ex situ* de mejillones en acuarios con agua de mar filtrada, durante diferentes eventos de TPM.
3. Realizar el seguimiento de una depuración natural de mejillones *in situ*.
4. Evaluar posibles diferencias en la dinámica de depuración de TPM entre diferentes momentos de floración algal.
5. Realizar experiencias de intoxicación de mejillones alimentados con fitoplancton tóxico.
6. Realizar experiencias de depuración en acuarios en agua de mar filtrada con el agregado de quitosano.
7. Evaluar la influencia del método de depuración *ex situ* sobre el estado de salud del mejillón a través de indicadores de condición.
8. Evaluar la condición, la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos en mejillones de bancos naturales de la costa de Chubut.

CAPÍTULO 1

Acondicionamiento de bivalvos para la experimentación

INTRODUCCIÓN GENERAL

Mantenimiento de bivalvos a escala de laboratorio

Las investigaciones sobre fisiología, nutrición, toxicología y reproducción de bivalvos a escala de laboratorio requieren a menudo un mantenimiento prolongado de los organismos en sistemas de acuarios relativamente pequeños, con poco o ningún intercambio de agua. Es así como, la calidad del agua de mar es uno de los aspectos más importantes a considerar en dicho tipo de experiencias, así como en las desarrolladas en el marco de esta tesis.

Durante el mantenimiento de organismos vivos, los sistemas cerrados pueden acumular subproductos metabólicos tóxicos o potencialmente tóxicos, entre los cuales el amoníaco (NH_3) y el dióxido de carbono (CO_2) son los más significativos. Sin embargo, en general la acidificación del agua de mar implica un proceso de largo plazo, debido a que la presencia de carbonatos ejerce un efecto de amortiguamiento. La sensibilidad de los organismos a la acidificación depende de la talla, momento del ciclo de vida, historia de exposición natural a variaciones de CO_2 , entre otros factores [100-102]. En particular, los bivalvos son tolerantes a la acidificación por CO_2 , producto de su propia respiración [103,102]. Los efectos negativos reportados se describen a concentraciones muy altas (~2000 - 4000 ppm), con reducciones de pH de ~0,7 y con tiempos de exposición de varios días (en algunos casos a partir de ~80 días) [100,104,103]. Incluso, Lee et al. [102] documentaron efectos subletales a un pH por debajo de 6,5 y efectos letales a un pH de 5,4 para un tiempo de exposición de 96 h (LpH50 96 h).

El producto metabólico excretado en mayor proporción por los bivalvos es el amonio disuelto total (TAN por su sigla en inglés Total dissolved Ammonium Nitrogen) [105]. El mismo puede representar un riesgo para los organismos al acumularse, incluso durante exposiciones de corta duración [81] apud [82] [83-86]. El TAN es la suma de dos formas químicas, amonio ionizado (NH_4^+) y amonio desionizado o amoníaco (NH_3), cuyo equilibrio dinámico depende principalmente del pH, la temperatura y la salinidad. La constante de disociación del NH_4^+ (pK) en agua de mar es igual a 9,5 a 25°C por lo que a un pH de 8,1, el 95% de TAN está presente como NH_4^+ y 5% como NH_3 [106]. En general, al pH del agua de mar (7,9-8,2; [107]) la especie NH_4^+ está presente en una proporción alta, mientras que la especie NH_3 , que es la forma más tóxica, permanece en

niveles bajos [83,108,86]. La toxicidad del NH_3 radica en su gran capacidad de difusión a través de la membrana celular, por su mayor afinidad lipofílica [109] apud [82], mientras que el NH_4^+ es mayormente hidrosoluble y es la forma en que los bivalvos excretan el nitrógeno. Los efectos tóxicos pueden ser diversos, principalmente en el transporte de oxígeno a los tejidos, que incluye daños tisulares (branquias), menor capacidad de transporte de fluidos sanguíneos a consecuencia de cambios en el pH, incremento en la demanda de oxígeno y daños histológicos a las células de transporte [81] apud [82].

La concentración de TAN debe ser controlada correctamente durante un experimento a fin de evitar una errónea interpretación de los resultados. Esto incluye la aclimatación necesaria de los organismos experimentales durante un tiempo que puede variar desde unos pocos días hasta varias semanas. En dicho período, los bivalvos suelen ser mantenidos en altas densidades en sistemas cerrados, lo que aumenta el riesgo de acumulación de TAN [110-113]. El suministro de alimento es otro de los factores que afecta la concentración a lo largo del tiempo [91,93-95]. En cuyo caso, la experimentación sin ofrecimiento de alimento, reduce el riesgo de acumulación. Esta última estrategia ha sido aplicada en varios estudios de crecimiento y capacidad de mantenimiento celular [96], depuración de fitotoxinas [97], estudios metabólicos y toxicológicos [91,98], depuración bacteriológica [99] y experimentos fisiológicos de exposición a TAN [114].

El objetivo del presente capítulo es encontrar las condiciones óptimas para el mantenimiento de bivalvos en acuarios, enfatizando el control de los niveles de TAN. En la primera parte, utilizando a la vieira tehuelche como bivalvo modelo, se exploran diversas metodologías de reducción de TAN. En la segunda parte, se presenta una aplicación de tales metodologías en una escala mayor, en sistemas de recirculación cerrada, manteniendo mejillones (*M. platensis*) en densidades medias.

PRIMERA PARTE

Reducción de amonio en cultivos de laboratorio para el mantenimiento de bivalvos.

INTRODUCCIÓN

En acuarios cerrados destinados a mantenimiento o aclimatación de bivalvos, el TAN que se acumula en el agua como resultado de la excreción debe ser removido para evitar los inconvenientes derivados de su toxicidad. Frecuentemente, en cultivos de laboratorio, el control del TAN se realiza a través del recambio total o parcial de agua de mar. Sin embargo, esto podría crear un ambiente estresante y ser especialmente contraproducente si se investigan, por ejemplo, indicadores de estrés [115,116]. Existen en el área de acuicultura diversos métodos de eliminación que podrían ser implementados en acuarios a escala de laboratorio. Su eficiencia y desempeño dependerán de las características del sistema y de los organismos a mantener [84]. Entre dichos métodos, el uso de bacterias nitrificantes y de algas marinas presentan una gran practicidad [84,117].

La biofiltración bacteriana tradicional ha sido ampliamente estudiada e implementada, principalmente en sistemas de recirculación de agua dulce [118,84,119-124]. Sin embargo, las bacterias son muy sensibles a los cambios de temperatura y concentración de nutrientes, y a la presencia de algunos productos químicos, como los compuestos asociados a metales y aminas, entre otros [125]. Las algas marinas, por otra parte, proporcionan una alternativa a los biofiltros bacterianos. Consumen nutrientes directamente del agua de mar [carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P)] y su biomasa se puede eliminar fácilmente con su cosecha. Además, con el uso de macroalgas, las condiciones fisicoquímicas del sistema permanecen más estables y la verificación de los niveles de oxígeno, pH y alcalinidad requiere menor frecuencia [126,117].

A escala experimental, el presente estudio explora la dinámica y la eficiencia en la remoción del TAN por parte de dos especies de macroalgas recolectadas en el golfo Nuevo (Patagonia, Argentina), para compararlas con el biofiltro bacteriano tradicional. El bivalvo seleccionado para el estudio fue la vieira tehuelche *A. tehuelchus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Biofiltro bacteriano

Para el biofiltro bacteriano se eligió un diseño de flujo ascendente con fragmentos de plástico libres como sustrato para el crecimiento bacteriano. Se utilizaron piezas de filtros con biomasa bacteriana activa de un sistema de cultivo funcional. Los fragmentos de plástico fueron 30 piezas de tubo corrugado de 3,5 cm de longitud cada uno, representando un área total de superficie de 1,05 m² para el crecimiento bacteriano. El biofiltro permaneció semi sumergido y con movimiento constante durante el ensayo.

Macroalgas marinas como biofiltro

Se utilizaron dos especies de macroalgas, el alga verde *Ulva* spp. y el alga parda *Undaria pinnatifida*, ambas halladas en intermareales rocosos del golfo Nuevo [127-130]. Se recolectaron durante la marea baja en Punta Este (42° 47' 16.5" S 64° 57' 6.1" O) (**Figura 2**). Al momento de la cosecha, se aseguró la extracción completa a fin de evitar daños en alguna de las estructuras de fijación. En el laboratorio, se limpiaron y lavaron con agua de mar y se colocaron en un acuario de 30 l con agua de mar filtrada previamente hasta 1 µm y desinfectada con luz UV (Biolight Technologies: 2000 l h⁻¹ – 1,40 W). Allí se aclimataron durante 2 días a una temperatura de 12,5°C, fotoperiodo 12:12 h luz:oscuridad, densidad media de flujo de fotones de 10,65 µM m⁻² s⁻¹ (medida con sensor Puntual PAR Cavadevices), salinidad 33 ups (medida con Arcano FG-211 Salinidad / ATC 0– 100), y OD > 90% del nivel de saturación (medido con sensor YSI modelo 58) mediante aireación con compresor y piedras aireadoras.

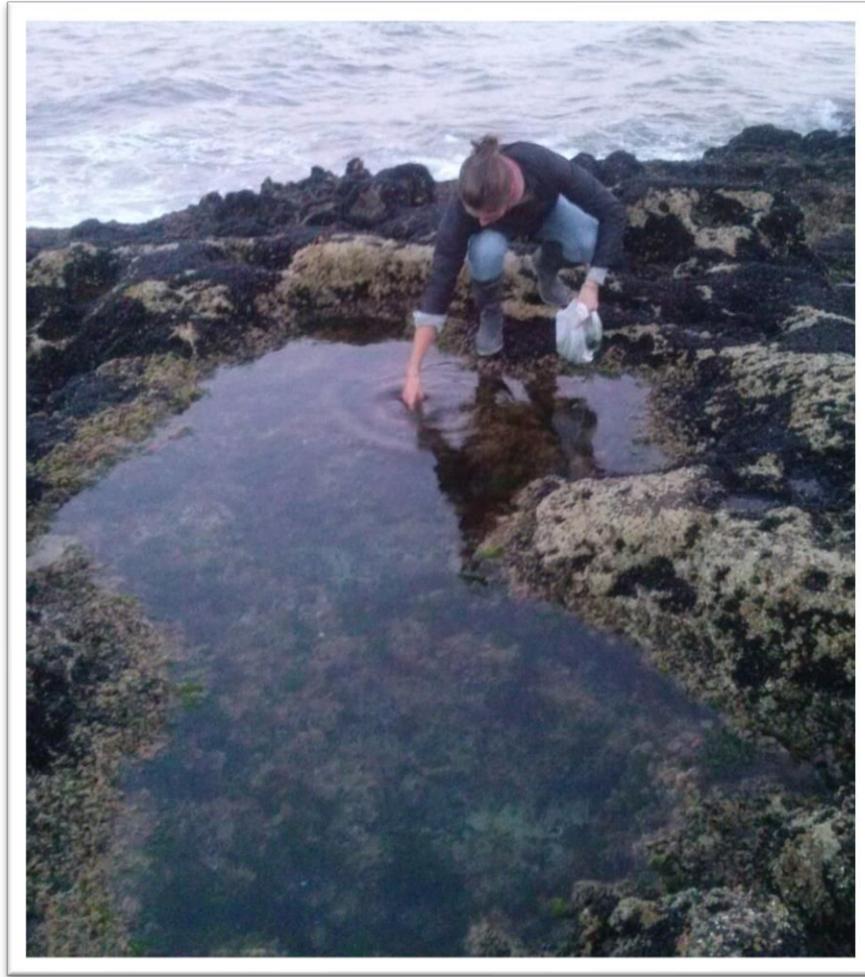


Figura 2. Recolección de *Ulva* spp. durante la marea baja del intermareal rocoso de Punta Este (golfo Nuevo, Chubut).

Recolección de las vieiras tehuelches.

Las vieiras (altura de valva de 6,9 a 7,4 cm y peso húmedo total de 61 a 68 g peso húmedo total) se recolectaron mediante buceo autónomo (profundidad ~15 m) en marzo de 2015 en San Román (42° 14' 55.2" S 64° 13' 22.6" O), donde la temperatura del mar era 12-13°C. Fueron transportadas al laboratorio dentro de conservadoras térmicas con humedad y hielo. Se limpiaron los epibiontes cuidadosamente (para evitar sobreestimulación y desove) y se colocaron en un sistema de recirculación de 300 l bajo las mismas condiciones de aclimatación de las algas. Se mantuvieron en dicho sistema sin ofrecimiento de alimento hasta el comienzo del experimento (≤ 3 días).

Diseño experimental.

El experimento se realizó en recipientes plásticos de 3 l (acuarios), previamente lavados con HCl al 5% y enjuagados con abundante agua corriente seguido de agua destilada. Los accesorios del acuario se desinfectaron en cloro al 10% durante 1 día y luego se enjuagaron de igual manera que los acuarios. Todos los materiales se secaron antes del comienzo del experimento. El agua de mar utilizada fue filtrada por filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C (tamaño de poro nominal: 1,2 μm). Una vez llenados, los acuarios fueron cubiertos por una envoltura plástica para evitar la evaporación. Las condiciones experimentales fueron las mismas para el periodo de aclimatación de las algas y las vieiras.

Durante 14 días, se ensayaron 6 escenarios diferentes, cada uno en un acuario con su correspondiente réplica (**Figura 3**):

CN (control negativo): sin vieira ni biofiltro.

CP (control positivo): vieira sin biofiltro.

T1: vieira y *Ulva* spp. como biofiltro (44-47 g peso húmedo - g_{PH}).

T2: vieira y *U. pinnatifida* como biofiltro (43-46 g_{PH}).

T3: vieira y biofiltro bacteriano.

T4: vieira con filtración mecánica del agua mediante sifón durante los primeros 8 días seguido de biofiltración durante los 6 días posteriores. Características de la filtración mecánica: filtro de tela y reincorporación del volumen filtrado al sistema, cada 48 h. Características de la biofiltración: adición del biofiltro más efectivo entre los utilizados en T1 a T3, que resultó en 44-47 g_{PH} de *Ulva* spp. por acuario.

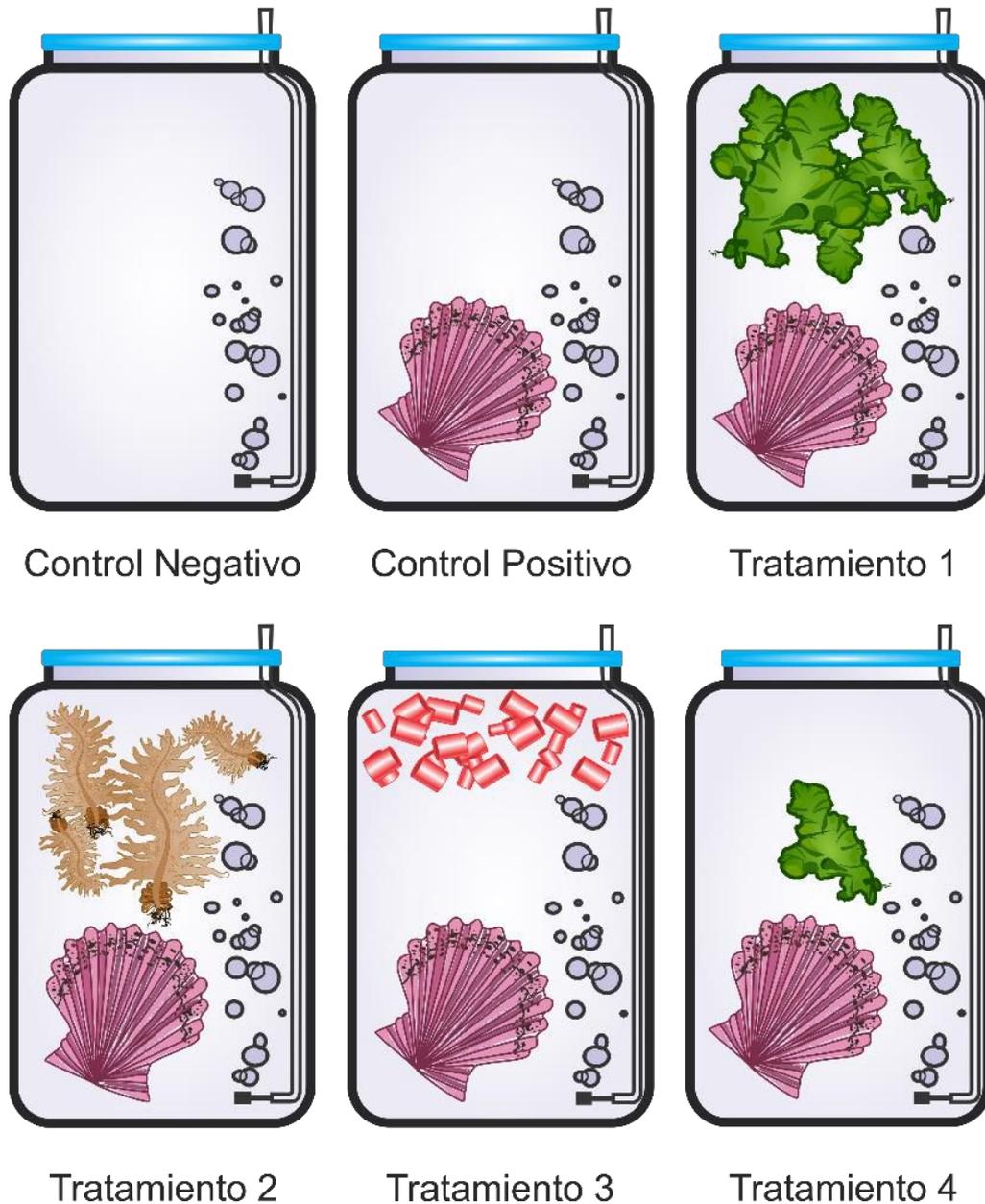


Figura 3. Esquema del diseño experimental. CN: sin vieira ni biofiltro, CP: vieira sin biofiltro, T1: vieira con *Ulva* spp. como biofiltro, T2: vieira con *U. pinnatifida* como biofiltro, T3: vieira con biofiltro bacteriano y T4: vieira con filtración mecánica del agua de mar durante los primeros 8 días seguido de la adición de *Ulva* spp. como biofiltro durante los 6 días siguientes.

Durante el transcurso del experimento, diariamente se realizó una evaluación cualitativa de la condición de las vieiras, por observación de su comportamiento. Cada 48 h, se midió el pH usando un pHmetro (RS232) y se tomaron dos alícuotas de 25 ml de agua de cada acuario para la

posterior determinación del TAN. Las muestras se tomaron siempre por la mañana para reducir diferencias relacionadas al ritmo circadiano de excreción de bivalvos [131,132]. El volumen total extraído de cada acuario fue ~12% respecto al volumen inicial, por lo que no se realizó reposición de agua.

Las determinaciones analíticas sobre cada alícuota se realizaron por duplicado según el método colorimétrico de la reacción con azul de Indofenol [133,134]. El mismo consiste en el tratamiento de la muestra en medio alcalino con fenol y citrato con hipoclorito de sodio en presencia de nitroprusiato de sodio, el cual actúa como catalizador. El azul de Indofenol formado con TAN-N presente se midió en un espectrofotómetro UV-Vis Hitachi 110A a una longitud de onda de 640 nm. El error relativo entre las réplicas químicas siempre fue < 10% y entre las réplicas del ensayo < 35%. Los resultados se expresaron como mg l^{-1} TAN-N ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NH}_3$). La concentración de N-NH_3 se estimó a partir de los datos tabulados por Zepka Baumgarten et al. [135], quienes informan el porcentaje de N-NH_3 respecto a TAN-N para diferentes temperaturas, pH y salinidades.

La eficiencia de reducción de TAN-N (% ERd) en un tiempo t para cada tratamiento se calculó como:

$$\% \text{ERd}_t = ([\text{CP}_t] - [\text{TN}^{\circ}_t]) \times 100 / [\text{CP}_{t_0}].$$

donde $[\text{CP}_t]$ es la concentración de TAN-N en el control positivo en el tiempo t, $[\text{TN}^{\circ}_t]$ es la concentración de TAN-N en el tratamiento N° en el tiempo t y $[\text{CP}_{t_0}]$ es la concentración de TAN-N en el control positivo en el tiempo inicial.

Análisis estadísticos.

Los resultados se ajustaron a diferentes modelos de regresión: regresión lineal, polinomios de segundo y tercer orden y función exponencial. Se utilizó la nomenclatura y: C (concentración), x: t (tiempo en días). El criterio de información de Akaike con una corrección para tamaños de muestra finitas se utilizó para encontrar el mejor modelo de ajuste [136]. Se consideró que un modelo con $\Delta i \geq 2$, proporciona un ajuste diferente a los datos. El estadístico de Akaike (W_i) se muestra como un parámetro de selección. R Core Team [137] se utilizó para todos los análisis estadísticos.

RESULTADOS

Las vieiras se mostraron saludables durante todo el experimento, con signos de filtración activa como son el manto y tentáculos extendidos. El agua de todos los controles y tratamientos, registró una concentración media inicial de TAN-N de $0,020 \pm 0,005 \text{ mg l}^{-1}$ y poca variación en el pH (rango: 7,8 - 8,0) a lo largo de todo el experimento.

Durante el transcurso del experimento, la concentración de TAN-N varió entre los controles y también entre los tratamientos (**Figura 4**). En el **CN** se mantuvo relativamente constante y por debajo de $0,025 \text{ mg l}^{-1}$ (**Figura 5**), correspondiendo a los niveles más bajos entre todos los ensayos. En el **CP**, aumentó conforme el transcurso de los días, alcanzando en D14 un valor promedio final de $9,85 \text{ mg l}^{-1}$. En este caso, el mejor ajuste a los datos se obtuvo con un modelo de regresión polinómica de segundo orden ($C = 0,004 + 0,525t + 0,013t^2$; $p < 0,001$, $R^2 = 0,99$; $W_i: 0,668$) (**Figura 4**). Sin embargo, una regresión lineal también proporcionó un buen ajuste ($C = 0,713t - 0,331$; $p < 0,001$, $R^2 = 0,98$; $W_i: 0,299$; $\Delta i < 2$) con la que se estimó la tasa de incremento de TAN-N en $0,03 \text{ mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$.

En **T1** (con *Ulva* spp.), la concentración de TAN-N se mantuvo entre $0,02$ y $0,22 \text{ mg l}^{-1}$ hasta D10, siendo inferiores a los medidos en CP, T2 y T3. Luego aumentó, alcanzando un valor promedio final de $1,54 \text{ mg l}^{-1}$ (**Figura 5**). En este momento se observaron cambios en el aspecto y color de la biomasa algal. Utilizando las concentraciones de CP como referencia, los porcentajes de reducción para D8 y D14 fueron 98% y 84%, respectivamente (**Figura 6**).

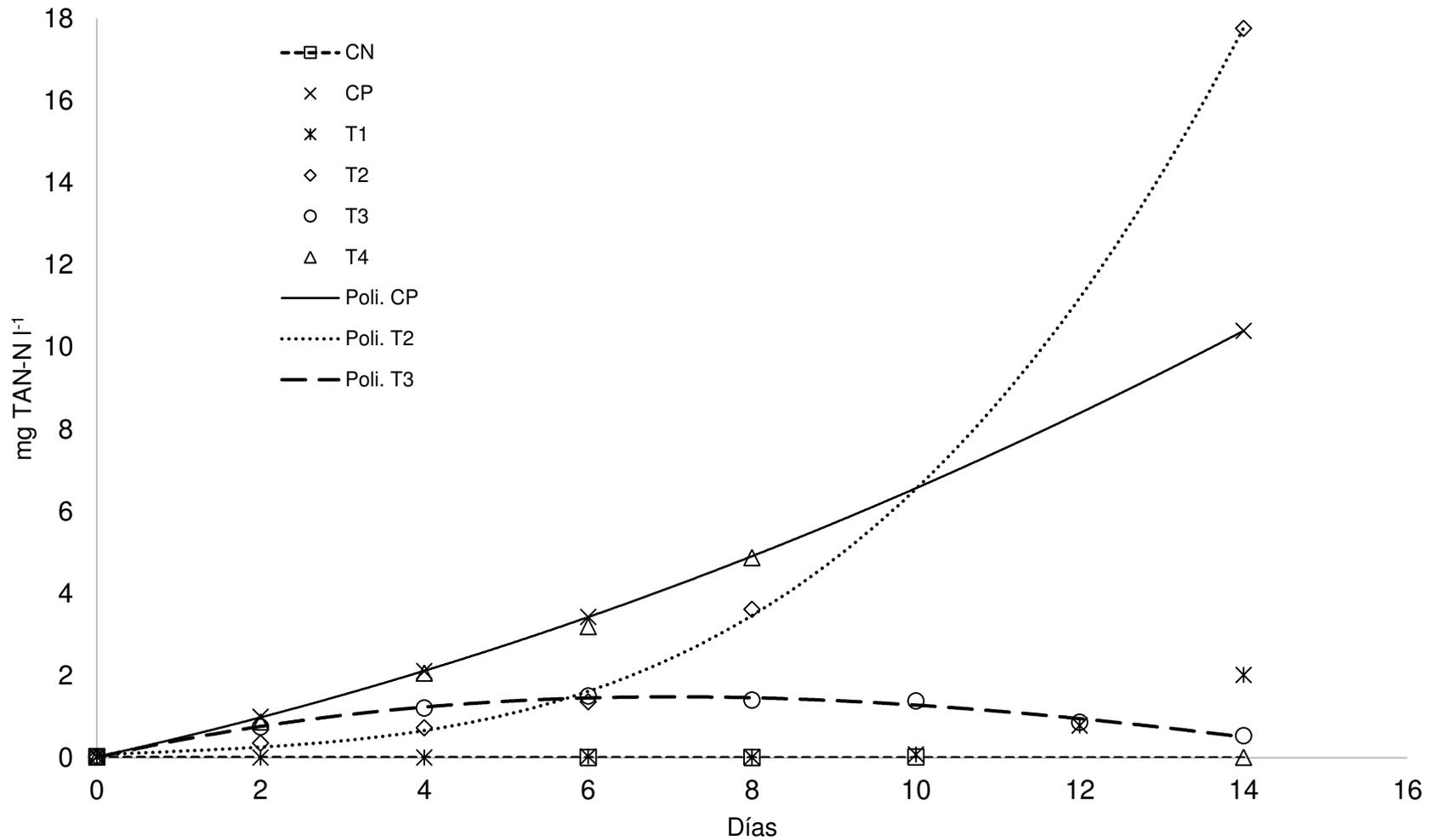


Figura 4. Concentración de TAN-N en mg l⁻¹ (TAN-N = N-NH₄⁺ + N-NH₃) durante el experimento. Se muestra el promedio de 2 réplicas. Las líneas representan las funciones ajustadas a los datos. CP: Control Positivo, CN: Control Negativo, T: Tratamiento, Poli.: función polinómica.

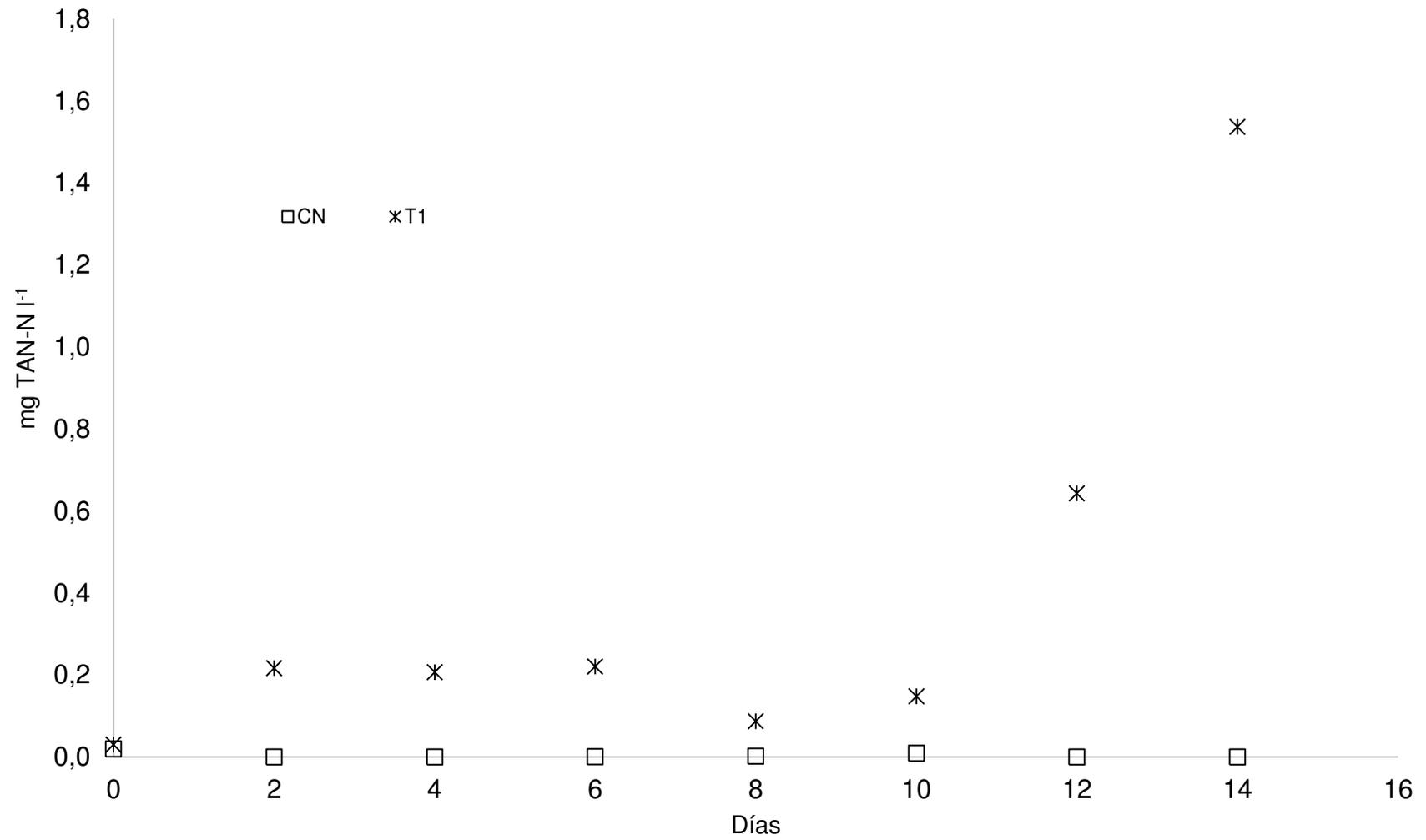


Figura 5. Concentración de TAN-N (mg l⁻¹) durante el experimento comparando el control negativo (CN) y el tratamiento 1 (T1). Se muestra el promedio de 2 réplicas.

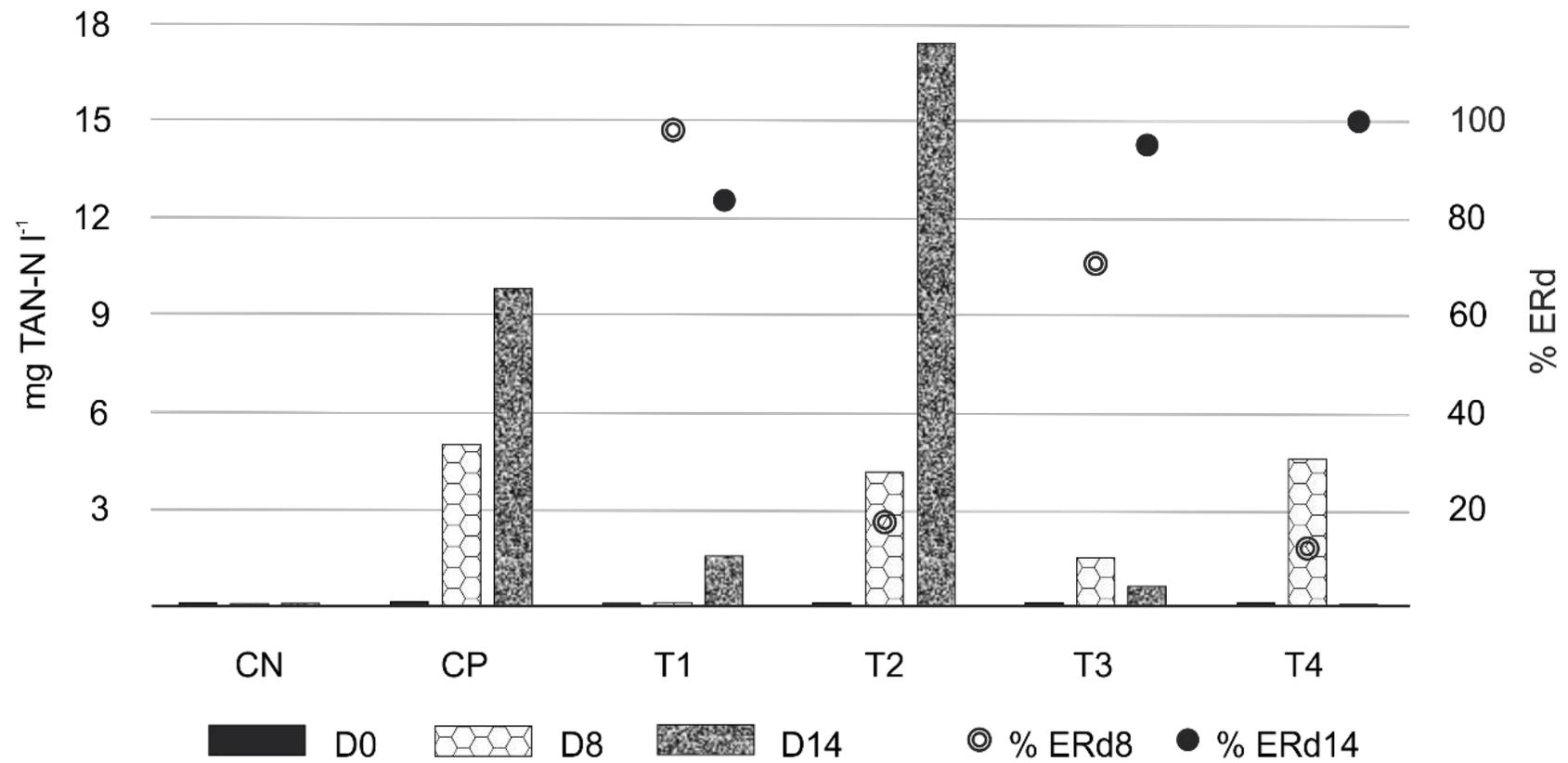


Figura 6. Concentración de TAN-N (mg l⁻¹). Se señala el promedio de 2 réplicas de la concentración inicial (D0), del día 8 (D8) y concentración final en D14 y la eficiencia de reducción de TAN-N al día 8 y 14 (% ERd). CP: Control Positivo, CN: Control Negativo, T: Tratamiento.

En **T2** con *U. pinnatifida* como biofiltro, la concentración de TAN-N fue de 4,17 mg l⁻¹ en D8 (ERd 22,5%, **Figura 6**) y de 17,35 ± 0,40 mg l⁻¹ en D14. Esta última fue la más alta entre todos los tratamientos y controles (**Figura 7**). A partir del cuarto día de experimento, se observó un cambio en el aspecto de la biomasa de algas y en el color del agua de los acuarios. Regresiones polinómicas de tercer orden ($C = 0,042 + 0,097t + 0,0094t^2 + 0,005t^3$; $p < 0,001$, $R^2 = 0,99$; $Wi: 0,603$) (**Figura 4**) y de segundo orden proporcionaron un ajuste comparable ($C = 0,036 - 0,41t + 0,115x^2$; $p < 0,001$, $R^2 = 0,99$; $Wi: 0,394$; $\Delta i < 2$).

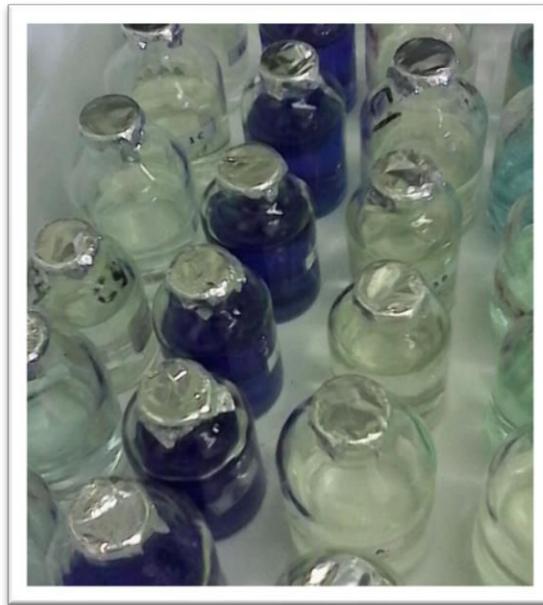


Figura 7. Resultado de la tinción azul de Indofenol. Las muestras de azul intenso corresponden a las muestras de los acuarios con *U. pinnatifida*.

En **T3** con biofiltro bacteriano, la concentración más alta de TAN-N se midió en D8 con un valor promedio de 1,45 mg l⁻¹ (ERd 71%). Posteriormente comenzó a disminuir, alcanzando una concentración promedio de 0,45 mg l⁻¹ (ERd 95%) en D14 (**Figura 6**), valor inferior a los niveles medidos en CP, T1 y T2. Una regresión polinomial de tercer orden proporcionó el mejor ajuste a los datos ($C = -0,011 + 0,492t - 0,047t^2 + 0,001t^3$; $p < 0,001$, $R^2 = 0,97$; $Wi = 0,9$) (**Figura 4**).

En **T4**, durante el período de filtración mecánica (primeros 8 días), hubo un aumento lineal en la concentración de TAN-N ($C = 0,545t - 0,1$; $p < 0,001$, $R^2 = 0,97$; $Wi: 0,711$), mostrando un porcentaje de eliminación más bajo (ERd 12%) que el alcanzado en T2. Luego, *Ulva* spp. fue agregada a los sistemas y la concentración de TAN-N disminuyó a valores tan bajos como los medidos en CN (ERd 100%), condición que persistió hasta el final del experimento (**Figura 4**).

La **Tabla 1** resume las concentraciones de TAN-N en D0 (inicial), D8 y D14 (final) para los controles y tratamientos, y presenta las estimaciones de las concentraciones de N-NH₃ correspondientes.

Tabla 1. Concentraciones de compuestos nitrogenados (en mg l⁻¹) obtenidos en el presente estudio. CP: Control Positivo, CN: Control Negativo, T: Tratamiento.

	TAN-N			N-NH ₃			TAN ♠			NH ₃ ♦		
	D0	D8	D14	D0	D8	D14	D0	D8	D14	D0	D8	D14
CN	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CP	0,02	<u>5,04</u>	<u>9,85</u>	0,00	<u>0,06</u>	<u>0,13</u>	0,02	<u>6,49</u>	<u>12,69</u>	0,00	<u>0,08</u>	<u>0,15</u>
T1	0,02	0,09	<u>1,54</u>	0,00	0,00	<u>0,02</u>	0,04	0,11	<u>1,98</u>	0,00	0,00	<u>0,02</u>
T2	0,02	<u>4,17</u>	<u>17,35</u>	0,00	<u>0,05</u>	<u>0,22</u>	0,02	<u>5,37</u>	<u>22,35</u>	0,00	<u>0,07</u>	<u>0,27</u>
T3	0,02	<u>1,45</u>	0,45	0,00	<u>0,02</u>	0,01	0,02	<u>1,87</u>	0,58	0,00	<u>0,02</u>	0,01
T4	0,02	<u>4,44</u>	0,01	0,00	<u>0,06</u>	0,00	0,03	<u>5,73</u>	0,01	0,00	<u>0,07</u>	0,00

El NH₃ se estimó como 1,29% de TAN, para Temperatura: 12°C, pH: 7,5 - 8 y salinidad: 31-35 (ver Zepka Baumgarten et al. [135]). Los valores subrayados son los que excedieron los estándares de calidad del agua (ver Tabla 1.2 en Discusión).

♠ Factor de conversión: 1/0,776.

♦ Factor de conversión: 1/0,822

DISCUSIÓN

La tolerancia al TAN de los animales y sus propias tasas de excreción están influenciadas por varios factores biológicos, como la especie, el tiempo de exposición a una concentración particular de TAN, la calidad y cantidad de los alimentos y las características fisicoquímicas del agua de mar, como el pH, la temperatura y la salinidad [93,138-142,86]. En este estudio, a partir del aumento de la concentración de TAN en el CP se estimó una tasa de excreción aparente de $0,03 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que es del mismo orden de magnitud que la reportada por Navarro, Gonzalez [138] para la vieira *Argopecten purpuratus* ($0,019\text{-}0,051 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Epifanio, Srna [143] encontraron que las ostras y las almejas eran notablemente resistentes a altas concentraciones experimentales de TAN y reportaron un nivel subletal de $5,6 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ l}^{-1}$ para la ostra *Crassostrea virginica* (la solución de prueba se preparó disolviendo cloruro de amonio de grado analítico en agua de mar). En el presente estudio, esta concentración solo se excedió después de D8 en CP y T2, pero no se visualizaron efectos letales ni subletales en las vieiras. Además, los valores de pH registrados a lo largo de todos los ensayos (7,8-8,0) aseguraron la prevalencia de la forma iónica sobre el compuesto no ionizado más tóxico.

La información existente sobre el nivel de seguridad de concentraciones de compuestos nitrogenados en agua de mar es muy limitada para la acuicultura de bivalvos. Entre ellos, se han recomendado valores entre $0,59$ y $6,20 \text{ mg l}^{-1}$ para el TAN y entre $0,01$ y $0,08 \text{ mg l}^{-1}$ para NH_3 (**Tabla 2**), los que han sido superados por algunas de las mediciones realizadas en este trabajo. En ese sentido, los resultados de este estudio sugieren que la vieira tehuelche sería relativamente tolerante a la presencia de TAN y de NH_3 . Cabe destacar, sin embargo, que las concentraciones más altas de TAN podrían afectar funciones biológicas como el desarrollo celular [144], la integridad lisosomal [115] y la actividad de las proteínas Na-K-ATPasa y Na-ATPasa [114].

Las dos especies de macroalgas evaluadas como biofiltro mostraron diferentes desempeños. Con *Ulva* spp. (T1) las concentraciones de TAN se mantuvieron en niveles aceptables, mientras que con *U. pinnatifida* (T2) se alcanzaron valores más altos que los medidos en CP y se observó la mayor tasa de acumulación. Esta tendencia puede estar relacionada con la degradación de la biomasa algal durante el experimento, probablemente debido a la falta de vitaminas u otros nutrientes específicos. La mayor eficiencia como biofiltro de *Ulva* spp. en comparación a *U. pinnatifida* es coincidente con lo reportado por diversos autores [145-147]. Gil et al. [147] encontraron hasta un 90% de eliminación de TAN de aguas residuales diluidas; Krom et al. [148] informaron la eliminación del 80% en cultivo de peces marinos; y Schuenhoff et al. [126] informaron una eliminación del 30% en la filtración de solo el 50% del volumen total del sistema. Debe considerarse que los aumentos en la concentración de TAN-N en T1 después de 10 días

podrían deberse a la fragmentación de algas. Resultados similares fueron encontrados por Mao et al. [149] para un sistema policultivo con vieiras *Chlamys farreri* y algas *Gracilaria lemaneiformis*.

Tabla 2. Resumen de estándares de calidad del agua de mar y pautas para la acuicultura extraídos de la literatura. Unidades expresadas en mg l⁻¹ a excepción de la quinta columna.

	TAN-N	N-NH ₃	TAN ♠	NH ₃ ◆	μM TAN-N
Valor umbral PC95 ANZECC/ARMCANZ [150]☼	0,91	0,01	1,17	0,01	65,00
Valor umbral revisado por Batley, Simpson [151]	0,46	0,01	0,59	0,01	32,86
Criterio crónico marino USEPA [152]	0,76	0,01	0,98	0,01	54,30
Nivel de seguridad general para acuicultura, principalmente peces de agua dulce, revisado por Lawson [83]	0,78	0,01	1,00	0,02	55,43
Niveles de seguridad para acuicultura para peces marinos de Huguenin, Colt [107]	0,78	0,01	1,00	0,01	55,36
Niveles de seguridad para acuicultura de juveniles de camarón atigrado por Menasveta et al. [119]	0,50	0,01	0,64	0,01	35,71
Criterio crónico para invertebrados marinos según Boardman et al. [153]	4,81	0,06	6,20	0,08	343,57

Los valores proporcionados por los diversos autores están en negrita. El NH₃ se estimó como 1,29% de TAN, para Temperatura: 12 °C, pH: 7,5 - 8 y salinidad: 31-35 (ver Zepka Baumgarten et al. [135])

♠ Factor de conversión: 1/0,776.

◆ Factor de conversión: 1/0,822

☼ Valor para la protección del 95% de las especies (pH: 8; T: 20 °C). Derivado de efectos crónicos no detectables después de exposición de 95 días.

El patrón observado con el biofiltro bacteriano (T3) es consistente con el desarrollo de la nitrificación. La eficiencia de eliminación de dicho biofiltro en D14 fue del 95%, similar al 98% encontrado por Seo et al. [120]. La tasa de absorción aumentó hacia el final del experimento, patrón que podría indicar una estabilización lenta del sistema experimental [154,120]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en un periodo mayor podría suceder una reducción de la nitrificación debido a la disminución del pH. Huesemann et al. [155] encontraron que la tasa de nitrificación en el agua de mar se reduce en aproximadamente 15% al disminuir el pH de 8 a 7,8, 50% a pH 7 y más del 90% a pH 6,5. Además, estos autores concluyeron que la actividad de nitrificación cesa completamente a pH 6.

En sistemas cerrados, el pH a menudo se reduce debido a la producción de iones de hidrógeno propio del proceso de nitrificación y, por otro lado, a causa del aumento del CO₂ resultante de la respiración de los organismos mantenidos en el sistema [156]. A lo largo del presente estudio, sin embargo, el pH se mantuvo en un rango favorable para la nitrificación [157]. La duración experimental fue probablemente lo suficientemente corta para mantener un pH óptimo. Por otro lado, los bivalvos también pueden amortiguar los cambios de pH por medio de la disolución parcial de los depósitos calcáreos de las valvas [158-160].

Un factor de suma importancia al evaluar la respuesta del filtro bacteriano, corresponde a la historia biológica y las condiciones de crecimiento naturales de las bacterias [157]. En este estudio, se asumió que el ensamble microbiano consistía en las mismas cepas encontradas en el ambiente marino costero de Puerto Madryn (golfo Nuevo); incluso, pudo suceder una selección de aquellas cepas más resistentes durante la activación del biofiltro [161]. La competencia por bacterias heterótrofas [162], se considera poco probable, ya que no se detectó una variación significativa en el OD. Estudios adicionales sobre la composición bacteriana nitrificante serían de suma importancia para una mejor comprensión de la dinámica de este tipo de biofiltros.

El tratamiento T4 mostró que la filtración de materia orgánica sedimentada en el fondo de los acuarios (primeros 8 días), podría proporcionar un método complementario útil, previo a la biofiltración por *Ulva* spp. La eliminación de materia orgánica sedimentada evita la acumulación de amonio debido a su re-mineralización, y permite acortar el tiempo de permanencia de las algas en condiciones experimentales, disminuyendo las posibilidades de su degradación y generación de TAN. Bajo esta modalidad de tratamiento, la concentración de TAN-N al momento de introducir las algas (D8) era de 4,44 mg l⁻¹, disminuyendo a niveles indetectables en D14.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo acuerdan con estudios previos, los cuales encontraron que *Ulva* spp. de golfo Nuevo tiene una mayor afinidad por el amonio que *U. pinnatifida* de la misma área [146,147]. La capacidad de captación de TAN por algas marinas está condicionada por factores biológicos, principalmente la edad de los individuos y la historia natural [163-166], por factores físicos tales como las condiciones de cultivo (profundidad, luz, densidad) y químicos como la forma disuelta de N [149]. En general, las algas marinas pueden absorber NH₄⁺ más fácilmente que las formas oxidadas de N [167,168].

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales probadas en este estudio, se concluye que *Ulva* spp. fue más eficiente que *U. pinnatifida* en su aplicación como biofiltro para el control del nivel de TAN. Esta alga permitió mejorar la calidad del agua en los 2 días posteriores a su adición a un sistema con agua marina enriquecida en amonio, disminuyendo su concentración y manteniéndola en niveles cercanos a los de seguridad. Es así como esta especie representaría una buena alternativa al biofiltro bacteriano utilizado tradicionalmente, siendo una opción adecuada en estudios de investigación de bivalvos a escala de laboratorio, así como durante períodos de aclimatación.

En cuanto al bivalvo utilizado en este trabajo para la experimentación, debe destacarse la resistencia mostrada por la vieira *A. tehuelchus* a concentraciones relativamente elevadas de TAN. En tal sentido, y más allá de los resultados relativos a la biofiltración, los datos obtenidos también proporcionan información útil para el diseño y ejecución de experimentos con este bivalvo en particular.

SEGUNDA PARTE

Eliminación de amonio para el acondicionamiento de bivalvos en Sistemas de Recirculación Cerrada (SRC)

INTRODUCCIÓN

En un sistema equilibrado de cultivo, la tasa de excreción (TE) de amonio (TAN) por parte de la biomasa de animales debe ser equiparado por la tasa de absorción del sistema de biofiltración seleccionado para su control. En general, se asume que la TE es resultado del catabolismo de proteínas por lo que es totalmente dependiente de la disponibilidad y proporción de los componentes nutricionales [169]. Además, la TE en bivalvos puede variar de acuerdo al estado reproductivo [170,171], la ruta metabólica de los aminoácidos [172], el tamaño del individuo, entre otros y, en particular en mejillones, al tipo de hábitat intermareal o submareal en el que se encuentren [173].

La zona intermareal presenta un gradiente de estrés físico, especialmente térmico y osmótico/desecativo y de potencial daño por la fuerza de las olas [174]. En función de los ciclos de marea, el cierre de las valvas y menor tiempo disponible para la alimentación [175,176,171,177,178] determinan que los mejillones que allí habitan se vean expuestos a condiciones de hipoxia o anoxia [179] y a altas concentraciones de TAN [174]. En tal sentido, los bivalvos que ocupan el intermareal presentan un comportamiento, fisiología y metabolismo diferenciados en relación a los organismos del submareal [174] que les permite sobrellevar el tiempo de emersión. Ciertas características incluyen mayor grosor de las valvas [179], capacidad de reducción de la TE [175,176], mayor tasa de filtración [171], menores tasa de aclaramiento [176,180] y eficiencia de absorción [176], menor consumo de oxígeno [79], anaerobia y tolerancia a la acumulación de TAN-N en su cavidad paleal [181,174]. Durante la emersión, reducen el metabolismo [181,174] y consumen reservas, por lo que poseen menor proporción de compuestos lipídicos como fosfolípidos, esteroides y específicos de función energética como los triacilglicerol [178] y menor cantidad de energía destinada al crecimiento, alcanzando menores largos [171], pesos e índices de condición [182,183,179]. Las diferencias mencionadas pueden ser el resultado de la adaptación al ambiente y la diversidad genética [176,184,173,185], como es el caso de *Mytilus edulis* [175,174], o parte de la plasticidad fenotípica de la especie [173].

Debido a la existencia de variabilidad entre grupos, el estado fisiológico de los bivalvos a mantener en acuario puede ser evaluado de manera integral al relacionar el oxígeno consumido

y el nitrógeno excretado. Estos representan los costos y pérdidas de energía asociada con el metabolismo [179] y permiten establecer efectos vinculados con el origen de los individuos cuando son sometidos a nuevas condiciones ambientales y/o nutricionales [79]. A partir de la relación atómica O:N es posible obtener información acerca del balance energético relativo a diversos sustratos [172,186]. De manera general, un valor entre 7 y 9,3 de dicha relación es indicador de consumo de proteínas [170,80], mientras que un valor mayor a 24 sugiere consumo de lípidos y carbohidratos y mejores condiciones nutricionales [170,79].

La tasa de incremento de TAN en un acuario no solo es el resultado de la excreción de los organismos bajo cultivo, sino que también deben considerarse los aportes debidos a la contaminación del recinto de experimentación, la carga de nutrientes propia del agua utilizada, la formación de biofilm en estructuras de tuberías y paredes del sistema [187], entre otros aspectos. Por lo tanto, el control de los niveles de TAN en el sistema requiere de un manejo integral del mismo.

Como se discutió en la primera parte del presente Capítulo 1, la elección del tipo de biofiltro implica un desafío particular debido a las diferencias en el rendimiento de acuerdo a las características operativas y los requisitos del sistema en el que se va a implementar [188]. Por ejemplo, el desempeño del biofiltro bacteriano varía enormemente de acuerdo al sistema de recirculación en el que se incluye [189]. Esto sucede incluso en marcas comerciales en las que las condiciones de uso han sido estandarizadas [4]. Por otro lado, la utilización de macroalgas podría significar una práctica alternativa, pero no menos dependiente de las características del sistema.

Un sistema de recirculación cerrada (SRC) es un diseño de acuarios útil para el cultivo de bivalvos a mediana y gran escala. Posee bajos costos operacionales y facilita el control de los principales parámetros, entre ellos temperatura, salinidad, pH y OD [4]. Estos sistemas se utilizan durante periodos de mediano a largo plazo por lo que es posible que, además del TAN, se acumulen formas oxidadas de nitrógeno inorgánico, como nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Estas especies químicas son el resultado de un proceso autótrofo disimilativo de nitrificación, donde el amonio es oxidado por *Nitrosomonas* sp. produciendo NO_2^- , que luego se convierte en NO_3^- por *Nitrobacter* sp. [84,125]. Mientras que la toxicidad del NO_2^- radica esencialmente en sus efectos sobre la osmorregulación y la disrupción del transporte de oxígeno [81] apud [82] [82,87], el producto final es considerado el menos tóxico entre las formas inorgánicas de nitrógeno [88]. El estudio de la cinética de estos compuestos nitrogenados es esencial con el uso de biofiltros bacterianos pero además, en el caso de utilizar macroalgas como biofiltro, es fundamental para comprender la influencia en la productividad y la biomasa de las mismas [190]. Frecuentemente, en los SRC las concentraciones de nitrógeno alcanzan niveles mucho más elevados que los que se encuentran en las aguas costeras marinas. El riesgo de la acumulación debe ser evaluado en

cada caso particular de experimentación ya que incorporar un mecanismo para su remoción puede significar un incremento innecesario del costo [82,191]. Pocos estudios han investigado la toxicidad de los compuestos nitrogenados en bivalvos marinos [192].

El objetivo general de esta segunda parte del Capítulo 1 es evaluar la estabilidad y control de los niveles de amonio reducido en un SRC para el mantenimiento de bivalvos a mediano plazo y sin suministro de alimento. Para ello se utilizaron mejillones *M. platensis* de dos ambientes diferentes: intermareal y submareal. En principio se estudiaron la tasa de excreción, el consumo de oxígeno y la tasa de acumulación aparente de TAN-N. Por último, se evaluó el desempeño de biofiltros bacterianos tradicionales y de *Ulva* spp. como alternativas para la eliminación del N inorgánico reducido durante el mantenimiento de mejillones en un SRC. Para tal fin se utilizaron como base los resultados obtenidos en la primera parte. El uso de SRC, manejo de mejillones y tiempo seleccionado de las experiencias están relacionados con los experimentos para la depuración de biotoxinas (por ejemplo, TPM) de bivalvos (Capítulo 2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de mejillones y preparación del experimento.

Se recolectaron manualmente mejillones *M. platensis* de talla homogénea con largo $5,9 \pm 0,6$ cm y peso húmedo de los tejidos blandos de $6,5 \pm 2,7$ g_{PH} del intermareal rocoso bajo de Playa los Algueros ($44^{\circ} 50' S$ $65^{\circ} 43' O$), y del submareal del sistema de cultivo de la escuela N° 721 ($44^{\circ} 53' 10.9'' S$ $65^{\circ} 37' 28.5'' O$) próximos a la localidad de Camarones (**Figura 8**) en mayo de 2016.



Figura 8. Sitio de recolección en los cultivos de mejillones de la escuela 721. En la imagen se distinguen los long-lines emplazados en la caleta ($44^{\circ} 53' 10.9'' S$ $65^{\circ} 37' 28.5'' O$).

Los bivalvos fueron transportados dentro de conservadoras plásticas, refrigerados con packs de hielo y humedad. Una vez arribados al laboratorio fueron limpiados de epibiontes, arena y algas marinas. Hasta el momento de experimentación los individuos de cada grupo (intermareal y submareal) fueron colocados en sendos SRC. Cada sistema contenía un volumen de 300 l de agua de mar y contaba con biofiltro bacteriano, una bomba de agua (2000 l/h) para garantizar la recirculación, y una piedra aireadora para mantener la concentración de OD próximo al nivel de saturación. El agua de mar empleada fue filtrada previamente hasta $1 \mu m$ y desinfectada con luz UV. Las condiciones experimentales se fijaron, de acuerdo a las condiciones ambientales del sitio de recolección, en una temperatura de $10^{\circ}C$, salinidad 35 ups y fotoperiodo 12/12.

Al día siguiente de la recolección, algunos individuos fueron seleccionados para la medición inmediata de la tasa de excreción (TE) y consumo de oxígeno (CnsOD), mientras que otros continuaron en periodo de aclimatación para ser utilizados en los sucesivos ensayos. Durante tal periodo, los sistemas fueron limpiados diariamente mediante un sistema sifón a fin de retirar la materia orgánica sedimentada (heces y pseudoheces), incorporando inmediatamente el volumen de agua extraída. Al momento de detectarse mejillones muertos, éstos fueron retirados. Los bivalvos no fueron alimentados en ninguna instancia de experimentación.

Para la realización de los experimentos de manejo integral para el control de los niveles de TAN durante el mantenimiento de bivalvos en SRC, se realizó una nueva colecta de mejillones en septiembre de 2016 del sistema de cultivo de la escuela N° 721 en Camarones. El transporte y aclimatación de los bivalvos fue igual al previamente descrito, a excepción de la temperatura y la salinidad que se fijaron a 15°C y 32 ups, respectivamente.

Tasa de excreción (TE)

Según la literatura científica, existen diferentes maneras de evaluar la tasa de excreción. En general, los experimentos siguen la estructura propuesta por Bayne [193]. Este autor propone un tiempo ideal de 2 horas para la medición de TAN, momento a partir del cual daría inicio el proceso de nitrificación y desnitrificación. Este sería inevitable dada la presencia de las bacterias desnitrificantes que porta el organismo en sus valvas y cavidad paleal [194].

El día posterior a la recolección, se seleccionaron 4 mejillones del intermareal y 4 del submareal ($6,6 \pm 0,1$ cm largo de valva) para la medición inmediata de la TE (**Figura 9**). Cada individuo fue transferido a un recipiente de vidrio con 400 ml de agua de mar de baja concentración de TAN-N (**Figura 10**). Los recipientes fueron previamente lavados con HCl al 5%, luego enjuagados con agua corriente y, finalmente, con agua destilada. Iniciado el experimento, los recipientes fueron tapados herméticamente, permitiendo la incubación de los mejillones por 2 h [193]. Transcurrido ese periodo se destaparon y, cuidadosamente para no agitar el medio, se colectaron dos alícuotas de 25 ml para la medición de TAN-N. Posteriormente, se midió el OD utilizando un oxímetro YSI modelo 58. En paralelo, se realizaron 3 controles sin mejillones en los cuales se procedió de la misma manera. El experimento se realizó a 16°C, sin aireación y salinidad de 35 ups.



Figura 9. Mejillones del intermareal (arriba) y submareal (abajo) seleccionados para la experimentación.

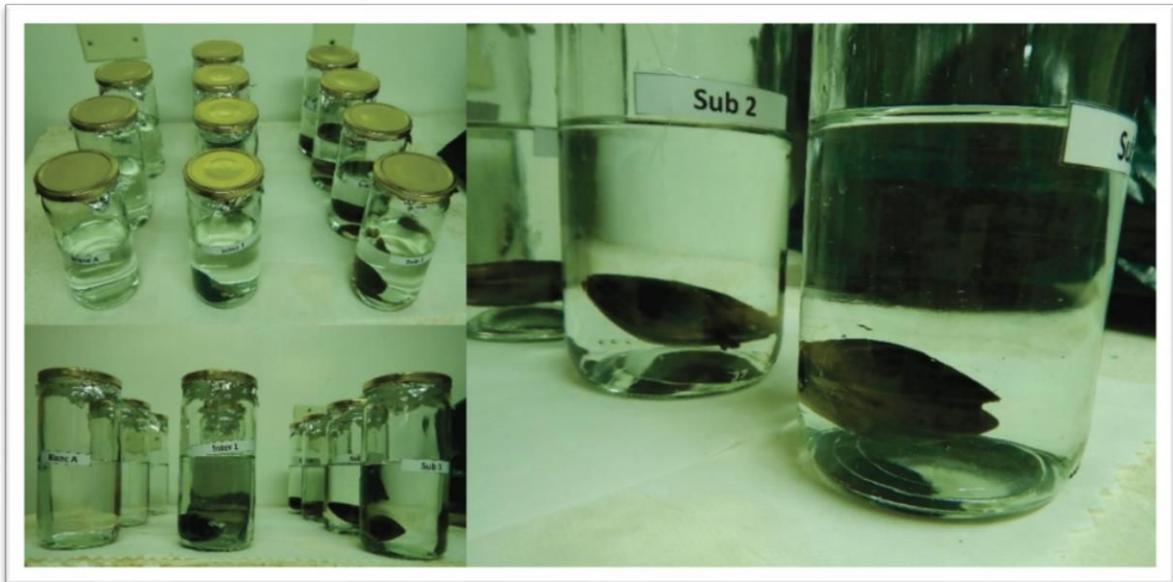


Figura 10. Experimento para la medición de tasa de excreción.

Una vez finalizado el experimento, los individuos fueron sacrificados y se registró el peso húmedo de los tejidos blandos, los que luego se secaron a 60 °C para obtener el peso seco (PS). Todas las mediciones de peso se realizaron en una balanza analítica (Shimadzu AUW220 ± 0,1 mg).

A fin de evaluar la capacidad de aclimatación, el experimento se repitió luego de 6 días a 16°C y 10°C con nuevos mejillones del estanque de aclimatación (4 mejillones del intermareal y 4 del submareal $6,2 \pm 0,1$ cm largo de valva). Se consideró que a partir de ese tiempo la TE alcanza valores basales [86,189,170].

El cálculo de la TE se realizó en base a los trabajos de Zhen et al. [195] considerando el PH y PS de los tejidos blandos, y la diferencia entre la concentración final de TAN-N de los recipientes con mejillón y la concentración existente en los controles luego de 2 h de incubación, siguiendo la fórmula:

$$TE_{mej} = (TAN-N_t - TAN-N_{control}) / (t \times PS_{tej.blandos})$$

En donde **TAN-N_t** es la concentración de TAN-N ($\mu\text{g l}^{-1}$) en recipientes con mejillones luego de transcurrido el tiempo **t** (h) de incubación y **TAN-N_{control}** es la concentración de TAN-N ($\mu\text{g l}^{-1}$) en el control. El cálculo se realizó utilizando el peso seco de los tejidos blandos (**PS_{tej.blandos}**).

Se corroboró la estabilidad de la concentración de TAN-N en los controles a lo largo del tiempo de experimentación a fin de descartar contaminación externa. Para tal fin se consideró aceptable una diferencia inferior a $\pm 0,001$ mg l^{-1} entre la concentración inicial y la final. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g TAN-N l}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ y $\mu\text{g TAN-N h}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Consumo de oxígeno (CnsOD)

En simultáneo a la determinación de TE se midió el CnsOD. A fin de no alterar el **OD inicial** con la introducción del sensor, con la misma agua de mar se llenó un recipiente extra, de iguales características experimentales. Al finalizar la incubación, y posterior a la extracción de las muestras para medición de TAN-N, el OD fue medido en cada recipiente de mejillones y controles.

El consumo de O_2 (CnsOD) se calculó según la siguiente fórmula:

$$CnsOD = \{[(OD_{t0} - OD_t) / t] - [(OD_{t0} - OD_{control}) / t]\} / PS_{tej.blandos}$$

En donde **OD_{t0}** es el oxígeno disuelto ($\mu\text{g l}^{-1}$) inicial, **OD_t** el de los recipientes con mejillones luego de transcurrido el tiempo **t** (h) de incubación y **OD_{control}** el de los controles (sin mejillones). La relación se realizó utilizando el peso seco de los tejidos blandos (**PS_{tej.blandos}**). Los resultados se expresaron en $\mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ y en $\mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Relación O:N

Se calculó de acuerdo a Mayzaud, Conover [172]. Para obtener el dato de oxígeno se multiplicaron los $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1}$ x 62,5, que resulta de dividir 1000/16, en donde 1000 es el factor para convertir miligramos en microgramos y 16 es el peso atómico del oxígeno. Para el dato de nitrógeno, se multiplicaron los $\text{mg TAN-N h}^{-1} \text{g}^{-1}$ (en PS) x 71,43, que resulta de dividir 1000/14 en donde 14 es el peso atómico del nitrógeno. Finalmente, se realizó el cociente entre los dos valores obtenidos.

Acumulación de TAN-N en un sistema cerrado con mejillón

Luego de 15 días de aclimatación, se retiraron del SRC 4 mejillones del intermareal y 4 del submareal ($6,1 \pm 0,2$ cm largo de valva) que fueron mantenidos durante 15 días en acuarios de vidrio con 2,5 l de agua de mar filtrada de baja concentración de TAN-N y aireación constante. Se contó además con 3 acuarios control sin mejillones. Todos los acuarios fueron cubiertos con una tapa plástica para evitar pérdida de agua por evaporación. De cada uno y con frecuencia de 48 h, dos alícuotas de 25 ml de agua para la medición de TAN-N se tomaron durante la mañana. Las condiciones de experimentación fueron las mismas que aquellas descritas para el periodo de aclimatación. Al comienzo y final del experimento se midieron salinidad, temperatura, OD y pH a fin de corroborar su estabilidad.

Una vez finalizado el experimento, los individuos fueron sacrificados. En cada uno se midió el largo de valvas, se separaron tejidos blandos y se registró el peso húmedo y finalmente el peso seco después de secar a 60 °C.

Los datos fueron expresados en mg TAN-N l^{-1} , corregidos con el promedio de las concentraciones en los 3 controles y ajustados a una regresión lineal. Además, la tasa de incremento se expresó en $\text{mg TAN-N h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$ a fin de realizar la comparación con las diferentes TE.

Manejo integral de los niveles de compuestos nitrogenados para el mantenimiento de mejillones en SRC

Se utilizaron 3 sistemas de recirculación cerrada de 300 l, especialmente montados en el Servicio del Acuario Experimental (SAE) del CCT CONICET-CENPAT para el desarrollo de la presente tesis (**Figura 11**). Se utilizó biofiltro bacteriano que fue transferido desde estanques de cultivo de peces marinos que se encontraban en el SAE. Teniendo en cuenta que la velocidad de flujo suele ser un aspecto secundario a las características del biofiltro [196], el mismo se fijó en 2000 l/h

(bomba de agua marca ATMAN) para todas las experiencias. El agua de mar empleada fue filtrada previamente hasta $1\ \mu\text{m}$ y desinfectada con luz UV. Las condiciones experimentales se fijaron en una temperatura de 10°C , salinidad 32 ups y fotoperiodo 12/12.

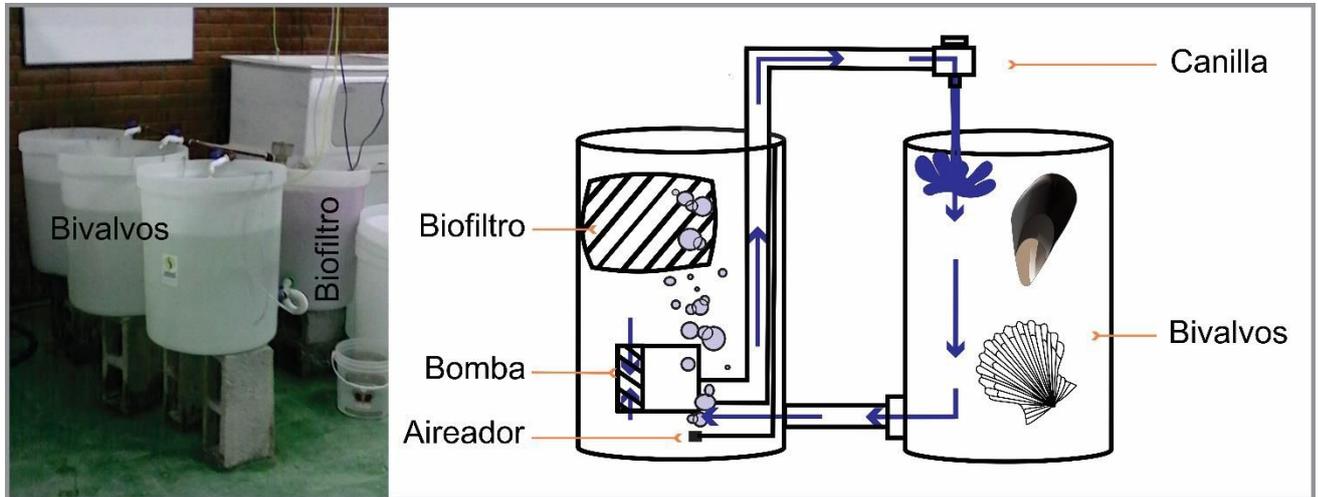


Figura 11. Imagen (izquierda) y esquema (derecha) de un Sistema de Recirculación Cerrada.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la vieira tehuelche, *Ulva* spp. ofrece la posibilidad de un manejo práctico de los SRC. Por ello, también se evaluó su eficiencia para el mantenimiento de mejillones como alternativa al biofiltro bacteriano tradicional.

La densidad de mejillones se determinó de acuerdo a las necesidades para cumplimentar los objetivos de depuración de biotoxinas (mantener un N° de mejillones equivalente a $\sim 900\ \text{g}_{\text{PH}}$ de tejidos blandos), por lo que se utilizaron en cada SRC ~ 125 mejillones con largo valvar de $6,1 \pm 1,2\ \text{cm}$ y de tejidos blandos de $7,3 \pm 1,8\ \text{g}_{\text{PH}}$. Teniendo en cuenta el trabajo de Gil et al. [147] y los resultados de excreción de la presente tesis, se estimó la biomasa de alga necesaria y se adicionaron $21,80\ \text{g}_{\text{PH}}$ de *Ulva* spp a los sistemas 1 y 2 (réplicas), mientras que el sistema 3 conteniendo solo mejillones se consideró control positivo (CP). El alga utilizada fue recolectada de las pozas del intermareal en Punta Cuevas ubicada al sur de la ciudad de Puerto Madryn. Se trabajó con la luz del recinto de experimentación con densidad media de flujo de fotones $\sim 6\ \mu\text{M}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo 12:12. Cada 48 h, se tomaron dos alícuotas de 25 ml de cada estanque del SRC con el biofiltro, para la medición inmediata de TAN-N. Los días 3, 5, 7 y 15 se colectaron además 100 ml en una botella plástica que se almacenó a -20°C para la posterior medición de las formas oxidadas de nitrógeno inorgánico ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$), con discriminación de ambas formas. Posterior a ello, se efectuó la limpieza de materia orgánica sedimentada en los estanques mediante sifón y la reposición del volumen de agua perdido.

El experimento se extendió durante 28 días. Según la evolución del TAN-N en muestras consecutivas, se consideró el mayor espaciado entre mediciones, el aumento de la intensidad de luz y de biomasa algal y el eventual recambio total del agua de mar.

Inmediatamente finalizado el periodo de experimentación con *Ulva* spp., se retiró la totalidad de mejillones. Se procedió al recambio de las $\frac{3}{4}$ partes del agua de todos los sistemas (recomendable al usar bacterias) y se colocaron los biofiltros bacterianos de uso convencional, descritos en la primera parte del Capítulo 1. En esta oportunidad, el área total del medio para la fijación y crecimiento bacteriano fue de $\sim 60 \text{ m}^2$ por sistema, con el burbujeo del aireador debajo de los tubos. Esto permitió asegurar su movimiento y el intercambio de O_2 y del CO_2 producido por las bacterias (simulando un sistema “rotating biological contactor” [197]). Luego de una semana se introdujeron ~ 500 mejillones (largo $4,5 \pm 0,3 \text{ cm}$) en cada uno de los 3 sistemas (**Figura 12**). A partir del día siguiente y durante 24 días en intervalos de 3-5 días, comenzaron los controles para concentraciones de TAN-N y $\text{N}-(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)$. La proporción de N-NO_2^- se determinó en una muestra de D17.

En este experimento, los bivalvos fueron parte de un estudio de depuración (Dex3, Ver [Capítulo 2, primera parte](#)) por lo que la biomasa de mejillones fue disminuyendo luego de cada extracción. En todos los casos, la medición de parámetros fue previa a la recolección de los animales. Una vez finalizado el periodo de depuración (D27) y sin mejillones en los sistemas, se realizó un último control de los SRC a los 40 días de iniciado el seguimiento.



Figura 12. Total de mejillones recolectados y mantenidos en SRC con seguimiento de biofiltro bacteriano.

Determinaciones químicas

Las determinaciones de TAN-N se realizaron utilizando los mismos métodos descritos en la primera parte del Capítulo 1. Nitratos + nitritos se analizaron en el Centro para el Estudio de Sistemas Marinos, utilizando un Autoanalizador Skalar San Plus [198]. Brevemente, el método incluye: regulación del pH 8,2, pasaje por una columna de cadmio cuperizado para reducir el nitrato a nitrito y posterior diazotización con sulfanilamida acoplada con dihidrocloruro de N-(1-naftil) etilendiamina. La absorción del compuesto azoico coloreado que se forma, se mide a 540 nm. De esta manera, el resultado incluye la suma del nitrito originalmente presente en la muestra más el derivado de la reducción del nitrato en la columna de cadmio. La determinación de nitritos se realizó manualmente siguiendo las técnicas de Strickland, Parsons [133] y se midió en un espectrofotómetro UV-Vis Hitachi 110A a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados de concentración se expresaron en mg l^{-1} de TAN-N y de $\text{N}-(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)$. Los $\text{N}-\text{NO}_2^-$ se expresaron como un porcentaje del total de $\text{N}-(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)$.

Análisis estadísticos

Las comparaciones entre conjuntos de datos de TE, CnsOD y O:N se analizaron utilizando análisis unidireccional de varianza (ANOVA) t-test o F-test seguido de una prueba post hoc de Tukey luego de este último. Antes del análisis, la normalidad y la homocedasticidad de los datos se analizaron con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente. En aquellos casos en donde los supuestos no se cumplieron, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados fueron considerados significativos de acuerdo al $\alpha < 0,05$. Los resultados de concentración de TAN-N y de $\text{N}-(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)$ fueron ajustados a regresiones lineales. R Core Team (2016) se usó para los análisis estadísticos.

RESULTADOS

Tasa de excreción del mejillón

A pesar de que en el primer ensayo los mejillones tuvieron poco tiempo de aclimatación, a los pocos segundos de ser puestos en los recipientes experimentales, abrieron sus valvas y mostraron claros signos de filtración. Aquellos mejillones del submareal tuvieron una respuesta rápida, fijación a través del biso y mayor producción de heces en el primer ensayo. Los del intermareal abrieron sus valvas reducidamente y se desplazaron con el pie al comenzar el ensayo. En la **Tabla 3** se resumen los resultados de TE para las diferentes temperaturas experimentadas.

En mejillones del intermareal, la TE y el CnsOD medidos a 16°C fueron significativamente menores en individuos sin aclimatación que en aquellos con 6 días de este proceso (TE: F-test = 4,89, $p = 0,037$ y CnsOD: F-test = 4,85, $p = 0,037$). Por otra parte, la relación O:N no demostró diferencias entre los tratamientos (Kruskal-Wallis, $p = 0,174$). Aunque la variabilidad de respuesta fue mayor en mejillones sin aclimatación a 16°C.

En mejillones del submareal no hubo diferencias entre las TE medidas (F-test = 1,27, $p = 0,327$). Si bien la tasa de CnsOD disminuyó con el tiempo de aclimatación y mucho más con la temperatura a 10°C (F-test = 18,74, $p = 0,001$), la relación O:N no presentó diferencias entre los tratamientos analizados (F-test = 9,74, $p = 0,414$).

A 16°C y luego de la aclimatación, los mejillones del intermareal mostraron mayor TE y CnsOD que los del submareal (TE: t-test = 3,06, $p = 0,022$ CnsOD: t-test = 6,51, $p = 0,001$).

Conforme a lo esperado, en todas las experiencias el pH disminuyó luego de transcurridas las 2 h de excreción. La mayor variabilidad de este parámetro se observó en mejillones del submareal (F-test = 14,77, $p = 0,001$), siendo más notoria a 16°C sin aclimatación (F-test = 6,63, $p = 0,017$). Para los mejillones del intermareal, la mayor variación de pH se registró a 16°C con aclimatación (F-test = 10,32, $p = 0,005$).

Tabla 3. Tasa de Excreción (TE), Consumo de Oxígeno (CnsOD) y relación oxígeno:nitrógeno (O:N) para 4 mejillones del intermareal (Inter) y 4 del submareal (sub), expuestos a diferentes temperaturas y condiciones de aclimatación. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de medias.

			Sin aclimatación		Con aclimatación (6 días)			
			16 °C		16 °C		10 °C	
			Inter.	Sub.	Inter.	Sub.	Inter.	Sub.
ΔpH	(pH _{inicial} - pH _{final})	Media	0,16	0,98	0,25	0,34	0,1	0,38
		DE	0,03	0,43	0,04	0,03	0,06	0,21
TE	μg TAN-N l ⁻¹ h ⁻¹ g _{PS} ⁻¹	Media	32,77 ^a	59,18 ^{a,b,c}	135,87 ^b	71,78 ^c	108,37 ^{a,b}	34,07 ^{a,b,c}
		DE	38,31	51,72	38,86	15,52	63,38	23,81
	μg TAN-N h ⁻¹ g _{PS} ⁻¹		13,11	23,67	54,35	28,71	43,35	13,63
CnsOD	μg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹ g _{PS} ⁻¹	Media	1064,13 ^a	1357,92 ^a	1771,38 ^b	1089,39 ^c	1130,85 ^{a,b}	772,32 ^d
		DE	250,81	192,56	207,47	28,05	520,91	130,99
	μg O ₂ h ⁻¹ g _{PS} ⁻¹		425,65	543,17	708,55	435,76	452,34	308,93
O:N	PS	Media	87,59	97,28	12,19	13,76	9,79	27,24
		DE	92,42	156,3	4,03	3,00	1,62	18,38

Acumulación de TAN-N en un sistema cerrado con mejillón

En todos los acuarios experimentales, la salinidad no presentó variaciones, el pH se encontró en valores similares al del agua de mar ($8,1 \pm 0,2$) y el OD permaneció cercano a la saturación. La concentración de TAN-N en los controles se mantuvo en valores de $0,006 \pm 0,001 \text{ mg l}^{-1}$ durante todo el experimento.

La tasa de acumulación neta fue similar para ambos grupos de mejillones, con mayor variabilidad en los del intermareal que en los del submareal (**Tabla 4**). La concentración final (D14) alcanzada fue de $1,25 \pm 0,80 \text{ mg TAN-N l}^{-1}$ y $1,16 \pm 0,20 \text{ mg TAN-N l}^{-1}$, respectivamente. Si bien los bivalvos seleccionados tenían longitud homogénea ($6,1 \pm 0,2 \text{ cm}$), presentaron diferentes pesos húmedos y secos (intermareal: $3,25 \pm 0,70 \text{ g}_{\text{PH}}$ y $0,38 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{PS}}$; submareal: $5,01 \pm 0,74 \text{ g}_{\text{PH}}$ y $0,87 \pm 0,13 \text{ g}_{\text{PS}}$). Estas diferencias se vieron reflejadas en la estimación de la tasa estandarizada por el peso seco, lo que dio como resultado una tasa de acumulación de TAN-N 2,6 veces mayor en mejillones del intermareal.

Tabla 4. Resumen de funciones de ajuste (f. ajuste) para la tasa de acumulación de 4 réplicas.

		mg TAN-N l ⁻¹	mg TAN-N l ⁻¹ g PS ⁻¹	μg TAN-N l ⁻¹ h ⁻¹ g PS ⁻¹ ⊗
Intermareal	f. ajuste	C = 0,1t - 0,09	C = 0,26t - 0,25	
	ρ	< 0,001	< 0,001	10,83
	R ² aj.	0,56	0,56	
Submareal	f. ajuste	C = 0,09t - 0,1	C = 0,1t - 0,1	
	ρ	< 0,001	< 0,001	4,17
	R ² aj.	0,83	0,92	

⊗ calculado únicamente con la pendiente teórica.

Manejo integral para el mantenimiento de mejillones en SRC

En el desarrollo de los experimentos, la salinidad no presentó variaciones, el pH se mantuvo cercano al agua de mar ($\sim 7,8-8,1$) y el OD próximo al punto de saturación. Durante la evaluación de *Ulva* spp. como biofiltro para SRC se observó baja eficiencia de biofiltración, por lo cual se realizaron ajustes de algunos parámetros, aunque sin obtener resultados favorables. En D4 y D6 se duplicó la biomasa de algas (total sistema 1: $225,50 \text{ g}_{\text{PH}}$ y sistema 2: $219,40 \text{ g}_{\text{PH}}$), en D16 se aumentó la intensidad de luz a $50-54 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y en D22 se realizó un recambio total de agua y

se agregó *Ulva* spp. (total sistema 1: 294,10 g_{PH} y sistema 2: 301,90 g_{PH}). El resultado fue una acumulación de TAN-N equivalente a la observada en el primer periodo, por lo que la experimentación fue suspendida luego de 6 días desde el recambio (**Figura 13 a**). Las cinéticas de acumulación de TAN-N en los SRC se ajustaron a una función lineal similar en ambos periodos (**Tabla 5**), con una tasa de acumulación de 0,30 mg TAN-N l⁻¹ en el CP y 0,20 mg TAN-N l⁻¹ (58% menor) con *Ulva* spp. La concentración máxima alcanzada en D21 en los SRC con *Ulva* spp. fue de 4,18 ± 1,50 mg TAN-N l⁻¹ y en el CP 6,72 mg TAN-N l⁻¹.

Durante este periodo las formas oxidadas de N inorgánico fueron acumuladas mayormente en los sistemas con *Ulva* spp., alcanzando un máximo de concentración en D21 de 0,72 ± 0,10 mg N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) l⁻¹. Los resultados se ajustaron a una función exponencial incluso luego del recambio total de agua en D22 (**Tabla 5, Figura 13 b**). En contraste, el CP demostró un incremento lineal y menor en sus concentraciones llegando a 0,14 mg N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) l⁻¹ en D21. En los SRC con *Ulva* spp., el porcentaje de N-NO₂⁻ varió de 1% a 4% al D15 (**Tabla 6**), proporción mucho mayor que la observada en CP, en el cual ninguna de las muestras superó el 1% de N-NO₂⁻.

Tabla 5. Resumen de las tasas de acumulación de TAN-N y N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) de 2 réplicas para *Ulva* spp. y para el control positivo (CP). f. ajuste: función de ajuste.

		mg TAN-N l ⁻¹		mg N-(NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻) l ⁻¹	
		1-21 días	22-28 días	1-21 días	22-28 días
<i>Ulva</i> spp.	f. de ajuste	C = 0,18t + 0,3	C = 0,19t + 0,2	C = 0,03e ^{0,13t}	C = 0,036e ^{0,3t}
	p	< 0,001	0,004	< 0,001	0,02
	R ² aj.	0,87	0,88	0,66	0,73
CP	f. de ajuste	C = 0,31t + 0,02	C = 0,3t + 0,3	C = 0,005t + 0,05	C = 0,005t + 0,04
	p	< 0,001	0,08	0,001	0,25
	R ² aj.	0,97	0,97	0,83	0,70

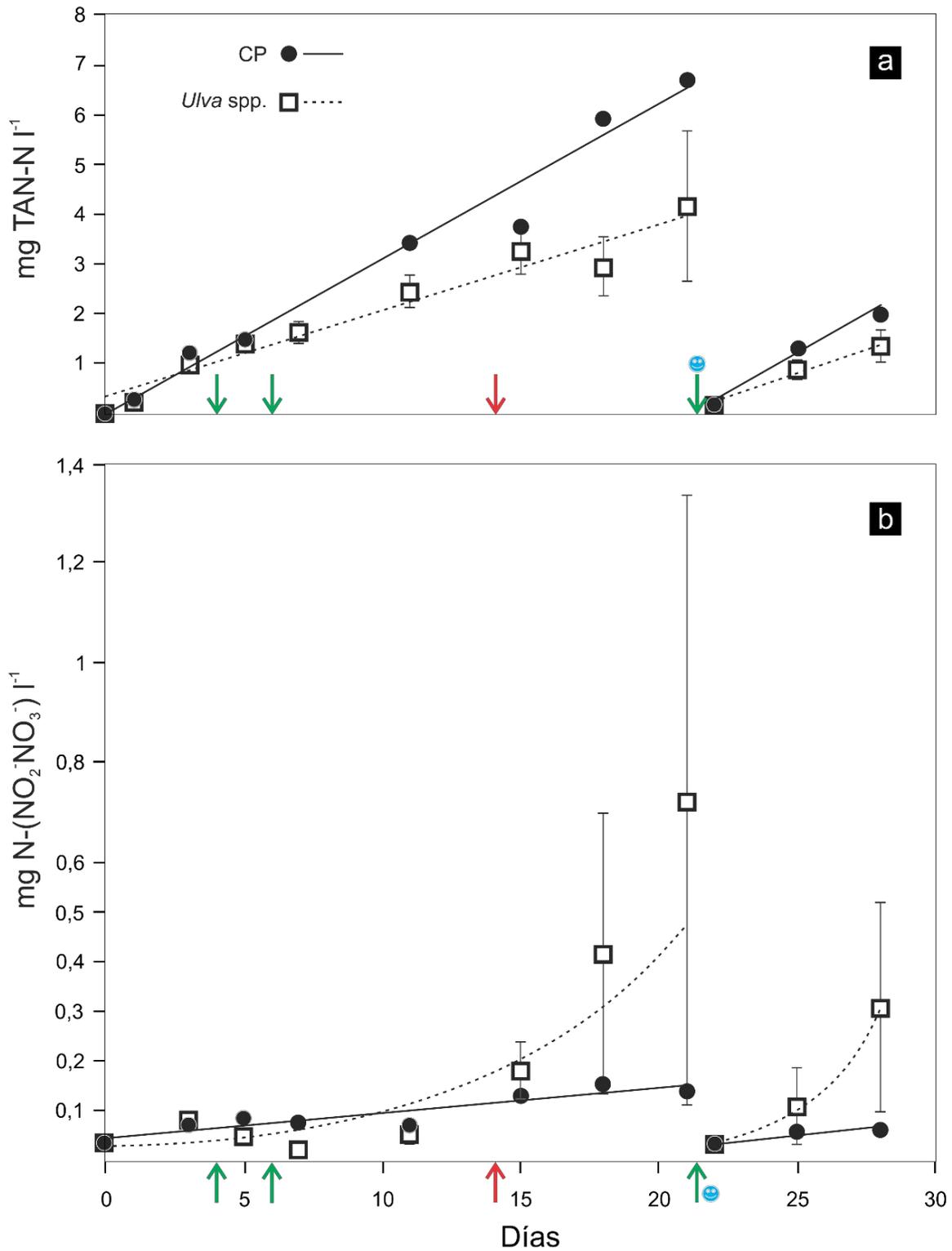


Figura 13. Acumulación de **a)** TAN-N y **b)** N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) en relación al tiempo (días) de SRC con *M. platensis* y *Ulva* spp. como biofiltro. Las flechas verdes indican adición de macroalgas, la roja un incremento de intensidad de la luz y “☺” recambio de agua. Se muestra la media y desvío estándar de dos réplicas en *Ulva* spp. CP: Control Positivo.

Tabla 6. Porcentaje de N-NO₂⁻ para 2 muestras de agua de SRC con *Ulva* spp. y el control positivo (CP) de los días 3, 5, 7 y 15.

% N-NO ₂ ⁻		D3	D5	D7	D15
<i>Ulva</i> spp.	Media	1,1	1,3	2,1	3,8
	DE	0,7	0,2	0,3	2,6
CP		0,9	0,8	0,5	-

Luego del agregado de biofiltro bacteriano, se observó una concentración de TAN-N decreciente, con ajuste exponencial significativo ($C = 1,24e^{-0,13t}$, R^2 aj. = 0,6 $p < 0,001$) (**Figura 14 a**). Se estimó una eficiencia de reducción del 25% en D4 y del 76% en D10. En D24, el último control de los SRC con mejillones, la concentración de TAN-N fue de $0,09 \pm 0,06$ mg TAN-N l⁻¹ y el último control en D40 demostró un mantenimiento del agua de mar sin contaminación externa ($0,005 \pm 0,003$ mg TAN-N l⁻¹). En contraste, los nitratos y nitritos se acumularon rápidamente de forma potencial ($C = 1,85t^{0,56}$, R^2 aj. = 0,9 $p < 0,001$) (**Figura 14 a**), alcanzando en D24 una concentración de $10,50 \pm 1,30$ mg N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) l⁻¹, lo que equivalió a 15 veces más que lo observado con *Ulva* spp. y 75 veces más que en CP. En D40 los nitratos y nitritos alcanzaron $12,70 \pm 1,80$ mg N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) l⁻¹ que resultó en 18 y 91 veces más que en *Ulva* spp. y CP, respectivamente. Los N-NO₂⁻ en D17 correspondieron al $1,5 \pm 1,8$ % del total, 2,5 veces menor a lo observado en D15 con *Ulva* spp.

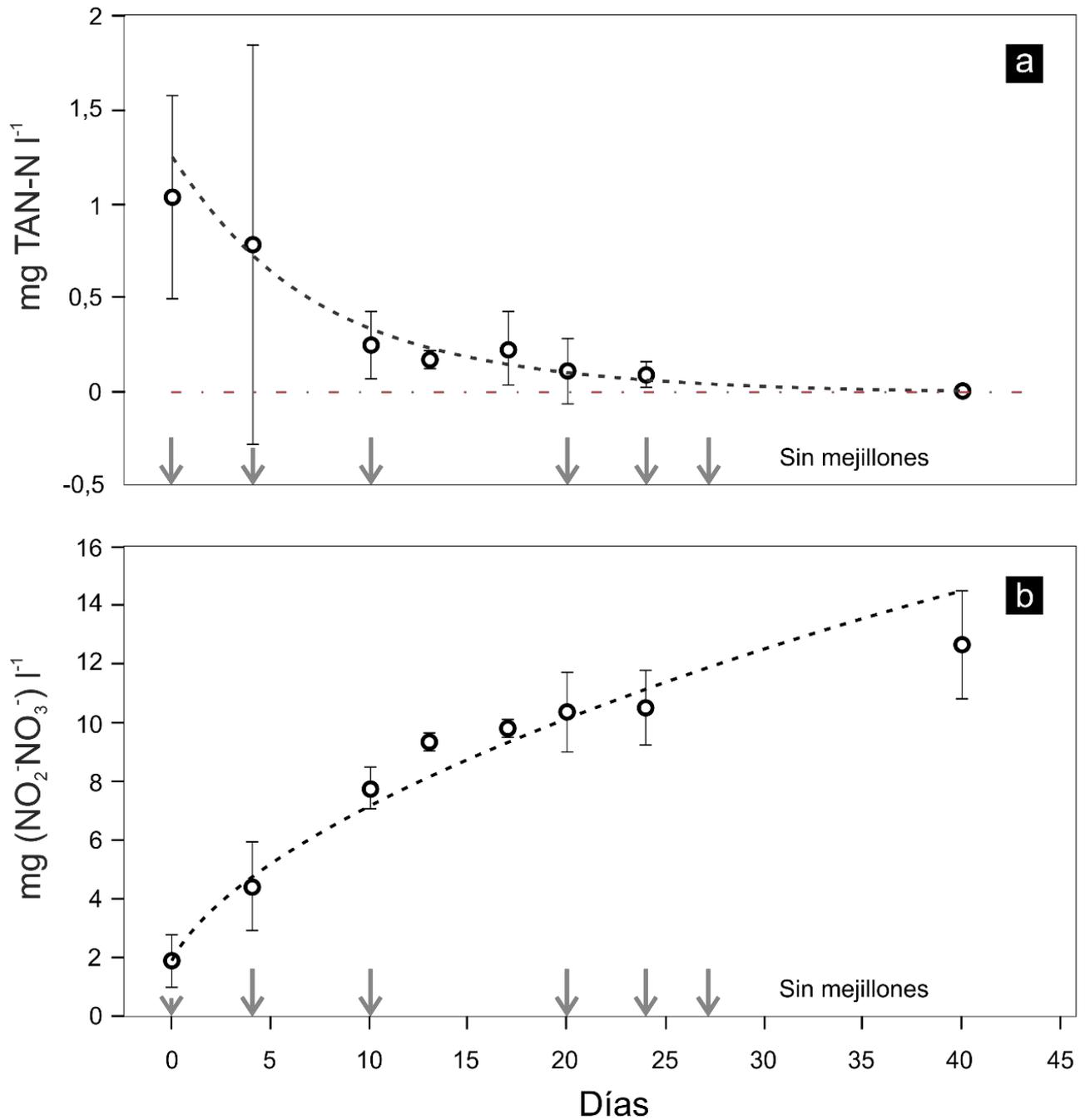


Figura 14. Concentración de **a)** TAN-N y **b)** N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) en relación al tiempo (días) de SRC con *M. platensis* y biofiltro bacteriano. Las flechas indican extracciones de mejillones y la línea roja punteada la intersección con 0. Se muestra la media y desvíos estándar de 3 réplicas y con línea punteada la función de ajuste **a)** $C = 1,24e^{-0,13t}$ **b)** $C = 1,85t^{0,56}$.

DISCUSIÓN

Tasa de excreción del mejillón, consumo de oxígeno y relación O:N

La plasticidad fenotípica le permite a una especie enfrentar la variabilidad ambiental a través de cambios morfológicos y fisiológicos, pudiendo estas modificaciones a su vez, tener efectos a corto y/o largo plazo [199,185]. Por tanto, la plasticidad contribuye a una historia natural propia de cada población y se espera que se vea expresada fisiológicamente. Contrario a lo esperado, las diferencias encontradas entre los mejillones del intermareal y submareal, solo fueron percibidas en una de las condiciones ensayadas (16°C con aclimatación). Por tanto, se considera insuficiente la evidencia para respaldar el supuesto de diferenciación fisiológica en cuanto a las variables estudiadas entre los mejillones de acuerdo a su hábitat. En términos generales, no se habría observado una “memoria ecológica” entre los organismos, expresión acuñada por Mallet et al. [200] y utilizada frecuentemente en este tipo de estudios comparativos.

La TE y el CnsOD están supeditados a muchas variables que incluyen las condiciones de experimentación y la especie. Las TE medidas en este estudio se encontraron en el rango de 13,11 - 54,35 $\mu\text{g TAN-N h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$, 2 órdenes de magnitud superiores a las tasas reportadas por otros autores para *M. edulis* [201] apud [202]. Los menores valores fueron medidos en las experiencias inmediatas sin aclimatación. El CnsOD se mantuvo en el rango 425,65 - 708,55 $\mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$ y en los mejillones del submareal se observó una tendencia a disminuir en sucesivos experimentos. Estos resultados fueron del mismo orden que lo registrado para *M. edulis* durante el transporte (240 a 384 $\mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$) y que la tasa basal una vez aclimatados (128 $\mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$) [80] y hasta 100 veces menores que lo reportado en la bibliografía para *Mytilus galloprovincialis* y *Xenostrobus securis* [203].

No se observaron indicios de que la TE de *M. platensis* se vea influenciada por las diferentes temperaturas ensayadas, comportamiento también reportado para *M. galloprovincialis* [79]. Por el contrario, se ha reportado un incremento de TE con la temperatura en *C. gigas* de 0,05 $\mu\text{M } ^\circ\text{C}^{-1}$ (7 mg TAN-N $^\circ\text{C}^{-1}$) [86]. Por otra parte, el CnsOD presentó diferencias significativas entre temperaturas para mejillones del submareal, siguiendo el mismo patrón registrado para *M. galloprovincialis* y *X. securis* [203] y contrario a la ausencia de variabilidad en este parámetro en *M. edulis* [80].

El tiempo de aclimatación resultó ser un aspecto de relevancia ya que afectó el CnsOD en ambos grupos de mejillones y la TE en aquellos del intermareal, en concordancia con lo observado para *M. edulis* por Barrento et al. [80]. Okumus [204] sugiere que la variación de la TE involucra

procesos de reajuste osmótico que podrían ser diferentes en mejillones del intermareal y por lo tanto dar explicación a la mayor variabilidad medida en este grupo.

Es sabido que bivalvos provenientes del intermareal tienen mecanismos compensatorios a la exposición aérea que afectan el CnsOD [174], reducen la tasa metabólica [179] e incluso consumen reservas [171]. Sin embargo, los mejillones del intermareal utilizados en la presente experiencia presentaron mayor CnsOD y TE respecto a los del submareal luego de la aclimatación y a 16°C. Esta respuesta en la TE también fue observada durante el invierno en *Perna canaliculus* del intermareal alto (59,7 $\mu\text{g TAN h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$) respecto a individuos del intermareal bajo (20,3 $\mu\text{g TAN h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$) [171]. Dichos valores son del mismo orden que los medidos en el presente experimento (intermareal: 54,35 $\mu\text{g TAN h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$; submareal: 28,71 $\mu\text{g TAN h}^{-1} \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$). Las diferencias encontradas en estos parámetros podrían relacionarse con el estado nutricional de los organismos experimentales, de acuerdo con el momento en el que fueron cosechados y teniendo en cuenta un ciclo anual dependiente de la temperatura, la disponibilidad y calidad del alimento y sobre todo al estado reproductivo de los individuos [79]. También, la presencia de alimento aún sin digerir en el tracto digestivo, podría influir en los resultados de los diferentes parámetros fisiológicos medidos, principalmente en aquellos mejillones sin aclimatación [175].

A pesar de las variaciones observadas en CnsOD y TE, las mismas no se vieron reflejadas en el indicador de metabolismo O:N, lo que podría interpretarse como un requerimiento energético similar entre las dos poblaciones. Estos resultados contrastan con lo observado para otros mitílidos como *M. galloprovincialis* en experimentos similares en donde se estimó que los bivalvos del intermareal poseían una demanda energética mayor, expresada por mayores CnsOD y TE y menor O:N [79]. Debe tenerse en cuenta que los parámetros de referencia de O:N generales son teóricos y pueden diferir entre las especies [172,186] de acuerdo al tipo de reservas del organismo [186], el uso de proteínas y la energía requerida para el catabolismo de los componentes [172]. Se ha calculado para el mejillón *M. edulis* un valor de 50 como indicador de buena salud, 30 como indicio de consumo de proteínas y 7 como agotamiento total de las mismas [205] apud [206]. En base a dichos estándares y sustentado por la ausencia de diferencias significativas en los resultados, se estima que los mejillones utilizados en la presente investigación se encontraban consumiendo sus reservas proteicas desde el inicio. No se conoce hasta el momento el rango de valores de O:N específico para *M. platensis* de las costas chubutenses, no descartándose la posibilidad de una variabilidad interespecífica, tal como se describió por ejemplo en especies zooplanctónicas [172].

De forma general, el origen de los mejillones no afectaría en gran medida la estabilidad de un sistema, siendo más importante el efecto del tiempo de aclimatación de los organismos en la variabilidad de sus tasas fisiológicas.

Acumulación de TAN-N en un sistema cerrado con mejillón

El hábitat de origen de los mejillones no constituyó un factor de influencia en la tasa de acumulación de TAN-N en un sistema cerrado. Sin embargo, sí se percibieron diferencias entre los grupos al estandarizar la tasa por el peso seco de los individuos mantenidos. Tal discrepancia en la expresión de los resultados puede ser a causa de que la selección de los mejillones se realizó en base a longitudes de valvas similares sin tener en cuenta sus pesos. Una situación similar fue mencionada por Labarta et al. [176], quienes describen que los mejillones *M. galloprovincialis* del intermareal presentaron el doble de peso húmedo en referencia a los del submareal con el mismo largo, diferencia atribuida por tales autores al estado reproductivo diferente de los dos grupos utilizados. La estandarización de los resultados y la evaluación de las diferencias en tamaño y peso de los bivalvos debe ser considerada con precaución y de acuerdo a los objetivos deseados.

La tasa de acumulación y la TE aparente calculada a partir de la pendiente de la función de ajuste fueron menores a lo estimado en las experiencias preliminares de TE. Este resultado enfatiza el hecho de que en un sistema ocurren otros procesos que modifican la TE teórica, por ejemplo, nitrificación y desnitrificación por bacterias propias de las valvas de los mejillones [86] o la volatilización del amonio [207]; esto último más común en sistemas expuestos al aire libre.

Luego de 8 días de experimentación, en todos los acuarios se registraron concentraciones de TAN-N mayores a los niveles de seguridad para la protección de la vida acuática pero inferiores al criterio crónico de seguridad para invertebrados marinos (**Tabla 2** ver Capítulo 1, primera parte). En el sentido práctico, la velocidad en la que se acumula el TAN-N en un sistema cerrado no estaría relacionado con el hábitat de los mejillones, siendo este aspecto secundario al diseñar y evaluar un sistema de acuario para el mantenimiento de los bivalvos.

Mantenimiento integral para el mantenimiento de mejillones en SRC.

La importancia de evaluar el equilibrio y funcionamiento de cada SRC acoplado a un mecanismo de biofiltración específico se vio evidenciada en los resultados de los experimentos a mediana escala. Los resultados obtenidos con *Ulva* spp. fueron contrarios a lo descrito por otros autores para *Ulva lactuca* y *Haliotis iris* [145] y los hallados previamente en las experiencias piloto con vieira tehuelche, aún cuando se utilizó un rango de intensidad lumínica mayor. Uno de los posibles motivos podría estar relacionado con el sitio de extracción de *Ulva* spp. ya que, pese a la cercanía entre ambos sectores de recolección, las poblaciones en ellos asentadas podrían haber tenido diferentes aptitudes de asimilación de nutrientes [208]. Además, otras causas podrían

relacionarse a factores biológicos como la edad, historia natural [163-166] y la época del año en la cual fueron recolectadas [209].

El cultivo de mejillón aumentó considerablemente los niveles de TAN-N en el agua del sistema, pero estos nutrientes no fueron aprovechados por el alga a pesar del incremento de su biomasa. Ajjabi et al. [210] describieron para un sistema integral de cultivo de *M. galloprovincialis* y *Gracilaria verrucosa* un incremento de la remoción de TAN-N acorde al incremento de la densidad algal, pero en contraposición al crecimiento de su biomasa. Como resultado, concluyen en un óptimo de remoción de 1:0,28 macroalgas/mejillones, relación similar a la proporción final trabajada en el presente experimento (1:0,33). Estos autores, además, habiendo mantenido una densidad de bivalvos casi 5 veces menor, luego de 21 días alcanzaron en los CP concentraciones de TAN-N proporcionalmente iguales (2,29 mg l⁻¹ ~0,0076 mg por g_{PH} mejillón) a las halladas en este trabajo (6,72 mg TAN-N l⁻¹, ~0,007 mg TAN por g_{PH} mejillón).

La tasa de incremento de TAN-N del CP mostró que tan solo en 3 días, las concentraciones alcanzadas en un sistema sin mantenimiento sobrepasarían los niveles de seguridad recomendados de ~ 1 mg TAN-N l⁻¹ (**Tabla 2** ver Capítulo 1, primera parte). En CP se alcanzaron las mayores concentraciones de TAN-N medidas durante los experimentos (6,72 mg TAN-N l⁻¹), sin observarse visualmente un efecto en los bivalvos, como el cierre de sus valvas o retraimiento del manto. A partir de estos resultados, se presume cierta tolerancia de *M. platensis* a concentraciones relativamente elevadas de TAN.

La acumulación de TAN-N en los sistemas con *Ulva* spp. (C= 0,18t) fue ligeramente más lenta que en CP (C= 0,31t) como resultado posiblemente no del metabolismo algal sino a procesos de desnitrificación bacteriana asociada a las superficies pasivas de los estanques [189] e incluso de las frondas de las mismas macroalgas. Esta hipótesis se ve fortalecida por el incremento exponencial de N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) en tales tratamientos, incluso mucho mayor (D15: 18 ± 0,06 mg N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) l⁻¹) a los 0,03 mg N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) l⁻¹ señalado por Cahill et al. [145] en tratamientos con macroalgas.

A partir de D4, el biofiltro bacteriano permitió disminuir y mantener las concentraciones de TAN-N por debajo de los niveles y criterios de seguridad (**Tabla 2** ver Capítulo 1, primera parte), a pesar de la variabilidad en la biomasa de mejillones. El proceso de desnitrificación no fue completo ya que se observó una acumulación de N-(NO₂⁻ + NO₃⁻) de forma potencial durante todo el periodo, sin ningún indicio de remoción de una etapa anaeróbica, aún luego de 15 días sin mejillones (D40). Una dinámica similar a la sucedida fue descrita por Srna, Baggaley [157], quienes informan la reducción de TAN a partir de una alta concentración inicial y el incremento de los nitratos y nitritos desde valores muy bajos hasta alcanzar una constante igual a la concentración de TAN inicial. Los resultados también son comparables a las concentraciones de

TAN-N mantenidas por el biofiltro bacteriano en un sistema de cultivo de peces ($0,25 \text{ mg l}^{-1}$), donde también se reporta la acumulación de N-NO_2^- [207].

Lefebvre et al. [207] y Cahill et al. [145] describieron los procesos de amonificación, nitrificación y reducción de TAN como cinéticas de primer orden con una tasa de descomposición en función de la temperatura y la concentración del elemento reactivo. Este tipo de expresión fue también observada con la utilización de biofiltro, tanto para el proceso de reducción de TAN-N como en la nitrificación por $\text{N-(NO}_2^- + \text{NO}_3^-)$.

La acumulación de nitritos y nitratos alcanzó los valores más elevados durante la utilización de biofiltro bacteriano. Las mayores concentraciones medidas de $12,72 \pm 1,80 \text{ mg N-(NO}_2^- + \text{NO}_3^-) \text{ l}^{-1}$ y $\sim 0,15 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ l}^{-1}$ fueron inferiores al estándar para el cultivo de especies marinas, a los niveles recomendados para la protección de la vida acuática de Canadá y al criterio de calidad en ecosistemas acuáticos para la protección de especies sensibles (**Tabla 7**). Existen por otra parte, ciertos criterios de mayor exigencia que sugieren máximos de $0,06 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ l}^{-1}$. Si bien no se conoce para bivalvos la toxicidad crónica de estos compuestos nitrogenados, los niveles alcanzados en los presentes experimentos fueron muy inferiores a las concentraciones LC_{50} de especies de ostras, vieiras y almejas. En general, los organismos marinos son relativamente resistentes a la toxicidad de los compuestos inorgánicos nitrogenados [87], ya que la potencial toxicidad de los nitritos se ve reducida por la presencia de iones de cloro del agua de mar [4].

Tabla 7. Resumen de estándares internacionales de calidad para nitritos y nitratos (mg l^{-1}) en agua de mar y para la acuicultura.

	N-NO₃⁻	N-NO₂⁻
Criterio para la calidad de agua estuarinas y costeras. ASEAN [211]	0,06	0,055
Criterios de calidad de agua recomendados para la protección de la vida acuática marina. Canadá [212] apud [87]	2,9 - 3,6	
Criterio de calidad de ecosistemas acuáticos para la protección de especies sensibles [213] apud [87]		0,08 - 0,35
Nivel de seguridad para la protección de la vida acuática. Canadá	45 (exposición prolongada) 339 (exposición breve)	
Nivel aceptable para el cultivo de especies marinas [82]	20 (88,6 NO ₃ ⁻)*	
Nivel aceptable para el cultivo de peces marinos [4]	50	
		LC50
<i>Argopecten irradians irradians</i> [192]	4453,40 (72 h)	345 (72 h)
<i>Mercenaria mercenaria</i> y <i>Cassostrea virginica</i> [143]	~4480 (72 h)	329-735 (96 h)

* Valor informado en bibliografía factor de conversión 0,2257 [214]

CONCLUSIÓN

Los experimentos realizados permitieron estimar el rendimiento de un SRC específico para el mantenimiento de mejillones. Se resaltó la necesidad de seleccionar los mecanismos de biofiltración de acuerdo a la escala de trabajo, quedando demostrado que el tipo de acuario elegido puede influir en el desempeño.

La evaluación de los aspectos fisiológicos de los organismos a cultivar permitió conocer la sensibilidad de la especie, así como también las posibles variaciones de los parámetros de cultivo a las que se ve expuesto un sistema integrado. En este sentido, los mejillones demostraron poseer tolerancia a la acumulación de diferentes componentes de nitrógeno inorgánico disuelto.

A partir de lo observado en esta investigación, se deduce que el origen de los mejillones no sería un factor de relevancia para el diseño de un SRC, mientras que sí lo sería el periodo de aclimatación para la estabilización del metabolismo de los organismos.

El conocimiento de la tasa de excreción de los bivalvos, en complemento a la acumulación de TAN-N en un dado sistema, permitiría el cálculo de su equivalente en un mecanismo de biofiltración. Bajo las condiciones de experimentación desarrolladas en SRC, el biofiltro bacteriano tuvo mejor desempeño que *Ulva* spp. y se considera una mejor alternativa práctica y sencilla para el desarrollo de las depuraciones *ex situ* de bivalvos intoxicados con biotoxinas. Futuras investigaciones deberán considerar la optimización de la superficie efectiva de crecimiento bacteriano y el rendimiento de la biofiltración, incorporando, además, variables como la velocidad de flujo entre los tanques con el biofiltro y los organismos mantenidos.

CAPÍTULO 2

TOXINA PARALIZANTE DE MOLUSCOS (TPM). Bivalvos sometidos a procesos de depuración *ex situ* y experiencias de intoxicación

INTRODUCCIÓN GENERAL

Floraciones Algales Nocivas y TPM

En los océanos, las comunidades fitoplanctónicas reflejan cuantitativa y cualitativamente las características del ambiente marino [215]. De acuerdo a ciertos factores ambientales (temperatura, salinidad, luz, nutrientes, entre otros), a su variabilidad temporal y espacial y a la presencia/ausencia de predadores, las microalgas son capaces de desarrollar diferentes dinámicas y ciclos de vida [216,217]. En algunos casos, especies particulares bajo adecuadas condiciones ambientales, pueden proliferar de forma vegetativa aumentando rápidamente su número celular [218]. Estos eventos son de importancia mundial debido a que muchas de esas especies generan problemas ecológicos, impacto económico y riesgo para la salud humana [219,53,220]. La Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO definió el término Floraciones Algales Nocivas (FAN o su sigla en inglés HAB – Harmful Algal Blooms) como referencia al incremento microalgal (independientemente de su concentración) que generara un impacto negativo (nocivo) en la salud pública, la acuicultura, el ambiente y/o las actividades recreativas [221,222].

Debido a las implicancias de las FAN, estos eventos han sido estudiados a lo largo de los años desde diversos aspectos. Principalmente se busca comprenderlas en su vínculo con fenómenos naturales como por ejemplo El Niño, o con efectos antrópicos como el calentamiento global [223]. Frecuentemente, se ha señalado un aumento en intensidad y duración de los episodios, además de una expansión de las áreas afectadas [52-57]. Estos aspectos han sido observados especialmente en determinadas localidades con desarrollo productivo en acuicultura, como es el caso ocurrido en Chile, en donde las FAN se expandieron a nuevas regiones tras la eutrofización resultante de mortalidades masivas de salmónidos [224,225]. Debe considerarse, además, que la dinámica de las FAN es determinada por la especie causante, pudiendo en algunos casos no estar potenciada por actividades antrópicas [223].

El conocimiento sobre la diversidad fitoplanctónica capaz de generar FAN ha ido en aumento debido, en cierta medida, a la incorporación de nuevas áreas de estudio, al aumento de

investigaciones referentes a la temática, al aumento del vínculo del hombre con el medio marino y a las mejoras tecnológicas de medición. Se estima que por año se describen entre 3 y 4 especies fitoplanctónicas nuevas [226,227]. Zingone, Enevoldsen [227], señalan que, de las aproximadamente 4000 especies de microalgas descritas hasta el momento, 200 (4%) corresponden a especies nocivas. Dicha fracción incluye 80 especies productoras de toxinas (2%), dentro de las cuales aproximadamente el 75% corresponde a especies de dinoflagelados. Los mismos autores sugieren la subestimación del número de especies tóxicas, de acuerdo a la gran cantidad de especies crípticas que se han comenzado a diferenciar tras la aplicación de nuevas técnicas de detección y análisis de toxinas.

Un tipo de FAN que involucra la producción de toxinas de alto riesgo para el ser humano, es aquella asociada a las Toxinas Paralizantes de Moluscos (TPM o su sigla en inglés PST – Paralytic Shellfish Toxins) [228]. Las TPM son capaces de bloquear el canal de sodio dependiente de voltaje. Este canal es una proteína que atraviesa la membrana plasmática de muchas células excitables en los nervios de los mamíferos, en las fibras del músculo esquelético y en la mayoría de las fibras del músculo cardíaco. Bajo correcto funcionamiento, el canal de sodio, dependiente de potencial y con selectividad iónica, participa en la despolarización de la célula generando un aumento de la fase del potencial de acción. Cuando las TPM bloquean el canal, enlentecen o anulan completamente la propagación del potencial de acción y por ende, producen una parálisis muscular [229]. La intoxicación por estas toxinas es altamente riesgosa en vertebrados ya que la parálisis puede desencadenar un paro respiratorio y, por consiguiente, la muerte. Hasta el momento no se han desarrollado antídotos o tratamientos específicos frente a una intoxicación por TPM en humanos [53,54,228].

Las TPM son producidas por dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* y *Gymnodinium*, así como también por algunas especies de cianobacterias en ambientes de agua dulce [230-232,56,52]. Las TPM son un conjunto de aproximadamente 57 análogos (al menos 18 con relevancia toxicológica) derivados de la saxitoxina (STX), una tetrahidropurina neurotóxica (**Figura 15**) [233]. El conjunto de TPM se separa en grupos como carbamatos, N-sulfocarbamoilos, decarbamoilos y deoxicarbamoilos [234]. La molécula de STX fue la primera descrita, siendo una toxina carbamato no sulfatada de estructura muy simple. Fue calificada como la de mayor toxicidad, razón por la cual la toxicidad total de TPM se reporta como microgramos equivalentes de STX ($\mu\text{g eq.STX}$) [55,235-237]. La toxicidad de la molécula radica en el dihidroxilo (o grupo cetona hidratado) del anillo de cinco carbonos (C12-OH de la **Figura 15**). Sus análogos, de menor toxicidad, se conforman con diferentes estructuras entre los grupos funcionales R_{1-4} llegando a una reducción de toxicidad de hasta un 60% por la presencia de un hidroxilo en la posición R_4 en los decarbamoilos [56] (**Tabla 8**).

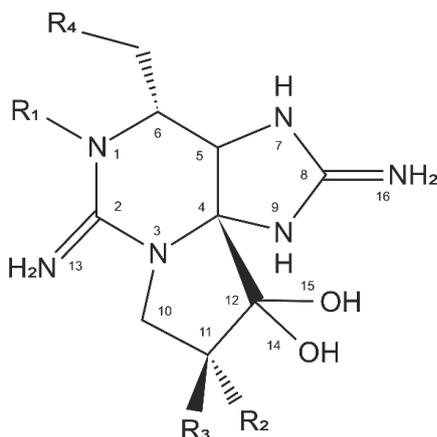


Figura 15. Estructura molecular básica de la saxitoxina. R₁₋₄: grupos funcionales. (Figura modificada de Cusick y Sayler, 2013).

Tabla 8. Variedad de Toxinas Paralizantes de Moluscos. STX: Saxitoxina, GTX: Gonyautoxina, R₁₋₄: grupos funcionales. (Tabla modificada de Cusick y Sayler, 2013).

División	Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Carbamatos	STX	H	H	H	OCONH ₂
	NeoSTX	OH	H	H	OCONH ₂
	GTX 1	OH	OSO ₃ ⁻	H	OCONH ₂
	GTX 2	H	OSO ₃ ⁻	H	OCONH ₂
	GTX 3	H	H	OSO ₃ ⁻	OCONH ₂
	GTX 4	OH	H	OSO ₃ ⁻	OCONH ₂
N-sulfocarbamoilo	GTX 5 (B1)	H	H	H	OCONHSO ₃ ⁻
	GTX 6 (B2)	OH	H	H	OCONHSO ₃ ⁻
	C1	H	OSO ₃ ⁻	H	OCONHSO ₃ ⁻
	C2	H	H	OSO ₃ ⁻	OCONHSO ₃ ⁻
	C3	OH	OSO ₃ ⁻	H	OCONHSO ₃ ⁻
	C4	OH	H	OSO ₃ ⁻	OCONHSO ₃ ⁻
Decarbamoilo	dcSTX	H	H	H	OH
	dcNeoSTX	OH	H	H	OH
	dcGTX 1	OH	OSO ₃ ⁻	H	OH
	dcGTX 2	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
	dcGTX 3	H	H	OSO ₃ ⁻	OH
	dcGTX 4	OH	H	OSO ₃ ⁻	OH
Deoxidecarbamoilo	doSTX	H	H	H	H
	doGTX 2	H	H	OSO ₃ ⁻	H
	doGTX 3	H	OSO ₃ ⁻	H	H

Implicancias ecológicas y sociales

Las algas planctónicas son el alimento de muchos animales marinos filtradores, como los bivalvos, esponjas, ascidias, algunos peces, entre otros. Cuando ocurre un cambio en las condiciones ambientales y se produce una floración de la especie productora de TPM [57], los organismos filtradores incorporan toxinas a través del alimento. Particularmente, la sensibilidad de los invertebrados a los efectos tóxicos es muchas veces relativamente baja debido a que el efecto nocivo no involucra directamente funciones vitales. Los efectos inmediatos en bivalvos expuestos a fitoplancton tóxico se relacionan con una disminución de la tasa de filtración, absorción y crecimiento, en diferentes grados de aceptación y acostumbramiento [238,239]. Sin embargo, se han registrado serios daños, incluyendo grandes mortalidades en bivalvos con poca tolerancia (o nula), efecto también observado para otros invertebrados como gasterópodos [240]. Sumado a lo anterior, la etapa embrionaria de desarrollo del bivalvo es especialmente afectada, pudiendo resultar problemático en aspectos relacionados al repoblamiento [241]. El riesgo para estas poblaciones susceptibles aumenta en situaciones en donde las FAN productoras de toxinas florecen en áreas sin previos registros del evento tóxico, o aumentan en duración e intensidad [242,243,239,244].

Aquellos bivalvos que son resistentes a los efectos tóxicos de las TPM y que poseen altas tasas de filtración [245], se vuelven vectores de las toxinas al bioacumularlas en sus propios tejidos, convirtiéndose en un potencial riesgo para sus depredadores y consumidores superiores de la red trófica [246-248]. Ciertos peces filtradores pueden verse directamente afectados [59,60] o incluso también llegar a transferir las toxinas a sus consumidores; tal es así como, en diferentes eventos nocivos, se han registrado mortalidades de aves [61] [62] apud [249] y grandes mamíferos como las ballenas [63,64].

Las especies capaces de producir TPM se diferencian entre sí por el tipo de toxina que producen. El organismo productor está caracterizado por su perfil tóxico o proporción de cada análogo que, a su vez, condiciona su toxicidad total. Ciertamente, también la localidad y el ambiente en donde se desarrolle dicha microalga tienen gran influencia en el perfil tóxico [250-252,55,58,253]. De allí que la toxicidad pueda variar de una región a otra, incluso siendo la misma especie productora. Aquellos organismos que las consumen y bioacumulan en sus propios tejidos, generalmente transforman metabólicamente la estructura molecular de las toxinas adquiridas en nuevos análogos químicos [245]. Entender los cambios en la composición de toxinas es importante por un lado porque permite predecir la dinámica de las floraciones y por otro porque las biotransformaciones son un determinante principal de la toxicidad neta en los tejidos de los bivalvos [245].

A nivel mundial, las TPM poseen la mayor cantidad de registros históricos de intoxicaciones y han sido responsables de la mayoría de las fatalidades humanas asociadas a intoxicación por biotoxinas [58]. Estimaciones realizadas a partir de mejillones tóxicos, asocian síntomas leves en el hombre por una ingesta oral entre 144 y 1660 $\mu\text{g eq.STX}$ por persona e intoxicaciones fatales entre 456 y 12400 $\mu\text{g eq.STX}$ por persona. Sin embargo, estos rangos pueden presentar grandes variaciones. Por ejemplo, existen registros de muerte por ingesta de solo 300 $\mu\text{g eq.STX}$ por persona y de ausencia de síntomas para dosis de 320 $\mu\text{g eq.STX}$ por persona [229]. Recientemente, mediante el uso de modelos dosis-respuesta en humanos, Arnich, Thébault [254] identificaron dosis de 0,37 $\mu\text{g eq.STX}$ por kg de peso corporal (pc) a partir de la cual podrían observarse efectos, dosis de 1,85 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ pc para producir sintomatologías leves, dosis de 5,16 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ pc para efectos moderados y dosis de 82,2 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ pc como potencial causativa de fatalidades. En el 2005, la FAO [229] señalaba que el aumento aparente de las intoxicaciones humanas causadas por TPM podrían ser consecuencia de los progresos en la identificación y detección de toxinas, además del incremento de registros médicos; inclusive podría deberse a la expansión del cultivo y consumo de mariscos.

A lo largo de las siguientes partes del capítulo se presentan las investigaciones desarrolladas sobre TPM en bivalvos de interés comercial. Se aborda en primer lugar el estudio de la cinética de depuración *ex situ* de organismos naturalmente intoxicados en las costas de Chubut (Patagonia Argentina). A continuación, se brindan los primeros avances en el conocimiento de la intoxicación de bivalvos de la misma región, pero en condiciones totalmente experimentales. Como última etapa, se evalúa la capacidad del producto Quitosano como facilitador de la depuración; en este caso se usaron bivalvos de criadero como organismos de prueba y tanto la intoxicación como la depuración se realizaron en laboratorio.

PRIMERA PARTE

TPM en Argentina. Depuración del bivalvo *Mytilus platensis*

INTRODUCCIÓN

En Argentina, los eventos de FAN productoras de TPM han sido relacionados con diversas especies de dinoflagelados, tales como: *Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium tamarense* en norte del mar Argentino [255,256], *A. catenella* en el canal de Beagle [46] y *A. tamarense/catenella* [250,51,257-261] en las costas de la provincia del Chubut (**Figura 16**). Recientemente, *A. ostensfeldii* ha sido descrito como productor de TPM en las costas norpatagónicas [262] y también la presencia de *A. minutum* fue reportada en la zona chubutense como probable productora de toxinas. Sin embargo, la contribución de este último en la intoxicación de los bivalvos sería muy baja, de acuerdo a las densidades celulares registradas en las muestras de campo [67]. Con el advenimiento de las técnicas moleculares, la clasificación de las especies del género *Alexandrium* fue revisada por varios autores. A partir de análisis filogenéticos se encuentran identificados tres complejos de especies: el grupo *A. ostensfeldii*, el grupo *A. minutum* y el complejo de especies *A. tamarense* [263]. Para el último caso, los criterios morfológicos para diferenciar entre las especies resultaron ser inadecuados (la presencia de poro ventral en la primera placa apical y/o la formación de cadenas [264,249] **Figura 16**). En especial el Grupo I de ese complejo, ha sido discutido reiteradas veces y recientemente establecido como nombre válido *Alexandrium catenella* (Prud'-homme van reine 2017) [67,259,260]. Por lo expuesto y para facilitar la interpretación de los resultados con las publicaciones existentes hasta el momento, en la presente tesis se hace referencia a la especie de las costas del Chubut como *A. tamarense/catenella*.

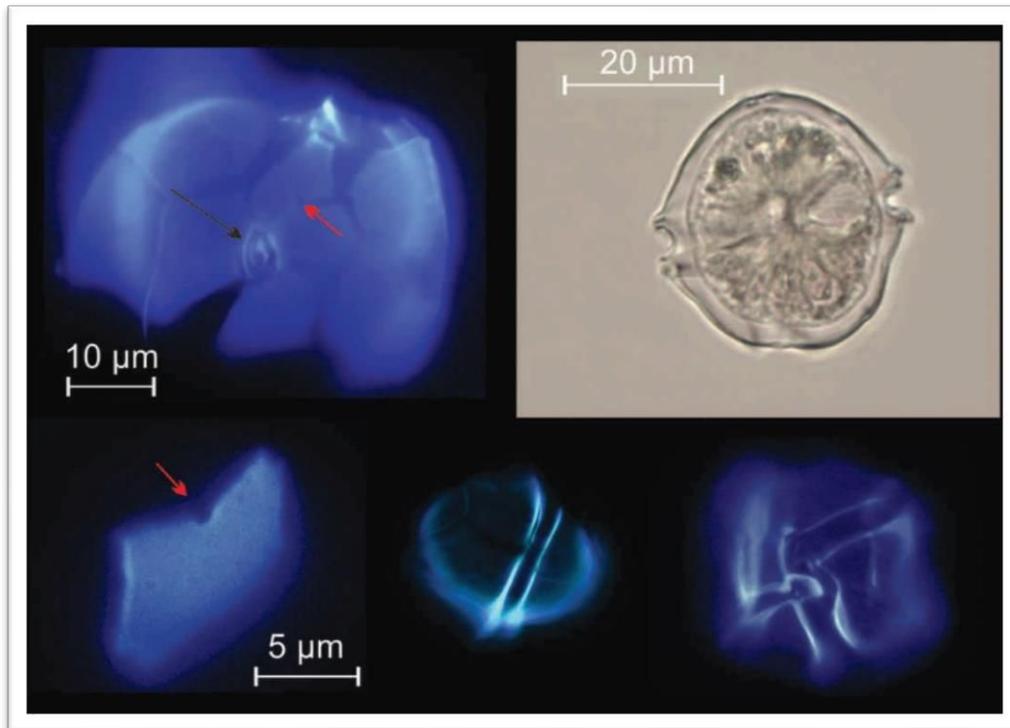


Figura 16. Arriba a la derecha: célula de una cepa de *A. tamarense/catenella* observada por microscopio óptico. Arriba a la izquierda y abajo: células vegetativas de *Alexandrium tamarense/catenella* examinadas con microscopía de fluorescencia, posterior a la tinción con Calcofluor (Fluorescent Brightener 28, Sigma – Aldrich Co., St. Louis, USA). En la imagen se señala con una flecha negra la placa del poro apical P_o y con una flecha roja el poro ventral en la primera placa apical P_1' . (fotografías de la Dra. Leilen Gracia Villalobos).

Poder predecir floraciones es un importante pero ambicioso objetivo. A pesar de las dificultades en medir las condiciones iniciales del ambiente, algunos modelos matemáticos han podido ser desarrollados. Sin embargo, su aplicabilidad es restringida a las especies y condiciones locales que fueron marco de su construcción [265]. Los factores que pueden estar involucrados en la floración de *A. tamarense/catenella* son pobremente comprendidos. De forma general para las costas de Chubut, se conoce que las floraciones suceden principalmente durante la primavera y verano [266,19,267]. En Península Valdés, un área libre de impacto antrópico (golfo San José y norte del golfo Nuevo), se ha estudiado que la recurrencia del fenómeno es clara, presentándose todos los años con bajas concentraciones celulares pero aun así con valores altos de toxicidad en bivalvos [266]. Por otra parte, a partir de observaciones directas a campo se formuló la hipótesis de cierta plasticidad genética entre las diferentes poblaciones de *Alexandrium*, la cual le conferiría la capacidad de generar floraciones en diferentes momentos del año, con diferentes condiciones ambientales [268] e incluso, variar su potencial tóxico de acuerdo a la disponibilidad de nitrógeno [250].

Los eventos de floraciones toxígenas de TPM en Argentina producen, claramente, acumulación de TPM en bivalvos de diferentes especies, pero también han sido detectadas en los gasterópodos *Zidona dufresnei* y *Odontocymbiola magellanica* [69,269]. Además, entre los años 2000 y 2006 se registraron a lo largo de las costas de la provincia del Chubut mortalidades de pingüinos *Spheniscus magellanicus* y otras aves marinas [61,62], eventos que podrían estar relacionados con un episodio de floración de *A. tamarense/catenella*. Sumado a lo anterior, no se descarta la posibilidad de que la ballena franca austral *Eubalaena australis* esté siendo afectada por biotoxinas [68].

La mayor preocupación generada por las TPM se asocia al riesgo de salud humana por consumo de productos marinos con toxinas. En Argentina, los registros comienzan en el año 1980 con un caso de intoxicaciones fatales, asentándose a lo largo de los años varios episodios de diferente gravedad, siendo el último fatal notificado para el año 2011 [270,271,51,272-275]. A fin de evitar intoxicaciones humanas por el consumo de moluscos tóxicos, las autoridades provinciales imponen vedas extractivas temporales cuando los niveles de TPM exceden el límite de 800 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ de tejidos blandos, toxicidad determinada a partir del Bioensayo en Ratón (Decreto Provincial N° 309/ 2011 – Boletín Oficial marzo 2011).

En la provincia del Chubut el “Plan de Prevención y Control de Mareas Rojas” funciona con este fin, desde el año 1985 [276], determinando toxicidad en moluscos comercializables pero también monitoreando las poblaciones fitoplanctónicas. La suspensión de actividades en acuicultura resultante de la veda es por tiempo indefinido y depende enteramente del programa de monitoreo provincial para detectar el momento de finalización. Sin embargo, la frecuencia de muestreo puede ser demasiado espaciada para el estricto seguimiento del fenómeno lo que conduce a una extensión de la veda. Por eso mismo, entender la cinética de depuración de las toxinas se torna especialmente importante no solo para el desarrollo de herramientas relacionadas al monitoreo, sino también para propuestas prácticas en la gestión de la acuicultura [58].

La dinámica de depuración de bivalvos naturalmente intoxicados con TPM, generalmente, es poco conocida [71]. En Argentina, solo se realizó el seguimiento *in situ* de una especie, la cholga *Aulacomya ater* (renombrada como *Aulacomya atra*). Sin embargo, en este tipo de estudios a campo, la ingesta de fitoplancton no es fácil de cuantificar y se dificulta la comprensión de los procesos de depuración [277,278,58]. Como una alternativa, la depuración *ex situ* puede ser una herramienta muy útil porque, al evitar la re-intoxicación, permite estudiar la cinética de depuración y la biotransformación entre análogos que ocurre durante la misma. Existen en la literatura científica trabajos que reportan resultados positivos en depuraciones *ex situ* de TPM de bivalvos [279] y otras ficotoxinas como Toxina Amnésica de Moluscos (TAM) [280]. También es sabido

que las transformaciones entre análogos dependen de las especies involucradas, tanto del fitoplancton productor como de la capacidad metabólica del organismo consumidor [245].

Los bivalvos del género *Mytilus* son considerados centinela para la detección temprana de FAN de TPM ya que las bioacumulan rápidamente expresando toxicidad fácilmente detectable en sus tejidos. Son considerados depuradores rápidos [71,58] y poseen una distribución muy amplia en todo el territorio argentino, tanto en el sector submareal como intermareal [281,58]. Todo ello hace al mejillón *M. platensis* un organismo modelo y prometedor para comenzar el estudio experimental de las TPM y para la aplicación de nuevas técnicas de depuración. Durante los últimos años, se han incrementado en la Argentina las investigaciones referentes a TPM y otras biotoxinas [66,19,67,49,68,69,267,282]. Sin embargo, aún no se han reportado experiencias de laboratorio que permitan avanzar en la comprensión de la cinética de captación y eliminación de las toxinas por parte de los bivalvos u otros vectores de toxinas residentes en la zona costera del país.

El objetivo general de esta primera parte es evaluar cualitativa y cuantitativamente la depuración *ex situ* sin ofrecimiento de alimento, del mejillón *M. platensis* naturalmente intoxicado con TPM. Debe considerarse que el estudio de la cinética de depuración bajo dichas condiciones, conlleva una dificultad inherente derivada de la impredecibilidad del desarrollo de FAN y del nivel de toxicidad alcanzado en cada evento. En tal sentido, la posibilidad de contar con organismos intoxicados y el nivel de toxicidad inicial en cada ensayo realizado, dependieron estrictamente de la ocurrencia de eventos naturales. Estas experiencias son las primeras del tipo en la provincia del Chubut. El estudio se complementa con la medición de TPM en bancos naturales de mejillones y con el seguimiento *in situ* de su toxicidad en un sitio y evento puntuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experiencias de depuración ex situ (Dex) de mejillones de la costa de Chubut

Recolección de mejillones y preparación del experimento

Al momento de ser detectado un evento de floración de *A. tamarense/catenella* y posterior confirmación de la presencia de toxinas en mejillones, se procedió a recolectar bivalvos en la localidad involucrada. Esta instancia se desarrolló en colaboración con el Laboratorio de Salud Ambiental de la provincia del Chubut, donde se reciben y procesan las muestras provenientes del monitoreo de acuerdo al “Plan de Prevención y Control de Mareas Rojas”.

Fue factible realizar 3 experimentos, dos de ellos utilizando mejillones intoxicados de la localidad de Rada Tilly (45° 54' 59.5" S 67° 32' 27.3" O), uno durante la primavera 2015 (**Dex1**) y otro en el verano 2016, (**Dex2**) y un tercero con mejillones de la localidad de Quinta Rossi (45 °40' 35.1" S 67° 21' 31.3" O) durante la primavera 2016 (**Dex3**).

En cada caso, se recolectaron manualmente individuos vivos de *M. platensis* de la zona intermareal bajo (Dex1 y Dex2: largo $5,5 \pm 0,6$ cm, Dex3: largo $4,5 \pm 0,3$ cm). Los bivalvos fueron transportados dentro de conservadoras plásticas refrigeradas con packs de hielo y humedad. Una vez arribados, se llevaron al laboratorio donde fueron limpiados de epibiontes, arena y algas marinas y un número equivalentes a ~ 300 g de tejido blando (60-80 individuos) se separó para la posterior determinación de TPM. Se consideró a estos organismos como representativos de las condiciones iniciales del campo (Control de Campo Inicial: **CCI**) y su toxicidad como la concentración inicial de la depuración. Los individuos restantes (~1000 mejillones) se distribuyeron equitativamente entre tres SRC (tres réplicas) para dar comienzo inmediatamente a las experiencias de depuración. Cada sistema tenía un volumen de 300 l de agua de mar y contaba con biofiltro bacteriano, una bomba de agua (2000 l/h) para garantizar la recirculación, y una piedra aireadora para mantener la concentración de oxígeno disuelto próximo al nivel de saturación. El agua de mar empleada fue filtrada previamente hasta 1 μ m y desinfectada con luz UV. Las condiciones experimentales se fijaron, de acuerdo a las condiciones ambientales del sitio de recolección, en una temperatura de 12,5°C, salinidad 33 ups y fotoperiodo 12/12. La materia orgánica sedimentada (heces y pseudoheces) se aspiró diariamente a través de un sistema sifón y el agua de mar perdida durante este proceso se reemplazó inmediatamente. Al momento de detectarse mejillones muertos, estos fueron retirados del sistema y contabilizados para la estimación del porcentaje de mortalidad. Los bivalvos no fueron alimentados en el transcurso del experimento.

Depuración ex situ de mejillones naturalmente intoxicados

Una vez iniciado el experimento, se retiraron periódicamente un número de mejillones correspondientes a ~ 200 g de tejido blando (50-80 mejillones) de cada sistema o réplica. Las extracciones fueron programadas cada 7 días, aumentando la frecuencia durante los primeros 10 días en caso de concentraciones de TPM iniciales superiores a los 2000 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ o extendiendo los intervalos de extracción en caso de no detectarse diferencias significativas en la toxicidad entre muestras consecutivas en el tiempo. Los tejidos blandos de los mejillones derivados de cada sistema se dividieron en dos sub-réplicas, cada una de las cuales se homogeneizó para la determinación inmediata de la toxicidad mediante Bioensayo en Ratón (BR). La toxicidad correspondiente a cada intervalo de tiempo se estimó como el valor medio de las tres réplicas con su correspondiente desvío estándar (DE). Las extracciones periódicas se efectuaron hasta emplear el total de mejillones de cada sistema, momento en el cual se dio por concluida la experiencia de depuración *ex situ* (Fin de la Depuración: **FD**). Simultáneamente con esta última extracción, se recolectó una muestra de campo que se utilizó como Control de Campo al Final (**CCF**) de la depuración, para medir la concentración en los mejillones que permanecieron *in situ* durante la experiencia y luego comparar ambos escenarios.

Seguimiento de la depuración in situ (Din) de mejillones naturalmente intoxicados

Durante la primavera 2016 se detectó un evento de TPM en la localidad de Cerro Avanzado (42° 48' 57.2" S 64° 53' 27.1" O). A partir de ese momento se comenzaron a extraer cada 10 días muestras de mejillones del intermareal bajo a fin de realizar el seguimiento de la depuración *in situ* (**Din**). La frecuencia de extracción de bivalvos varió en función de la accesibilidad al sitio de extracción asociada al horario de marea baja. En cada momento se recolectó un número de individuos equivalente a ~ 200 g de tejidos blandos (50-80 mejillones de 8,1 cm \pm 1,5 cm), para conformar dos réplicas independientes que se procesaron para su inmediata determinación de concentración de TPM.

Análisis de TPM

Determinación mediante Bioensayo en Ratón (BR)

La toxicidad total de todas las muestras se determinó por el método biológico oficial en Argentina BR [283] según lo descripto por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (1995) (Association of Official Analytical Chemists: AOAC) [284]. El método se basa en el efecto tóxico producido por un extracto ácido de la muestra analítica, inoculado intraperitonealmente en ratones. El límite de detección depende de la cepa de animales utilizada, pudiendo encontrarse entre 320 y 480 μg

eq.STX kg⁻¹. Siguiendo el procedimiento analítico, se homogeneizaron los tejidos blandos de mejillones y se separaron 100 g en un vaso de precipitado al cual se les agregó 100 ml de HCl 0,1 N y se calentó a 80°C durante 5 minutos. Posterior a ello, el pH de la matriz fue ajustado a 3,0 y una alícuota de aproximadamente 20 ml de muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se tomó 1 ml del sobrenadante obtenido y se procedió a la inoculación del ratón. Este procedimiento se realizó en 3 individuos de aproximadamente 20 g cada uno. De acuerdo al momento de muerte y el peso de los ratones, se utilizaron las tabulaciones del método y se obtuvo la concentración de la toxicidad en Unidades Ratón (UR) (**Figura 17**). A continuación, los valores se convirtieron en unidades equivalentes de toxicidad (µg eq.STX kg⁻¹ de tejido blando) siguiendo la ecuación $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1} = \text{UR} \times \text{factor de conversión} \times \text{factor de dilución} \times 200$ [284]. El factor de conversión fue de 2, el cual corresponde a la estirpe de ratón utilizada.



Figura 17. Bioensayo en ratón con muestras de mejillones tóxicos.

Determinación mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección de Fluorescencia

Los extractos ácidos de algunas muestras se congelaron y mantuvieron a -20°C para su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con derivatización post columna y Detección de Fluorescencia (High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: HPLC-FLD) [285]. Esta técnica es la más recomendada para la cuantificación y determinación de perfiles toxicológicos, además de poseer una alta sensibilidad pudiendo detectar desde 20-100 fentomoles. Dado el elevado costo asociado, solo algunas muestras fueron seleccionadas para su análisis, en función de los mejores resultados obtenidos previamente mediante BR (**Tabla 9**).

Tabla 9. Muestras seleccionadas para análisis por HPLC-FLD en donde se muestran las instituciones responsables del análisis.

Depuración	Muestras seleccionadas	Número de réplicas	Laboratorio
Dex1	D3, FD, CCF	3	Provincial de Salud Ambiental del Chubut
Dex3	CCI, D17, FD, CCF	1	Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP)
Din	CCI, D6, D30	1	

CCI: Control de Campo Inicial (= Inicio de la Depuración), FD: Fin de la Depuración, CCF: Control de Campo al Final de la depuración, D3, D6, D17 y D30: muestras del día 3, 6, 17, y 30, respectivamente.

A continuación, se describen los procedimientos analíticos que se llevaron a cabo en cada laboratorio.

Laboratorio Provincial de Salud Ambiental (Trelew)

Primeramente, los extractos ácidos se descongelaron, se centrifugaron a 8000 rpm durante 2 minutos y se pasaron a través de una columna de cartucho Sep-Pak C18, previamente activado con metanol y aire. Se inyectó una alícuota de extracto (primeros 500 µl) en el cromatógrafo (Waters 2695) equipado con una columna C8 fase reversa (5 µm, 150 × 4,6 mm), derivatización postcolumna y seguido por un detector de fluorescencia (Waters 2475). La fase móvil (velocidad de flujo 0,7 ml.min⁻¹) consistió en 2 mM ácido 1-hepteno sulfonato de sodio en 10 mM de buffer de fosfato de amonio (pH 7,1) para la separación de los grupos GTX y ácido 2 mM 1-hepteno sulfonato de sodio en 30 mM de buffer de fosfato amónico (pH 7,1) y acetonitrilo al 5% para el grupo de las STX. La derivatización posterior a la columna se logró utilizando un Módulo de Reacción Post Column - Waters®. Solo se usaron solventes orgánicos de grado HPLC (Merck) y agua ultrapura (sistema de purificación Simplicity®, Millipore). Para la identificación de toxinas y su cuantificación, se adquirió material de referencia de saxitoxinas (STX; dcSTX) y gonyautoxinas (GTX 1&4; GTX 2&3) del Consejo Nacional de Investigación del Instituto de Biociencias Marinas de Canadá (National Research Council of Canada-Institute for Marine Biosciences: CNRC-NRC).

El contenido de TPM de las muestras se identificó y cuantificó mediante la comparación de los tiempos de retención y las áreas de los picos con las de los estándares. La concentración de cada análogo de TPM se expresó como nmol g⁻¹ de tejido blando mientras que la toxicidad total de las muestras como µg eq.STX kg⁻¹ de tejido blando. Los valores finales calculados por el laboratorio responsable.

Al inicio, los sobrenadantes de los extractos ácidos se descongelaron, se filtraron utilizando filtros GF/F y se pasaron a través de una columna de cartucho Sep-Pak C18 (Waters), previamente activado con metanol y equilibrado con agua (**Figura 18**). Se colectaron los últimos 500 μl en microtubos-filtros (peso molecular de exclusión de 10000 daltons, ultrafree, Millipore) y se centrifugaron a 8000 rpm durante 2 minutos. De ese ultrafiltrado se inyectaron 5-20 μl en el cromatógrafo (Shimadzu LC-10A) equipado con una columna C8 fase reversa (Inertsil GL Phenomenex, 5 μm , 150 \times 4,6 mm, Alltima, Alltech), derivatización postcolumna (Eldex AA 100-S-2), seguido por un detector de fluorescencia en línea (Shimadzu FR-10Axl).



Figura 18. Imagen ilustrativa de un cartucho Sep-Pak C18.

La fase móvil (velocidad de flujo $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) consistió en 2 mM de deheptasulfonato en 10 mM de fosfato de amonio (pH 7,2) para la separación de los grupos GTX, 2 mM 1-heptasulfonato en 30 mM de buffer fosfato fosfato (pH 7,1) acetonitrilo al 5% para el grupo de STX y 2 mM tetrabutilamonio fosfato (pH 5,8) para los grupos C1-C4. Se realizó un análisis adicional omitiendo el agregado de oxidante en el reactor post-columna con el fin de descartar falsos positivos debido a impurezas autofluorescentes [256]. Los estándares fueron adquiridos en el CNRC-NRC. La concentración se determinó comparando las áreas de los picos aislados (toxinas) detectados en la muestra, con el área de los picos de los estándares analíticos de cada toxina. La concentración de cada análogo de TPM se expresó como nmol g^{-1} de tejido blando. Para el cálculo de toxicidad total de las muestras en $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ de tejido blando se utilizaron los Factores de Toxicidad Equivalente (Toxicity Equivalency Factors – TEF) [234].

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos por BR de cada depuración fueron analizados mediante ajustes de regresión. La asociación de los resultados obtenidos mediante BR y HPLC-FLD se estimó mediante análisis de correlación. Las diferencias entre las concentraciones de TPM y entre las toxicidades totales correspondientes a CCI, CCF y FD se analizaron utilizando análisis unidireccional de varianza (ANOVA) t-test o F-test seguido de una prueba post hoc de Tukey. Antes del análisis, la normalidad y la homocedasticidad de los datos se analizaron con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente. En aquellos casos en donde los supuestos no se cumplieron, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados fueron considerados significativos de acuerdo al $\alpha < 0,05$. R Core Team (2016) se usó para los análisis estadísticos.

RESULTADOS

Depuración ex situ de mejillones naturalmente intoxicados.

Los resultados por BR obtenidos para el inicio y fin de las depuraciones *ex situ* (Dex) se resumen en la **Tabla 10**. En función de los eventos naturales, fue factible contar con 3 niveles de toxicidad inicial. En la experiencia de Dex1, la toxicidad en CCI fue notablemente mayor que las restantes (F-test = 567,8, $p < 0,001$) e igual a 6,5 veces el NS para consumo humano. En Dex2 resultó 1,3 veces inferior a NS y en Dex3 fue 1,2 veces mayor.

Tabla 10. Niveles de toxicidad total medida mediante BR de las diferentes depuraciones *ex situ* de mejillones naturalmente intoxicados. Se muestra la media y el desvío estándar (DE) de 3 réplicas y el porcentaje de reducción de toxicidad (% Rd.) entre CCI y FD. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de medias.

	CCI		FD		CCF		% Rd.	<i>p</i>	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE			
Dex1	5200,5 ^b	182,5	1135,9 ^c	253,35	12477,8 ^a	2936,2	78,2	Kruskal-Wallis	0,017
Dex2	598,5	33,2	286,3	248,5	388,7	3,8	52,2	Kruskal-Wallis	0,103
Dex3	995,2 ^a	148,5	263,7 ^b	194,1	761,8 ^a	108,9	73,5	Kruskal-Wallis	0,03

CCI: Control de Campo Inicial (= Inicio de la Depuración), FD: Fin de la Depuración, CCF: Control de Campo al Final de la depuración.

La evolución en el tiempo de los resultados por BR en Dex1 y Dex3 se ajustaron a un modelo exponencial: $C = C_0 e^{-Kt}$ donde C es la toxicidad total al tiempo t; C_0 es la toxicidad inicial; t es el tiempo transcurrido y K es una constante con unidades de tiempo (**Figura 19 a y c**). Para el caso de Dex2, el ajuste no fue significativo para ninguna función de regresión (**Figura 19 b**).

Dex1 (Figura 19 a): el experimento se prolongó por 29 días, momento en que se retiraron los últimos mejillones del sistema. Mientras que en dicho período la toxicidad en campo aumentó en 140% (CCI = 5200, CCF = 12478 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$), la depuración *ex situ* permitió una reducción del 78% (FD: 1136 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$). La evolución de la toxicidad en el tiempo fue ajustada al modelo exponencial $C = 4489 e^{-0,053t}$ ($R^2 \text{ aj.} = 0,8$; $p < 0,001$) y, aunque experimentalmente no se alcanzó el estado estacionario, el modelo permitiría predecir la posibilidad de alcanzar NS después de 33 días de depuración.

Dex2 (Figura 19 b): La reducción de la toxicidad alcanzada, de aproximadamente el 50%, no fue significativa (CCI: 599; FD 286 $\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$). Una vez comenzada la depuración *ex situ* se obtuvo un estado estacionario desde la primera extracción (D5: 405,2 $\mu\text{g eq. STX kg}^{-1} \pm 132,3$), manteniéndose sin diferencias significativas en las dos extracciones subsiguientes (D17 y FD). Tampoco se observaron diferencias significativas entre FD y CCF.

Dex3 (Figura 19 c): Al finalizar la experiencia luego de 30 días de depuración, se obtuvo una reducción significativa en la toxicidad del 73,5% (CCI = 995; FD = 264 $\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$), mientras que en campo la concentración durante ese período solo se redujo hasta 762 $\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$ (CCF = 2,9 x FD; Kruskal-Wallis $p = 0,44$), valor sin diferencia estadística respecto de la concentración inicial. La evolución de la toxicidad en el tiempo fue ajustada al modelo exponencial $C = 830,24 e^{-0,04t}$ ($R^2 \text{ aj.} = 0,68$ $p < 0,001$).

De forma comparativa, la **Figura 20** reúne las curvas de depuración teóricas para Dex1, Dex2 y Dex3.

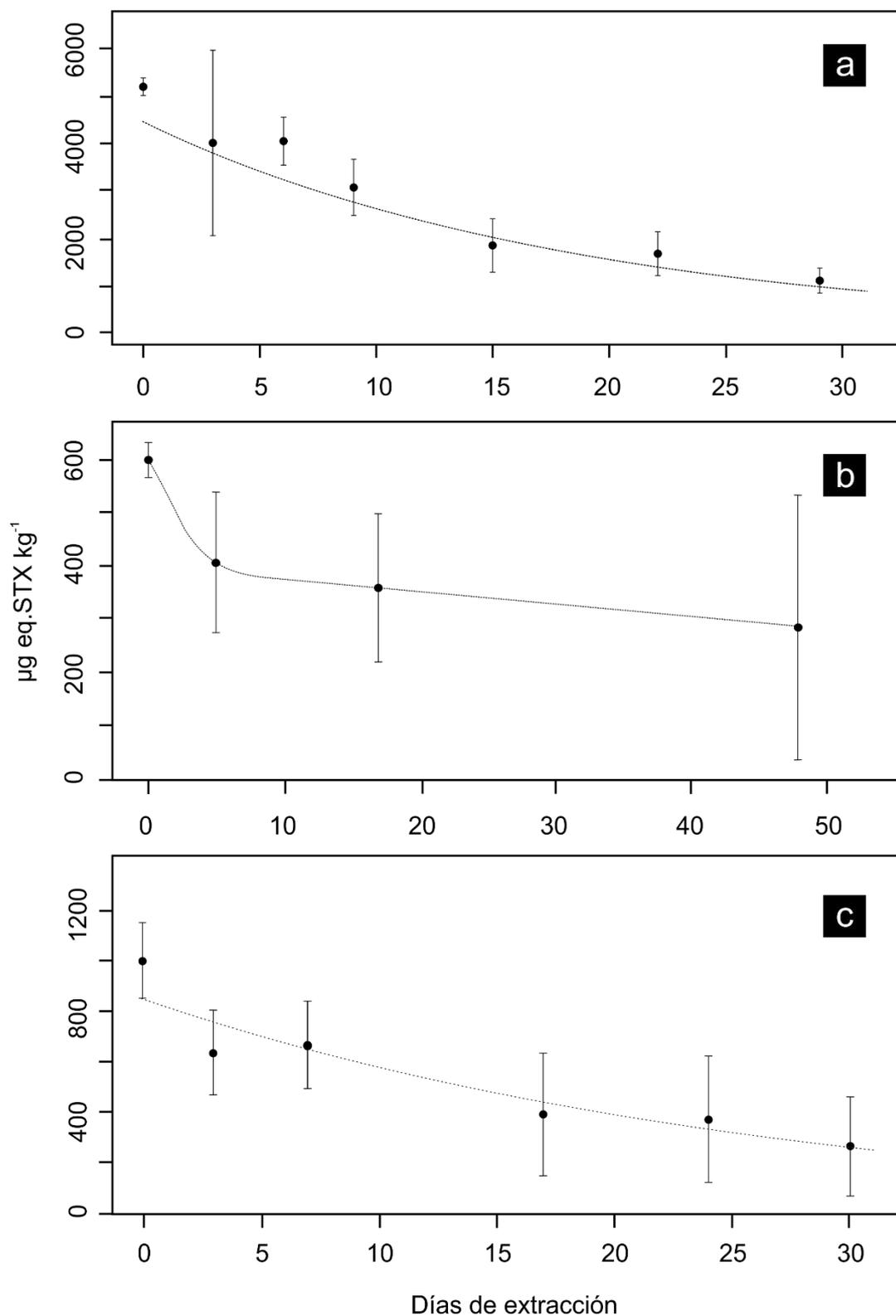


Figura 19. Cinética de depuración *ex situ*. Niveles de toxicidad total ($\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$) medidos mediante BR vs. Días de extracción. Los puntos señalan el promedio de 3 réplicas y las líneas el desvío estándar. Con línea punteada se señala la curva de regresión **a) Dex1** $C = 4489 e^{-0,053t}$, **b) Dex2**, **c) Dex3** $C = 830,24 e^{-0,04t}$.

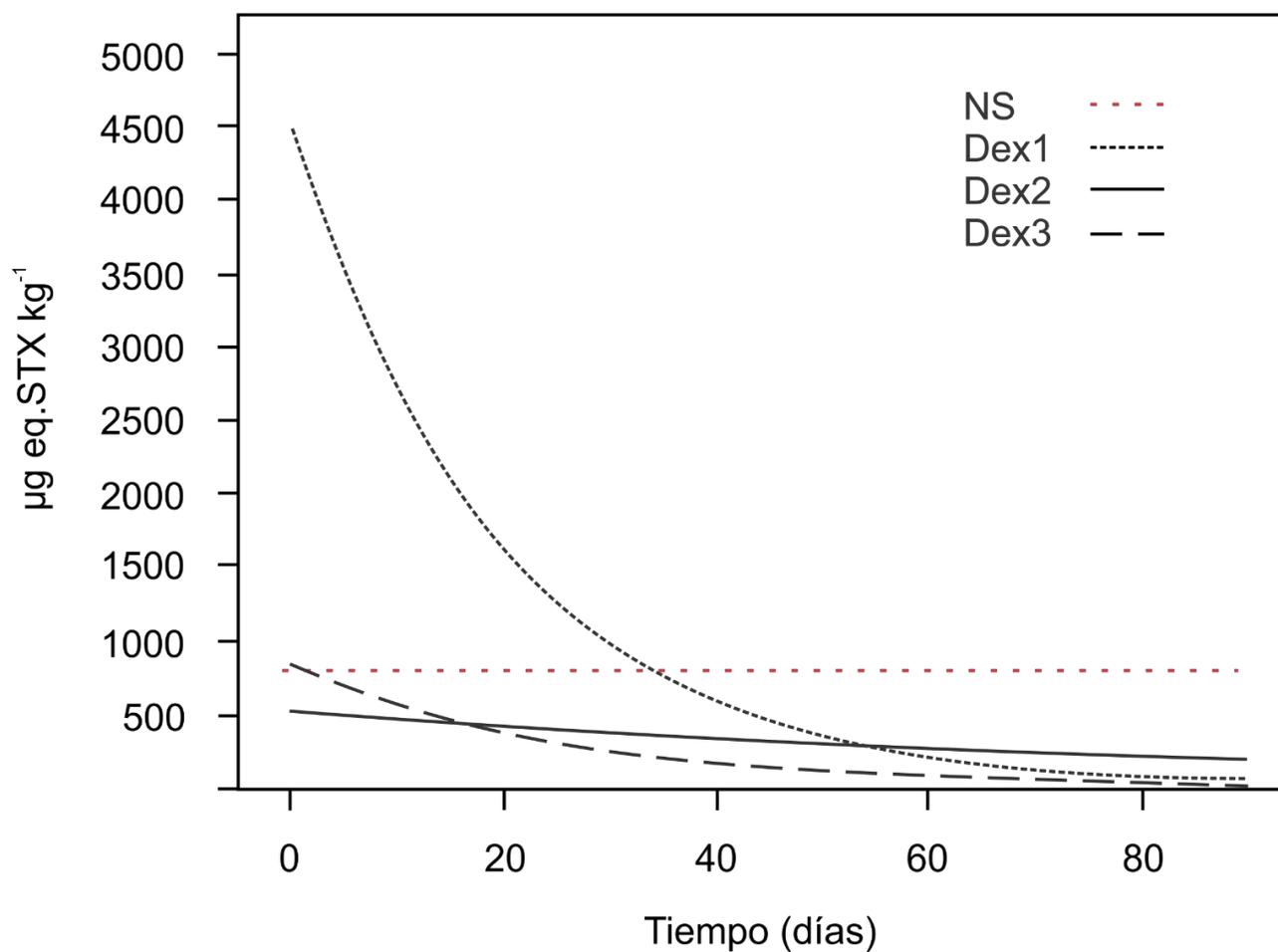


Figura 20. Curvas de depuración teóricas para Dex1, Dex2 y Dex3 obtenidas a partir de los resultados de BR. El ajuste de Dex2 no es significativo. Niveles de toxicidad total ($\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) Vs. Tiempo (Días). En línea punteada roja se indica el NS.

Seguimiento de la depuración *in situ* de bivalvos naturalmente intoxicados

En **Din** la toxicidad inicial (CCI; $1011 \pm 226,8$) fue estadísticamente similar a la CCI de la experiencia Dex3, la cual tuvo lugar en la misma época del año. La reducción alcanzada en un período de 30 días fue del 63% (D30 = $374 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$). Por otra parte, transcurridos 37 días de muestreo, ya no se detectó presencia de TPM en los mejillones recolectados (depuración 100%). Los datos obtenidos por BR ajustaron significativamente a una regresión lineal ($C = -25,064t + 971,85$; $R^2 \text{ aj.} = 0,9$ $p = 0,0002$) (**Figura 21**).

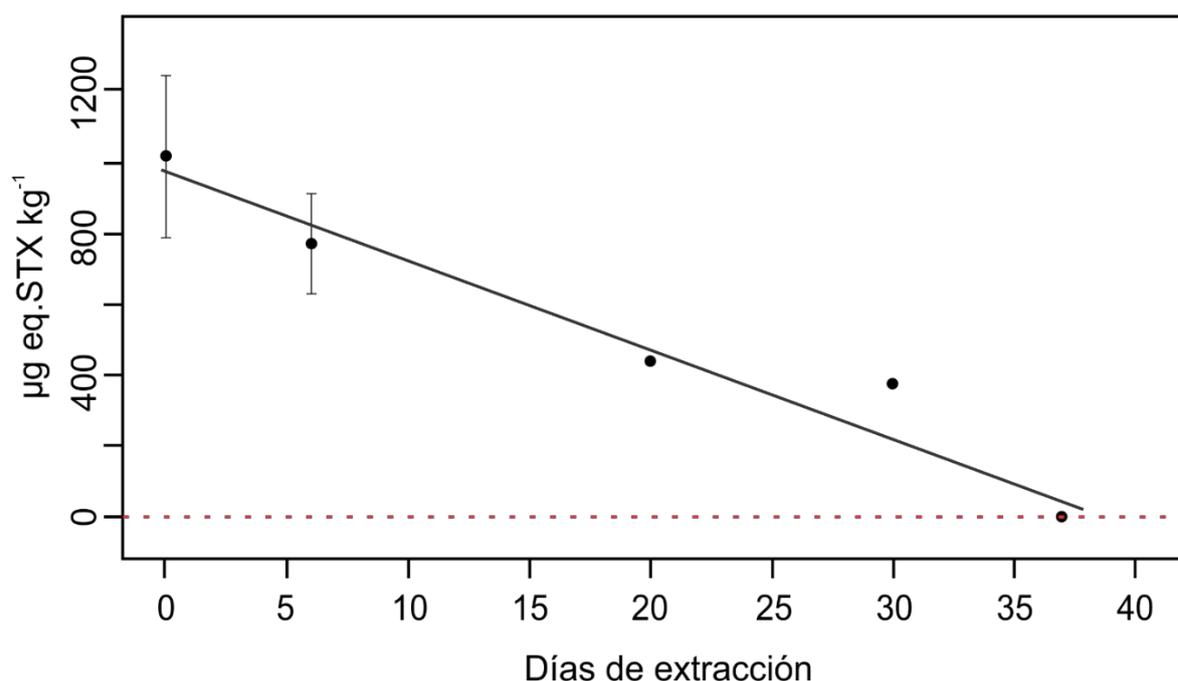


Figura 21. Cinética de depuración *in situ* **Din** de acuerdo a los niveles de toxicidad total ($\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) medidos mediante BR. Los puntos de las dos primeras extracciones señalan el promedio de 3 réplicas y las líneas el desvío estándar. Con línea punteada se señala la regresión lineal $C = -25,064t + 971,85$ y en línea roja la intersección con 0.

Toxicidad y patrones de depuración mediante el uso de HPLC-FLD.

En **Dex1** los resultados de toxicidad absoluta obtenidos mediante HPLC-FLD muestran una disminución significativa del 68% entre los 3 (D3) y 29 días (FD) de depuración ($t\text{-test} = 9,47$ $p = 0,001$), tendencia similar a la hallada con BR (**Tabla 11**). Existió semejanza en los patrones de reducción ($R^2 \text{ aj.} = 0,78$; $p < 0,001$) en las pendientes ($t\text{-test} = -0,25$, $p = 0,805$) y en los coeficientes de intercepción ($t\text{-test} = 0,93$, $p = 0,379$). Ambos métodos determinan valores diferentes de la relación CCF/FD (HPLC-FLD: 5; BR: 14); teniendo en cuenta que la toxicidad en

CCF medida por HPLC-FLD resultó mucho menor que por BR. Sumado a lo anterior, la reducción de la concentración total de toxinas fue del 69,2%.

Tabla 11. Concentración de toxinas totales (nmol g⁻¹) y toxicidad total (µg eq.STX kg⁻¹) medida por Bioensayo en Ratón (BR) y HPLC-FLD en **Dex1**. Se muestra la media de 3 réplicas (1 a 3) y su desvío estándar (DE). El porcentaje de reducción (% Rd.) se calculó entre los valores promedios de D3 y FD.

Dex1					
Muestra	1	2	3	Media	DE
BR (µg eq. STX kg⁻¹)					
D3	2030	3732	2956,8	2906,27	852,12
FD	768	990,1	1377	1045,03	308,19
CCF		14554			
			% Rd.	64,0	
HPLC-FLD (µg eq. STX kg⁻¹)					
D3	2410	2640	2490	2513,33	116,76
FD	640	610	1130	793,33	291,95
CCF		4480			
			% Rd.	68,4	
HPLC-FLD (nmol g⁻¹)					
D3	5,11	5,64	5,34	5,36	0,27
FD	1,35	1,27	2,33	1,65	0,59
CCF		9,17			
			% Rd.	69,2	

D3: día 3 de depuración, FD: Fin de la Depuración, CCF: Control de Campo al Final de la depuración

En **Dex3** la toxicidad total muestra algunas disimilitudes respecto a lo hallado con BR (**Tabla 12**). En primer lugar, para las muestras analizadas, CCI fue 2,23 veces mayor respecto lo obtenido por BR. De acuerdo a ello, se calculó una reducción de toxicidad del 90% entre CCI y FD (30 días de depuración) en contraposición del 64% estimado por BR. Sumado a lo anterior, la reducción de la concentración de toxinas total entre las mismas muestras fue del 88,1%. En cuanto a la relación CCF/FD, se obtuvo un valor de 5 mediante HPLC y de 2 con BR. Respecto de la evolución

en campo durante el período en que transcurrió Dex3 (CCF/CCI), ambas técnicas indican una reducción de aproximadamente el 50%.

Por último, en **Din** (**Tabla 12**), la disminución de la toxicidad total y de la concentración de TPM entre CCI y D30 medidos por HPLC fue del 54,2 y 43,8% respectivamente, este último similar a lo observado por BR (56%). Sin embargo, la evolución entre dichos extremos mostró que, mientras por HPLC-FLD la toxicidad medida en D6 fue 2,8 veces mayor que en CCI, por BR fueron similares.

Tabla 12. Concentración de toxinas totales (nmol g⁻¹) y toxicidad total (µg eq.STX kg⁻¹) medida por HPLC-FLD y Bioensayo en Ratón (BR) en **Dex3** y **Din**. El porcentaje de reducción (% Rd.) se calculó entre CCI y FD ó D30.

Dex3			
	BR (µg eq.STX kg ⁻¹)	HPLC-FLD (µg eq.STX kg ⁻¹)	HPLC-FLD (nmol g ⁻¹)
CCI	1100,26	2461,92	10,20
D17	516,10	215,19	1,70
FD	392,50	236,44	1,21
CCF	684,80	1200,73	5,12
% Rd.	64,3	90,4	88,1

Din			
	BR (µg eq.STX kg ⁻¹)	HPLC-FLD (µg eq.STX kg ⁻¹)	HPLC-FLD (nmol g ⁻¹)
CCI	851,00	442,05	2,10
D6	864,00	1220,19	5,68
D30	374,40	202,32	1,18
% Rd.	56,0	54,2	43,8

CCI: Control de Campo Inicial, D17: Día 17 de depuración *ex situ*; FD: Fin de la Depuración; CCF: Control de Campo al Final de la depuración. D6: Día 6 de depuración *in situ*; D30: Día 30 de depuración *in situ*.

Aun cuando los niveles de toxicidad obtenidos por BR y por HPLC-FLD mostraron algunas diferencias (**Tablas 11 y 12**) la correlación entre ellos mostró un buen ajuste (**Dex1** $p = 0,009$, **Dex3** y **Din** $p = 0,01$) (**Figura 22 a y b**).

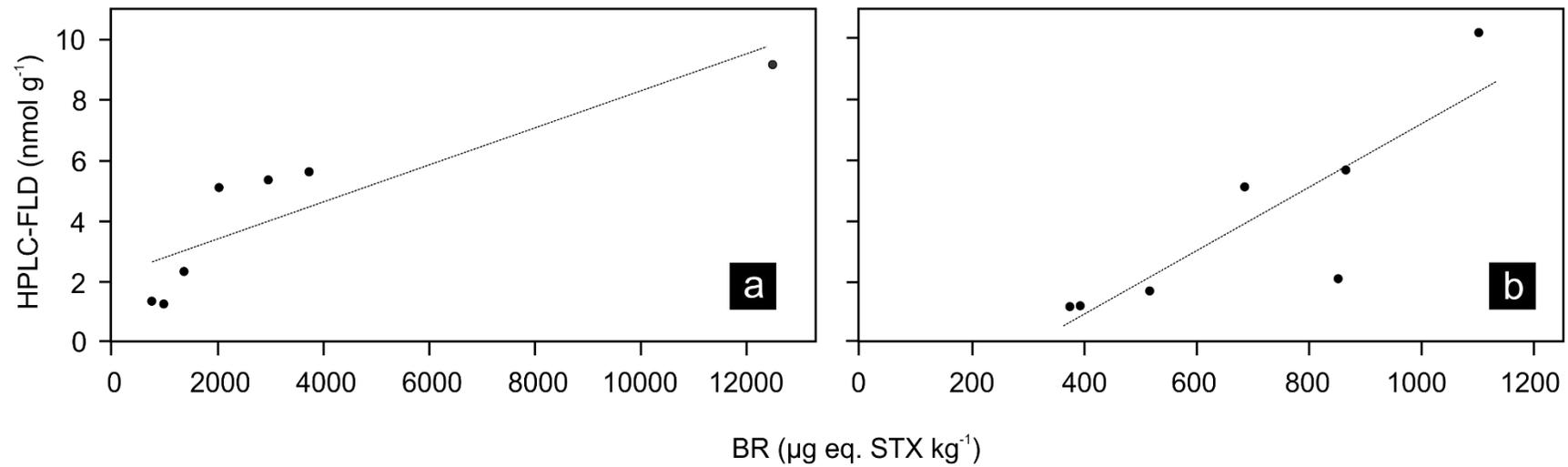


Figura 22. Correlación entre los resultados del total de toxinas obtenidos por HPLC-FLD y la toxicidad total medida por Bioensayo en Ratón (BR). **a) Dex1** y = $0,006x + 2,18$; $R^2 \text{ aj.} = 0,73$. **b) Dex3 y Din1** y = $0,0105x - 3,278$; $R^2 \text{ aj.} = 0,67$.

Composición tóxica

En **Dex1** el perfil varió de acuerdo al tiempo de depuración de los mejillones (**Tabla 13**). Los análogos GTX 1&4 fueron mayoritarios en D3 (89%) y FD (75%). Luego del periodo de depuración, se observó una disminución significativa principalmente para los análogos GTX 1 (t-test = -6,94, $p = 0,002$) y GTX 4 (t-test = -13,996, $p < 0,001$) pero también para GTX 3 (t-test = -5,48, $p = 0,005$), conformándose un perfil en FD con GTX1 como la más representativa (60%), seguida de GTX4 (15%) ~ GTX2 (14%) > GTX3 (6,5%) > STX (4,2%). En CCF, el orden de representatividad fue igual al de FD: GTX1 (60%), GTX4 (29%), GTX2 (7%) y GTX3 (4%), pero con ausencia de STX. Los análogos dcSTX y C1-C4 no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas.

Tabla 13. Concentración (nmol g^{-1}) de cada uno de los análogos para muestras de **Dex1**. Se señala la media de 3 réplicas y su desvío estándar (DE), el porcentaje de representatividad de cada análogo respecto al total (%Rep.) y el porcentaje de reducción de concentración entre D3 y FD (%Rd.).

Dex1	D3			FD			%Rd.	CCF	
	Media	DE	%Rep.	Media	DE	%Rep.		nmol g^{-1}	%Rep.
STX	ND	-	0,0	0,07	0,02	4,2	0,0	ND	0,0
GTX1	2,38	0,08	44,4	0,99	0,34	59,8	58,5	5,43	59,2
GTX2	0,26	0,02	4,8	0,23	0,06	14,1	10,3	0,65	7,1
GTX3	0,31	0,06	5,8	0,11	0,03	6,5	66,0	0,44	4,8
GTX4	2,41	0,15	44,9	0,25	0,22	15,4	89,5	2,65	28,9

D3: Día 3 de depuración *ex situ*; FD: Fin de la Depuración; CCF: Control de Campo al Final de la depuración. ND: No Detectado.

Durante la **Dex3** el perfil tóxico de los mejillones también varió durante la depuración. En todas las muestras derivadas del experimento (D17, FD, CCI y CCF) se identificaron STX y GTX 1&4 y GTX 2&3 (**Tabla 14**). En CCI se calculó mayor representatividad de los análogos GTX 1&4 con un 68% del total (GTX1 44% y GTX4 24%), seguidos por GTX 2 (16%), STX (10%) y GTX 3 (6%). Después de 17 días de depuración (D17), la representatividad de GTX 2 se tornó mayoritaria (57%) seguido por STX (23%), GTX 3 (15%) y GTX 1 (5%). En este momento, la concentración de GTX 4 se encontró cercana al límite de detección lo que significó una reducción de casi el 100% respecto a CCI. Se observó que entre D17 hasta la finalización del experimento la concentración de GTX 1 aumentó de 0,055 a 0,23 nmol g⁻¹. A pesar de ello, la reducción final del análogo respecto a CCI fue estimada en 94,9%. Al finalizar en FD, teniendo en cuenta la reducción de todos los análogos observada respecto a CCI, la mayor representatividad fue dada por GTX 2 (51%), seguidos STX (20%), GTX 1 (19%) y GTX 3 (10%). Respecto a CCF, el perfil toxicológico fue similar al observado para CCI y la depuración menor a la observada *ex situ*. Los análogos dcSTX y C1-C4 no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas.

Tabla 14. Concentración (nmol g⁻¹) de cada uno de los análogos en muestras de **Dex3**. Se señala el porcentaje de representatividad de cada análogo (%Rep.) y el porcentaje de reducción de concentración entre CCI y FD (%Rd.).

Dex3	CCI		D17		FD		% Rd.	CCF	
	nmol g ⁻¹	%Rep.	nmol g ⁻¹	%Rep.	nmol g ⁻¹	%Rep.		nmol g ⁻¹	%Rep.
STX	1,01	9,9	0,28	23,2	0,24	19,8	76,2	0,85	16,6
GTX1	4,50	44,2	0,055	4,6	0,23	19,0	94,9	1,55	30,2
GTX2	1,67	16,4	0,69	57,3	0,62	51,2	62,9	0,92	17,9
GTX3	0,59	5,8	0,18	14,9	0,12	9,9	79,7	0,23	4,5
GTX4	2,42	23,7	traza	-	traza	-	100	1,58	30,8

CCI: Control de Campo Inicial, D17: Día 17 de depuración *ex situ*; FD: Fin de la Depuración; CCF: Control a Campo al Final de la depuración

El perfil de TPM hallado en **Din** fue similar al observado en las experiencias previas de depuración (**Tabla 15**). Los análogos más representativos en CCI fueron GTX 1&4 con un 66% del total (GTX1 30%, GTX4 36%), seguidos por GTX 2 (26%) y GTX 3 (8%). Luego en D6, la concentración de los análogos aumentó en diferentes proporciones, siendo el más representativo GTX 1 (39%) seguido por GTX 2 (31%), GTX 4 (22%) y GTX 3 (8%). Transcurridos 30 días de seguimiento *in situ*, se encontró una reducción de GTX4 próxima al 100% y de GTX 1 en 54%, respecto a CCI. Contrario a ello, GTX 2 aumentó 34,5% expresándose como el análogo más representativo en D30 (62,7%). El análogo STX fue detectado en concentraciones cercanas al límite de detección sólo en las muestras correspondientes a CCI y D30. Los análogos dcSTX y C1-C4 no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas.

Tabla 15. Concentración (nmol g⁻¹) de cada uno de los análogos en muestras de **Din**. En la tabla se señala el porcentaje de representatividad de cada análogo (%Rep.) y el porcentaje de reducción de concentración entre CCI y D30 (%Rd.).

Din	CCI		D6		D30		%Rd.
	nmol g ⁻¹	%Rep.	nmol g ⁻¹	%Rep.	nmol g ⁻¹	%Rep.	
STX	traza	-	ND	-	traza	-	-
GTX1	0,63	30,0	2,24	39,4	0,29	24,6	54,0
GTX2	0,55	26,2	1,76	31,0	0,74	62,7	-34,5
GTX3	0,17	8,1	0,43	7,6	0,15	12,7	11,8
GTX4	0,75	35,7	1,25	22,0	traza	-	100

CCI: Control de Campo Inicial, D6: Día 6 de depuración *in situ*; D30: Día 30 de depuración *in situ*. ND: No Detectado.

DISCUSIÓN

Depuración de mejillones naturalmente intoxicados

En la provincia del Chubut, Rada Tilly es uno de las localidades incluidas en el monitoreo del Plan de Prevención y Control de Mareas Rojas. A lo largo del tiempo, las floraciones allí registradas han mostrado un amplio rango de duración e intensidad, variando entre niveles de toxicidad bajos como el del año 2009 y altos como en el año 2000 (**Tabla 16.**). Quinta Rossi, por otro lado, ha sido monitoreada esporádicamente, registrándose en promedio toxicidades de $934,03 \pm 560,34 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ y un máximo en noviembre de 2013. Por último, la localidad de Cerro Avanzado, formó parte del monitoreo sólo en el año 2004. En general, la permanencia de la toxicidad en bivalvos se extiende desde la primavera hasta mediados del verano [19]. Sin embargo, es difícil determinar la duración precisa de los eventos de floración a partir de los datos resultantes del monitoreo. Por un lado, la irregularidad en la frecuencia de los muestreos y por otro, las vedas impuestas en forma preventiva impiden detectar el momento preciso en donde las toxinas desaparecen del ambiente, o cuando los mejillones comienzan verdaderamente una depuración con alimento 100% no tóxico.

Las toxicidades de campo medidas para este estudio en Rada Tilly, fueron relativamente de menor intensidad respecto de datos históricos en el lugar. Además, la permanencia del evento tóxico también fue de menor duración. Por otra parte, los valores medidos en muestras de campo en Quinta Rossi, son del mismo orden del promedio histórico (**Tabla 16.**).

Tabla 16. Toxicidades medidas por BR ($\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) en mejillones de bancos naturales provenientes de las localidades estudiadas en la presente tesis.

	Mínimo	año	Máximo	año	Referencia
Rada Tilly	1039	2009	20191	2000	Dirección de Salud Ambiental.
Quinta Rossi	465,6	2014	3416	2013	Ministerio de Salud de la
Cerro Avanzado	242	2004	388	2004	Provincia del Chubut [70]
Rada Tilly	388,7	2016	12477,8	2015	
Quinta Rossi	761,8	2016	995,2	2016	Este estudio
Cerro Avanzado	374,4	2016	864	2016	

El mantenimiento de los mejillones en tanques de recirculación evita la re-intoxicación por TPM. Esto se observó claramente en los experimentos de primavera de 2015 (Dex1) y de 2016 (Dex3),

donde mediante una depuración *ex situ* de 29 y 30 días respectivamente, la concentración de toxinas en los mejillones resultó menor que en los que permanecieron durante ese periodo en el entorno natural.

El mejillón *Mytilus* es considerado un depurador rápido o moderado, con una tasa promedio de eliminación de toxinas de 10,6% día⁻¹ [245]. Con frecuencia, la cinética de depuración ha sido descrita a través de un modelo exponencial de un compartimento ($C = C_0 e^{-kt}$) característico de una tasa inicial rápida, continuada por una tasa de menor velocidad [286,245]. Este tipo de modelo resultó satisfactorio en las experiencias realizadas en este trabajo. Considerando los resultados obtenidos por BR, en Dex1 se observaron tasas de depuración aproximadas de 6,4% día⁻¹ durante los 3 primeros días y de 1,8% día⁻¹ hacia el final de la experiencia, mientras que en Dex3 las tasas fueron de 12,2% día⁻¹ y 4,8% día⁻¹ respectivamente. Se observó además que la constante k fue del mismo orden en ambos casos (Dex1: 0,05 día⁻¹ y Dex3: 0,04 día⁻¹). Conclusiones similares fueron señaladas para la depuración de la vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* intoxicada naturalmente y transferida a un entorno natural sin registros de TPM [71] y para la almeja *Spisula solidissima* bajo condiciones de laboratorio [287].

La rápida reducción inicial de toxinas después de la exposición de bivalvos a una dieta tóxica ha sido relacionada con la eliminación de las microalgas tóxicas no digeridas como pseudoheces [58,55]. La variación temporal de la tasa de depuración, en ciertos casos, podría explicarse mejor con un modelo más complejo de dos compartimentos como el propuesto por Silver, Cembella [58], utilizando datos empíricos de la intoxicación y depuración natural de mejillones *M. edulis*. Sin embargo, los mismos autores destacan que para especies con depuración rápida, un modelo simple de un compartimento sería suficiente para explicar la dinámica llegando a representar lo que sucede para muchas toxinas. No obstante, para aplicar este tipo de herramientas matemáticas con *M. platensis* de la costa de Chubut, se requeriría contar con un número mucho mayor de registros en el tiempo, y el desarrollo de depuraciones *ex situ* adicionales, en diferentes condiciones, niveles de toxicidad y eventos de floración.

Los resultados de los experimentos Dex1 y Dex3 mostraron que el mejillón *M. platensis* pudo reducir su nivel de toxicidad inicial de alrededor de 5200 y 1000 µg eq.STX kg⁻¹ en un 78 y 73% respectivamente después de un mes de depuración *ex situ*, incluso en ausencia de fitoplancton no tóxico como alimento. En el caso de la depuración de mejillones en su ambiente natural (Din), partiendo de niveles tóxicos similares a los del experimento Dex3, la cinética respondió preferentemente a una función lineal, con una tasa constante de depuración teórica del 2,59% día⁻¹. Además, se observó que la reducción de toxicidad luego de 30 días de iniciado el seguimiento *in situ* fue de 63% y del 100% luego de 7 días más. Este contraste muy posiblemente esté relacionado a condiciones óptimas de subsistencia, en un medio con presencia de

fitoplancton no tóxico como alimento lo cual aceleraría el proceso de eliminación de toxinas a la vez de ofrecer una recuperación energética para el organismo [245].

La capacidad de reducción de TPM por parte de bivalvos de Argentina fue sugerida por Carreto et al. [51], quienes estimaron un tiempo de detoxificación medio de 9 días para el mejillón *M. platensis* y la cholga *A. atra*. Carreto et al. [268] reportan que mejillones naturalmente intoxicados con *A. tamarense/catenella* en las costas de Mar del Plata fueron capaces de reducir su toxicidad desde $\sim 5000 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ a niveles por debajo del límite de seguridad bromatológico, en tan solo dos semanas de depuración *in situ*.

Con lo anterior contrastan notoriamente otras observaciones obtenidas a campo para bivalvos de la costa del Chubut. Particularmente, la cholga *A. atra* con un nivel de toxicidad de $4372,2 \pm 1610 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ necesitó más de 6 meses para su depuración completa o al menos 4 meses para alcanzar niveles de toxicidad por debajo de los límites de seguridad alimenticia [277,278]. A pesar de que esto podría haber sido el resultado de una nueva intoxicación, siendo que se trató de un seguimiento de toxicidad *in situ*, también debe tenerse en cuenta que la toxicidad en los bivalvos puede mantenerse durante varios meses a pesar de la no detección de microalgas tóxicas en el ambiente [281,288,246,56]. En este contexto se ha observado incluso que los bivalvos pueden incrementar su toxicidad, como el caso de *P. yessoensis* y *A. tamarense* del Japón [289]. En cuanto a otras depuraciones *ex situ*, los resultados obtenidos por Shumway et al. [288] con la vieira *Placopecten magellanicus* sin ofrecimiento de alimento, muestran claras diferencias a lo encontrado en los mejillones, ya que la vieira apenas depuró 1/3 de su toxicidad inicial en 4 meses (toxicidad inicial: $\sim 16740 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$). En este caso, debe considerarse que los pectínidos son considerados depuradores lentos [245].

Diversas investigaciones demuestran que tanto el grado de depuración como el tiempo requerido para ello difieren según las condiciones ambientales y las especies intoxicadas. Song et al. [71], por ejemplo, informaron que se necesitan 30 días de depuración *in situ* para eliminar la toxicidad total de vieiras japonesas (toxicidad inicial: $960,1 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$). Contrariamente, Chen, Chou [290] encontraron que la almejas morada *Hiatula rostrata* cultivada en medios naturales y naturalmente infestadas (toxicidad inicial: $5830 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) necesitaban aproximadamente 6 meses de depuración *in situ* para alcanzar niveles de toxicidad aceptables para el consumo humano. En cuanto a la experimentación en laboratorio, la vieira *P. yessoensis* intoxicada con una monodieta de *A. tamarense* presentó una reducción del 64% en 10 días (de 14 nmol/g a 5 nmol g^{-1}) [289]. Otros autores por el contrario, realizando depuraciones *ex situ* de *S. solidissima* solo con agua filtrada a $20 \mu\text{m}$, no encontraron ninguna reducción de TPM incluso luego de 6 meses (entre 30000 y $45000 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) [291].

Ciertamente, el tiempo necesario para alcanzar una depuración del 100% depende de la toxicidad inicial de los mejillones [292], tal como se vio reflejado en los diferentes experimentos desarrollados durante los años 2015 y 2016. En el caso de la depuración Dex2, los niveles de toxicidad invariables pueden atribuirse no solo a los bajos valores iniciales sino también a la ausencia de alimento como promotor de la depuración de los organismos. Como Velásquez, Navarro [293] describieron, la concentración de TPM en *M. chilensis* pudo disminuir de toxicidades ligeramente más altas que 800 µg eq.STX kg⁻¹ a niveles no detectables luego de 16 días de depuración en condiciones de laboratorio con fitoplancton no tóxico como alimento para los bivalvos. Es preciso resaltar que las conclusiones arribadas a partir de ensayos de intoxicación en laboratorio no son fáciles de contrastar con los datos resultantes de experimentos con mejillones naturalmente intoxicados. Sumado a lo anterior, como han sugerido Esteves et al. [277] evaluando la depuración natural de *A. atra*, la toxicidad constante de consecutivas mediciones podría ser consecuencia de una inhibición metabólica del bivalvo. Se estima que la toxicidad en Dex2 es consecuencia de la floración sucedida al comienzo del experimento Dex1 por lo que serían bivalvos con una exposición a TPM de aproximadamente 6 meses, lo que podría haber generado una inhibición metabólica.

Composición tóxica

Los valores de TPM hallados por BR mostraron buena correlación con los resultados de toxicidad total calculados a partir de HPLC-FLD, concordancia también señalada por otros autores [294,69]. A pesar de ello, el cálculo de toxicidad para CCI y CCF en Dex3 fue mucho mayor en los resultados por HPLC-FLD, situación también posible en este tipo de estudios, sobre todo de acuerdo al rango de concentraciones trabajado [295,296].

El valor de la toxicidad total estimada por HPLC-FLD está determinada por varios aspectos. Tanto el procedimiento analítico como el cálculo posterior pueden introducir variaciones. Por un lado, de acuerdo al método de digestión en el cual las muestras se tratan a temperatura con una solución ácida de HCl 0,1 N, los análogos como neoSTX y C1,2 podrían transformarse en STX y GTX respectivamente [281,297,298]. De esta manera, su presencia puede no ser detectada, aparentando una baja o despreciable contribución en la toxicidad total [69]. Por otro lado, los grupos tóxicos más potentes de GTX y STX que pudieron ser cuantificados, dependiendo de sus concentraciones, pueden llegar a enmascarar la toxicidad de otros análogos. Por último, otro efecto sobre el nivel de toxicidad estimado podría estar vinculado con el uso de TEF. Este aspecto debe considerarse con precaución ya que, para cada valor teórico utilizado por análogo, no se ha comprobado el mismo modo de acción en muestras de bivalvos de Argentina. Además no se

conoce la pureza de las muestras, las cuales pueden contener posibles co-eluyentes oxidados que sobreestimen el valor cuantificado [299].

La tasa de depuración de los bivalvos no solo está relacionada con las condiciones ambientales y las especies como se discutió anteriormente, sino también con las transformaciones entre los diferentes análogos de TPM en sus tejidos. Existen diferentes mecanismos de depuración que involucran retención o eliminación selectiva de toxinas individuales, epimerización y/o una variedad de procesos de biotransformación tales como conversión reductora en presencia de un reductor natural, hidrólisis a pH bajo o conversión enzimática [292,245,71,300]. Como resultado del metabolismo de los individuos, el perfil de TPM puede ser muy variable, incluso entre poblaciones de la misma especie provenientes de diferentes localidades [69]. Los resultados obtenidos en este estudio por HPLC-FLD permitieron describir la transformación de TPM a lo largo del tiempo, tanto para experimentos de depuración de los bivalvos de forma *ex situ* (Dex1 y Dex3) así como también de un ciclo en el ambiente natural (Din).

El perfil tóxico de los bivalvos recolectados en Rada Tilly para Dex1 reflejó un patrón similar a los registros históricos de mejillones del mismo sitio del Departamento de Bromatología de la Provincia de Chubut (**Tabla 17** - datos no publicados para *M. platensis* de enero de 2010.).

Tabla 17. Concentración de cada uno de los análogos cuantificados en mejillones recolectados en Rada Tilly en el año 2010. Se señala la media de 3 réplicas, su desvío estándar (DE) y el porcentaje de representatividad de cada análogo (%Rep.). Departamento de Bromatología de la Provincia de Chubut.

	nmol g ⁻¹	DE	% Rep.
STX	0,30	0,24	0,7
GTX1	16,90	19,19	38,3
GTX2	6,30	4,46	14,3
GTX3	6,20	2,00	14,1
GTX4	14,40	9,26	32,7
GTX5	traza	-	

En este estudio los análogos GTX 1&4 (epímeros α y β respectivamente) fueron predominantes en los mejillones de Dex1 (D3, FD y CCF), Dex3 (CCI y CCF) y Din (CCI y D6), en coincidencia con los resultados del Departamento de Bromatología de la Provincia de Chubut. Similares conclusiones fueron reportadas por otros autores para *M. edulis* de diferentes áreas del Mar Argentino [301,69,294,268]. La prevalencia de GTX 1&4 también se definió para otras especies de bivalvos como la almeja *Tapes japonica* [55], la almeja morada *H. rostrata* [290] y la cholga *A. atra* [294]. Durante la depuración, estos epímeros variaron notablemente tanto en concentración como en representatividad respecto al total de toxinas. En todos los casos analizados, el epímero

β mostró mayor reducción respecto al epímero α . Estos cambios de proporción señalarían una eliminación selectiva de las toxinas y una posible epimerización. En particular, la evolución del perfil composicional observado durante la depuración *in situ* (Din) podría asociarse a la ingesta de *A. tamarense/catenella* en diferentes momentos a lo largo del periodo evaluado. Botelho et al. [302] observaron que los perfiles de algunos bivalvos, incluido *Mytilus* spp., variaba a lo largo del transcurso de la floración.

La variación de GTX 2 (epímero β) mostró un patrón de poca reducción y, en el caso de Din, un cierto incremento de concentración entre el inicio y los primeros 6 días de seguimiento a campo. Por otro lado, la representatividad de GTX 2 en cuanto al total de toxinas se vio incrementada al transcurrir la depuración de los mejillones. Respecto a GTX3 (epímero α), se observó un patrón similar a su epímero, pero en menor concentración y proporción, es decir, se depuró con mayor velocidad que GTX 2. Montoya et al. [250] señala que, una vez en el organismo del bivalvo, sucede epimerización entre GTX 2&3 hasta alcanzar una relación de equilibrio α/β de 1:3, en el cual el epímero β (GTX 2), termodinámicamente más estable, se acumula mayoritariamente. Esta proporción se observó en CCI de Dex3 y Din, aumentando la discrepancia hacia el final del periodo de experimentación a causa de la eliminación diferencial.

Carreto et al. [301] han descrito que en el mejillón *M. edulis* un 95% de las toxinas totales pertenecen al grupo de las GTX y una pequeña proporción a las STX y neoSTX. En particular para las STX, Turner et al. [69] informaron relativamente bajas concentraciones de este análogo para la misma especie de mejillón. Por el contrario, durante el proceso de depuración de las TPM, Song et al. [71] encontraron que las STX se acumulaban durante la depuración *in situ* de los mejillones y Bricelj et al. [287] observaron que la almeja *S. solidissima* acumulaba STX durante el periodo de depuración *ex situ*. De acuerdo a lo observado en los experimentos de este estudio, se encontraron similitudes con lo descrito por los autores señalados y con lo registrado por el Departamento de Bromatología en 2010, donde las STX promediaron una representación de 0,4% sobre el total de análogos. En Dex1, las STX pudieron ser detectables solo en mejillones expuestos a 29 días de depuración *ex situ* y su acumulación representó en FD solo un 4,2% de los análogos totales. Por otro lado, durante el seguimiento *in situ* (Din), las STX se encontraron próximas al nivel de detección. En contraposición a las observaciones de la primera experiencia, en Dex3 las STX significaron una importante representatividad entre los análogos, alcanzando un máximo porcentaje en D17. A pesar de ello, la concentración de este análogo luego se observó en disminución conforme transcurría la experiencia.

La aparición de STX durante la depuración Dex1 podría ser el resultado del proceso metabólico de las TPM. La reducción de GTX a STX y la estabilidad de estas últimas fueron documentadas para las almejas *M. mercenaria* [303] y *Saxidomus giganteus* [304] apud [303]. El mecanismo de

reducción involucrado sigue siendo desconocido para las especies argentinas y podría ser consecuencia de un reductor natural [305,306] o una vía enzimática como la observada en otros moluscos como *Concholepas concholepas* [246]. Esta última alternativa de conversión de TPM suele ser poco común en bivalvos [245,307,308,287]. A lo anterior debe agregarse que la condición de inanición en la que se desarrollaron los experimentos podría promover la acumulación de STX. La larga permanencia de las STX, la ocurrencia en la etapa avanzada de depuración de mejillones, la presencia predominante de este análogo en depredadores como caracoles [301,69,309] y la baja proporción o ausencia total en el fitoplancton indican que este análogo suele ser producto de la metabolización. El mismo posee gran estabilidad temporal y una marcada dificultad para ser destruido o eliminado.

Los perfiles de TPM de los mejillones estudiados en este trabajo fueron similares al descrito anteriormente para el dinoflagelado toxígeno del área bajo estudio [250,257]. Esta correlación de las TPM del mejillón y del plancton causativo ha sido informado en otros estudios [306]. El perfil TPM de *A. tamarense/catenella* del golfo San Jorge descrito por Montoya et al. [250] no presenta C1 o C2 ni STX, posee mayoritariamente GTX 1&4 y concentraciones traza de GTX2. A su vez, Fabro et al. [67] reportan para muestras fitoplanctónicas del mismo golfo, la presencia de los análogos N-sulfocarbamoilos, C1 y C2 y la presencia ocasional de STX y neoSTX. Debe tenerse en cuenta que estos perfiles están sujetos a la estacionalidad y a las variabilidades ecológicas de las diversas localidades. Es así como cepas aisladas de diferentes áreas del Mar Argentino, incluso del mismo golfo, pueden presentar análogos como C1 y C2 [301,294,250,257]. En especial para las poblaciones del golfo Nuevo, Montoya et al. [250] describen varias diferencias en los perfiles dadas por mayores proporciones de C2, presencia de STX, neoSTX, representatividad notoria de GTX 4 y mayor proporción de GTX 3 y C1 respecto de GTX 1.

La ausencia de C1 y C2 en tejidos de mejillones analizados en este trabajo puede ser el resultado de su biotransformación. Se ha descrito la capacidad de conversión muy rápida de los N-sulfocarbamoilos a sus correspondientes GTX, dada su forma químicamente más estable en el organismo de mejillones [287,55,303]. Como se señaló previamente, el tratamiento ácido de las muestras puede generar hidrólisis de N-sulfocarbamoilos a GTX.

Por lo expuesto anteriormente, se infiere que el mejillón *M. platensis* tiene capacidad de eliminación selectiva de toxinas y epimerización metabólica. Por consiguiente, la conversión de acuerdo a procesos selectivos de depuración/retención de cada análogo señala la importancia de aplicar modelos de dos compartimentos empleando datos empíricos de la intoxicación y de depuración natural [287] para mejorar la comprensión de dichos procesos, considerando además los diferentes tejidos y sus capacidades de desintoxicación [229].

CONCLUSIÓN

Este estudio proporciona la primera cinética de depuración *ex situ* de las TPM en mejillones naturalmente intoxicados de Argentina. De acuerdo a las posibilidades surgidas de los eventos naturales que ocurrieron durante el desarrollo de esta tesis, se lograron evaluar tres niveles de toxicidad inicial, mostrando diferencias y similitudes en sus dinámicas temporales de depuración. Los sistemas de recirculación resultaron efectivos para la depuración de los bivalvos ya que no se observaron daños directos o mortandades masivas. A pesar de no alcanzarse en algunos casos el nivel de seguridad para la protección de la salud humana, fue factible obtener reducciones significativas de las TPM. De esta forma se aportó al conocimiento de los tiempos necesarios para alcanzar concentraciones inocuas y se determinó que el mejillón *M. platensis* es un depurador rápido a moderado, incluso sin suministro de alimento. Por otra parte, a través de las depuraciones *ex situ*, se logró evitar la re-intoxicación de los individuos mantenidos en los SRC, situación improbable de los estudios a campo previos.

A través de los perfiles tóxicos, se demostró que *M. platensis* metaboliza las toxinas ingeridas y tiene capacidad de eliminación selectiva y epimerización metabólica. Esta diferencia de depuración entre los análogos sugiere la necesidad de ampliar los estudios y considerar el análisis de diferentes tejidos del bivalvo durante su desintoxicación. Los resultados mostraron, además, que la proporción relativa entre GTX 1&4 y GTX 2&3 podría ser útil para detectar la etapa de depuración de bivalvos bajo condiciones de campo debido a la rápida eliminación/transformación de GTX 1&4 y menor reducción de GTX 2&3 en el transcurso del tiempo. A partir de lo observado durante los análisis cualitativos de TPM, se resalta la necesidad de aplicar técnicas analíticas en complemento al BR como estrategia de mejora para el sistema de salud y prevención de intoxicaciones, así como también para ampliar la base de datos de las transformaciones de las TPM durante las diversas FAN acontecidas.

También se logró evaluar las concentraciones de TPM en mejillones mantenidos *in situ*, ampliando y contribuyendo de esta manera a la base de datos del Programa de Monitoreo de Mareas Rojas de la provincia del Chubut. Este trabajo contribuye al conocimiento general de las TPM y las FAN, desde el aspecto biológico y químico del evento, así como también en el conocimiento de sus implicaciones en la salud humana. Si bien su significancia es particularmente importante para la costa patagónica y toda la costa argentina ya que corresponde a los primeros experimentos en laboratorio realizados con especies locales, adquiere relevancia internacional dado el creciente interés que existe para la mejor comprensión de la temática abordada.

SEGUNDA PARTE

Intoxicación de bivalvos alimentados con el dinoflagelado *Alexandrium tamarense/catenella*

INTRODUCCIÓN

La presencia de *A. tamarense/catenella* en las costas de Chubut, ha sido monitoreada con frecuencia a causa de su potencial nocividad. Actualmente se cree que ya no existen zonas libres de toxicidad en toda la costa de la provincia [19]. Normalmente, este dinoflagelado es detectado en el medio natural en relativas bajas concentraciones respecto a otras especies, tal como sugieren Andrinolo et al. [278], quienes estimaron para el golfo San José la representatividad de *Alexandrium* en un 2% del total de especies. Similar es lo observado en el golfo Nuevo, sitio en donde la presencia de *Alexandrium* varía entre años, pero frecuentemente no es detectada (**Tabla 18** - registros obtenidos en el marco del “Plan de Prevención y Control de Mareas Rojas”, comunicación personal: Leilén Gracia Villalobos y Norma Santinelli).

Eventualmente, suceden floraciones naturales de *A. tamarense/catenella*. Según Zingone, Enevoldsen [227] el incremento poblacional que define una floración puede variar considerablemente en el espacio y tiempo, dependiendo de las condiciones ambientales. En este sentido, tales autores señalan que las floraciones nocivas no implican biomásas altas, especialmente especies del género *Alexandrium* catalogadas como peligrosas en densidades bajas de 0,1 a 1 cél. ml⁻¹. En las costas de Chubut no se encuentra publicado el valor consensuado sobre la densidad mínima de *Alexandrium* a partir de la cual se considera riesgoso. Ciertamente, la densidad a la que llega esta especie varía entre localidades y años [19]; es así como, mientras en el golfo Nuevo se registraron hasta 18 cél. ml⁻¹ en el año 2007, en zonas cercanas de Península Valdez se han reportado densidades máximas relativamente bajas, tal como 1,2 cél. ml⁻¹ en 2005 [250], o mucho más elevadas como 27,5 cél. ml⁻¹ en el año 2013 [67].

Tabla 18. Densidades mínimas y máximas de *A. tamarense/catenella* medidas en el golfo Nuevo (incluye todos los sitios de monitoreo) durante los años 2000 a 2011.

Año	cél. ml ⁻¹	
	Mín.	Máx.
2000	0,07	2,97
2001	0	1,12
2002	0	0
2003	0	0
2004	0	0
2005	0-0,44	5,6
2006	0	0,44
2007	0-1,51	18,13
2008	0	0
2009	0-0,34	7,6
2010	0	1,26
2011	0	2,52

En períodos de floración, la probabilidad de acumulación de TPM en animales filtradores como los bivalvos aumenta considerablemente y constituyen, a su vez, momentos de preocupación para la salud pública. Los niveles de toxicidad que alcanzan están relacionados principalmente con la densidad celular del fitoplancton tóxico y con el tiempo de permanencia del evento de floración [310]. Un claro ejemplo fue el acontecido en 1992 en Ushuaia en donde se relacionaron los 1208460 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ (BR) detectados en mejillones con una densidad de 821 cél. ml^{-1} de *A. catenella* [46]. Sin embargo, la correlación no siempre es clara en eventos naturales siendo que en reiteradas oportunidades la toxicidad de bivalvos permanece luego de la desaparición de la microalga del ambiente (ver Capítulo 2, primera parte) o incluso se detecta un inicio de alta toxicidad en filtradores sin abundancia de microalgas. Este último caso se observó en las costas de Comodoro Rivadavia (Golfo San Jorge), donde Pérez et al. [264] informaban para los años 2005 a 2006 escasa presencia de *A. tamarense/catenella* (mín. 0,02 cél. ml^{-1} a un máx. 0,88 cél. ml^{-1}) mientras que el “Plan de Prevención y Control de Mareas Rojas” arrojaba concentraciones desde 688 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ hasta 3265 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ en mejillones del sector. Las explicaciones a estos sucesos pueden estar relacionadas con varios factores, entre ellos, las diferencias de toxicidad de los dinoflagelados de acuerdo a la región [311], las condiciones ambientales [312] y/o la capacidad de metabolización de los bivalvos (ver Capítulo 2, primera parte). Lamentablemente, para la Argentina no se conoce la cinética de intoxicación de ningún bivalvo. Debido a que cada especie sigue su propio patrón de captación y acumulación de toxinas, disponer de este conocimiento permitiría la construcción de mejores herramientas para el monitoreo y el manejo de los eventos de FAN [288].

Por lo tanto, evaluar los perfiles de TPM en bivalvos durante el proceso de intoxicación, así como en el de depuración, puede ser de utilidad como una herramienta retrospectiva del tiempo que lleva establecida la FAN o como un indicador temprano de un nuevo pico o aumento fitoplanctónico. Esto se vuelve particularmente interesante de aplicar en sectores en donde por diversas razones el monitoreo periódico no es factible de realizar [287].

En función de todo lo expuesto, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: los bivalvos pueden bioacumular toxinas y alcanzar toxicidades de TPM superiores al valor de seguridad alimenticia al ser expuestos a fitoplancton nocivo en bajas densidades durante tiempo prolongado. Por consiguiente, el objetivo general de la experimentación fue exponer bivalvos a una baja concentración de *A. tamarense/catenella* durante un tiempo determinado y observar la capacidad de acumulación y metabolización de toxinas. Para ello se realizaron ensayos preliminares con *M. platensis* y *A. tehuelchus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento de intoxicación de bivalvos se desarrolló en varias etapas. Se realizaron dos ensayos de intoxicación preliminares para evaluar visualmente la respuesta inmediata del mejillón ante diferentes concentraciones del dinoflagelado tóxico. Antes y después de estos ensayos, aunque solo de forma exploratoria, también se evaluó la toxicidad de los mejillones. En una segunda etapa, se desarrolló el experimento de intoxicación del mejillón *M. platensis* alimentándolo con un 100% dieta tóxica, en un tiempo de exposición de mediano plazo. Por último, se realizaron experiencias exploratorias para la comprensión de la intoxicación de la vieira tehuelche *A. tehuelchus*. Los análisis de TPM por BR y HPLC-FLD (INIDEP) se realizaron según la metodología descrita en la primera parte del presente Capítulo.

Ensayos preliminares de exposición aguda de M. platensis a una dieta tóxica

En el primer ensayo (E1) de exposición aguda se utilizó un grupo de individuos extraídos durante el experimento Dex3 (primavera 2016, sitio Quinta Rossi), luego de 3 días de comenzada la depuración *ex situ*. La toxicidad medida en ese momento fue referencia de la concentración de TPM inicial.

Se utilizaron 3 frascos de vidrios como acuarios con 2,5 l de agua de mar filtrada hasta 1 μm y desinfectada con luz UV. Cada frasco con 25 individuos fue tapado y aireado utilizando una pipeta de vidrio. La temperatura fue de 12,5°C y la salinidad de 33 ups, en coincidencia con las condiciones del experimento Dex3. A cada grupo de mejillones se le ofreció diariamente una cantidad diferente de *A. tamarense/catenella* considerada como alta, media y baja densidad. Para definir dichos niveles de ofrecimiento, se tomó como referencia la densidad de microalgas toxigénicas que otros autores midieron en la zona costera de Patagonia y que relacionaron con toxicidad en mejillones (Esteves et al. [277] y Pérez et al. [264]). En cuanto a la tasa de filtración, se tuvieron en cuenta aquéllas que han sido reportadas en la literatura internacional [313] ya que no han sido estudiadas en mejillones de bancos naturales de la costa de Chubut. De esta manera se fijaron como “alto” al ofrecimiento de ~ 10912500 cél. (~ 436500 cél. día⁻¹ por mejillón), “medio” a ~ 2500000 cél. (~ 100000 cél. día⁻¹ por mejillón) y “bajo” a 220000-280000 cél. (~ 8800 cél. día⁻¹ por mejillón). En cuanto a tasa de filtración se consideró un valor de $\sim 3,8$ l h⁻¹ (91,2 l día⁻¹). De esta manera, la densidad celular equivalente al ofrecimiento “bajo” correspondió a 0,09 cél. ml⁻¹ (8800 cél. día⁻¹/91,2 l día⁻¹). Dicho valor es del mismo orden de magnitud al estimado como relativamente escaso por Pérez et al. [264]. Para la densidad “media” se incrementó en un factor

de ~10 y para la “alta” se consideró el máximo posible alcanzado en los cultivos de este estudio (~5000 cél. ml⁻¹).

Los cultivos microalgales se cosecharon en etapa exponencial de crecimiento. Se utilizaron 3 cepas diferentes de acuerdo a la disponibilidad del cultivo de cada una: Punta Pardelas, Rada Tilly y Km 3. La dieta fue ofrecida manualmente utilizando una pipeta graduada. Una vez agregado el fitoplancton tóxico el comportamiento y estado general de los bivalvos se evaluó visualmente en intervalos de ~2 horas, registrando primordialmente la producción de pseudoheces y la actividad de filtración. Transcurridas 24 horas de exposición, se registró la presencia de organismos muertos y se procedió a retirar los bivalvos de cada frasco que fueron congelados para el posterior análisis de TPM.

El segundo ensayo (E2) de intoxicación aguda se realizó con mejillones recolectados del intermareal rocoso de Cerro Avanzado en noviembre de 2017, con las mismas condiciones que el primero (E1). En este caso, cada frasco recibió 25 individuos de largo promedio de $3,5 \pm 0,4$ cm y un peso promedio de los tejidos húmedos de $1,9 \pm 0,7$ g. Se utilizó la cepa de microalgas de Punta Pardelas y se ofreció a cada réplica ~10912500 cél. día⁻¹.

Para analizar la concentración de TPM, el conjunto de mejillones de cada frasco fue homogeneizado en dos sub-réplicas y procesado para análisis por BR. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$.

Intoxicación del mejillón M. platensis alimentado con el dinoflagelado A. tamarense/catenella

Mejillones de talla homogénea ($5,1 \pm 0,5$ cm) y peso de tejidos blandos húmedos promedio de $4,03 \pm 0,90$ g fueron recolectados en el intermareal bajo de Cerro Avanzado el 5 de mayo de 2017, luego de confirmar la ausencia de TPM por medio de BR (**Figura 23**). Una vez arribados al SAE del CCT CONICET-CENPAT un grupo de mejillones fue separado como muestra inicial, mientras que los demás fueron limpiados de sedimentos y epibiontes y colocados en un SRC con agua de mar filtrada a 1 μm y desinfectada con UV, biofiltro biológico y aireación constante. Para la aclimatación de los bivalvos y para el posterior desarrollo del experimento, la salinidad fue de 33 ups y la temperatura de 13 °C simulando las condiciones naturales medidas a campo al momento de la recolección. Durante el periodo de aclimatación, los mejillones no fueron alimentados.



Figura 23. Recolección de mejillones del intermareal durante la marea baja en Cerro Avanzado (golfo Nuevo, Chubut).

El experimento se diseñó en base a los resultados de los ensayos preliminares y los trabajos desarrollados por Suzuki et al. [298], Ichimi et al. [297] y Sekiguchi et al. [289]. El 5 de junio se dio inicio a la experimentación, para la cual se utilizaron 15 frascos de vidrio (sistemas cerrados) con 2 l de agua de mar filtrada hasta 1 μm y desinfectada con UV, aireación independiente y 15 mejillones cada uno (**Figura 24**). Cada frasco correspondió a una réplica de aproximadamente 100 g de tejidos húmedos de mejillón, que es la cantidad mínima de muestra necesaria para el análisis de TPM por BR.



Figura 24. Disposición del experimento de intoxicación del mejillón.

La cepa utilizada para la preparación de la dieta correspondió a dinoflagelados *A. tamarense/catenella* aislados de Punta Pardelas en el año 2013. Cada dos días se realizó el recuento de células de los cultivos a fin de estimar el volumen necesario para alcanzar la dosis de alimento deseada (100% microalgas tóxicas). Con el fin de no generar el rechazo de las microalgas y teniendo en cuenta las consideraciones de diseño desarrolladas por Bricelj et al. [303], los mejillones fueron alimentados con 220000 a 280000 cél. día⁻¹ durante los primeros 9 días y con 640000-700000 cél. día⁻¹ los 16 días subsiguientes. El volumen total de alimento se subdividió en 3 entregas en diferentes momentos del día y se colocó en cada acuario con una pipeta de vidrio graduada. Previo a cada adición de microalgas, se tomó una muestra de 5 ml de agua de cada frasco y se la fijó con lugol para estimar el remanente de dinoflagelados. Luego se retiró un volumen de agua igual al que debía agregarse en cultivo, a fin de mantener un volumen final constante. Todos los recuentos celulares se realizaron utilizando la cámara Sedgewick Rafter en microscopio óptico.

Diariamente, cada frasco se inspeccionó y limpió de heces aspirando el fondo con una pequeña manguera. Durante el experimento no se realizaron recambios completos de agua, a menos que se detectase mortalidad de individuos y/o desove. En el caso de observarse producción de pseudoheces, éstas fueron separadas y analizadas bajo microscopio (Leica DM2500).

A los días 4, 9, 16, 21 y 25 de experimentación, 3 frascos fueron removidos y de cada réplica se homogeneizaron todos los tejidos blandos y se procesaron para BR. Los extractos ácidos correspondientes a una muestra del inicio y de los días 9, 16 y 25 fueron conservados a -20°C para posteriores análisis por HPLC-FLD. Los resultados de toxicidad total se expresaron en $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$.

La toxicidad y el perfil tóxico de la cepa de dinoflagelado utilizada en el ensayo fueron analizados. Para ello, 350 ml de cultivo de una densidad celular de $36143 \text{ cél. ml}^{-1}$ se filtraron por filtro GF/F. El filtro con extracto celular se congeló a -80°C y se envió al laboratorio del INIDEP para su correspondiente digestión y análisis de toxinas. Para este caso, la extracción de toxinas se realizó con ácido acético.

Intoxicación de la vieira tehuelche A. tehuelchus alimentada con el dinoflagelado A. tamarense/catenella

El diseño de experimento desarrollado para el mejillón fue repetido para la vieira tehuelche. El objetivo de esta experiencia preliminar fue evaluar visualmente las respuestas inmediatas del bivalvo ante el ofrecimiento de una dieta 100% tóxica, así como conocer los tiempos mínimos necesarios para la detección de TPM por BR.

Vieiras de talla homogénea (longitud $6,5 \pm 0,5 \text{ cm}$) fueron colectadas en el submareal de San Román mediante buceo autónomo el 15 de septiembre de 2017. Luego fueron trasladadas al laboratorio, limpiadas de sedimentos y epibiontes y colocadas en un SRC con agua de mar filtrada a $1 \mu\text{m}$ y desinfectada con UV, biofiltro biológico y aireación constante. Para la aclimatación de los bivalvos y para el desarrollo del experimento, las condiciones del acuario fueron 33 ups y $12,5^{\circ}\text{C}$. Durante el periodo de aclimatación, las vieiras no fueron alimentadas.

La experimentación se inició el 25 de septiembre y constó de 9 frascos de vidrio con 2 l de agua de mar filtrada (sistemas cerrados) con 4 vieiras cada uno y aireación. Cada frasco correspondió a una réplica de aproximadamente 100 g de tejido húmedo, necesarios para el análisis de TPM.

La cepa utilizada para la preparación de la dieta correspondió a dinoflagelados aislados de Punta Pardelas. La metodología de alimentación y el mantenimiento de los sistemas fueron los mismos

que en el experimento con mejillones. En cada sistema se adicionaron 640000-700000 cél. día⁻¹. Se planificó una remoción de 3 frascos cada 5 días para la homogenización de los tejidos blandos de todas las vieiras y medición de TPM por BR. Los resultados de toxicidad total se expresaron en µg eq.STX kg⁻¹.

Análisis estadísticos.

Los resultados de todas las experiencias se analizaron descriptivamente. Además, los datos obtenidos a partir de BR de las intoxicaciones de mediano plazo del mejillón y la vieira fueron analizados mediante ajuste a regresión lineal. Para el análisis de resultados obtenidos por HPLC-FLD, los valores cercanos al límite de detección o no detectables, fueron considerados como cero. R Core Team (2016) se usó para el análisis estadístico.

RESULTADOS

Ensayos preliminares de exposición aguda de M. platensis a una dieta tóxica

Durante el desarrollo de los ensayos preliminares no se detectaron mejillones muertos. En aquellos frascos que recibieron una concentración media y alta de células tóxicas, el agua se volvió turbia y los mejillones cerraron sus valvas inmediatamente después de ser entregado el alimento. Esto no fue observado para el caso de las concentraciones bajas. La reactivación de la filtración se observó en los primeros 5 minutos de iniciada la exposición. Transcurridas 24 horas, el aspecto del agua de los frascos turbios volvió a ser translúcida. La formación de pseudoheces fue observada para los mejillones que recibieron concentraciones medias y altas de microalgas tóxicas. Para el segundo ensayo (E2), la máxima concentración estimuló el desove de los organismos. En cuanto a la concentración de TPM, los mejillones de E1, expuestos por 24 h a media y alta densidad celular tendieron a incrementar su toxicidad (**Tabla 19**). En el caso de E2, no se detectaron diferencias significativas.

Tabla 19. Niveles de toxicidad medidos por BR en mejillones expuestos a dieta 100% *A. tamarense/catenella* por 24 h. E1: Se señala la media de dos sub-réplicas y su desvío estándar (DE). E2: Se señala la media de 3 réplicas y su DE.

Cepa	$\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$	Cél. día ⁻¹	Inicio	24 h
E1				
Rada Tilly	Media DE	Baja	765,0 158,2	772,1 56,5
Pardelas	Media DE	Media	563,4 101,3	973,6 27,8
Km 3	Media DE	Alta	566,4 217,2	866,7 80,2
E2				
Pardelas	Media DE	Alta	1011,4 160,4	1042,4 153,4

Baja: 220000-280000 cél., Media: 2500000 cél., Alta: 10912500 cél.

Intoxicación del mejillón M. platensis alimentado con el dinoflagelado A. tamarense/catenella

Durante todo el experimento, los mejillones se mostraron activos, saludables y no se detectaron respuestas inmediatas de cerramiento de valvas al ofrecer el alimento en los acuarios. En los días 2 y 20 se halló un individuo muerto, lo que se calculó como un 0,8% de mortalidad. En tales ocasiones se hizo el recambio completo del agua de los correspondientes frascos. El día 8 se detectó un mejillón desovando por lo que se procedió al recambio total del agua para evitar la estimulación de desove del resto de los individuos. Este frasco fue destinado a medición de TPM el día 9.

Examinando las muestras de agua que se tomaron diariamente de cada uno de los frascos, se observó ausencia total de células de *A. tamarense/catenella* en la mayoría de los casos. Ocasionalmente se encontró una única célula, la cual se consideró como un efecto no significativo en la concentración final. Únicamente en el día 2 se calculó un remanente de 120 cél. ml⁻¹ (240000 cél. en 2l).

En una oportunidad se observó presencia de pseudoheces, las cuales se colectaron y analizaron bajo microscopio. Como se observa en la **Figura 25**, las células de dinoflagelados se encontraban aglomeradas y enteras en la mucosidad, pero también se observó la conservación de una célula en el caso de las heces. En general, podría decirse que los mejillones incorporaron la mayoría o la totalidad del alimento tóxico ofrecido.

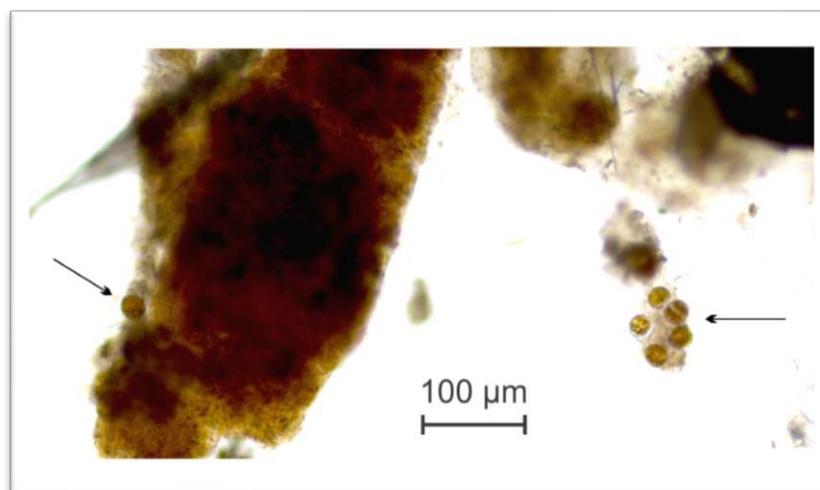


Figura 25. Heces (izquierda) y pseudoheces (derecha) de mejillón, observadas bajo microscopio óptico. Señaladas con una flecha, se aprecian las células enteras de *A. tamarense/catenella*.

Como resultado de la alimentación con dinoflagelados toxígenos, los mejillones fueron adquiriendo niveles crecientes de toxicidad por TPM. Mediante BR se comenzó a detectar toxicidad en los mejillones desde el día 16 de exposición a la dieta tóxica (**Tabla 20**). Considerando como valor inicial el momento en el que se incrementó la dosis de alimento los registros de toxicidad consecuentes se ajustaron a una función lineal $C = 31,2t + 93,6$ (R^2 aj. = 0,65; $p < 0,001$) (**Figura 26**), en la que la ordenada al origen se consideró parte del error del método ($p = 0,28$). La toxicidad alcanzada a los 25 días de intoxicación no superó el NS señalado para la protección de la salud humana. De la extrapolación de la función lineal puede predecirse que el NS sería alcanzado a los 32 días de exposición.

Tabla 20. Niveles de toxicidad total medida mediante BR en mejillones intoxicados por una dieta 100% *A. tamarense/catenella*. Se muestra la media y el desvío estándar (DE) de 3 réplicas.

Días intoxicación	Cél. día ⁻¹	µg eq. STX kg ⁻¹	
		Media	DE
0		ND	-
4	220000-280000	ND	-
9		ND	-
16		388,27	14,3
21	640000-700000	421,00	50,6
25		593,67	146,4

ND: No Detectado

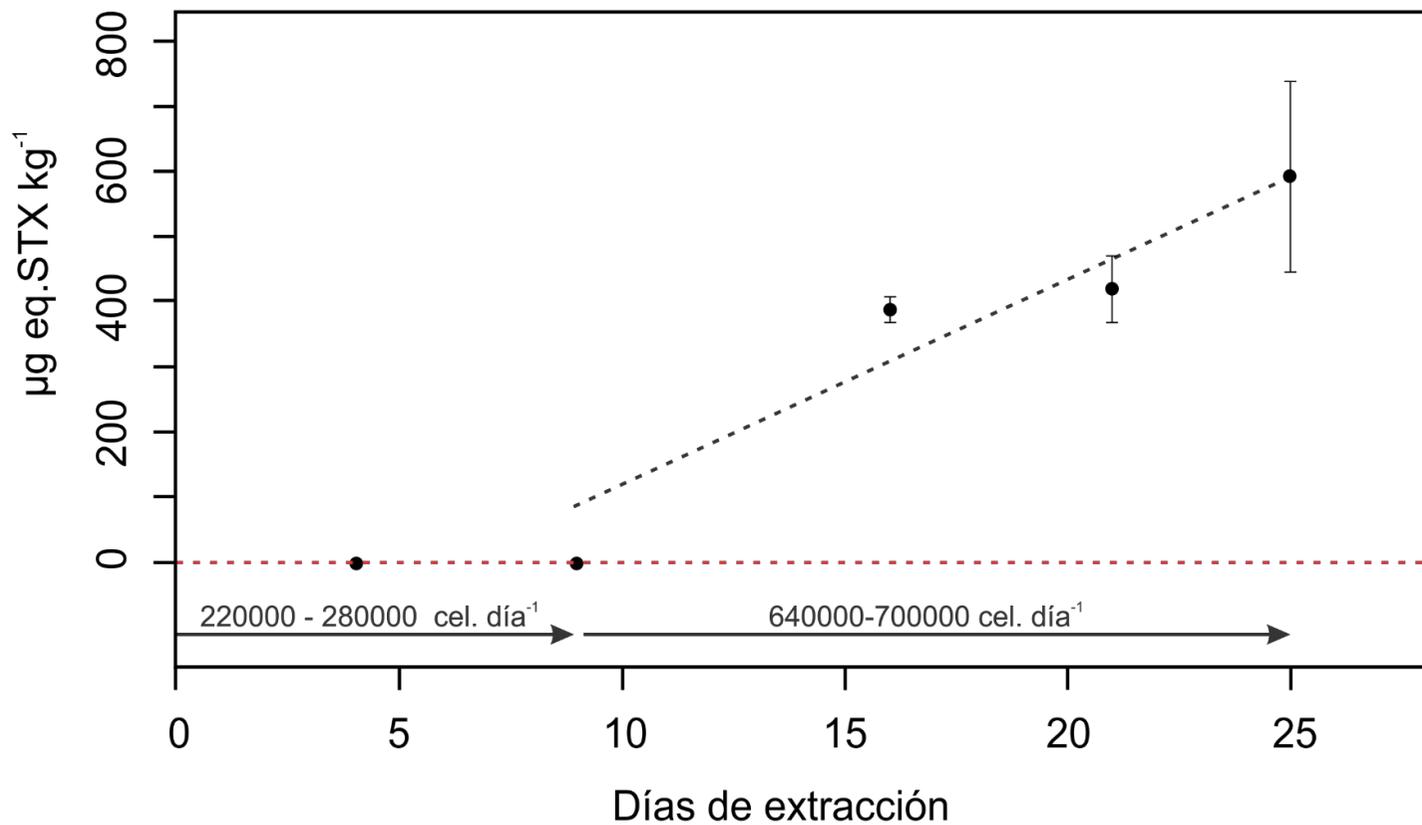


Figura 26. Cinética de intoxicación del mejillón alimentado con *A. tamarense/catenella* de acuerdo a los niveles de toxicidad total ($\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$) medidos por BR. Los puntos señalan la media de 3 réplicas y las líneas el DE. Con línea punteada se señala la regresión $C = 31,2t + 93,6$ y en línea roja la intersección con 0.

Similar a lo observado por BR, los resultados de toxicidad obtenidos por HPLC-FLD muestran un incremento conforme transcurre el tiempo de experimentación (**Tabla 21**); sin embargo, éstos son del orden de 2,5 a 3 veces mayores que los obtenidos por BR. A pesar de ello, se observó correlación entre los resultados de ambos métodos (R^2 aj. = 0,98; $p = 0,006$) (**Figura 27**). Según los valores obtenidos por HPLC-FLD, la toxicidad en mejillones con 16 días de intoxicación, superó el valor de NS.

Tabla 21. Concentración de toxinas (nmol g^{-1}) y niveles de toxicidad total calculados por HPLC-FLD ($\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$) en mejillones alimentados con *A. tamarense/catenella*. Se muestran además los valores de toxicidad total medidos por Bioensayo en Ratón (BR) de las mismas muestras.

Días	BR ($\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$)	HPLC-FLD ($\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$)	HPLC-FLD (nmol g^{-1})
0	ND	-	traza
9	ND	-	traza
16	393,80	1178,59	5,44
25	466,00	1613,45	7,56

ND: No Detectado

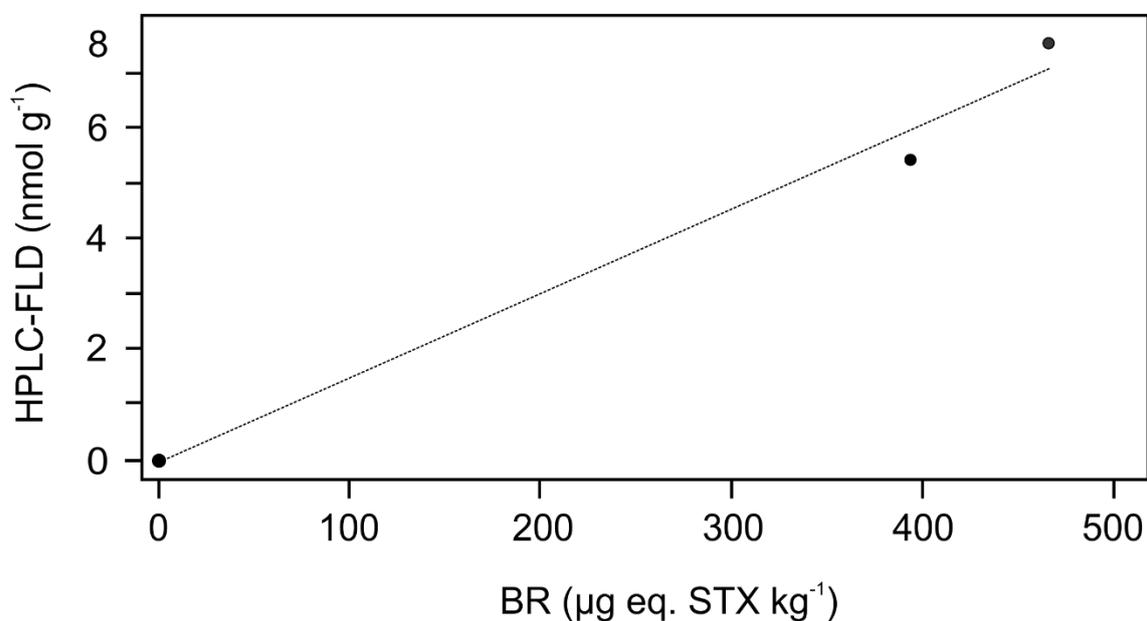


Figura 27. Correlación entre los resultados del total de toxinas obtenidas por HPLC-FLD (nmol g^{-1}) y la toxicidad total medida con Bioensayo en Ratón (BR). $y = 0,01x - 0,04$; R^2 aj. = 0,98.

A partir del perfil tóxico obtenido por HPLC-FLD pudo observarse que las muestras iniciales poseían concentraciones cercanas al límite de detección (traza) de los análogos GTX 2&3 (**Tabla 22**). A los 9 días, aún no detectable por medio del BR, todos los análogos a excepción de STX comenzaban a acumularse en concentraciones cercanas al límite de detección del equipo. Una vez transcurridos los 16 días de intoxicación, los mejillones presentaron un perfil representado en un 79% por GTX 1&4 (GTX 1 22% y GTX 4 56% del total), seguido por GTX 3 (10%), GTX 2 (9%) y dcGTX 3 (2%). Luego de 25 días de intoxicación, las proporciones se mantuvieron, dada la mayor representatividad por GTX 1&4 (74%). Las STX no fueron detectadas en ninguna de las muestras analizadas. De acuerdo a lo cuantificado en los días 16 y 25, los análogos que más se incrementaron fueron GTX 3 en un 77% y GTX 2 en un 69%, seguidos por los epímeros GTX 1&4 y dcGTX 3 entre un 29 y 36% (**Tabla 22**).

Tabla 22. Concentración (nmol g⁻¹) de cada análogo en mejillones con 0, 9, 16 y 25 días de intoxicación. Se señala el porcentaje de representatividad (%Rep.) y el porcentaje de incremento (%Inc.) desde el día 16 al 25.

Días	0	9	16		25		%Inc.
			nmol g ⁻¹	% Rep.	nmol g ⁻¹	% Rep.	
STX	ND	ND	ND	-	ND	-	-
GTX1	ND	traza	1,22	22,4	1,64	21,7	34,4
GTX2	traza	traza	0,49	9,0	0,83	11,0	69,4
GTX3	traza	traza	0,56	10,3	0,99	13,1	76,8
GTX4	ND	traza	3,06	56,3	3,95	52,2	29,1
dcGTX3	ND	traza	0,11	2,0	0,15	2,0	36,4

ND: No Detectado.

Las cepas de dinoflagelado del complejo *A. tamarense/catenella* presentaron un perfil tóxico caracterizado por C2 (47%), seguido por GTX 4 (19%), GTX 3 (11%), C1 y GTX 1 (ambas 8%). Los análogos GTX 2 y neoSTX presentaron un 2% de representatividad y STX, dcGTX 2 y dcGTX 3 menos del 1% (**Tabla 23, Figura 28**). La toxicidad calculada para la cepa fue de 82,56 fmol eq.STX cél.⁻¹ ó 24,71 pg eq.STX cél.⁻¹.

Tabla 23. Perfil tóxico de la cepa de *A. tamarense/catenella* de Punta Pardelas. Se señala el porcentaje de representatividad de cada análogo (%Rep.)

	fmol cél. ⁻¹	%Rep.
neoSTX	4,95	2,4
STX	0,97	0,5
GTX 1	17,10	8,2
GTX 2	4,35	2,1
GTX 3	23,49	11,3
GTX 4	40,19	19,3
dcGTX 2	0,23	0,1
dcGTX 3	1,42	0,7
C1	17,39	8,3
C2	98,34	47,2
Total fmol cél.⁻¹	208,43	

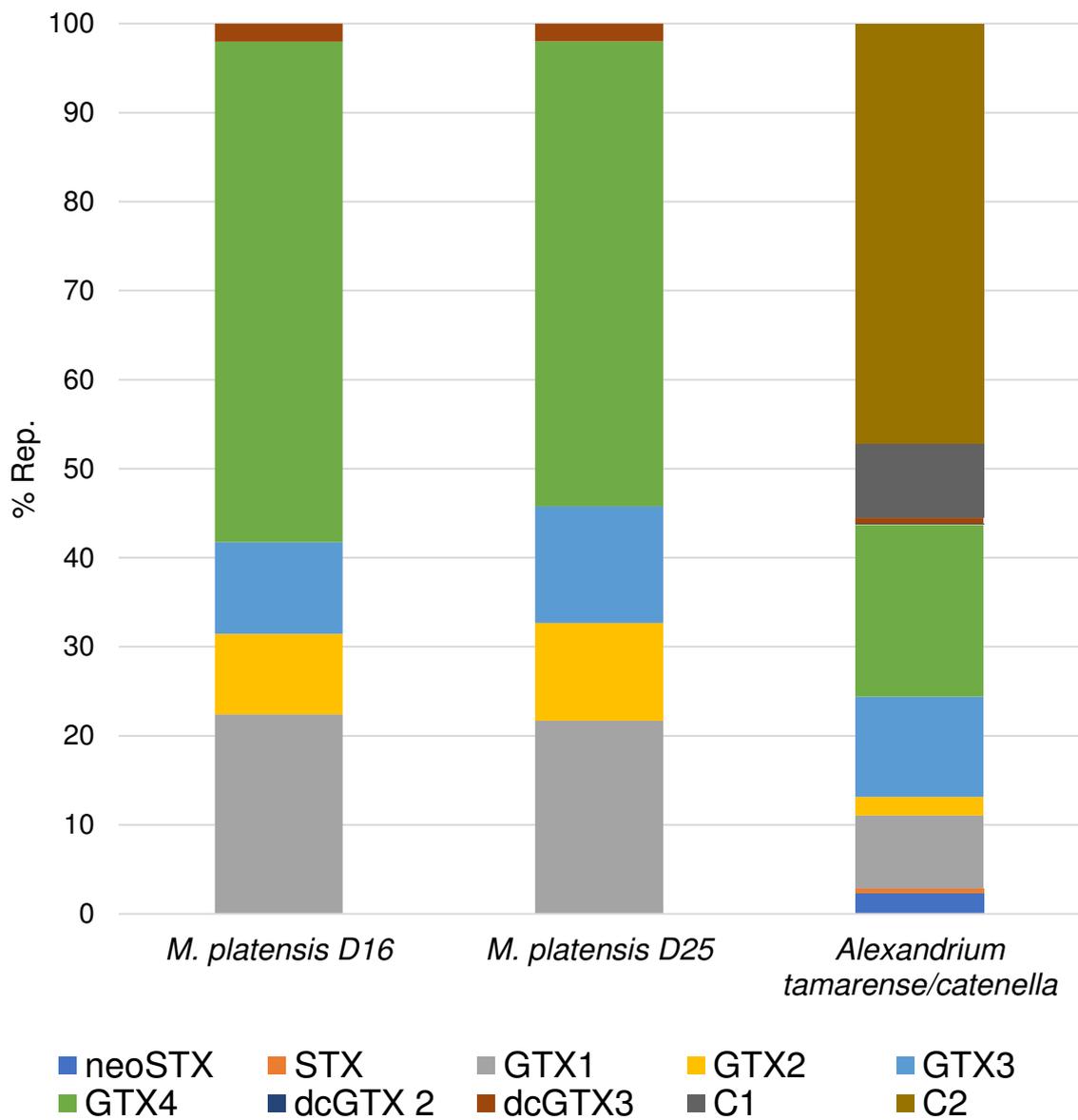


Figura 28. Porcentaje de representatividad de cada uno de los análogos de TPM de forma comparativa entre muestras de mejillones *M. platensis* de los días 16 y 25 (D16 y D25 respectivamente) y la cepa de *A. tamarense/catenella* de Punta Pardelas.

Intoxicación de la vieira tehuelche A. tehuelchus alimentada con el dinoflagelado A. tamarense/catenella

Durante el desarrollo de esta experiencia preliminar, las vieiras presentaron varios síntomas de estrés. Se observaron pseudoheces, heces e incluso un líquido lechoso en la superficie de los sistemas que, posiblemente, serían gametos que fueron desovados. En las reiteradas oportunidades que esto último ocurrió, se realizó un recambio total del agua. En los casos en que solo se retiraban las heces con una manguera, los individuos comenzaban a desplazarse nadando lo que implicó un gasto energético. Los aspectos señalados, sumado a la intensa actividad alrededor del experimento, propios del espacio común de la sala experimental, no permitió cumplir con el esquema de remoción de frascos planificado.

A fin de llevar a cabo el análisis de TPM, se fueron eligiendo los frascos que poseían vieiras en un estado de visible debilidad, esto es, manto y tentáculos retraídos, manto laxo y/o cerramiento completo de valvas. Las réplicas se constituyeron por los tejidos blandos homogeneizados de 3 ó 4 vieiras. Al finalizar el experimento la mortalidad alcanzó el 52,5%, considerando como muerto al organismo que no respondía a estímulos mecánicos. Existió remanente celular en todos los sistemas durante el experimento, encontrando desde 7 a 73 cél. ml⁻¹. Esto sugiere que las vieiras tenían poca actividad de filtración, observándose incluso a individuos con las valvas completamente cerradas durante varias horas al día.

Los niveles de TPM se midieron en vieiras con diversos tiempos de exposición. En aquellas expuestas durante 14 días a una dieta tóxica se registró un valor positivo en el BR que, si bien se encontró alejado del NS, pudo ser cuantificado (**Tabla 24**). Los datos del presente ensayo no pudieron ser ajustados a una función de regresión.

Tabla 24. Niveles de toxicidad total medido por BR en vieiras alimentadas con *A. tamarense/catenella*. Se muestra la media y su desvío estándar (DE) cuando existieron réplicas.

Día intoxicación	N° Réplicas	µg eq. STX kg ⁻¹	
		Media	DE
0	1	-	-
3	1	ND	-
4	3	ND	-
7	1	ND	-
8	2	207,75	293,8
9	1	ND	-
12	1	429,30	-
14	3	517,53	79,3

ND: No Detectado.

DISCUSIÓN

El experimento y los ensayos preliminares descritos en este capítulo corresponden a las primeras experiencias de intoxicación realizadas con especies de bivalvos y dinoflagelados tóxicos de nuestro país. Hasta el momento, los escasos conocimientos sobre la dinámica de intoxicación de bivalvos de nuestra región provenían de muestras naturales, es decir, sin la posibilidad de discernir la ingesta real de microalgas tóxicas o el efecto de otras especies fitoplanctónicas en la dieta [277,26,19,51]. Los resultados del presente capítulo ofrecen las bases y herramientas para el desarrollo de nuevas y mejoradas experiencias, no solo con el mejillón y la vieira de la costa atlántica argentina, sino también para otras especies de bivalvos. En particular, constituyen el primer paso para la estimación de los tiempos necesarios para la intoxicación de *M. platensis* según la densidad y tiempo de exposición microalgal nociva.

A partir de los ensayos preliminares E1 y E2 se observó el comportamiento de los mejillones frente a diversas concentraciones de alimento tóxico. Ello permitió establecer mejores condiciones para el desarrollo de un nuevo experimento, teniendo en cuenta las herramientas disponibles en el laboratorio. Durante el periodo de intoxicación, los mejillones exhibieron buenos signos de salud, se cuantificó un mínimo porcentaje de mortalidad y solo un individuo presentó signos de desove, lo que supone una buena aclimatación de los organismos a las condiciones de experimentación. Si bien en E1 la toxicidad medida fue mayor en mejillones expuestos a media y alta densidad celular, esto pudo deberse a la variabilidad de los individuos, tanto para depurar (eran individuos intoxicados) como para incorporar a la microalga tóxica.

Intoxicación de M. platensis alimentado con A. tamarense/catenella

Se conoce que algunas especies de bivalvos con historia natural de exposición a biotoxinas fitoplanctónicas suelen desarrollar estrategias que les permiten rechazar las microalgas tóxicas durante la filtración o incluso aprovecharlas como alimento y fuente de energía [314-317,252,238,318]. En tal sentido, se han teorizado mecanismos de defensa contra las toxinas para *M. chilensis* [247] y se han encontrado estrategias de resistencia a la presencia de TPM en ciertas poblaciones de la almeja *Mya arenaria* [317]. En relación a *M. platensis* del golfo Nuevo, los registros de TPM en sus tejidos denotan un patrón estacional de acumulación [19] lo que sugeriría que esta especie podría llegar a aprovechar a *A. tamarense/catenella* como alimento. Si bien durante el presente experimento no se determinó una tasa de asimilación, se observó que los mejillones incorporaron el fitoplancton en todo momento. Excepcionalmente en una de las réplicas, se calculó una densidad de 120 cél. ml⁻¹. Ello se atribuyó a un error de muestreo,

teniendo en cuenta que dicho escenario implicaría ausencia total de filtración en 24 h por parte de todos los mejillones del acuario, lo cual se contrapone a la actividad de filtración observada en el resto de los acuarios. Incluso frente al rechazo del alimento ofrecido, las células de *A. tamarense/catenella* habrían sido aglomeradas en pseudoheces luego de pasar por la cavidad paleal de los individuos.

De acuerdo a lo medido por BR, los mejillones alcanzaron niveles de toxicidad detectables luego de 16 días de alimentación con concentraciones bajas de *A. tamarense/catenella*. Desde el momento en el que se aumentó la densidad fitoplanctónica del alimento, el incremento de toxicidad en mejillones se ajustó a una función lineal. Los bivalvos del género *Mytilus* han sido descritos como rápidos acumuladores de biotoxinas por su elevada tasa de filtración y tolerancia a las toxinas [319,306,316], a diferencia de otros bivalvos como los pectínidos [320]. Los resultados de este trabajo contrastan notoriamente con los obtenidos para juveniles de *M. chilensis* que acumularon 1160 $\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$ en solo 2 días de exposición con un ofrecimiento constante de 250 cél. ml^{-1} de *A. catenella* [321]. También con los reportados para adultos de la misma especie que adquirieron una toxicidad de 6420 $\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$ a los 8 días de exposición a una densidad de 179,8 cél. ml^{-1} . Similares resultados a este último caso también fueron alcanzados por Velásquez, Navarro [293], quienes observaron una toxicidad mayor a 800 $\mu\text{g eq. STX kg}^{-1}$ luego de 5 a 8 días de intoxicación con 50% *A. catenella* de una dieta equivalente al 2% del peso húmedo por mejillón. Los resultados también fueron muy diferentes a lo hallado por Suzuki et al. [298] para *M. galloprovincialis* (largo 3-4 cm) en condiciones experimentales similares a las del presente experimento. En esta oportunidad, el mejillón mostró inmediata presencia de toxinas pasadas las 12 primeras horas de alimentación con una cantidad fija de *A. tamarense* de 30000 cél. día^{-1} por individuo. La baja tasa de acumulación estimada en el presente trabajo (31,2 $\mu\text{g eq. STX kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$), se debería al uso de mejillones adultos y de grandes tallas y a la densidad celular de exposición sumamente baja, ambos condicionantes de la cinética de intoxicación [310,321,319].

De acuerdo a la regresión deducida de los resultados por BR, se estimó teóricamente el momento en el que la toxicidad de los mejillones podría alcanzar el NS, suponiendo continuidad de la cinética de orden 0. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que esta proyección no contempla posibles cambios o asíntotas de la función, tal como fue descrita por Navarro, Contreras [316] como un posible resultado del equilibrio entre la eliminación y asimilación de las toxinas en etapa avanzada de intoxicación. Ciertamente, el entendimiento de una cinética de intoxicación y la variabilidad en la acumulación de las toxinas, debe considerar procesos fisiológicos integrados al comportamiento de alimentación del mejillón (filtración, ingestión y asimilación) [319]. Como no han podido ser consideradas en el presente trabajo se espera, para futuras experiencias, incorporar los aspectos fisiológicos necesarios.

El incremento en la toxicidad de mejillones también fue visible a partir de análisis por HPLC-FLD. Según los valores resultantes de esta técnica, los mejillones exhibieron toxicidad superior al NS luego de 16 días de intoxicación, contrastando con lo obtenido por BR. Como se discutió también en la primera parte del presente Capítulo 2, el método de BR posee un mayor error, sobre todo en el rango de las concentraciones tóxicas trabajado. Es así como, Ben-Gigirey et al. [295] al observar este tipo de discrepancias, sugieren que las decisiones de veda deben considerar los resultados de ambos métodos, siempre y cuando el sistema de salud posea las herramientas necesarias.

Los resultados de toxicidad por HPLC-FLD describen mayor detalle y contrastan con los supuestos englobados en una cinética de acumulación de primer orden [322]: i) no hay transformación de toxinas, ii) la tasa de acumulación es igual para todas las toxinas y iii) todos los análogos son eliminados a la misma velocidad. De acuerdo a lo anterior y en contraposición a la linealidad descrita por los resultados de BR, la proporción de cada análogo respecto al total de toxinas varió conforme transcurrió el tiempo de experimentación. En estudios de intoxicación de *M. galloprovincialis* alimentado con *A. minutum*, observaron que GTX 4 era el único análogo que describía una linealidad en su cinética de acumulación [322]. En el presente experimento, este análogo siempre fue predominante por lo que su propio efecto en la toxicidad total podría enmascarar la toxicidad y dinámica de los análogos encontrados en menor proporción. También, la mayor representatividad de GTX 4 es acorde con lo hallado por Moroño et al. [319] para *M. galloprovincialis*. Estos autores a su vez indican muy baja cantidad de dcGTX 3 en los tejidos del mejillón, al igual que lo detectado en este trabajo para *M. platensis*.

Generalmente, GTX 2 ha sido considerado el análogo con una estabilidad mayor y tiempo de depuración más lento [322,250], también en coincidencia con las depuraciones *ex situ* descritas en el Capítulo 2, primera parte. Acorde a ello, se observó en el presente experimento, un mayor porcentaje de incremento de este análogo, superado únicamente por su epímero β GTX 3. GTX 2&3 fueron registrados en mejillones del banco natural (tiempo 0), aunque en cantidades traza, lo cual puede sugerir un rastro de la floración detectada en primavera-verano del mismo año 2016 (Din). Este tipo de observaciones fueron realizadas por otros autores en las regiones de Chile [323].

A partir de trabajos realizados *in situ* con la cholga *A. atra* de golfo Nuevo (Punta Paredas), Reyero et al. [294] observaron un perfil tóxico contrastante a lo expuesto en la presente experiencia. Los autores señalan una relativamente baja proporción de N-sulfacarbamoilos (6%), muy baja concentración de GTX 4 (9,5%) y una alta concentración de GTX 2 (36,44%). Esta disparidad en primer lugar puede estar dada por la especie, la cual posee tiempos de retención, metabolización y eliminación diferentes para cada análogo. Por otra parte, tratándose de un

estudio *in situ*, la posibilidad de re-intoxicación está presente, sobre todo si se tiene en cuenta la acumulación de C2 en los bivalvos analizados.

Todos los análogos de TPM hallados en el mejillón estuvieron presentes en el perfil tóxico de *A. tamarense/catenella* ofrecido como alimento. El perfil de esta microalga fue acorde a lo reportado por Montoya et al. [250] para la misma especie, quienes informan una gran predominancia de N-sulfocarbamoilo y dominancia de GTX 4 entre los carbamatos en la mayoría de las cepas. Por otra parte, y al igual que lo ocurrido en el presente trabajo, los autores reportan una proporción mayoritaria del epímero α GTX 3 y menor porcentaje del epímero β GTX 2 en todas las cepas analizadas. Sumado a lo anterior, la presencia de neoSTX y STX es observada en varias ocasiones, no solo en cepas cultivadas sino también en muestras naturales de fitoplancton. Los perfiles con ~50% C 1&2 son coincidentes además con los registros de *A. tamarense* de Mar del Plata [301,324] y reportes de *A. catenella* de Chile [324,325] y de Nueva Zelanda [326]. Lo observado también fue coincidente con lo descrito para *A. tamarense* de Japón (50% C 1&2 > GTX 1&4 y neoSTX) [327,298]. Contrario a lo anterior, Reyero et al. [294] describieron para muestras de poblaciones naturales de *A. tamarense/catenella* de Punta Pardelas, un perfil con apenas un 5% de N-sulfocarbamoilos y mayor representatividad de GTX 1. Debe considerarse que el perfil analizado en el estudio señalado fue resultante de muestras naturales, pudiendo diferir de aquellas cepas con varios ciclos generacionales de cultivo, en donde la representatividad de N-sulfocarbamoilos se ve notoriamente incrementada, entre otros cambios posibles [250].

En la muestra analizada también se cuantificó dcGTX 2&3. Krock et al. [325] exponen que la presencia de decarbamoilos es poco común en cepas saludables y suele ser resultado de un proceso de degradación metabólica tal como lo hallado en bivalvos. Sin embargo, la presencia de estos análogos ya había sido señalada anteriormente para *A. tamarense/catenella* de la costa atlántica [301,324].

El tipo de análogos de TPM y su concentración determinan la toxicidad de la microalga analizada. La concentración de toxinas (208,43 fmol cél.⁻¹) y la toxicidad de la cepa proveniente de Punta Pardelas (82,56 fmol eq.STX cél.⁻¹ o 24,71 pg eq.STX cél.⁻¹), en comparación con *A. tamarense/catenella* de diferentes áreas de la costa Argentina, fue considerablemente alta respecto a los registros previos de cepas cultivadas (de 13,3 a 51,3 fmol cél.⁻¹ y de 1,81 a 10,3 pg eq.STX cél.⁻¹), pero coincidente con los parámetros estimados para muestras naturales de fitoplancton (de 68,2 a 92,9 pg eq.STX cél.⁻¹ y de 163,9 a 261,4 pg eq.STX cél.⁻¹) [250]. La concentración y toxicidad halladas en este trabajo también superaron las informadas para cepas de Mar del Plata (63,2 fmol cél.⁻¹ y 9,28 pg eq.STX cél.⁻¹), *A. catenella* de Chile (50,5 fmol cél.⁻¹ y 4,65 pg eq.STX cél.⁻¹) [324], y para la especie *A. ostenfeldii* (0,27 fmol cél.⁻¹ y 0,66 pg eq.STX

cél.⁻¹) y *A. cf. tamarense* (18,8 fmol célula⁻¹). En general, la toxicidad y la concentración de TPM están estrechamente relacionadas con la condición de las cepas y de cultivo. La reiterada presencia de neoSTX en *A. tamarense/catenella*, incluso en concentraciones mayores al 10%, puede ser uno de los motivos causantes de las altas toxicidades encontradas para esta especie en su distribución atlántica [324,301].

La similitud entre los perfiles bivalvo-fitoplancton hallada en el presente trabajo ha sido encontrada en reiteradas ocasiones. Kwong et al. [308] describen para *Perna viridis* alimentada con *Alexandrium fundyense*, una acumulación de C2 seguida de una rápida eliminación, generando diferentes proporciones de análogos en los tejidos del bivalvo, pero manteniendo cualitativamente el perfil. Por otra parte, los perfiles del dinoflagelado pueden ser modificados una vez consumido por el bivalvo. Es común que en tejidos de mejillones los N-sulfocarbamoilos se transformen rápidamente en los análogos carbamatos más potentes [320,303]. Incluso es conocida la epimerización desde los epímeros β (GTX 4 y GTX 3) a los isómeros α (GTX 1 y GTX 2) [287]. Por otra parte, Carreto et al. [301] sugieren que dentro de los mejillones podría existir una interconversión entre GTX 1&4 a GTX 2&3 o degradación y eliminación rápida de C1 y C2. Como se discutió anteriormente, también las técnicas de extracción pueden influir en la detección de N-sulfocarbamoilos.

A partir de los perfiles observados en *A. tamarense/catenella*, se interpreta una acumulación/eliminación selectiva, epimerización y biotransformación de las toxinas en el organismo del mejillón [306]. En primer lugar, los epímeros β predominaron en la cepa del dinoflagelado, pero en el mejillón los epímeros α adquirieron importancia. Este proceso también fue evidenciado en poblaciones naturales de *P. magellanicus* [328]. También puede haber ocurrido transformación de N-sulfocarbamoilos a carbamatos, ya que no se detectó C1,2 en mejillones, pero sí se detectó dcGTX. Se ha sugerido que dcGTX es un producto intermediario de la conversión de C1,2 del fitoplancton tóxico a GTX en el mejillón [287], siendo el resultado de la conversión enzimática post-digestiva por carbamoilasa endógena producida por bivalvos [325,245].

Intoxicación de la vieira tehuelche A. tehuelchus alimentada con A. tamarense/catenella

De acuerdo a lo observado en el ensayo con la vieira tehuelche, para futuros ensayos deben tenerse en cuenta algunas modificaciones del diseño experimental, con el fin de disminuir el estrés de los individuos. Los acuarios transparentes, sumado a un elevado tránsito de usuarios en el recinto de trabajo, podría haber generado un estrés constante en las vieiras. Otras posibles mejoras podrían estar relacionadas con un aumento del volumen de los sistemas y un recambio

diario del total del agua [289,320]. Sin embargo, para lograr tales dimensiones se necesita mayor infraestructura y, por ende, mayor producción de microalgas tóxicas.

A pesar de los inconvenientes, un grupo de vieiras pudo ser mantenido durante 14 días con un régimen de alimentación 100% tóxica, permitiendo la detección de TPM en sus tejidos blandos. Los resultados reflejaron que la vieira necesitó un tiempo similar al observado en mejillones para bioacumular toxinas en sus tejidos. Pese a ello, la toxicidad medida fue mucho más baja en comparación a lo observado en otros pectínidos bajo experimentación como es el caso de *Pecten novaezelandiae* intoxicada con *A. tamarense* [329]. Debe resaltarse que la sensibilidad de esta especie puede variar de acuerdo a su ciclo reproductivo anual y su estado fisiológico [90,330]. Posiblemente, los individuos extraídos en esta ocasión se encontraban debilitados tras un periodo invernal de baja calidad y cantidad de alimento disponible en el ambiente. De todas maneras, futuros trabajos deberán tener en cuenta la posible susceptibilidad de la especie a las toxinas [239,243]. En algunos casos, las toxinas han generado no solo una respuesta de disconformidad y rechazo del fitoplancton sino también la parálisis del organismo, como en el caso de *Argopecten ventricosus* [320]

CONCLUSIÓN

El mejillón acumuló TPM en sus tejidos, a pesar de las bajas densidades de *A. tamarense/catenella*. Esto podría significar un riesgo para la salud pública si el tiempo de permanencia del dinoflagelado fuese el suficiente. *M. platensis* demostró una alta capacidad de bioconversión de las toxinas, de acuerdo a la evidente transformación de los perfiles tóxicos en el tiempo. La presencia de dcGTX 3 podría ser sugerida como indicador de una reciente exposición a *A. tamarense/catenella*. Sumado a lo anterior y a lo observado en la primera parte del Capítulo 2, se refuerza la hipótesis de que la proporción entre los epímeros α/β de GTX 1&4 y GTX 2&3 podrían ser indicadores del momento de depuración o intoxicación de bivalvos. Teniendo en cuenta la diferencia encontrada entre los valores de toxicidad obtenidos por HPLC-FLD en comparación con BR, se reafirma la importancia de aplicar las técnicas analíticas durante el monitoreo de las TPM en la provincia del Chubut.

A partir de lo presentado en el presente estudio se espera seguir desarrollando la experimentación para el conocimiento de la cinética de intoxicación por TPM de bivalvos expuestos a alimento tóxico. Futuros estudios deberían además adaptar y optimizar los experimentos para su aplicación en la vieira *A. tehuelchus*, especie que podría presentar mayor susceptibilidad ante las TPM.

TERCERA PARTE

Aplicabilidad del Quitosano en la depuración de TPM de bivalvos. Intoxicación y depuración de *Mytilus chilensis* alimentado con *Alexandrium catenella*

INTRODUCCIÓN

En muchos países como la Argentina los recursos marinos son explotados casi en su totalidad a través de la extracción directa. La acuicultura como mecanismo productivo, con sostenibilidad comercial es, sin embargo, un eslabón fundamental en la economía regional y nacional de países como Chile. En este contexto, la inocuidad, la calidad y el precio de los productos, entre otros, pueden verse vulnerados por eventos de contaminación en el ambiente marino como aquellos consecuentes de las FAN.

La acuicultura de bivalvos en Chile se desarrolló de manera progresiva, comenzando con producciones experimentales a pequeña escala. Debido a que la industria pesquera significaba un mayor rédito económico, la actividad progresó lentamente [73]. En el año 1960 se realizan los primeros estudios en moluscos bivalvos, en particular relacionados al cultivo de la ostra chilena *Ostrea chilensis*. Al año siguiente comienza el desarrollo de la mitilicultura como actividad organizada, iniciándose con el cultivo del mejillón o chorito chileno *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) [331]. En 1975 se establece la primera estación extensiva, momento a partir del cual se registra un notorio incremento en la creación de centros de cultivo, alcanzando alrededor de 120 estaciones para el año 1981 [73]. En este periodo también se registra la creación de planes de desarrollo y el establecimiento de instituciones, cuyo objetivo comprendía la investigación en el área de acuicultura (Instituto de Fomento Pesquero, IFOP) y la apertura a los mercados internacionales [1]. Hacia finales del 2003, el estado ya llevaba invertido 50 millones de dólares en proyectos vinculados al sector acuícola [1]. Para el año 2008, el área productiva de bivalvos alcanzaba un rendimiento óptimo, con abundante oferta de semilla, una gran producción de engorde y un aumento en el valor de las exportaciones. En la actualidad, la acuicultura en Chile sigue siendo fomentada por el gobierno nacional. En ese marco se cuenta con financiación como por ejemplo el “Consortio Tecnológico para la acuicultura Oceánica”, dentro de Programas Tecnológicos Estratégicos llevados adelante por la Corporación de Fomento de la Producción (CORFO) con hasta 6 mil millones de pesos de soporte económico [332].

El mejillón *M. chilensis* es una especie nativa de Chile que se distribuye desde la zona central del país (~ 38°S) hasta el sureste patagónico (~ 53°S). No solo es importante económicamente sino también tiene relevancia en términos ecológicos [333]. Tal como la mayoría de las especies de la familia Mytilidae, el mejillón posee abundante producción de biso lo cual beneficia la aplicación de técnicas tradicionales de acuicultura. A su vez, es muy eficiente filtrador, exhibiendo rápido crecimiento y alto porcentaje de carne/peso total [73].

El sur de Chile posee características de vital importancia para el desarrollo de actividades de acuicultura. La zona de la X Región (en donde se encuentra Chiloé) presenta formaciones geomorfológicas con numerosas bahías resguardadas del viento y estuarios [334,335]. Las bahías poseen un ambiente predominantemente marino con promedio anual de salinidad de 29,9 ups (mín. 24 y máx. 33 ups) y una temperatura media de 11,8°C (mín. 10 y máx. 17,5 °C). Por otra parte, los estuarios se caracterizan por altas fluctuaciones anuales de variables ambientales como la salinidad (promedio 24; mín. 13 y máx. 30 ups) y la temperatura (promedio 13,4; mín. 9 y máx. 19 °C) [73].

La producción de la X Región es de gran importancia para Chile. En el año 2002, las extensiones cultivadas alcanzaban 17 mil hectáreas (incluyendo salmónidos y algas), en las que se produjeron 500 mil toneladas de bivalvos (400 mil destinadas a exportación) lo que representó un 95% de la producción total del país. Del total producido en la región, 50 mil toneladas correspondieron únicamente a mejillones [1]. Las provincias de Chiloé y Llanquihue poseen la mayor cantidad de concesiones para el cultivo de mejillones y otras especies de mitílidos, concentrándose en Chiloé el 81% de la producción total de la región [335]. La extensión cultivada en este sector abarca el 99% tanto de centros en operación como de actividad de cosecha [336]. El 56% de los centros de cultivo se encuentra en la Isla de Chiloé, el 25,7% en Calbuco y Puerto Montt y el 18,3% restante distribuido en diversos lugares de la X Región [335].

Interacción de la miticultura con el medio ambiente.

Los cultivos intensivos pueden generar alteraciones en su entorno marino, tanto en relación a los ciclos biogeoquímicos de nutrientes como a los ciclos biológicos-ecológicos. Así por ejemplo, altas densidades de larvas de bivalvo pueden promover el cambio de perfil fitoplanctónico, producto de la selección trófica y masiva [5]. Este cambio significa un aumento en la fragilidad del ecosistema acuático lo que puede volverlo aún más susceptible a eventos naturales como las FAN. En el territorio chileno pueden darse 3 tipos de floraciones tóxicas: las TAM, TDM y TPM. En particular, la producción y comercialización de bivalvos en Chile como en otras partes del mundo, es especialmente susceptible a las FAN productoras de TPM [337].

En Chile se ha reportado a *A. catenella* como la especie más importante responsable de la producción de TPM e intoxicación de moluscos bivalvos [338,339]. *A. catenella* fue registrada por primera vez en 1972 en el Estrecho de Magallanes y desde entonces se conoce su distribución desde los 43°44'44" a 55°55' S [340,325]. Las floraciones comienzan en la zona costera durante los meses de enero a marzo y declinan a mediados de abril; a su vez, en el norte del país, pueden sucederse FAN bianuales. Estos eventos son altamente dependientes de los bancos de quistes en los sedimentos y su dispersión, acumulación y duración estarán directamente relacionadas con los vientos predominantes durante dicho periodo [341]. Se cree que la frecuencia y el patrón de dispersión se podrían estar modificando [340,325].

A partir del año 2005, de acuerdo al Reglamento de Plagas Hidrobiológicas (REPLA) (D.S. MINECON N° 345/2005), *A. catenella* fue declarada plaga [323]. Por la presencia de TPM y las otras toxinas marinas, SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura) implementó una serie de procedimientos y programas tendientes al control sanitario de productos marinos con exposición a contaminación. En este marco, el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) (1989 para exportación a Estados Unidos y 1995 para la Unión Europea) lleva adelante el monitoreo de contaminación en las áreas de extracción y se encarga de los análisis de contaminantes (incluidas las biotoxinas) en productos elaborados previo a la exportación. A través de este programa también se ha elaborado la clasificación de zonas de producción en bancos naturales y la gestión de centros de cultivo autorizados para la extracción y comercialización a mercados normalizados. Actualmente, el programa se ve regulado por los Reglamentos (CE) N° 854/2004, N° 853/2004, las Decisiones 2003/804/CE y 2004/623/CE, y sus modificaciones. Complementario a este programa, también coordinado por SERNAPESCA, existe el Programa de Control de Producto Final que tiene como objetivo certificar la inocuidad del producto a exportar. Por otro lado, desde la década de los '90, el Programa de Monitoreo de la Autoridad Sanitaria Regional (SEREMI), coordinado por el Instituto de Fomento Pesquero, tiene como objetivo evitar el riesgo de intoxicaciones humanas por consumo de moluscos bivalvos expuestos a biotoxinas [337].

La presencia episódica de biotoxinas en los bivalvos por encima de los límites regulatorios es un problema crónico que requiere el cierre prolongado de áreas cultivo y bancos naturales de producción de mariscos. Estas medidas, necesarias a menudo, resultan en pérdidas económicas significativas para la industria de la acuicultura [314,342]. En el año 1972, a raíz de un evento de FAN, Chile afrontó una disminución del 71% en la cosecha de cholga y del 59% en la de mejillón, respecto del año precedente. Ello equivalía a una pérdida económica de 1 millón de dólares [73]. En el año 2016, la producción y provisiones de mejillones se vieron nuevamente amenazadas por las fuertes FAN, momento en el que la producción disminuyó en un 2,3% [343,7]. A pesar que hacia la segunda parte del mismo año la producción había logrado recuperarse, las exportaciones

reflejaron una reducción a 67400 toneladas en relación a las 69700 producidas en 2015 (3,3% menos) [8]. Luego de este evento, ya para finales del 2017, Chile parece haber recuperado su productividad [344].

La presencia de biotoxinas en Chile, además de representar una amenaza para la economía regional, es un riesgo directo para la salud humana. Durante las últimas tres décadas, cientos de personas han sido afectadas por consumo de bivalvos con TPM; incluso, se conocen 25 casos en los que la intoxicación resultó ser fatal [325]. Por otra parte, las biotoxinas también pueden afectar la fisiología y metabolismo de los bivalvos intoxicados, por lo que estos aspectos han sido ampliamente estudiados. En mejillones *M. chilensis* alimentados experimentalmente con *A. catenella* se observó que la tasa de absorción disminuía al comienzo de la exposición, pero lograba recuperarse a valores normales conforme avanzaba el periodo de intoxicación. Además, se describió un incremento rápido de la toxicidad en los primeros días de intoxicación, alteración en la filtración, inhibición de la ingesta y aumento de las tasas de excreción [314,316,315]. Se ha señalado también que los bivalvos expuestos continuamente a TPM pueden desarrollar la capacidad de aprovechar la microalga tóxica como fuente de nutrientes [316].

En los últimos años, se ha acentuado el interés por mantener la calidad alimenticia de los productos marinos con especial atención en la evaluación de biotoxinas [345]. En primer lugar, se han ido perfeccionando diferentes métodos de detección y cuantificación que aumentaron la precisión de los resultados y permitieron la descripción de nuevas biotoxinas. En segundo lugar, se ha presentado la necesidad de re-examinar diferentes métodos de remoción de biotoxinas como una alternativa paliativa a la problemática [5,337]. Diferentes estrategias se han sugerido, entre ellas: la detoxificación por transferencia hacia aguas limpias, lo cual implica altos costos de operación [346]; la disminución de toxicidad por hervido o cocción al vapor [347,348], que incluye tratamientos muy discutidos al considerarse toxinas termoestables como las TPM [349] y tratamientos térmicos en combinación con cambios de pH [346,350]. Dentro de las limitadas alternativas para la remoción de biotoxinas de bivalvos, se destaca la aplicación de quitosano (QNO) como un posible facilitador [351].

Quitosano como facilitador en la depuración de TPM de bivalvos

El QNO, derivado de la quitina, es un biopolímero básico muy abundante en la naturaleza que se puede encontrar por ejemplo en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y moluscos [352]. Su estructura de cadena polimérica, muy similar a la de la celulosa, está constituida por las moléculas D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (**Figura 29**). La proporción de ambas moléculas puede variar en el compuesto según el grado de desacetilación, determinando las diferentes

características y propiedades del QNO [353,352]. Es así como la solubilidad, biodegradabilidad, reactividad y adsorción de sustratos estará condicionada por la cantidad de grupos amino protonados en la cadena polimérica [353].

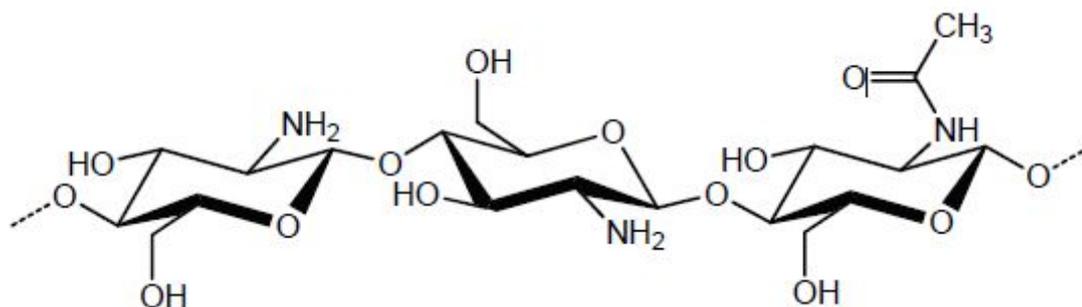


Figura 29. Estructura molecular del QNO poli[β -(1-4)-2-amino-desoxi-D-glucopiranososa] (Figura modificada de de Alvarenga, 2011).

En estado sólido, el QNO es un polímero semicristalino [354] pero, a diferencia de la quitina, su estructura de más del 50% [355] a 60% acetilación [352], es soluble en ácidos orgánicos acuosos y actúa como un catión polielectrolito [355]. En estas condiciones, cuando el grupo amino (de pKa de 6,2 a 7) es completamente protonado en ácidos con pKa menores a 6,2 (por ejemplo ácidos acético, nítrico, perclórico, fosfórico, entre otros) el compuesto se hace soluble formando una sal con el ácido [352,353]. Otros factores como por ejemplo el peso molecular, la temperatura y el procedimiento de producción del polisacárido pueden influir en la cantidad de grupos aminos expuestos en la molécula y, por tanto, determinar también la capacidad de disolución y sus propiedades [352]. Se han documentado, además, técnicas de purificación del compuesto que permiten la solubilidad completa en agua, sin presencia de un ácido [356].

La descripción del QNO y su caracterización comienza ya en los años '60 siendo descrito como una "quitina modificada", de estructura y propiedades variables [352]. El estudio del compuesto y el interés por el QNO fue incrementando sobre todo a partir de los años '70 frente a la necesidad de darle uso a los residuos de la industria pesquera [357]. Los subproductos de pesca, exoesqueletos de los crustáceos como son los descartes de la industria camaronera, ofrecen la posibilidad de reutilizarlos como materia prima [358]. Actualmente, la producción de QNO comercial es muy acotada, obteniéndose principalmente de los exoesqueletos de cangrejos y camarones. Dada la diversidad de fuentes de quitina y el estado de organización en su estructura sólida, las cualidades del QNO comercial no son uniformes y causan muchas dificultades durante las transformaciones o modificaciones químicas. El costo de extracción es otro problema particular, pobremente desarrollado hasta el momento [354]. En países como Estados Unidos y

Japón este producto es producido de manera rentable para la industria [359]. En otros continúa siendo un recurso de gran potencial comercial, en particular considerando los desperdicios de la industria pesquera, especialmente si se incluye, por ejemplo, el recupero de pigmentos y carotenoides (astaxantina) [358] que se utilizan como aditivos en la industria salmonera [359,360].

Hoy en día las aplicaciones del QNO son muy amplias y se pueden clasificar según su utilidad en diferentes ramas como la medicina, farmacología, tecnología molecular, entre otras [359,353,354]. La amplia variedad de sus funciones se correlaciona con un alto número de productos en el mercado y para cada aplicación existen distintos grados de pureza y variedades de formatos de comercialización [360]. A pesar de su versatilidad, el QNO ha sido pobremente estudiado en cuanto a su interacción con sistemas biológicos vivos. Es catalogado como un producto de nula o escasa toxicidad, siendo este un aspecto controversial y poco desarrollado [361,362]. Aún es carente la información referente a la biodegradabilidad *in vivo* del compuesto en diferentes arreglos estructurales [362], pero hay evidencias de un desacople de la molécula vía catabolismo biológico [363].

De acuerdo a la bibliografía, el modo por el cual el QNO es preparado y aplicado es variable. Para ser utilizado como floculante de microalgas fue tratado con ácido acético al 1% y a una proporción de 0,5 % (w/w) obteniendo una solución viscosa a pH de 3,5 [364]. Badawy [365] utilizan la proporción 100 mg en 100 ml de ácido acético 1%. Dima et al. [366] detallan una serie de diluciones en ácido acético al 1%, sugiriendo una máxima de 5 g l⁻¹. Nuevamente, las proporciones que soporte la solución serán determinadas por el grado de desacetilación del producto utilizado y su calidad intrínseca.

Xie et al. [351] describen la cinética de depuración de la ostra *Ostrea rivularis* intoxicada con *A. minutum* en condiciones de laboratorio, utilizando QNO como facilitador. En este trabajo, los autores afirman que la presencia del polisacárido actuó mejorando y disminuyendo los tiempos de depuración, no solo en presencia de alimento sino también únicamente en disolución en agua de mar sin microalgas. Las condiciones de experimentación no son precisas ya que los autores no describen la densidad de ostras tratadas con 0,05 g l⁻¹ de QNO, el método por el cual controlaron la concentración constante del compuesto, la razón por la cual se seleccionó la concentración ensayada ni el método por el cual se suministró el QNO. A pesar de la incertidumbre, la propuesta constituye en sí misma una alternativa alentadora.

Como hipótesis de este capítulo se consideró que el agregado de QNO en el agua produce una disminución de los tiempos en la depuración de TPM de mejillones intoxicados. Se asumió que, durante el periodo de intoxicación, los parámetros fisiológicos responderían de forma similar a experiencias previas, evidenciando la capacidad de aclimatación a la exposición de dinoflagelados tóxicos y al aprovechamiento de éstos como alimento.

En el marco de la hipótesis planteada, el objetivo general es evaluar los efectos del QNO en la velocidad de depuración de mejillones intoxicados con TPM de forma experimental. Además, se propone estudiar durante el periodo de intoxicación, la capacidad de acostumbramiento del mejillón al fitoplancton tóxico ofrecido como alimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades desarrolladas en el marco de esta parte del capítulo se llevaron a cabo en colaboración con el equipo de trabajo dirigido por el Dr. Jorge Navarro, en el Laboratorio de Ecofisiología Energética del Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Sitio de muestreo

Los mejillones se recolectaron de la estación de maricultura perteneciente a un productor particular. El establecimiento se ubica en Quellón Viejo, Chiloé, X Región, Chile (43°08'22.8"S 73°39'29.4"O).

El centro de cultivo está compuesto por 8 trenes, cada uno con 12 cuerdas madres (*long-lines*) de 100 m (**Figura 30**). De cada una de ellas cuelgan aproximadamente otras 150 cuerdas de 8 m, longitud suficiente para no sobrepasar la profundidad fótica propia de una zona cultivada (en zonas de alta densidad de cultivo la zona fótica tiene menor profundidad a causa del efecto sombra de las líneas). Estas cuerdas sostienen a los mejillones fijados y poseen un sistema de flotabilidad por boyas ubicadas cada 2 m de distancia. El sistema de trenes comienza a los 15 m de la línea de costa y se extiende por 30 m de distancia. Las semillas utilizadas de este establecimiento provienen de Puerto Montt.



Figura 30. Centro de cultivo en Quellón Viejo (Chiloé, X Región, Chile) donde se aprecia la gran cantidad de *long-lines*.

Recolección y acondicionamiento de mejillones

La recolección de mejillones se realizó durante los días 11 y 13 de octubre de 2017. Se colectaron individuos de diferentes tallas directamente de *long-lines* de 2 años de antigüedad (**Figura 31**) y del centro de encordado (**Figura 32**). Las condiciones ambientales en el sitio al momento de cosecha fueron: temperatura 11,2 °C, oxígeno disuelto 10,15 mg/l, pH 8,23 y salinidad 30,2 ups.



Figura 31. Maniobra de manipulación de *long-lines* y recolección de mejillones.



Figura 32. Estación de encordado flotante. Puede apreciarse el montículo de semilla de 6 meses de antigüedad.

Para separar los mejillones de la línea, se prestó particular atención en no lastimar la glándula del biso, por lo que se mantuvieron unidos como un conjunto de individuos. Los aglomerados fueron trasladados en seco dentro de conservadoras plásticas hasta un puesto en tierra en donde fueron procesados y acondicionados para su posterior transporte hacia el Laboratorio de Ecofisiología Energética en la ciudad de Valdivia, Chile. El acondicionamiento constó de la separación de cada individuo utilizando tijeras a fin de cortar el biso evitando la laceración o extracción de la glándula. A continuación, fueron medidos utilizando un calibre y seleccionados de acuerdo a las tallas: ~200 mejillones de $5,10 \pm 0,06$ cm para la experimentación y 51 de tallas entre 1,25 a 6,80 cm para la construcción de la curva talla-peso seco. Estos últimos fueron congelados a -20°C y mantenidos en bolsas plásticas hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio.

Los mejillones destinados a experimentación fueron limpiados de sedimentos y epibiontes utilizando agua de mar a la temperatura del sitio de colecta. Para el transporte hasta la ciudad de Valdivia, fueron colocados en conservadoras plásticas, humedecidos con agua de mar y mantenidos a $12,2^{\circ}\text{C}$ utilizando packs de hielo. En dos momentos del traslado, la conservadora fue llenada con agua de mar del sitio de colecta ($T = 12,2^{\circ}\text{C}$, salinidad = 30,9 a 31 ups) y se aireó durante ~3 h utilizando un sistema de aireación ATMAN AT-703 (**Figura 33**). Luego, se desagotó el agua y se continuó el traslado en húmedo.



Figura 33. Conservadora de transporte con aireación. Los mejillones fueron mantenidos en las mismas condiciones de colecta. En la foto de la derecha se puede apreciar el buen estado de los mejillones, indicado por la apertura de sus valvas y extensión del manto.

Una vez arribados al laboratorio, los mejillones fueron colocados en una cubeta plástica de 30 l con agua de mar filtrada a 1 μm y salinidad de 30 ups. Durante el periodo de aclimatación la temperatura fue mantenida a 13 °C utilizando un enfriador de agua automatizado (**Figura 34**). Diariamente, se realizó un recambio del 40-60% del volumen de agua, momento en el cual se procedió a retirar las heces y pseudoheces del fondo mediante un sistema sifón. Diariamente, los mejillones fueron alimentados con *Isochrysis galbana* en proporciones que no generaran estímulo para el desove. El periodo de aclimatación se prolongó durante 12 días, a fin de eliminar los individuos que mostrasen señales de debilidad o defectos fisiológicos.



Figura 34. Cubetas de aclimatación.

Curva de tallas en relación al peso seco

La construcción de una curva de talla/peso seco permite estimar el peso seco de los mejillones bajo experimentación y de esta manera realizar un cálculo preciso de la proporción de alimento a ofrecer por día. Para tal fin, los mejillones fueron descongelados, ordenados según talla, medidos nuevamente, abiertos y escurridos del exceso de líquido (**Figura 35**). Posteriormente los tejidos húmedos se separaron para registrar el peso húmedo y luego de secar a 100 °C por 24 h, se registró el peso seco.



Figura 35. Mejillones seleccionados y ordenados de menor a mayor.

Cálculo de la dieta tóxica, dieta control y concentración de QNO disuelto

La cantidad de alimento suministrado diariamente a los mejillones fue del 3% de su peso seco, valor estimado en base a la tasa teórica en bancos naturales (4% del peso seco por día) [73]. De acuerdo a ello y considerando la curva talla/peso seco, se proporcionaron de microalgas $12,69 \text{ mg día}^{-1}$ por individuo. La dieta control fue de 100% de *I. galbana* mientras que la dieta tóxica simuló condiciones representativas de eventos de TPM previamente registrados en el sur de Chile [239]: 30% de *I. galbana* y 70% de *A. catenella*. En ambos casos el alimento se preparó en un volumen final de agua de mar de 10 l, utilizando los siguientes pesos (obtenidos en experimentos anteriores) para cada especie: 0,0310 mg para 6194 células de *A. catenella* y 0,1434 mg para 4787616 células de *I. galbana*.

La microalga tóxica se obtuvo de un cultivo monoclonal, no axénico, de *A. catenella* cepa Coldita (de aquí en adelante se utiliza esta denominación de acuerdo a la utilizada en el laboratorio de trabajo). Esta cepa fue aislada en el 2011 de la Isla Coldita (sur de Chiloé, X Región), por el Instituto de Fomento Pesquero (Fisheries Development Institute, IFOP). El dinoflagelado fue cultivado en agua de mar filtrada a $0,45 \mu\text{m}$, con una salinidad de 30 ups y enriquecida con medio de cultivo L1. Las condiciones de mantenimiento se fijaron en $14 \text{ }^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 14/10 h luz/oscuridad [239]. La microalga no tóxica *I. galbana* correspondió al clon T-ISO cultivado en agua de mar filtrada a $0,45 \mu\text{m}$ con una salinidad de 30 ups y enriquecida con medio de cultivo f/2. El cultivo se mantuvo en condiciones de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 14/10 h luz/oscuridad. Ambas especies de microalga fueron cosechadas en el momento en que el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento (**Figura 36**).

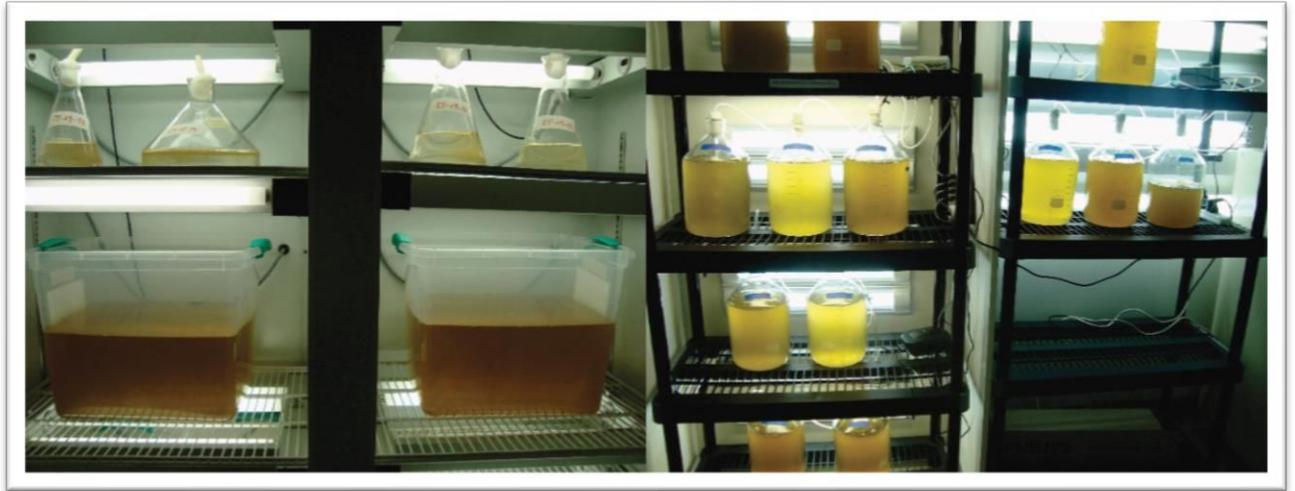


Figura 36. Izquierda: cultivo de *A. catenella*. Derecha: cultivo de *I. galbana*.

Para la determinación de TPM en la dieta, un cultivo de *A. catenella* con densidad de $10541 \text{ cél. ml}^{-1}$ fue filtrado por 5 filtros GF/C de 47 mm de diámetro previamente lavados con agua destilada y secados a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. Los filtros con muestra fueron luego mantenidos a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

El QNO utilizado durante el periodo de depuración fue un reactivo de calidad analítica, peso molecular medio y 75-85 % de desacetilación, marca SIGMA-ALDRICH Lote STBH0024. La dosificación del QNO fue estimada de acuerdo a la talla de los individuos bajo experimentación, como el 15% del peso seco, lo que correspondió a $63,45 \text{ mg día}^{-1}$ de QNO por individuo. La solución se preparó al 0,2 % p/v (o 5 % v/p [366]) en ácido acético 1 % v/v. Esta concentración fue la máxima posible por unidad de volumen del ácido, alcanzada en pruebas previas al experimento. Cada día se preparó el volumen correspondiente al total a utilizar ($63,45 \text{ mg} \times \text{N}^\circ$ de individuos expuestos).

Intoxicación y acumulación de TPM en mejillones alimentados con A. catenella

Acuarios de 9 l de capacidad fueron llenados con 5 l de agua de mar filtrada a $1 \text{ }\mu\text{m}$, de salinidad 30 ups, aireación constante y mantenidos a $13 \text{ }^\circ\text{C}$. En cada uno de 5 acuarios (réplicas) se colocaron 11 mejillones que recibieron la dieta tóxica. En cada uno de otros 5 acuarios (réplicas control), se colocaron 5 mejillones que recibieron la dieta control. Las dietas fueron distribuidas en los diferentes acuarios utilizando bombas peristálticas Masterflex, a un flujo de $1,4 \text{ ml/min}$ para lograr mantener un flujo constante de alimento (**Figura 37**). Cada 48 h se realizó un recambio de

agua del 40-60 %, momento en el que, además, se extrajo la materia orgánica sedimentada (heces y pseudoheces) a través de un sistema sifón. En caso de detectarse mortalidad de algún individuo, se procedió a retirarlo del acuario y luego se realizó un recambio total de agua.

El periodo de intoxicación se extendió durante 20 días. Para los análisis de toxinas se seleccionaron solo las réplicas control y tratamiento N° 3, 4 y 5. Al comienzo del experimento se extrajo 1 mejillón de cada réplica control para la concentración de TPM inicial. Luego, en los días 5, 10 y 20, se extrajo 1 mejillón de cada réplica con dieta tóxica para evaluar la acumulación de toxinas. En cada instancia, se determinó primeramente la tasa de aclaramiento de cada mejillón extraído, luego se registró la talla, se separó la valva y se tomó el peso húmedo de tejidos blandos. Por último, los tejidos blandos fueron mantenidos a -20°C para el posterior análisis de toxinas.



Figura 37. Sala de experimento con los acuarios distribuidos debajo de las bombas peristálticas.

Experimentos de alimentación

Tasa de aclaramiento

La tasa de aclaramiento (TA) ($\text{l h}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$) representa el volumen de agua liberado de partículas por unidad de tiempo. Se determinó usando un sistema estático, en el cual la disminución en la densidad de células de algas en el acuario experimental se monitoreó en relación con el tiempo

[367] a los 0, 5, 10 y 20 días de intoxicación. El cálculo de la tasa de aclaramiento se realizó según Coughlan [368].

De cada una de las 5 réplicas control y tratamiento se seleccionó un individuo y se limpió de toda adherencia a las valvas, incluyendo el biso que fue retirado en su totalidad utilizando tijeras. Este proceso fue realizado suavemente, en corto tiempo y en una sala a 15°C a fin de evitar la estimulación de desove. A continuación, cada individuo fue colocado en un acuario plástico correspondiente a su número de réplica, con 1,5 l de agua de mar en las mismas condiciones que las de experimentación. Se tuvo especial atención en cuanto a la aireación, de forma de evitar sobre-estimulación del individuo bajo estudio (**Figura 38**). La dieta fue suministrada manualmente utilizando pipetas graduadas, manteniendo una concentración constante de 2 mg l⁻¹ y conservando las proporciones 70% *A. catenella* y 30% *I. galbana* para la dieta tóxica y 100% *I. galbana* para la dieta control. Además, se contó con un acuario sin bivalvos, utilizado como control de la división y sedimentación celular.

Cada 30 min durante 3,5 h se tomó una muestra de ~20 ml de agua de cada acuario, utilizando una pipeta sumergida a media agua. Cada muestra fue inmediatamente medida en un contador de partículas “Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer” - Beckman Coulter, equipado con una apertura de tubo de 100 µm. Una vez registrado el valor de concentración celular, se devolvió el volumen retirado a su correspondiente contenedor experimental. Según los valores arrojados en cada medición se calculó el volumen de alimento a agregar a cada acuario a fin de mantener la concentración de 2 mg l⁻¹ constante. Al finalizar la prueba fisiológica, aquellos mejillones no utilizados en los análisis de toxinas fueron sacrificados para determinación del peso seco de los tejidos blandos.



Figura 38. Experimento de TA. Arriba a la izquierda se muestra el contador de partículas. Debajo a la derecha un mejillón durante la experimentación donde se puede notar la rápida producción de heces. Debajo a la izquierda y arriba a la derecha se observa el emplazamiento del experimento.

Eficiencia de absorción

La eficiencia de absorción (EA) se estimó determinando el contenido orgánico e inorgánico del alimento y de las heces, siguiendo el método de Conover [369]. En los días 0, 5, 10 y 20 del periodo de intoxicación se recolectaron las heces del fondo de cada uno de los acuarios (5 réplicas control y 5 con dieta tóxica) con la ayuda de una micropipeta. Cada colecta se filtró individualmente por un filtro GF/C de 25 mm de diámetro y se enjuagó con formiato de amonio isotónico para disolver sales y no sobreestimar la pesada. Cada filtro había sido previamente lavado con abundante agua destilada, secado por 24 h a 100 °C, calcinado por 3 h a 450°C y pesado. Una vez utilizado, el filtro con la muestra se sometió a la misma secuencia de secado, calcinado y pesado. La fracción orgánica e inorgánica de cada muestra se obtuvo por diferencia de pesos antes y después de la calcinación. Igual procedimiento se realizó para la dieta tóxica utilizando filtros GF/C de 47 mm de diámetro (3 réplicas). El porcentaje orgánico de la dieta control se tomó de los datos históricos de la cepa del laboratorio como $83,5 \pm 4\%$ [321].

Tasa de absorción

La tasa de absorción (T_{ab}) ($\text{mg org. h}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$) representa la cantidad de alimento ingerido por unidad de tiempo por individuo. Se estimó como el producto de la TA y la fracción orgánica del peso total de la dieta ofrecida.

Depuración de TPM en mejillón, utilizando QNO como facilitador

Finalizada la etapa de intoxicación, los mejillones se mantuvieron sin ofrecimiento de ningún tipo de alimento durante un día, para permitir la evacuación de células no asimiladas del tracto digestivo. Posterior a ello, los individuos que habían estado expuestos a la dieta tóxica, fueron redistribuidos a nuevos acuarios para comenzar la etapa de depuración. Las condiciones de temperatura, salinidad y aireación fueron iguales a las de la etapa de intoxicación, sin embargo, el volumen de cada acuario se incrementó a 8 l finales para evitar desbalances abruptos de pH. En cada uno de 3 acuarios (réplicas) se colocaron 4 individuos destinados a un tratamiento de agua enriquecida con QNO. A su vez, otros 3 acuarios (réplicas) con 3 mejillones se reservaron como control, por lo cual no recibieron ningún aditivo en el agua de mar. Durante esta etapa, los mejillones no fueron alimentados.

La solución de QNO fue suministrada de forma manual a cada réplica, utilizando una pipeta graduada. Para evitar un marcado descenso de pH, el volumen correspondiente fue dosificado en partes iguales en tres momentos diferentes del día (mañana, medio día y tarde). Paralelamente, se midió el pH antes y después de cada dosis utilizando el pHmetro Orion 5star, Thermo Scientific. Diariamente, se realizó un recambio del 100% de agua de cada acuario a fin de evitar la acumulación de QNO. El periodo de depuración se extendió por 20 días, considerando el día 0 la primera dosis de QNO (no se considera el día sin alimento entre medio de los momentos intoxicación/depuración). En los días 5, 10 y 20, se extrajo 1 mejillón de cada réplica, tanto del control como de las tratadas con QNO. Por cada mejillón se registró la talla, se separó la valva y se tomó el peso del tejido húmedo. Luego, el material húmedo fue mantenido a -20°C para el posterior análisis de toxinas.

Análisis de TPM por HPLC-FLD

Los análisis químicos se realizaron a modo de servicio técnico en el Instituto de Fomento Pesquero en Punta Arenas, Chile. El perfil tóxico de las muestras de fitoplancton y de mejillones se analizó mediante HPLC-FLD siguiendo las técnicas descritas por Franco, Fernández-Vila

[370]. El límite de detección de la técnica utilizada varió de acuerdo al análogo analizado desde 0,002 a 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

La identificación y cuantificación de TPM fue realizada en un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10ADvp, equipado con horno de columna CTO 10-10 Avp a 35°C, con detector de fluorescencia (CL-FL). Una columna Inertsil ODS-3 C18 (150 x 4,6 mm ID, 5 micras) (GL Sciences Inc., Japón) fue utilizada para confirmar la presencia de GTX, dcGTX y C en los estándares y en las muestras, mientras que una columna Licosphere 100 RP-18 (12,5 x 4 mm ID, 5 m) (Merck) se usó para la separación de STX, neoSTX y dcSTX. El primer eluyente isocrático para la separación de STX, neoSTX y dcSTX, aplicado a un flujo de 1 ml min^{-1} , consistió en 94% 1 mM de octano sulfonato de sodio (OSA) en 10 mM de ácido fosfórico (H_3PO_4) y se ajustó a pH 7,2. Se le añadió acetonitrilo hasta obtener un 6%. El segundo eluyente isocrático para separar las GTX y dcGTX, aplicado a un flujo de 0,8 ml min^{-1} , consistió en 1,5 OSA en 10 mM de H_3PO_4 y se ajustó a pH 7,0. Para separar las toxinas C, se utilizó un tercer eluyente a un flujo de 0,8 ml min^{-1} que consistió en 2 mM de tetrabutilamonio fosfato en 10 mM H_3PO_4 y se ajustó a pH 6,0. Todas las soluciones acuosas fueron ajustadas a pH con 0,5 M de hidróxido de amonio (NH_4OH). Para la reacción de oxidación y acidificación postcolumna, los reactivos fueron añadidos mediante dos bombas de la Serie I LabAlliance. La reacción de oxidación se llevó a cabo en una bobina de teflón (10 m, 0,5 mm DI) a 65°C usando 0,5 ml min^{-1} mM de ácido 7,0 periódico y 50 mM H_3PO_4 solución acuosa, la cual se ajustó a pH 9,0 con 5 M de hidróxido sódico (NaOH). El efluente se acidificó con 0,5 ml min^{-1} 0,5 M de ácido acético. Los derivados de la toxina fluorescentes se detectaron con un detector espectrofluorométrico Shimadzu RF-551, equipado con una lámpara de 150 W xenón (Ushio), una celda de flujo de 12 l, con longitud de onda de excitación de 330 nm y emisión a 390 nm (15 ± 5 nm ancho de banda) y una relación señal ruido de 3.

Los estándares fueron adquiridos en el CNRC-NRC. Las muestras fueron analizadas cuantitativamente comparando sus tiempos de retención y emisión de máxima fluorescencia con las generadas por las toxinas estándares. La adquisición de los resultados, así como su procesamiento, fueron ejecutados con el software Class VP. La toxicidad total fue calculada a partir de los resultados de HPLC-FLD mediante herramientas basadas en la equivalencia de toxicidad en ratones administradas por el laboratorio ejecutor de los análisis.

Preparación del material biológico

Los filtros con fitoplancton fueron descongelados y se les agregó 300 μl de ácido acético 0,05 M. Posteriormente, fueron macerados para el rompimiento de las células y centrifugados a 14000 rpm por 10 min. El sobrenadante recuperado se llevó a pH entre 3-4 con HCl 1 N o NaOH 0,1 N.

Una alícuota de 5 µl del sobrenadante se filtró por filtros de 0,45 µm de poro y 13 mm de diámetro y se inyectó en el HPLC-FLD.

En el caso de los mejillones, éstos fueron descongelados y homogeneizados. A una alícuota de 5 g se adicionaron 5 ml de HCl 0,1 N, se mezcló en vórtex durante 1 min, se centrifugó a 5000 rpm por 20 min y se recuperó el sobrenadante. El material sedimentado fue re-extraído con 5 ml de HCl 0,1 N, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el fitoplancton. El sobrenadante recuperado se mezcló con el anterior mediante vórtex por 1 min y se llevó a pH entre 3-4 con HCl 1 N o NaOH 0,1 N. Se inyectaron 5 µl del sobrenadante en el HPLC-FLD previa filtración de la alícuota por filtros de 0,45 µm de poro y 25 mm de diámetro.

Análisis estadísticos

Las dietas experimentales se compararon con una prueba de ANOVA de un factor. Se utilizó un ANOVA de dos vías para evaluar los efectos de la dieta y el tiempo experimental en las diferentes mediciones fisiológicas. Antes del análisis, la normalidad y la homocedasticidad de los datos se analizaron con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente. En aquellos casos en donde los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas no se cumplieron, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados de TA, EA y Tab en relación al tiempo transcurrido fueron analizados mediante el ajuste a una regresión lineal. En aquellos casos en donde existió más de una función ajustada a los datos, se evaluó la capacidad de explicación a través del criterio de corrección de Akaike corregido, descrito en la primera parte del Capítulo 1. Los resultados fueron considerados significativos de acuerdo al $\alpha < 0,05$. R Core Team (2016) se usó para los análisis estadísticos.

RESULTADOS

Fisiología de M. chilensis durante la Intoxicación.

Los datos de tallas y de peso seco se ajustaron a una función de regresión $y = 2,691x^{3,1075}$ ($R^2 = 0,93$, **Figura 39**), a partir de la cual se determinó que, para la longitud promedio de los mejillones utilizados ($5,10 \pm 0,06$ cm), corresponde un peso seco estimado de 423 mg. Sobre esa base, la dieta a entregar por individuo se fijó en 12,69 mg en microalgas (3% del peso seco).

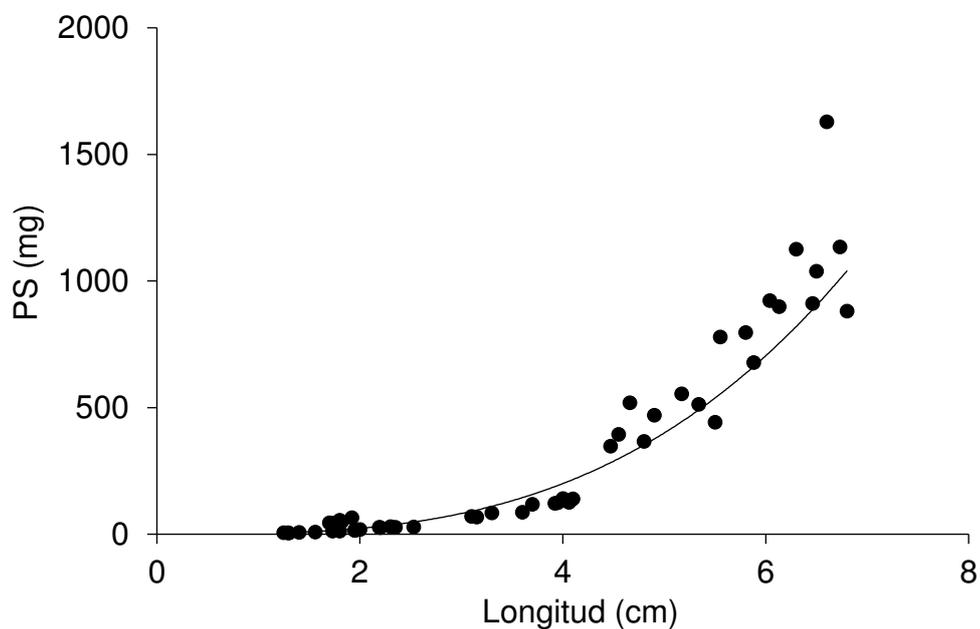


Figura 39. Curva de las tallas de mejillones usados en experimentación en relación al peso seco (PS en mg). $y = 2,691x^{3,1075}$, $R^2 = 0,93$

Durante el periodo de intoxicación, los mejillones expuestos a la dieta tóxica mostraron valvas más cerradas y manto retraído en comparación de los controles. A partir del día 16 de intoxicación, algunos individuos presentaron signos de flacidez muscular, con apertura valvar completa, pero aún con reacción ante un estímulo mecánico. A lo largo de la experiencia, debió retirarse un total de 6 individuos muertos: 5 en D18 (3 en una réplica y 1 en cada réplica restante) y otro en D20.

La tasa promedio de aclaramiento (TA) de los mejillones con dieta tóxica fue de $0,44 \pm 0,5$ l h^{-1} ind. $^{-1}$. Se observó una tendencia de incremento durante el periodo de exposición, aunque al límite

de la significancia estadística ($y = 0,03x + 0,2$, R^2 aj. = 0,16, $p = 0,046$) (**Figura 40**). Sin embargo, el aumento sí resultó significativo al considerar únicamente las células de *A. catenella* ($y = 0,09x + 0,5$, R^2 aj. = 0,41, $p = 0,001$). En cuanto a los mejillones control, la TA fue constante durante todo el experimento ($2,33 \pm 0,5$ $l\ h^{-1}\ ind.^{-1}$) y mayor que para los mejillones intoxicados (F-test = 171,3, $p < 0,001$).

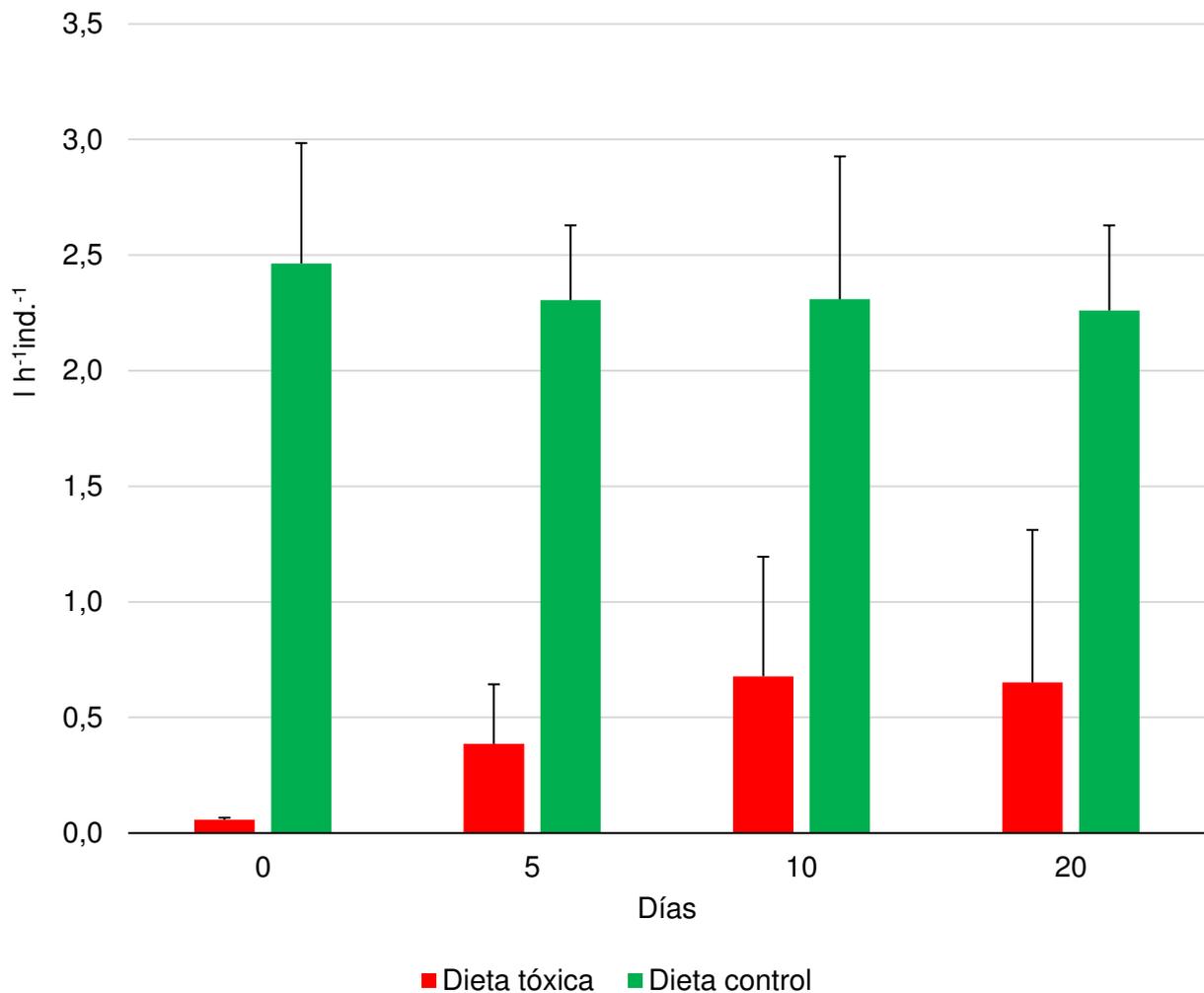


Figura 40. Tasa de aclaramiento TA ($l\ h^{-1}\ ind.^{-1}$) de los mejillones durante el periodo de intoxicación. Se muestra el promedio y desvío estándar de 5 réplicas.

La eficiencia de absorción (EA) mostró poca variación en todos los mejillones (**Figura 41**). Para los análisis estadísticos no se consideró lo medido en D5 ya que se asume un error metodológico en lo hallado para la dieta tóxica. El valor promedio de la EA de mejillones con dieta tóxica fue de $36,7 \pm 9,8\%$ y aquéllos con dieta control fue de $57,2 \pm 16,7\%$, no hallándose diferencias significativas entre los dos grupos (F-test = 1,98 $p = 0,17$). La EA de los mejillones con dieta tóxica tendió a incrementarse durante el experimento ($y = 0,97x + 26,95$ $p = 0,26$), pero sin evidenciarse una diferencia significativa entre el comienzo (D0) y el final (D20) de la intoxicación (Kruskal-Wallis $p = 0,59$). Los mejillones de la dieta control también presentaron una tendencia al incremento ($y = 1,7x + 32,5$ R^2 aj. = 0,24 $p = 0,038$) además de un máximo en D10 ($64,2 \pm 8,8\%$) sin que resulte significativamente mayor.

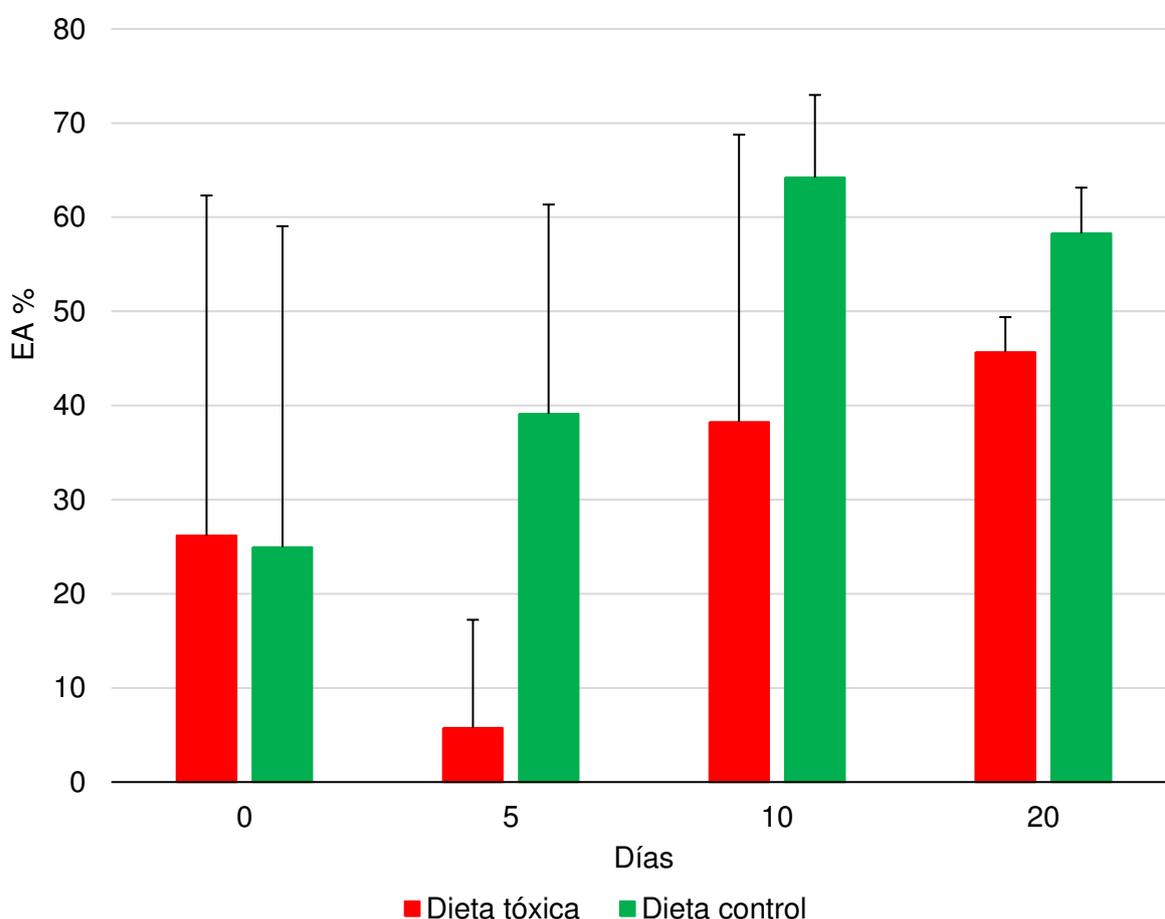


Figura 41. Eficiencia de absorción (EA %) de los mejillones durante el periodo de intoxicación. Se muestra el promedio y desvío estándar de 5 réplicas.

Se hallaron diferencias significativas en las tasas de absorción (Tab) de los grupos en general (F-test = 60,9 $p < 0,001$) (**Figura 42**). En los mejillones con dieta tóxica se observó un incremento

significativo durante el transcurso del experimento ($y = 0,031x + 0,032$ R^2 aj. = 0,5 $p = 0,0005$), siendo Tab en D20 significativamente mayor que en D0 (Kruskal-Wallis $p = 0,008$). Respecto a los mejillones con dieta control, no se observaron variaciones significativas en el transcurso del experimento observándose una media de $2,16 \pm 0,8$ mg org. h^{-1} ind. $^{-1}$.

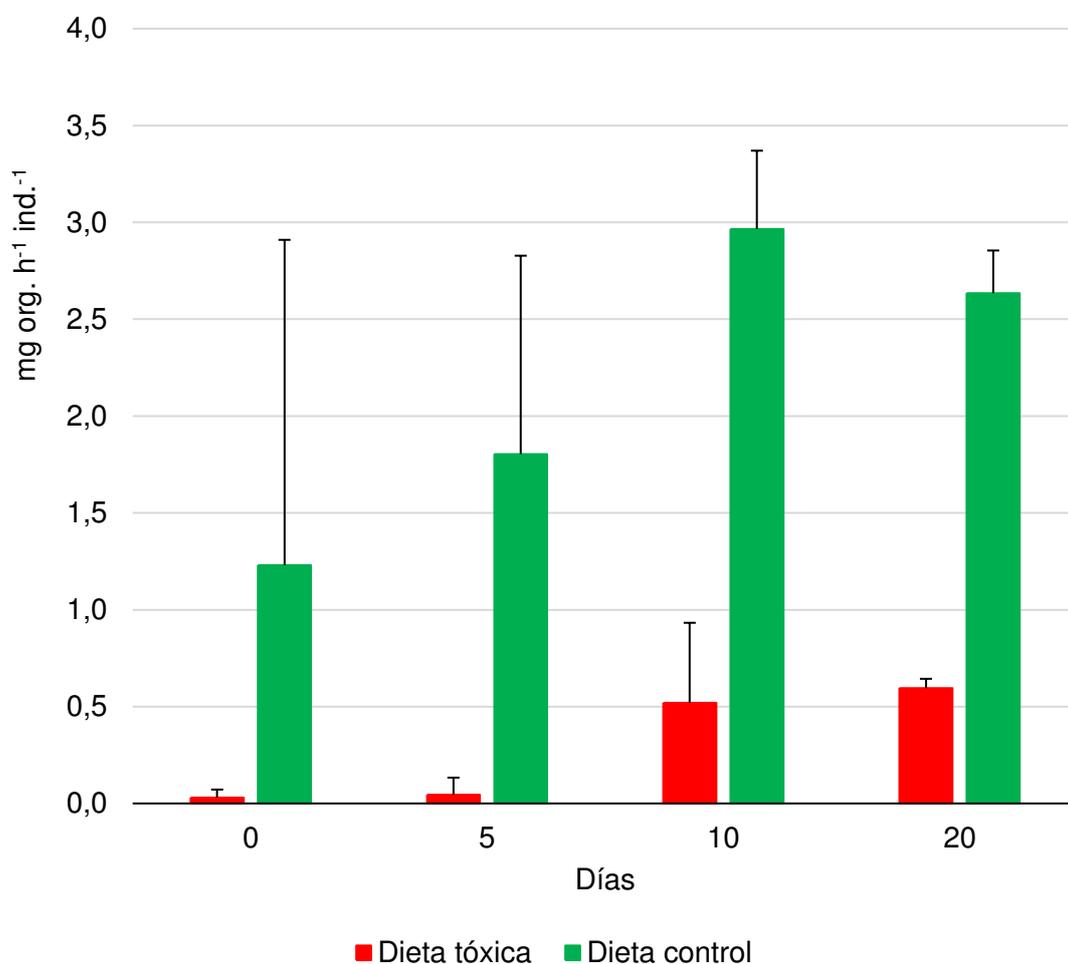


Figura 42. Tasa de absorción de la fracción orgánica de la dieta (mg org. h^{-1} ind. $^{-1}$) de los mejillones durante el periodo de intoxicación. Se muestra el promedio y desvío estándar de 5 réplicas.

Toxicidad y patrones de intoxicación y depuración de mejillones.

No se detectó toxicidad inicial en los mejillones del control. En cuanto a los mejillones bajo intoxicación, exhibieron una toxicidad superior al NS ($800 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) a partir de D5 ($4651,1 \pm 3268,8 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) alcanzándose $10505,6 \pm 4281,4 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ al día 20. Se ajustó a una función lineal ($C = 451,5t + 1673,6$, R^2 aj.= 0,55 $p = 0,008$) considerando la totalidad de los datos y a una función potencial al no considerarse el valor 0 inicial ($C = 1344,8 t^{0,7}$, R^2 aj.= 0,44 $p = 0,031$, $W_i = 0,5$) (**Figura 43**).

Durante el periodo de depuración, no se hallaron evidencias suficientes que soporten un efecto positivo del QNO en la reducción de la toxicidad de mejillones. Los datos resultantes de este tratamiento se ajustaron significativamente a una regresión lineal ($C = -311,1t + 8462,4$, $R^2 \text{ aj.} = 0,8$ $p = 0,001$), observándose una reducción significativa de la toxicidad en un 77% entre el comienzo y el final de la depuración (t-test = 3,15 $p = 0,03$) (**Figura 43**). Aquellos mejillones sin QNO ni suministro de alimento (control de depuración) no presentaron ningún patrón de depuración ni diferencias significativas en la toxicidad medida en los diferentes momentos. La toxicidad calculada al final del periodo fue superior al NS en todos los mejillones (%Rd. 72%). D41: $2965,9 \pm 1671,2 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ en el control y $2413,9 \pm 1175,6 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ en el tratamiento con QNO.

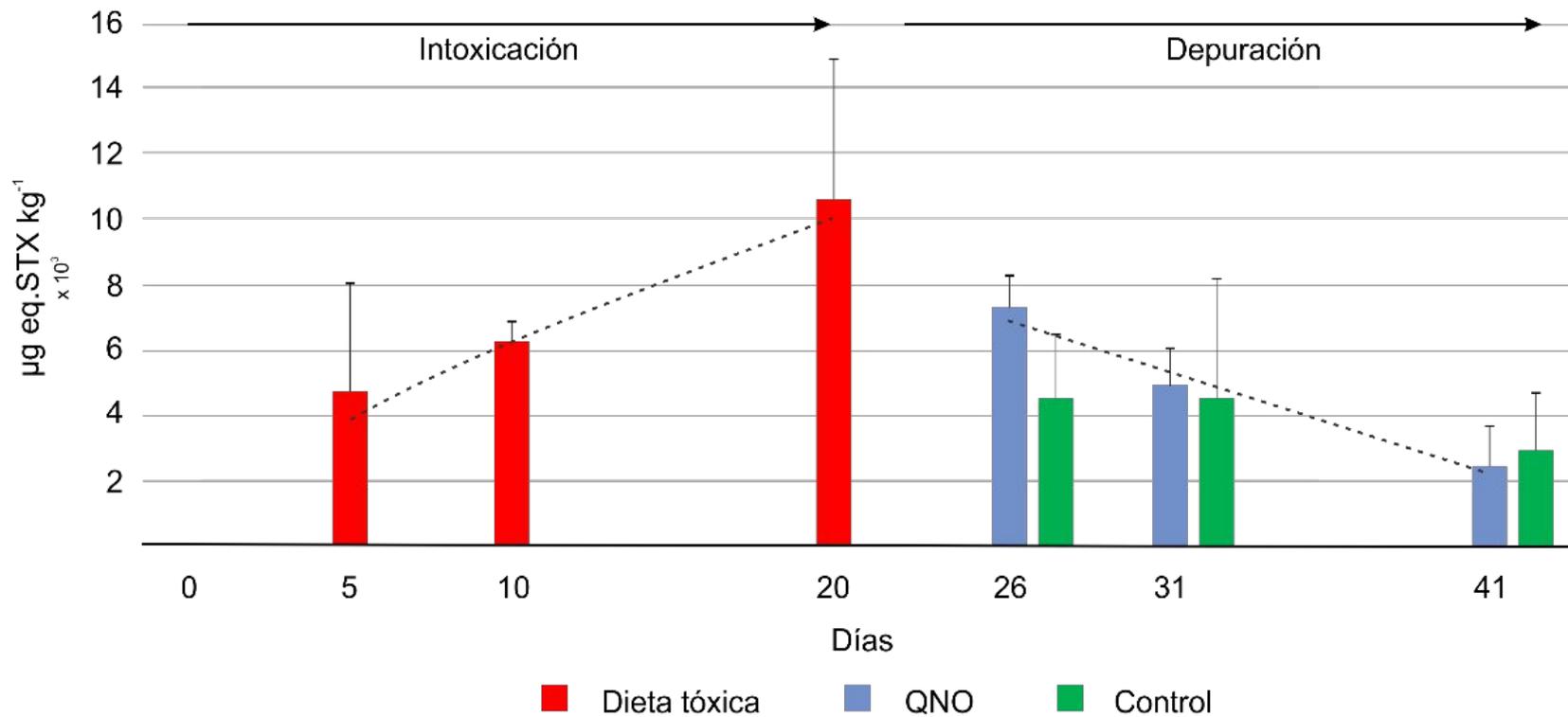


Figura 43. Toxicidad de *M. chilensis* ($\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) en relación a los días durante el periodo de intoxicación con *A. catenella* (Dieta tóxica) y depuración. La línea de puntos indica la cinética de intoxicación ($C = 1344,8 t^{0,7}$) y depuración con QNO ($C = -311,1t + 8462,4$). Se muestra el promedio y desvío estándar de 3 réplicas.

El pH de los acuarios con tratamiento de QNO varió de acuerdo a la adición del producto preparado (promedio $7,5 \pm 0,3$), registrándose los menores valores al principio del periodo de depuración. Los controles siempre mostraron un pH cercano al agua de mar de recambio (promedio $7,9 \pm 0,1$) (**Figura 44**).

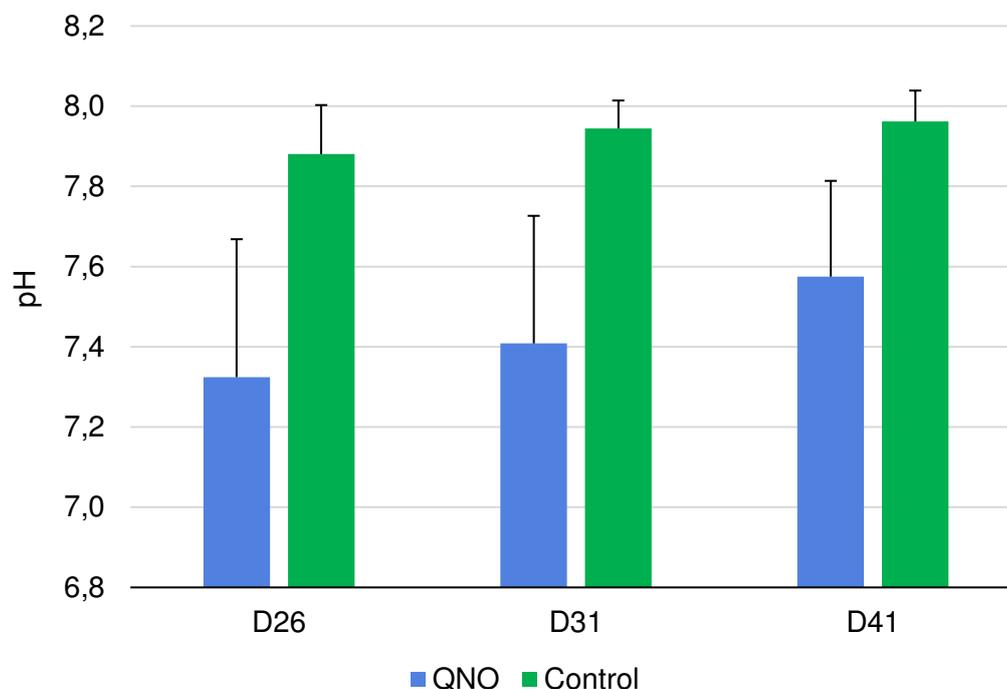


Figura 44. Variación del pH en acuarios con tratamiento de QNO y Control. Se muestra el promedio y desvío estándar de 3 réplicas.

Toxicidad, concentración y perfil de TPM en el dinoflagelado A. catenella

El perfil tóxico del dinoflagelado se caracterizó por C2 (50%), seguido de GTX 4 (21,5%), GTX 3 (13%), GTX 1 (7%), C1 (4%), GTX 5 (3,5%) y GTX 2 (1%) (**Tabla 25**). Las STX no fueron detectadas. La toxicidad calculada para la cepa fue de $9,7 \text{ fmol eq.STX célula}^{-1}$, equivalente a $2,9 \text{ pg eq.STX célula}^{-1}$ y $0,58 \text{ µg eq.STX mg}^{-1} \text{ célula}^{-1}$. Considerando el contenido de *A. catenella* de la dieta tóxica, se estima que cada mejillón recibió $5,17 \text{ µg eq.STX día}^{-1}$.

Tabla 25. Perfil tóxico de *A. catenella* cepa Coldita. Se muestra la media y el error estándar de 5 réplicas.

	fmol cél. ⁻¹	
	Media	Error
GTX 1	1,86	0,18
GTX 2	0,24	0,04
GTX 3	3,66	0,08
GTX 4	5,87	0,53
GTX 5	0,95	0,04
C 1	1,09	0,07
C 2	13,61	1,21
Total	27,28	2,04

Concentración y perfiles de TPM en mejillones durante la intoxicación y depuración

La concentración de toxinas totales siguió el mismo patrón de toxicidad descrito para *A. catenella*, pero con una diferencia más notoria entre el comienzo y el final de la depuración para el tratamiento con QNO y control (Kruskal-Wallis $p < 0,05$) (**Tabla 26**). Al finalizar el periodo de intoxicación en D20, los mejillones alcanzaron una concentración de $34,6 \pm 21,5$ nmol g⁻¹ TPM. Luego del periodo de depuración la concentración se redujo en un 69% en mejillones tratados con QNO y en un 67% en el caso de los controles. El perfil tóxico varió ampliamente durante el transcurso del experimento, no detectándose en ningún caso los análogos GTX 5, dcGTX 2, dcGTX 3 y dcSTX (**Tabla 26**).

Tabla 26. Resumen perfiles de TPM en *M. chilensis* durante la intoxicación con *A. catenella* y depuración con y sin QNO. %Rep.: porcentaje de representatividad de cada análogo, %Rd: porcentaje de reducción de concentración entre D20 y D41, D: día de experimentación.

Intoxicación										
		nmol g ⁻¹	GTX 1	GTX 2	GTX 3	GTX 4	STX	C 1	C 2	Total
D5	Media		0,50	2,68	2,28	0,80	1,09	2,84	3,79	13,98
	DE		0,86	0,11	0,44	1,38	0,96	0,83	1,3	4,9
	%Rep.		3,6	19,2	16,3	5,7	7,8	20,3	27,1	
D10	Media		1,27	2,61	2,36	2,16	1,66	2,16	4,03	16,24
	DE		0,20	0,19	0,30	0,16	0,14	0,59	1,1	2,5
	%Rep.		7,8	16,0	14,5	13,3	10,2	13,3	24,8	
D20	Media		2,63	3,60	4,30	4,98	1,70	5,82	11,58	34,61
	DE		1,63	1,08	1,90	2,81	0,27	4,80	9,1	21,5
	%Rep.		7,6	10,4	12,4	14,4	4,9	16,8	33,5	
Depuración										
D26	Control	Media	0,59	3,33	1,87	0,60	1,59	5,34	2,02	15,33
		DE	0,6	1,0	0,9	0,4	1,0	2,8	1,6	1,7
		%Rep.	3,9	21,7	12,2	3,9	10,3	34,8	13,2	
	QNO	Media	1,40	4,76	2,75	1,39	1,60	6,30	4,05	22,25
		DE	0,5	1,3	0,6	0,4	0,4	0,2	0,4	1,9
		%Rep.	6,3	21,4	12,4	6,3	7,2	28,3	18,2	
D31	Control	Media	0,99	4,31	1,96	0,93	0,30	4,25	2,01	14,76
		DE	0,9	2,1	1,0	0,8	0,3	4,7	2,2	1,6
		%Rep.	6,7	29,2	13,3	6,3	2,1	28,8	13,6	
	QNO	Media	1,14	4,78	2,07	0,88	0,53	5,65	2,57	17,62
		DE	0,5	1,2	0,7	0,2	0,2	3,2	1,5	2,0
		%Rep.	6,5	27,1	11,7	5,0	3,0	32,1	14,6	
D41	Control	Media	0,20	3,73	1,50	-	0,37	4,06	1,41	11,27
		DE	0,2	1,8	0,8	-	0,1	3,2	1,1	1,7
		%Rep.	1,8	33,1	13,3	0,0	3,3	36,0	12,5	
	QNO	Media	0,17	3,95	1,39	-	0,49	3,72	0,90	10,63
		DE	0,1	1,8	0,6	-	0,4	3,0	0,8	1,7
		%Rep.	1,6	37,2	13,1	0,0	4,6	35,0	8,5	
%Rd.	Control		92,2	-3,6	65,1	100,0	78,3	30,3	87,8	67,4
	QNO		93,5	-9,8	67,7	100,0	71,0	36,1	92,2	69,3

Durante la intoxicación los análogos se acumularon en diferente proporción marcando representatividad variable entre ellos (**Figura 45**). El análogo C2 fue mayoritario durante todo el

periodo. GTX 2&3 y C1 presentaron sus máximos de representatividad en D5 y las STX en D10, disminuyendo todos en D20. Las bioacumulaciones de los análogos GTX 3 y GTX 4 se ajustaron a regresiones lineales de función similar ($C_{GTX3} = 0,2t + 0,5$ R^2 aj.= 0,7 $p < 0,001$; $C_{GTX4} = 0,25t + 0,2$ R^2 aj.= 0,6 $p = 0,001$). Al finalizar la intoxicación el perfil estuvo caracterizado por C2 (33%), seguido por C1 (17%), GTX 4 (14%), GTX 3 (12%), GTX 2 (10%), GTX 1 (7,6%) y STX (4,9%).

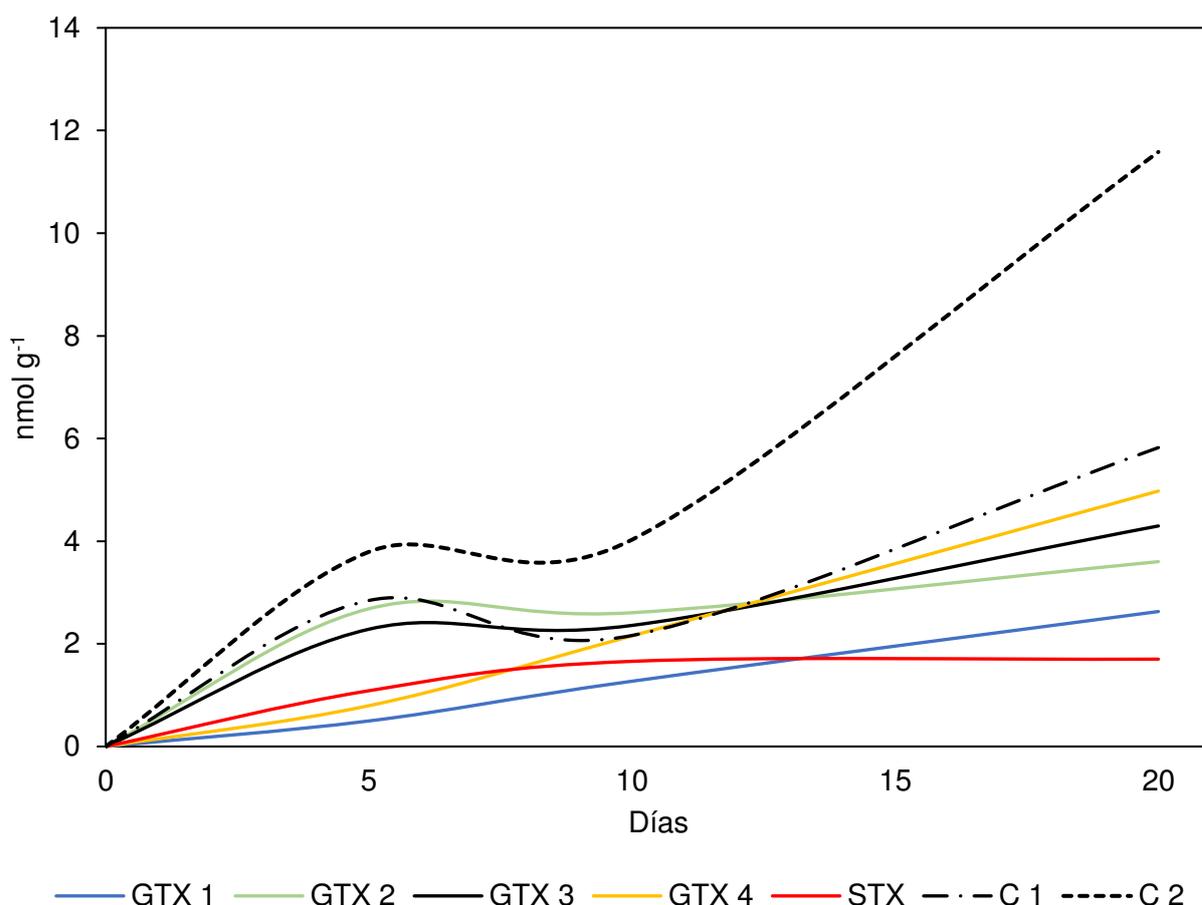


Figura 45. Perfil de TPM en mejillones durante la intoxicación. Las líneas están trazadas con los promedios de 3 réplicas de acuerdo al día de extracción.

La depuración de los análogos en los mejillones tratados con QNO presentó diferencias y similitudes respecto al control. Al finalizar el periodo, no se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones de cada análogo. En el control (**Figura 46 a**) el análogo GTX 1 mostró una disminución en D26 y un nuevo incremento en D31 para finalizar con una reducción del 92% en D41 respecto a D20 (Kruskal-Wallis $p = 0,05$). GTX 2 y C1 mostraron una concentración casi constante a partir de D31, permaneciendo en valores de ~ 4 nmol g^{-1} . En especial, GTX 2 mostró un incremento no significativo en D41 respecto a D20 (4%). GTX 3 no varió significativamente

mostrando una concentración constante de $\sim 1,8 \text{ nmol g}^{-1}$. GTX 4 mostró una disminución del 88% en D26 (Kruskal-Wallis $p = 0,05$), un incremento en D31 y una depuración del 100% al finalizar el periodo en D41. Las STX tuvieron una reducción significativa en D31 respecto a D20 (t-test= 5,56 $p= 0,05$) mostrando luego una concentración similar en D41. Por último, C2 mostró una reducción total del 87% (Kruskal-Wallis $p = 0,05$). En cuanto a los mejillones tratados con QNO (**Figura 46 b**) se encontró al finalizar el periodo de depuración que las GTX1 se redujeron en un 94% (Kruskal-Wallis $p = 0,05$). GTX 2 mostró un aumento de concentración en D26 para luego disminuir escasamente constituyendo en D41 un 10% de incremento no significativo respecto a D20. GTX 3 se redujo durante todo el periodo alcanzando en D41 un 67% de reducción no significativo respecto a D20. De la misma manera, GTX 4 alcanzó una reducción del 72% en D26 (Kruskal-Wallis $p = 0,05$) alcanzando luego el 100% de reducción en D41. La concentración de STX presentó una reducción significativa del 69% en D31 (F-test = 12,3 $p = 0,002$) y luego se mantuvo sin variaciones hasta D41 (71%Rd final). C1 no presentó variaciones significativas, tan solo con un leve incremento en su concentración en D26 respecto a D20. Por último, C2 presentó una disminución marcada del 65% en D26 y luego continuó hasta decrecer en un 92% en D41 (Kruskal-Wallis $p = 0,05$).

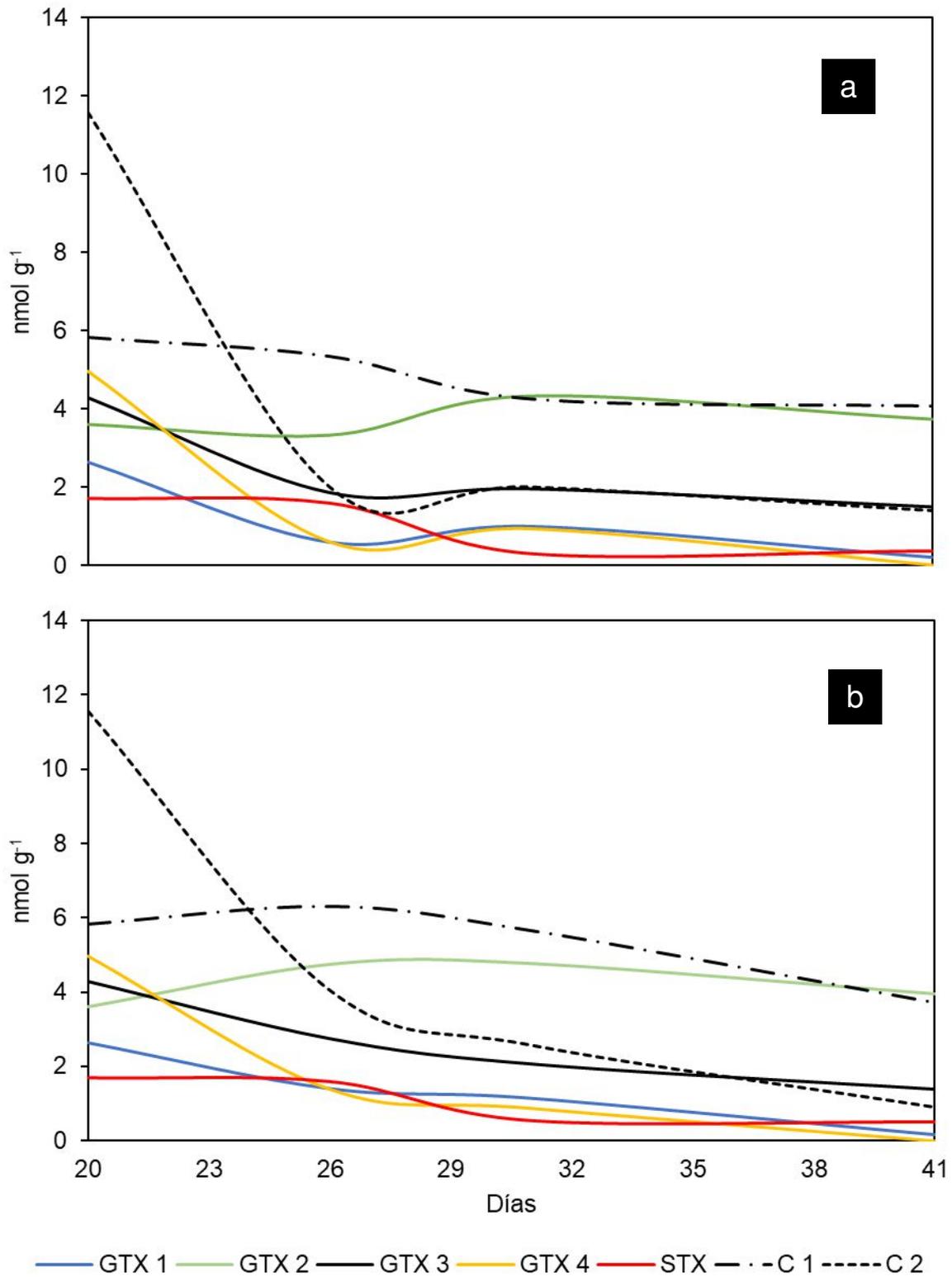


Figura 46. Perfil de TPM durante la depuración **a)** Control **b)** Tratamiento con QNO. Las líneas están trazadas de acuerdo a los promedios de 3 réplicas de acuerdo al día de extracción.

DISCUSIÓN

Fisiología de intoxicación

Durante el periodo de intoxicación, la presencia de toxinas en la dieta de los mejillones generó un efecto perjudicial perceptible, con signos visibles de parálisis como la flacidez en el músculo aductor y manto, la muerte de algunos individuos y TA y Tab menores que lo calculado para los mejillones control. Si bien TA y Tab mostraron una evolución positiva en el transcurso del experimento, no lograron aclimatarse a la dieta en el tiempo de intoxicación y dosis de exposición trabajados, como fue señalado reiteradas veces para la misma especie de bivalvo en condiciones experimentales similares [314,316,321,293,315]. La TA medida en los controles fue menor a los registros reportados previamente ($\sim 3 \text{ l h}^{-1}$ en mejillones de 5,5 cm y aproximadamente el doble de peso húmedo [316] y $\sim 4 \text{ l h}^{-1}$ [315]) y, por otro lado, los mejillones expuestos a toxinas nunca superaron la tasa de 1 l h^{-1} . Este último valor es similar al estimado al inicio de una intoxicación de mejillones [293,315] y almejas *Tagelus dombeii* recolectadas en zonas con escasa o sin FAN de *A. catenella* ($0,33 \text{ l h}^{-1} \text{ ind.}^{-1}$) [238]. La notoria reducción en TA de hasta un 81% observada en este trabajo es comparable con lo descrito para otros bivalvos como *O. chilensis* en la que se observó una reducción del 95% durante la exposición a *A. catenella* [239] y *C. gigas*, con 20% de reducción luego de 6 h de exposición a *A. tamarense* [371] e incluso inhibición completa con dietas 100% dinoflagelado tóxico [372] apud [315]. La reducción de este parámetro fisiológico puede significar una reducción de la energía disponible para el organismo que en definitiva afectaría a su desarrollo, crecimiento y reproducción [321]. Esto se vuelve particularmente importante al evaluar el efecto de los eventos de TPM en el rendimiento de los cultivos de bivalvos con susceptibilidad a los dinoflagelados tóxicos.

El indicador fisiológico EA no presentó diferencias significativas entre los mejillones con y sin exposición al dinoflagelado tóxico. Ello coincide, aunque en menor porcentaje, con lo observado anteriormente para la misma especie [316] y para *O. chilensis* [239]. Se ha reportado que *A. catenella* puede generar una disminución en la EA, como lo observado para la almeja *T. dombeii* [373].

Además de lo evaluado en el presente trabajo, la tasa de filtración de *M. chilensis* también puede verse reducida por la presencia de *A. catenella* [315]. Sin embargo, no se descarta que el tamaño de las células sea un factor influyente en la actividad de filtración y preselección de microalgas en este bivalvo [374,375]. Por otra parte, los efectos directos de parálisis observados en este trabajo no fueron descritos en ninguno de los experimentos realizados con esta especie de mejillón pero sí se ha observado un efecto en el metabolismo, crecimiento y hasta mortalidad en la ostra *O. chilensis* [239].

Frecuentemente, el género *Mytilus* ha sido descrito como poco sensible a la presencia de TPM [245] y, en particular, se ha señalado que *M. chilensis* tendría mecanismos que le permiten explotar las microalgas tóxicas como fuente de energía [314]. Este comportamiento puede asociarse con el lugar de origen de los organismos utilizados en la experimentación, pudiendo estar relacionado con una historia de baja exposición a las toxinas [252,317]. Estudios experimentales utilizando bivalvos nativos de Chile como *M. chilensis* [293] y *T. dombeii* [238,318] describen que individuos provenientes de localidades sin historias previas de eventos de TPM necesitan mayor tiempo de aclimatación a la presencia de *A. catenella* en la dieta, y presentan mayores perjuicios en su condición fisiológica. En ese sentido, las semillas utilizadas en los cultivos de Quellón Viejo (donde se obtuvieron los bivalvos para la presente experimentación), provenían de Puerto Montt, localidad no comprendida en el área de distribución de *A. catenella* y sin registros de TPM en bivalvos [340,325]. Por lo tanto, los organismos que allí se desarrollan podrían mostrar mayor susceptibilidad a la exposición de toxinas.

Toxicidad del mejillón durante la intoxicación y depuración de TPM

Los resultados de este trabajo mostraron que *M. chilensis* fue capaz de acumular toxinas por encima del NS con 5 días de exposición al dinoflagelado tóxico *A. catenella*. Estos resultados fueron acordes a lo hallado por Navarro, Contreras [316], quienes describen una toxicidad similar luego de 8 días ($6420 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) y una cinética de intoxicación afín a una función potencial del mismo orden al descrito en el presente trabajo ($C = 1589 t^{0,52}$ [316]; $C = 1344,8 t^{0,7}$). Por otra parte, y en contraposición a lo hallado aquí, los autores describen una meseta en los valores de toxicidad medidos luego de los 8 días. Además, se ha reportado que los mejillones con historial de exposición pueden no alcanzar el NS aún luego de 12 días de intoxicación con *A. catenella*, mientras que aquéllos provenientes de un sitio sin exposición frecuente de TPM llegan a una toxicidad máxima de $1100 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ al día 5 [293]. En el presente trabajo, no solo no se alcanzó un valor de saturación, sino que la toxicidad máxima alcanzada fue 10 veces mayor a la señalada para mejillones sin historial de exposición.

La toxicidad máxima alcanzada durante un experimento depende no sólo de las condiciones en las que se desarrolle, sino también de la especie de bivalvo, de la talla de los mismos y, por supuesto, de la microalga tóxica utilizada como alimento. Es así como, la capacidad de acumulación de toxinas en mejillones de menor tamaño (juveniles talla máx. 2,3 cm) en comparación a los utilizados en el presente trabajo, puede ser mayor alcanzando una toxicidad de $\sim 6000 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ luego de 5 días y hasta $16010 \mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ luego de 9 días [321]. Por otra parte, los resultados obtenidos al final del periodo de intoxicación tampoco superaron lo

obtenido para la especie de *M. edulis* alimentado 15 días con *A. tamarense* (23710 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$) [292].

Las concentraciones de *A. catenella* utilizadas durante el periodo de intoxicación fueron menores a las halladas normalmente en la naturaleza, donde se han llegado a registrar valores de hasta 779000 cél. l^{-1} [376] apud [239]. Una de las mayores floraciones de este dinoflagelado se registró en el canal de Beagle en el año 1992 [46]. En latitudes menores también se han producido eventos tóxicos con frecuencia, pero en particular aquella sucedida en el año 2002, alcanza las áreas de mayor desarrollo de los cultivos de los mitílidos en la isla de Chiloé. En ese episodio, la toxicidad de *M. chilensis* alcanzó los 295440 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ en Quellón, lo que provocó 67 intoxicados y una persona fallecida. En el año 2006, se registró un nuevo evento de menor magnitud en el sur de la isla, pero con valores que no superaron los 6000 $\mu\text{g eq.STX kg}^{-1}$ [337]. La región de la isla de Chiloé tiene numerosas especies de bivalvos comercialmente importantes, donde su extracción y consumo se ha reducido significativamente por el cierre temporal o indefinido de las áreas donde la presencia de TPM en los bivalvos se registra durante todo el año [238].

Conforme a lo esperado, el periodo de depuración fue más lento que el previo de intoxicación [321]. La mayor proporción de toxinas se redujo en los primeros 5 días de depuración (D26) encontrándose 56% Rd. en el control y 36% con QNO. Al final de la experiencia (D41), la reducción de toxinas en presencia de QNO no superó la alcanzada en el control y en ningún caso la toxicidad final fue menor que el NS. Una alta velocidad de depuración inicial, incluso sin la presencia de alimento, también fue observada para *M. galloprovincialis* intoxicado con *A. tamarense* [298]. Los autores obtuvieron una reducción del 40% en tan solo 2 días de depuración.

El tratamiento con QNO no permitió una mayor tasa de depuración como lo descrito por Xie et al. [351], quienes informan una reducción por debajo del NS en aproximadamente 5 días, partiendo de valores 3 veces superiores a los de este estudio. En cuanto a la variación de perfiles tóxicos es difícil comparar ya que se trata de especies de bivalvos y dinoflagelados diferentes. No se espera que la fluctuación del pH en este tratamiento haya afectado la respiración de los mejillones y, por tanto, la capacidad de metabolizar las toxinas [377], ya que no se observaron diferencias con los mejillones control. Ello concuerda con lo reportado por Navarro et al. [378] quienes observaron que los efectos negativos del aumento de acidez sobre la fisiología del mejillón comenzaban a manifestarse recién a partir de los 35 días, incluso con pH de 7,6. Por otra parte, estudios recientes revelan que un pH de 7,6 puede reducir la acumulación de toxinas de *M. galloprovincialis* alimentado con *Gymnodinium catenatum*, favorecer la proporción de análogos de menor toxicidad como C1&2 aumentando a su vez su tasa de depuración [379]. En los resultados hallados en el presente trabajo, la acidez no fue regular y no se observó una mayor

reducción de toxinas en D41 con QNO en comparación al control. Los resultados de intoxicación y depuración descriptos para *M. chilensis* difieren notablemente a las menores tasas descritas para *M. platensis* en los capítulos anteriores.

Toxicidad y perfil tóxico de A. catenella

La toxicidad de *A. catenella* de las costas de Chile fue medida en diferentes ocasiones pudiendo variar tanto en la cantidad de toxinas como en la toxicidad total. Existen registros de que la cepa de la localidad Coldita puede presentar hasta 2 veces más toxicidad de la medida en este trabajo ($22,5 \pm 3,4$ fmol eq.STX cél.⁻¹) [239]. Para cepas originarias de la localidad de Aysén, se estimó una toxicidad de $10,3 \pm 0,9$ fmol eq.STX cél.⁻¹ [238,293] similar a la informada en el presente trabajo pero también fue calculada en un orden 3 veces menor con $3,8 \pm 1,8$ fmol eq.STX cél.⁻¹ [321] y todavía casi 2 veces más tóxica ($4,65$ pg eq.STX cél.⁻¹ vs. $2,9$ pg eq.STX cél.⁻¹ cepas del presente trabajo) [324]. La concentración de toxinas hallada en el presente trabajo se encuentra dentro del rango enunciado para cepas de Chile (de $8,5$ a $96,9$ fmol cél.⁻¹) [380].

La toxicidad de la cepa es el resultado de la concentración de toxinas en relación a la proporción de cada análogo de TPM. El perfil es un rasgo fenotípico intrínseco de cada cepa estudiada, pudiendo mostrar una gran variabilidad entre aquéllas aisladas al sur de Chile, Aysén y la Región de Los Lagos [380]. El perfil del dinoflagelado hallado en este trabajo fue similar a datos previos para la misma especie de acuerdo a la predominancia de N-sulfocarbamoilos (especialmente C2) [324], seguido por GTX 1&4, [325,380]. A pesar de que no fueron detectados en esta oportunidad, la especie puede poseer bajo porcentaje de carbamatos Neo y STX, GTX 6 y traza C3 y C4 [325,380]. El perfil es característico de poblaciones de esta especie en el hemisferio norte del Océano Pacífico [325], coincidente además con *A. catenella* de Nueva Zelanda [326] y *A. tamarense* de Japón (predominancia C1&2 seguido GTX 1&4) [298].

El perfil de este dinoflagelado fue similar en algunos aspectos al descrito para *A. tamarense/catenella* (Ver Capítulo 2, segunda parte), dinoflagelado que actualmente se considera como la misma especie [67]. Ambas cepas mostraron una predominancia de N-sulfocarbamoilos, especialmente C2, y mayor proporción de GTX 4 entre los carbamatos. Sin embargo, las cepas de Argentina mostraron notoria presencia de neoSTX y STX y no presentaron rastros de GTX 5. Estas cualidades, sumado a una mayor concentración de TPM por célula, caracterizaron a la cepa atlántica con una toxicidad en un orden de magnitud mayor.

Concentración y perfiles de TPM del mejillón

Las N-sulfocarbamoilos predominantes en el dinoflagelado también representaron un porcentaje mayoritario en los tejidos del mejillón durante todo el experimento. C2 fue característico durante la intoxicación, mientras que C1 cobró importancia durante la depuración. Dentro de las gonyautoxinas, las GTX 2&3 fueron las más representativas en todas las muestras, también incrementando su proporción hacia el final del periodo de depuración. Este patrón, generalmente característico de los bivalvos [381] fue previamente reportado para *M. edulis* [292] y la ostra *C. gigas* [327] alimentados con *A. tamarense*. Las GTX 5 no fueron detectadas, posiblemente debido a una hidrólisis a STX [381,285], incluso como resultado del tratamiento ácido para la extracción de las TPM.

Los perfiles de los mejillones depurados tanto en el control como en el tratamiento con QNO fueron similares. En D41, los mejillones del control presentaron mayor proporción de GTX 2 que C1, situación opuesta a lo observada en presencia de QNO. Sin embargo, en ningún caso se alcanzó la significancia estadística.

La predominancia de epímeros β originaria del dinoflagelado fue metabólicamente transformada durante la depuración, dando como resultado en los mejillones de D41 un equilibrio epimérico de α/β de 1:3 en GTX 2&3 (Control: 2,48; QNO: 2,84) y C 1&2 (Control: 2,88; QNO: 4,13). El proceso de epimerización, observado principalmente entre N-sulfocarbamoilos, es descrito como una transformación común en tejidos de bivalvos [381]. La ausencia de decarbamoilos en mejillones no permitió la interpretación de una posible decarbamoilización. Según lo observado, los mejillones utilizados en este experimento no presentaron suficiente capacidad de transformación de N-sulfocarbamoilos a GTX como suele observarse en otros bivalvos [327,245], incluyendo a *M. platensis* de Argentina y *A. ater* del sur de Chile [382]. Sin embargo, esta poca capacidad de biotransformación también fue señalada por Suzuki et al. [298] para *M. galloprovincialis*, especie que acumuló mayormente las originales C 1&2 predominantes del dinoflagelado.

El perfil tóxico en *M. chilensis* descrito en el presente trabajo difiere con lo esperado para la especie, siendo que en la mayoría de las muestras alrededor del 50% de las TPM fueron N-sulfocarbamoilos. Se ha informado que los bivalvos de bancos naturales del sur de Chile presentan aproximadamente un 60% de TPM como GTX y específicamente el mejillón un 92% (mayoritariamente GTX 2) [323]. La proporción de esos análogos, explicada por una rápida transformación de C1&2, no fueron alcanzadas en los mejillones del experimento [383]. De todos modos, la presencia de C1 en mejillones es esperada, mientras que las STX [323] y GTX 5 [383] son menos frecuentes.

CONCLUSIÓN

El objetivo principal de esta parte del capítulo se basó en la búsqueda de nuevas alternativas que permitan preservar el recurso como organismo comestible durante los episodios de FAN de TPM. Los resultados obtenidos, conducen a desestimar al QNO como facilitador para la depuración de TPM en mejillones y obligan a continuar con esta línea de investigación. Aunque las condiciones experimentales no resolvieron positivamente la hipótesis, nuevos factores de depuración pueden llegar a combinarse con la adición de QNO, sobre todo teniendo en cuenta que no solo las especies, sino también la historia de exposición de las poblaciones experimentales, son condicionantes en el resultado de depuración.

En un panorama de productividad, la información obtenida a partir de las depuraciones puede proporcionar información útil sobre la duración probable del período de desintoxicación una vez que los animales se hubieran colocado en un medio ambiente libre de toxinas. Más allá de los objetivos específicos, los resultados obtenidos son de utilidad para diversas consideraciones. Las transformaciones sufridas de los análogos en los tejidos de los bivalvos durante la depuración deben considerarse como un determinante principal de la toxicidad neta. Además, pueden llegar a ser una herramienta útil como indicadores del estado de floración en cuanto a los tiempos necesarios para la reducción de las TPM [381].

Los resultados presentados en este capítulo informan sobre la susceptibilidad diferencial a las TPM de ciertas poblaciones de mejillones. Por ejemplo, la presencia de estas toxinas podría afectar el suministro de semillas desde Puerto Montt a causa de la reducción de la supervivencia y éxito reproductivo de los mejillones adultos de esa localidad. Otra consecuencia posible podría estar relacionada a la reducción del crecimiento de mejillones para consumo y comercialización en las zonas de Quellón Viejo y demás zonas de cultivo con presencia de TPM que utilicen las semillas originales de zonas no impactadas.

En particular, el aumento de frecuencia en las floraciones de *A. catenella* en el sur de Chile hacen que sea esencial continuar los estudios que ayuden a conocer las respuestas de *M. chilensis* en diferentes localidades y en una perspectiva a largo plazo. Esto es importante teniendo en cuenta no solo la relevancia ecológica del bivalvo sino también su valor comercial y de exportación basado en el alto volumen de mejillones producidos anualmente en sistema de cultivos (~ 300000 ton).

CAPÍTULO 3

Condición de bivalvos de interés comercial. Efectos del mantenimiento de bivalvos en condiciones *ex situ* sin suministro de alimento

INTRODUCCIÓN

Indicadores de condición de bivalvos

La condición de un bivalvo se define como la capacidad que tiene el organismo para resistir un estrés ambiental adverso, ya sea físico, químico o biológico. De esta forma, el estrés puede provocar una alteración medible de un estado de equilibrio fisiológico, conductual, bioquímico o citológico, inducido por el cambio ambiental que hace al individuo más vulnerable frente a un cambio posterior de diferente o igual intensidad [384]. El estado de salud o condición de los bivalvos está vinculado a una gran variedad de factores, alguno de los cuales son intrínsecos del organismo mientras que otros están relacionados con el ambiente [90]. El ciclo gonadal o el estadio reproductivo es uno de los factores intrínsecos más importantes que definen la condición de los animales, el cual sigue ciclos anuales y variaciones estacionales [385-388]. A su vez, la reproducción está estrechamente ligada a factores ambientales (por ejemplo la temperatura) que influyen en la alimentación y la capacidad de almacenamiento y utilización de sustancias de reservas [389]. Especialmente, la disponibilidad y composición del fitoplancton determinan la biomasa y composición bioquímica del bivalvo [390]. De la misma manera, los periodos de inanición también provocan cambios en la constitución del organismo, debido al metabolismo de mantenimiento basado en la utilización y consumo diferencial de los diversos tipos de reservas [92].

Se han sugerido algunos indicadores fisiológicos como herramientas útiles e indicadoras del bienestar y salud de los bivalvos. Entre ellos, los Índice de Condición (IC) basados en parámetros de fácil medición (peso húmedo, largo, volumen, etc.), han sido frecuentemente utilizados [388,391-393]. Esta clase de índices, brinda una noción general de las reservas del animal en cuanto a las proporciones, los componentes estructurales y el material gonadal [384,394]. Además, permiten distinguir un grado de salud aparente y su disminución llega a ser indicativa de la respuesta a una situación estresante [89].

De forma complementaria a los IC, el análisis de los componentes bioquímicos ha sido considerado adecuado para la estimación del estado fisiológico y metabólico [395,396,386,397]. Los carbohidratos, proteínas y lípidos son constituyentes generales de todos los organismos; sus variaciones temporales pueden estar asociadas no solo a la dieta y estrés, sino también a las peculiaridades del hábitat y a ciclos reproductivos de una población [398,396]. Estos componentes cumplen una función energética y la tasa a la que se usen dichas reservas dependerá de las demandas metabólicas del organismo [91]. Los carbohidratos constituyen la principal reserva energética pero además son elementos estructurales [399]. Por lo general, su concentración es muy susceptible a los cambios ambientales y fisiológicos del organismo, siendo su porcentaje directamente usado como indicador de condición [384]. Las proteínas cumplen funciones en reacciones enzimáticas, de transporte, de regulación metabólica, en defensa, como elementos estructurales y como sustrato energético en caso de inanición prolongada [91]. Las proteínas totales también son utilizadas como indicador de daño celular [400]. Por lo anterior, se espera que exista un patrón de variación de acuerdo a las diferentes actividades del individuo [399]. Los lípidos son elementos estructurales en todas las membranas biológicas [401], participan en el metabolismo, constituyen una fuente de nutrientes esenciales, vitaminas y mensajeros químicos [402] y, principalmente, desempeñan importantes funciones durante la gametogénesis y reproducción [403,401]. Durante este periodo constituyen reservas energéticas muy valiosas [385] por lo que sus concentraciones varían con el ciclo gonadal [404]. En especial, la determinación de la fracción lipídica ha tenido una gran importancia en la evaluación de la condición de bivalvos [405,406].

Dentro de los lípidos se encuentran los ácidos grasos (FA – por su sigla en inglés Fatty Acid) que están conformados por un monocarboxilo y una cadena hidrocarbonada de diferentes longitudes. Son clasificados según el número de dobles enlaces o insaturaciones en su molécula en: saturados (SFA – por su sigla en inglés Saturated Fatty Acid), monoinsaturados (MUFA – por su sigla en inglés MonoUnsaturated Fatty Acid) y poliinsaturados (PUFA – por su sigla en inglés PoliUnsaturated Fatty Acid) [407]. En particular, los SFA como C16:0 y C14:0 son indicadores de estrés energético, siendo que su reducción implica una reconstitución del estado nutricional [408]. Por otra parte, los PUFA y esteroides son constituyentes importantes que, además de participar de procesos bioquímicos, representan una fuente energética durante situaciones nutricionales críticas [409].

Los FA pueden dar información valiosa sobre el ambiente en el que el bivalvo se desenvuelve ya que su producción y distribución varía entre plantas y animales, y entre biomas. Por otra parte, la variación temporal de los FA está relacionada a la calidad y tipo de dieta [410,411,406] y pueden llegar a caracterizar un grupo taxonómico (a veces especie) y en gran medida el nivel trófico. Referente a ello, el concepto de marcadores tróficos se basa en la transferencia conservativa de

los patrones de FA desde la presa al consumidor, a la vez de ser reconocido en productores primarios.

En ambientes marinos, los PUFA son los FA más abundantes producidos principalmente por productores primarios (fitoplancton y macrofitas). En estos organismos, a pesar de poseer una variabilidad de perfiles de FA, se destaca la presencia predominante del ácido eicosapentaenoico (EPA C20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA C22:6n-3) [410]. Estos dos PUFA son los componentes de mayor importancia nutricional en la biomasa marina [92] y, en algunos casos, son considerados como esenciales para animales marinos que no pueden sintetizarlos *de novo* o lo hacen en muy bajo porcentaje. Es así como, al ser incorporados desde su fuente de alimentos y almacenados, ambos FA pueden ser utilizados como marcadores tróficos [402].

El perfil de FA caracteriza a los bivalvos en cuanto a la calidad energética del mismo y lo valoriza de acuerdo a su potencialidad como alimento. Se sabe que los FA, y en particular los PUFA, son necesarios para la supervivencia y crecimiento saludable de vertebrados como el humano [412]. Estos FA tienen funciones fisiológicas claves, específicamente involucradas en el desarrollo y la función neurológica, salud cardiovascular, agudeza visual, crecimiento, reproducción y también sobre el sistema inmune [413]. Algunos vertebrados pueden sintetizar PUFA, sin embargo, lo logran con muy bajo rendimiento [410] por lo que su incorporación a través de la dieta se transforma en una necesidad [414]. Es por ello que, alimentos con una rica proporción de PUFA como los moluscos marinos, pueden llegar a considerarse una opción dietaria beneficiosa [269].

Condición de bivalvos mantenidos en Sistemas de Recirculación Cerrados (SRC) sin ofrecimiento de alimento

Frecuentemente, los bivalvos deben ser estudiados de forma experimental, extrayéndolos del ambiente y siendo mantenidos de forma *ex situ* durante determinado tiempo de acuerdo a los objetivos de la investigación. De igual forma, por razones de seguridad sanitaria, los bivalvos destinados al consumo humano pueden requerir un período de depuración *ex situ* para la eliminación de contaminantes y microorganismos potencialmente tóxicos [405,400,406]. Considerando un sistema con las condiciones adecuadas de temperatura, salinidad, aireación y fotoperíodo, el tipo, calidad y cantidad de dieta ofrecida constituye el principal factor estresante durante la cautividad. Dicho estrés nutricional puede ocasionar el uso de reservas energéticas y, por consiguiente, afectar la condición general de los organismos [406].

La depuración *ex situ* de bivalvos comúnmente es realizada con ofrecimiento de alimento, lo cual suele disminuir el tiempo de eliminación de los tóxicos (discutido en el Capítulo 2, primera parte). Sin embargo, existen resultados dispares de acuerdo al tipo de contaminante o toxina y sobre

todo según la especie estudiada. Por ejemplo, se ha observado que *M. edulis* resistía a la inanición y que la presencia de alimentos no mejoraba la eliminación del ácido okadaico (OA) durante la depuración *ex situ* [415,97]. Contrariamente, Marcaillou et al. [405] describieron, para la misma especie y tipo de toxina, que la presencia de alimento no tóxico significaba un efecto positivo en la depuración.

Como se desarrolló en el Capítulo 2, primera parte, la cinética de depuración de TPM puede lograrse en ausencia de alimento, aunque a tasas menores. Este tiempo de mantenimiento *ex situ* podría llegar a afectar las reservas nutricionales de los bivalvos y afectar en definitiva su condición. Por el momento, en la literatura científica no se señala de forma clara un posible efecto de la inanición sobre bivalvos durante un proceso de depuración de las TPM.

Los efectos de la inanición en mejillones son varios y dependen principalmente de la duración de periodo. Bayne [170] describe cuatro efectos: la disminución de la tasa de consumo de oxígeno, seguida por la utilización de las reservas, una perturbación del metabolismo de las proteínas y el incremento del metabolismo anaeróbico. El resultado dependerá también del momento en el año en el que suceda la supresión del alimento. En estado no reproductivo, los bivalvos pueden alcanzar metabolismos basales rápidamente en los primeros 10 días. Sin embargo, durante el proceso de gametogénesis el consumo de reservas está dirigido a completar el desarrollo gonadal y el metabolismo es muy activo [170]. Por último, el tamaño de los individuos expuestos determina la plasticidad con la que soportarán la inanición, siendo posible que los bivalvos de mayor tamaño lleguen a tener mayor tolerancia [416].

El objetivo del presente capítulo es evaluar en la condición de los bivalvos, los efectos del mantenimiento *ex situ* sin alimentación, a través de indicadores como son los índices de condición, la composición bioquímica y los perfiles de FA. Por medio de estos últimos, además, se incluye el análisis y búsqueda de marcadores tróficos en los mejillones provenientes de bancos naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de la condición de bivalvos expuestos a un mantenimiento *ex situ* sin ofrecimiento de alimento se realizó, en primer lugar, para la vieira tehuelche *A. tehuelchus*. En segundo lugar, se evaluó la condición de los mejillones *M. platensis* que habían sido extraídos de bancos naturales y puestos a depurar las TPM en sistemas *ex situ*.

Mantenimiento de la vieira tehuelche en SRC

Considerando que en el periodo de trabajo no se registraron niveles de toxicidad detectables de TPM a través de BR, se realizó un experimento con vieiras para evaluar los posibles efectos de mantenimiento *ex situ* sin ofrecimiento de alimento. Considerando que los pectínidos son depuradores lentos, se realizaron dos experiencias de diferente duración. A finales del verano (SRC1) y a principios de otoño (SRC2) de 2015, se recolectaron en San Román aproximadamente 100 vieiras de talla comercial con una longitud de $6,9 \pm 0,5$ cm y un peso de los tejidos húmedos promedio de $24,10 \pm 0,70$ g. La recolección se realizó manualmente del fondo marino mediante buceo autónomo. Para su traslado al SAE del CCT CONICET-CENPAT, las vieiras se colocaron dentro de conservadoras plásticas refrigeradas con packs de hielo y manteniendo la humedad, asegurando de esta forma la supervivencia del 100% de los organismos. Una vez en el acuario, fueron limpiadas individualmente empleando un cepillo para retirar la máxima cantidad de organismos y materia orgánica adheridos a las valvas. A continuación, y previo enjuague con agua de mar, fueron depositadas en un SRC (**Figura 47**) con las mismas características descriptas en la Capítulo 1, segunda parte. El agua de mar empleada fue filtrada previamente hasta $1 \mu\text{m}$ y desinfectada con luz UV. Las condiciones experimentales se fijaron, de acuerdo a las condiciones ambientales del sitio de recolección, en una temperatura entre $12,5^{\circ}\text{C}$ y 13°C y salinidad 33 ups. El fotoperiodo se fijó en 12/12.



Figura 47. Vieiras mantenidas en un SRC (izquierda) y detalle de una vieira sacrificada (derecha).

La materia orgánica sedimentada (heces y pseudoheces) se aspiró del fondo diariamente a través de un sistema sifón y el agua de mar perdida durante este proceso se reemplazó inmediatamente. Durante el periodo de experimentación los individuos fueron visualmente evaluados, observando actividad de filtración y extensión del manto. En caso de detectarse vieiras muertas, éstas fueron retiradas del sistema y contabilizadas para la estimación del porcentaje de mortalidad. Los bivalvos no fueron alimentados en ninguno de los dos experimentos.

En el experimento SRC1, 5 vieiras fueron sacrificadas al inicio del periodo de experimentación (CCI) y otras 10 a los 30 días (D30). En el experimento SRC2, 11 vieiras se sacrificaron al inicio (CCI), 11 a los 60 días (D60) y 23 a los 90 días (D90). Cada individuo correspondió a una muestra individual e independiente. El total de las muestras extraídas en ambos experimentos fueron procesadas para el cálculo de diferentes índices de condición y analizadas para la determinación de la composición bioquímica.

Mantenimiento del mejillón en SRC

Por cada cinética de depuración realizada (descriptas en el [Capítulo 2, primera parte](#)), una vez finalizado el periodo de experimentación se recolectaron 3 mejillones de cada sistema (total de 9 individuos para el momento FD). Además, se tomaron 3 mejillones de bancos naturales correspondientes a CCI y 3 en CCF. Con tales muestras se calcularon diferentes índices de condición y se analizaron individualmente los componentes bioquímicos. Además, en 1 mejillón en CCI, 1 en CCF y 3 en FD se calculó la composición total de FA.

Índices de condición

Por cada individuo extraído de cada experimento, se determinó la longitud de las valvas usando un calibre digital electrónico (resolución 0,01 mm y precisión $\pm 0,02$ mm). Se tomó el peso húmedo total y se procedió a la separación de tejidos blandos, los cuales se pesaron en húmedo y luego, al igual que las valvas, se secaron en estufa a 60 °C. Una vez alcanzado un peso constante (aproximadamente 24 h), las muestras se dejaron enfriar y se registraron sus pesos secos. Con los datos obtenidos se calcularon ocho índices de condición (C-N°) de acuerdo con las siguientes fórmulas [417]:

IC-I: PS tejido blando (g) / PS valvas (g) * 100

IC-II: PH tejido blando (g) / PS valvas (g) * 100

IC-III: PH tejido blando (g) / PH total del bivalvo (g) * 100

IC-IV: PH tejido blando (g) / longitud de las valvas (mm) * 100

IC-V: PS tejido blando (g) / longitud de las valvas (mm) * 100

IC-VI: PS tejido blando (g) / PS total del animal (g) * 100

IC-VII: PS tejido blando (g) / PH tejido blando (g) * 100

IC-VIII: PS tejido blando (g) / longitud de la valva (cm) ³ * 100

Composición bioquímica y análisis de ácidos grasos

La concentración de cada componente bioquímico se determinó en cada individuo extraído en los correspondientes experimentos. Antes del procedimiento analítico, cada muestra previamente secada a 60°C, se molió en mortero de porcelana hasta obtener un polvo homogéneo. Los carbohidratos totales se analizaron siguiendo el método de Dubois et al. [418] con glucógeno como estándar; las proteínas se determinaron por Lowry et al. [419] usando albúmina bovina como estándar; y los lípidos totales se estimaron usando el método colorimétrico de Zöllner, Kirsch [420] utilizando colesterol como estándar. Además, el contenido total de cenizas se determinó por calcinación a 550 °C por 6 horas. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de peso seco de los tejidos.

Los FA se determinaron por individuo siguiendo el método de cromatografía gas-líquido, desarrollado por Lepage, Roy [421], utilizando cloruro de acetilo/metanol como reactivo. Estos análisis fueron realizados como un servicio a terceros brindado por el Laboratorio de Química Orgánica y Cromatografía del CCT CONICET-CENPAT. Los resultados de FA totales se

expresaron como $\mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$, mientras que los perfiles correspondientes se presentaron como abundancia individual relativa del total de FA (%). Los FA se agruparon en SFA, MUFA y PUFA y en estos últimos se calculó el total de omega-3 y omega-6 (PUFA con insaturaciones en el carbono 3 y 6, respectivamente). Además, se estimaron los índices C16:1(n-7c)/C16:0 [402] y C22:6(n-3)/C20:5(n-3) (o DHA/EPA) [422] como indicadores del tipo de dieta de los mejillones.

Análisis estadísticos

Las comparaciones entre conjuntos de datos relativos a la composición bioquímica e índices condición, se realizaron utilizando análisis unidireccional de varianza (ANOVA) t-test o F-test seguido de una prueba post hoc de Tukey. En aquellos casos en donde los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas no se cumplieron, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

Mantenimiento de la vieira tehuelche en SRC

En las experiencias realizadas, las vieiras se observaron activas, con el manto y tentáculos extendidos. Durante el experimento SRC1 no se registraron individuos muertos mientras que en SRC2 se calculó una mortalidad aproximada del 9% no siendo asociada con el tiempo de experimentación (muertes aleatorias en el tiempo). Este aspecto no modificó el desarrollo del ensayo ya que el total de individuos excedía ampliamente la cantidad necesaria para los análisis químicos.

A través del uso de los IC se hallaron diferencias significativas entre los individuos con diferentes tiempos de cautividad sin alimento (**Tabla 27**). Por un lado, en el experimento SRC1 los índices IC-II, IC-III y IC-IV señalaron una disminución significativa en la condición de vieiras de D30 respecto a las de CCI, mientras que lo contrario ocurrió en IC-VII. En SRC2, en todos los IC se evidenció una disminución respecto del momento inicial. Además, los IC-I y IC-VI mostraron un descenso significativo en D90 respecto de D60.

El efecto de la inanición no se vio reflejado en la composición bioquímica de las vieiras en D30 de mantenimiento *ex situ* en SRC1. Sin embargo, en SRC2 luego en D60 los cambios en los componentes bioquímicos comenzaron a ser notorios (**Tabla 28**). Las proteínas se incrementaron significativamente en D60 y luego disminuyeron significativamente en D90. Por otra parte, los carbohidratos disminuyeron en D60 y D90 respecto de CCI. Los lípidos se redujeron significativamente solo en las vieiras de D90. Por el contrario, las cenizas mostraron un porcentaje significativamente mayor solo en las muestras de D90.

Tabla 27. Índices de Condición (IC-I al IC-VIII) para las vieras extraídas durante los experimentos SRC1 y SRC2. Se muestra la media y el desvío estándar (DE) de cada conjunto de datos. Los valores de tabla son adimensionales. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de medias.

		SRC1			SRC2				
		CCI	D30		CCI	D60	D90		
IC-I	Media	14,72	12,52	t 1,72	16,11 ^a	11,22 ^b	9,16 ^c	F	67,517
	DE	1,72	2,55	<i>p</i> 0,11	1,69	1,73	1,56	<i>p</i>	< 0,001
IC-II	Media	96,96 ^a	72,36 ^b	t 4,02	109,30 ^a	82,78 ^b	78,84 ^b	F	22,923
	DE	6,27	12,77	<i>p</i> < 0,001	12,12	10,32	13,58	<i>p</i>	< 0,001
IC-III	Media	49,18 ^a	41,69 ^b	t 3,60	52,08 ^a	45,13 ^b	43,80 ^b	F	21,849
	DE	1,66	4,43	<i>p</i> < 0,001	2,61	3,07	3,95	<i>p</i>	< 0,001
IC-IV	Media	28,45 ^a	22,77 ^b	t 3,12	36,88 ^a	26,69 ^b	27,83 ^b	F	14,968
	DE	3,76	3,12	<i>p</i> 0,01	5,24	2,14	5,75	<i>p</i>	< 0,001
IC-V	Media	4,33	3,92	t 1,13	5,43 ^a	3,60 ^b	3,24 ^b	F	47,359
	DE	0,83	0,57	<i>p</i> 0,28	0,66	0,23	0,72	<i>p</i>	< 0,001
IC-VI	Media	12,81	11,09	t 1,71	13,86 ^a	10,06 ^b	8,37 ^c	F	65,478
	DE	1,31	2,04	<i>p</i> 0,11	1,25	1,37	1,30	<i>p</i>	< 0,001
IC-VII	Media	15,14 ^a	17,28 ^b	t 2,69	14,84 ^a	13,55 ^a	11,72 ^b	F	17,67
	DE	1,00	1,61	<i>p</i> 0,02	1,66	1,08	1,56	<i>p</i>	< 0,001
IC-VIII	Media	14,45	13,07	t 1,14	18,09 ^a	12,00 ^b	10,79 ^b	F	47,578
	DE	2,77	1,91	<i>p</i> 0,28	2,20	0,76	2,39	<i>p</i>	< 0,001

CCI: Control de Campo Inicial y D30, D60, D90: Días 30, 60 y 90, respectivamente.

Tabla 28. Composición bioquímica expresada en porcentaje de peso seco para las vietas extraídas durante los experimentos SRC1 y SRC2. Se muestra la media y el desvío estándar (DE) del conjunto de datos de los momentos. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de medias.

		SRC1			SRC2			
		CCI	D30		CCI	D60	D90	
Carbohidratos	Media	2,38	2,45	t 0,16	8,80 ^a	5,25 ^b	4,12 ^b	Kruskal-Wallis
	DE	0,86	0,82	p 0,814	3,24	2,15	1,55	p < 0,001
Proteínas	Media	29,83	32,16	t 1,06	30,95 ^a	36,17 ^b	27,02 ^c	F 22,193
	DE	5,19	3,35	p 0,31	4,31	3,13	3,78	p < 0,001
Lípidos	Media	17,00	18,73	t 1,32	16,72 ^a	13,94 ^a	8,83 ^b	F 35,661
	DE	3,08	2,03	p 0,211	2,47	2,88	2,70	p < 0,001
Cenizas	Media	14,85	12,90	t 2,19	15,15 ^a	16,77 ^a	20,57 ^b	F 36,535
	DE	1,11	1,80	p 0,05	1,40	1,28	2,23	p < 0,001

CCI: Control de Campo Inicial y D30, D60, D90: Días 30, 60 y 90, respectivamente.

Mantenimiento del mejillón en SRC

Durante el desarrollo de las depuraciones Dex1, Dex2 y Dex3, los mejillones exhibieron signos de buen estado de salud tales como valvas abiertas normalmente y manto extendido. La mortalidad observada en los tres experimentos fue baja con un promedio de 1,2%, no significando un riesgo para el desarrollo de los análisis planteados.

Para las depuraciones Dex1 y Dex2, ninguno de los IC mostró diferencias significativas. En el caso de Dex3, los índices IC-I y IC-IV a IC-VIII mostraron diferencias entre la condición de los mejillones de CCF con los de FD y/o CCI (**Tabla 29**). Sin embargo, los resultados de IC no mostraron diferencias relacionadas a un posible efecto del periodo de cautividad sin alimento sobre la condición de los mejillones; es decir, para ninguno de los IC se vio una reducción significativa en FD respecto de CCI.

Tabla 29. Índices de Condición (IC: IC-I al VIII) de los mejillones correspondientes a las depuraciones *ex situ* Dex1, Dex2 y Dex3. Se muestra la media y su desvío estándar (DE) del conjunto de datos. Los valores de tabla son adimensionales. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de medias.

		Dex1 (29 días)				Dex2 (48 días)				Dex3 (30 días)			
		CCI	FD	CCF		CCI	FD	CCF		CCI	FD	CCF	
IC-I	Media	12,15	10,72	11,58	F 1,099	11,17	8,73	8,24	F 1,487	11,83 ^{a,b}	8,91 ^b	13,14 ^a	F 6,793
	DE	1,20	1,77	0,59	<i>p</i> 0,364	2,95	2,06	2,67	<i>p</i> 0,265	2,18	1,34	3,09	<i>p</i> 0,011
IC-II	Media	63,89	64,15	64,75	F 0,011	62,50	54,48	53,74	F 1,256	96,56	76,56	79,52	F 3,158
	DE	9,27	7,85	1,70	<i>p</i> 0,989	9,68	7,51	8,35	<i>p</i> 0,32	6,32	13,04	12,04	<i>p</i> 0,079
IC-III	Media	38,85	38,96	39,30	F 0,022	38,31	35,13	34,83	F 1,158	49,09	43,07	44,13	F 2,607
	DE	3,45	2,94	0,62	<i>p</i> 0,978	3,70	3,21	3,43	<i>p</i> 0,347	1,63	4,43	3,62	<i>p</i> 0,115
IC-IV	Media	8,63	11,11	12,68	F 3,398	11,37	12,29	11,20	F 0,286	11,86 ^a	9,08 ^a	4,15 ^b	F 11,98
	DE	0,78	2,24	1,31	<i>p</i> 0,068	1,81	2,54	3,00	<i>p</i> 0,756	1,43	2,31	0,15	<i>p</i> 0,001
IC-V	Media	1,64	1,87	2,28	F 1,613	1,99	1,99	1,74	F 0,201	1,48 ^a	1,07 ^{a,b}	0,68 ^b	F 4,68
	DE	0,06	0,51	0,37	<i>p</i> 0,24	0,13	0,63	0,76	<i>p</i> 0,821	0,49	0,31	0,08	<i>p</i> 0,031
IC-VI	Media	10,83	9,66	10,38	F 1,098	10,01	8,00	7,58	F 1,453	10,55 ^{a,b}	8,17 ^b	11,57 ^a	F 6,922
	DE	0,95	1,46	0,47	<i>p</i> 0,365	2,37	1,75	2,25	<i>p</i> 0,276	1,72	1,13	2,39	<i>p</i> 0,01
IC-VII	Media	19,14	16,67	17,90	F 3,22	17,70	15,92	15,10	F 0,931	12,37 ^b	11,72 ^b	16,40 ^a	F 9,912
	DE	1,68	1,57	1,02	<i>p</i> 0,076	2,08	2,48	2,52	<i>p</i> 0,421	3,04	1,00	1,34	<i>p</i> 0,003
IC-VIII	Media	5,48	6,24	7,59	F 1,613	6,63	6,62	5,80	F 0,201	4,95 ^a	3,56 ^{a,b}	2,27 ^b	F 4,677
	DE	0,21	1,70	1,23	<i>p</i> 0,24	0,44	2,09	2,55	<i>p</i> 0,821	1,62	1,03	0,26	<i>p</i> 0,031

CCI: Control de Campo Inicial; FD: Fin de la Depuración y CCF: Control de Campo al Final de la Depuración.

En cuanto a los componentes bioquímicos en los mejillones (**Tabla 30**), se observaron variaciones significativas en Dex1 y Dex3, no hallándose ninguna en Dex2. En ninguna de las depuraciones *ex situ* se hallaron disminuciones significativas entre CCI y FD. Luego de 29 días de depuración *ex situ* sin alimento, en Dex1 se observó un aumento significativo de las proteínas y lípidos en mejillones, no diferenciándose significativamente con lo hallado en mejillones de bancos naturales de CCF. A su vez, se observó que la proporción de cenizas de muestras de CCF bajó significativamente respecto de CCI, pero no de FD. Considerando Dex3, se halló una concentración significativamente mayor de carbohidratos en mejillones del CCF respecto de CCI y FD. En cuanto a la proporción de proteínas, en mejillones de CCF fue significativamente menor a la estimada en CCI. Los mejillones de FD no mostraron diferencias significativas en este componente respecto a ambos controles. El porcentaje de cenizas no difirió entre CCI y FD, mientras que en CCF mostró un valor significativamente menor.

Tabla 30. Composición bioquímica expresada en porcentaje de peso seco de los mejillones correspondientes a las depuraciones *ex situ* Dex1, Dex2 y Dex3. Se muestra la media del conjunto de datos y su desvío estándar (DE). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de medias.

		Dex1 (29 días)					Dex2 (48 días)					Dex3 (30 días)				
		CCI	FD	CCF	F		CCI	FD	CCF	F		CCI	FD	CCF	F	
Carbohidratos	Media	13,15	14,24	20,19	F	1,19	13,57	15,75	15,51	F	0,17	8,29 ^a	5,59 ^a	14,11 ^b	F	11,80
	DE	9,90	5,88	2,08	<i>p</i>	0,337	3,98	5,42	7,58	<i>p</i>	0,844	2,69	1,93	4,43	<i>p</i>	0,001
Proteínas	Media	27,50 ^a	41,31 ^b	42,47 ^b	F	41,356	38,90	41,36	41,23	F	0,363	33,87 ^a	29,40 ^{a,b}	24,75 ^b	F	3,975
	DE	1,05	2,08	4,06	<i>p</i>	< 0,001	3,98	4,97	1,52	<i>p</i>	0,703	6,14	3,21	3,91	<i>p</i>	0,047
Lípidos	Media	16,21 ^a	21,14 ^b	20,59 ^{a,b}	F	5,056	20,07	19,83	18,08	F	0,633	12,04	13,43	14,51	F	0,895
	DE	1,73	2,41	2,64	<i>p</i>	0,026	2,52	2,64	1,82	<i>p</i>	0,548	1,95	2,21	2,80	<i>p</i>	0,434
Cenizas	Media	16,72 ^a	12,99 ^{a,b}	9,37 ^b	F	6,481	14,00	11,68	13,89	F	0,642	31,29 ^a	29,34 ^a	19,28 ^b	F	5,333
	DE	1,67	2,92	0,83	<i>p</i>	0,012	4,50	3,96	2,02	<i>p</i>	0,543	9,17	3,82	3,55	<i>p</i>	0,022

CCI: Control de Campo Inicial; FD: Fin de la Depuración y CCF: Control de Campo al Final de la Depuración.

Los resultados de los FA se muestran en la **Tabla 31**. Las menores concentraciones de FA totales en Dex1 se encontraron en CCI, mientras que en Dex2 y Dex3 se hallaron en los mejillones expuestos a depuración (FD). La mayor concentración de FA totales fue medida en CCF de Dex1 ($16597,48 \mu\text{g g}^{-1}$) y Dex3 ($14400,16 \mu\text{g g}^{-1}$).

Se lograron identificar 32 FA, cuyos perfiles completos se muestran en el **Anexo N°1 Tabla 32, 33 y 34**. Los perfiles fueron cualitativamente similares en todos los mejillones, incluyendo aquéllos que habían sido expuestos a un proceso de depuración. Considerando la abundancia relativa sobre el total, las proporciones de SFA y MUFA fueron similares en todos los casos (entre 16 y el 23%), mientras que los PUFA fueron siempre los más abundantes (55,86% - 67,57%). Particularmente entre los SFA, el C16:0 fue el más abundante en todos los casos. En Dex1, la menor concentración de este FA fue observada en CCI mientras que en Dex2 y Dex3 fue medida en FD. La representatividad, sin embargo, fue menor en CCF para Dex1 y Dex2, y menor en CCI para Dex3. En orden decreciente de representatividad se detectaron los SFA 18:0, 14:0 y 17:0 (entre 5,0 y 1,4%). Dentro de los MUFA el FA más abundante fue C20:1(n-9)cis, seguido por C16:1(n-7)cis. Este orden se vio invertido para las muestras de FD correspondientes a Dex1. En todos los casos, la proporción C16:1(n-7c)/C16:0 fue menor a 1. Sumado a lo anterior, C18:1(n-9)cis y su isomero C18:1(n-9)trans fueron los terceros en porcentaje de representatividad. Por otra parte, C15:1(n-5) se presentó mayormente en menores proporciones, constituyendo en algunos casos menos del 0,001%. Diferente a lo anterior, en las muestras CCI de Dex3, el MUFA de menor representatividad fue C17:1(n-7). En cuanto a los PUFA, los que se encontraron en mayor proporción en todas las muestras fueron C22:6(n-3) (DHA) y C20:5(n-3) (EPA). Sus proporciones relativas fueron ~1% en Dex1, ~1,5% en Dex2 y 0,6 a 0,8% en Dex3. También se detectaron otros PUFA de importancia tales como C20:4(n-6) y (C18:3(n-6)) y su precursor C18:2(n-6)cis.

Tabla 31. Resumen de ácidos grasos (FA) para los mejillones de las depuraciones *ex situ* Dex1, Dex2 y Dex3. SFA: FA saturados; MUFA: FA monoinsaturados; PUFA: FA poliinsaturados. C22:6(n-3) / C20:5(n-3) = DHA / EPA.

		Total FA µg g⁻¹	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	Σ omega-3 µg g ⁻¹ (%)	Σ omega-6 µg g ⁻¹ (%)	C16:1(n-7c) /C16:0	C22:6(n-3) /C20:5(n-3)
Dex1CCI		9222,76	20,73	19,63	59,64	4006,50 (43,4)	1331,46 (14,4)	0,61	0,92
Dex1FD	Media DE	13774,74 2282,80	16,91	18,19	64,90	7332,47 (53,2)	1523,78 (11,1)	0,73	1,04
Dex1CCF		16597,48	16,10	17,15	66,74	9267,72 (55,8)	1672,26 (10,1)	0,64	1,34
Dex2CCI		14924,53	16,71	17,38	65,91	8019,83 (53,7)	1634,48 (10,9)	0,60	1,54
Dex2FD	Media DE	11515,82 1784,75	15,93	17,32	66,75	5867,94 (50,9)	1585,49 (13,8)	0,55	1,48
Dex2CCF		14776,05	16,28	16,15	67,57	7085,14 (47,9)	2580,27 (17,5)	0,48	1,55
Dex3CCI		12175,52	19,26	18,96	61,78	5567,99 (45,7)	1727,53 (14,2)	0,61	0,88
Dex3FD	Media DE	8301,45 1518,31	23,78	16,64	59,58	3214,86 (38,7)	1489,36 (17,9)	0,30	0,82
Dex3CCF		14400,16	22,06	22,07	55,86	6177,14 (42,9)	1632,18 (11,3)	0,60	0,62

CCI: Control de Campo Inicial; FD: Fin de la Depuración y CCF: Control de Campo al Final de la Depuración.

DISCUSIÓN

Condición de las vieiras

Las vieiras sobrevivieron a la inanición prolongada en los experimentos SRC1 y SRC2 por 30 y 90 días, respectivamente. Sin embargo, según los registros de IC y de concentración de los componentes bioquímicos, habría existido un desmejoramiento en su condición. Estos aspectos también fueron observados para otros pectínidos como *Chlamys ferrerii*, los que evidenciaron disminución de su biomasa y condición general [423].

Los IC resultaron buenos parámetros para detectar el efecto de la inanición. Durante el experimento SRC1, la disminución de los IC-II, IC-III y IC-IV en D30 indicaron una reducción en los tejidos blandos de las vieiras. En particular, se observó que IC-VII (PS tejidos blandos/PH tejidos blandos) fue significativamente mayor en D30 respecto a CCI. La relación puede ser resultante de una disminución de la retención de agua en los tejidos del bivalvo o un incremento en el tejido seco. Marcaillou et al. [405] ha sugerido que la variación en el peso seco puede ser consecuencia de la materia orgánica del agua que no pudo retirarse correctamente durante la manipulación de las muestras. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que los bivalvos poseen gran porcentaje de agua en sus tejidos y, por lo tanto, las medidas basadas en PH suelen presentar gran variabilidad [424].

La composición bioquímica de los bivalvos está relacionada con la calidad y cantidad de alimento en el ambiente [425]. En las vieiras tehuelches recolectadas a campo, dicha composición coincidió con la obtenida por de Vido de Mattio [90]. La proporción de ninguno de los componentes resultó alterada en SRC1 luego de 30 días de inanición, mientras que luego de 60 días los efectos fueron detectables. En concordancia con lo descrito por Pleissner et al. [92] en *M. edulis*, los carbohidratos fueron los primeros en ser consumidos, disminuyendo significativamente en D60 (SRC2). El aumento de proteínas en una primera etapa de inanición y la posterior disminución significativa, fue igualmente descrito por Hong-Sheng et al. [423] para la vieira *C. ferrerii* y por Yan et al. [416] para la almeja *Ruditapes philippinarum*. Estos autores sugieren que el incremento inicial es debido al consumo de lípidos; que una vez agotados, el bivalvo comienza a consumir sus proteínas. Complementario a ello, las vieiras también exhibieron una notoria pérdida de los lípidos luego de 90 días, señal clara del déficit prolongado [387]. Por último, el incremento del porcentaje de cenizas observado en las vieiras sería consecuencia del consumo de las reservas energéticas, lo cual coincide con lo informado para la almeja *Donax vittatus* por Ansell, Sivadas [91].

Los efectos de la inanición sobre los bivalvos también varían de acuerdo al periodo reproductivo en el que se encuentren. de Vido de Mattio [90] describe en la vieira tehuelche del Golfo San José fluctuaciones anuales de los componentes bioquímicos señalando que las reservas de glucógeno y lípidos aumentan desde valores bajos en invierno hasta máximos en primavera, siendo utilizados en el crecimiento y desarrollo gonadal; estas reservas disminuyen durante el período de desove recuperándose al finalizar el mismo. En el presente estudio, las vieiras fueron recolectadas a finales del verano y principio de otoño por lo que su susceptibilidad a la inanición posiblemente se vio condicionada por el segundo desove en el que se encontrarían. Sin embargo, estudios histológicos deberán ser incluidos en futuras investigaciones para describir la correlación de este factor y el efecto de la inanición.

Condición de los mejillones

En las diferentes experiencias de depuración de TPM, los mejillones mostraron ser menos afectados por el periodo de inanición en comparación a lo acontecido con las vieiras. A partir de la información brindada por los diferentes indicadores, no se pudo apreciar en el mejillón un efecto cuantificable producto del proceso de experimentación, incluso en aquellos organismos de Dex2 mantenidos durante casi dos meses.

En primer lugar, los diferentes IC no mostraron disminuciones significativas entre los mejillones de campo iniciales y aquellos expuestos a depuración *ex situ* (entre CCI y FD). Por otra parte, las diferencias significativas observadas en Dex3 fueron sólo entre los controles, lo cual estaría relacionado a cambios en el ambiente. Los valores obtenidos para IC-V coincidieron con los descriptos por Colombo [398] para la misma especie proveniente de un sitio de colecta cercano a los presentados en este estudio.

Como segundo indicador, el análisis de la composición bioquímica permitió detectar algunas diferencias no relacionadas con el efecto del experimento. A pesar de ello, en todas las muestras las concentraciones de carbohidratos, proteínas, lípidos y cenizas se encontraron en el rango de lo esperado para diversas especies de mejillones [426,398,425,427,408,397].

El aumento de proteínas y lípidos en FD respecto de CCI en Dex1 puede ser atribuible a la variabilidad intrínseca de la población y no al efecto de la depuración *ex situ* y ayuno. Se ha reportado gran variabilidad en *Mytilus* sp. incluso en la misma población expuesta a condiciones idénticas [396].

En los mejillones de Dex3 las diferencias encontradas se vincularon especialmente con el control final a campo. El menor porcentaje de proteínas en los bivalvos de CCF (extraídos a finales de la primavera) puede estar relacionado con finalización del periodo de desove y consumo de

reservas. Por otro lado, el aumento de los carbohidratos en estos mejillones podría estar indicando el inicio de las floraciones fitoplanctónicas [398].

Resultados disimiles han sido reportados en cuanto a los efectos de la inanición sobre la composición bioquímica de diversas especies de bivalvos durante la depuración *ex situ*. En este sentido, Marcaillou et al. [405] señalan que el mejillón *M. edulis* no consumió los carbohidratos durante la depuración de OA, a pesar de la ausencia de alimento. Sin embargo, estos autores observaron la utilización de los lípidos a partir de los 21 días de inanición. Por otra parte, Freitas et al. [400] reportan que las almejas *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum* no presentaban cambios en las proteínas totales durante los 7 días de la depuración de metales. En contraposición con lo anterior, Ruano et al. [406] reportaron un efecto negativo producto de la depuración sanitaria en los bivalvos *Crassostrea angulata*, *M. edulis*, *Cerastoderma edule* y *Venerupis pullastra*, detectando una disminución en el IC (PS de tejidos blandos/volumen cavidad valvar) e incluso en los FA transcurridas tan solo 72 h de inanición.

La composición de FA descritos en el presente trabajo para *M. platensis* se corresponde con los patrones esperados para bivalvos marinos y representa un estado saludable, caracterizado por un alto grado de insaturaciones [395]. Las variaciones generales encontradas no pueden ser directamente atribuidas a las condiciones de depuración a las que fueron expuestos los mejillones; sobre todo, si se tiene en cuenta la ausencia de diferencias significativas en lípidos.

En el presente trabajo se observó que C16:0 fue el SFA más abundante para todas las muestras (7,27%-11,40%). Este mismo patrón se ha reportado para la misma especie de mejillón del golfo San Jorge (~17%) [425] y de la costa bonaerense (16,7%-30,8%) [428], así como para otras especies de bivalvos [409,402,406] y de gasterópodos de la costa chubutense [269]. En este estudio se han detectado, además, SFA en relativa abundancia como el C17:0 (mín:1,2 máx:1,6). Este, junto con C15:0 han sido relacionados a una dieta con cierta composición bacteriana [422]. Dentro de los MUFA descritos en este trabajo, C16:1(n-7)cis y C20:1(n-9)cis resultaron los más abundantes en concordancia con lo reportado por Colombo et al. [425] y Kluytmans et al. [401]. Los SFA y MUFA han sido descritos como indicadores de alimentación con detritos [410], aunque también suelen estar presentes en microalgas como diatomeas como es el caso del C16:0 [402]. Se ha observado además una síntesis *de novo* de los SFA C16:0 y C18:0 y sus derivados inmediatos C16:1 y C18:1 por parte de *M. edulis* del Mar de Wadden [401].

Los PUFA mostraron una notoria predominancia, en especial, mayor proporción de omega 3 sobre omega 6. Resultados similares también fueron obtenidos para *M. platensis* del Golfo San Jorge [425], para otras especies del género *Mytilus* [428,401,422,408,429] y para otros bivalvos como *P. magellanicus* [402], *Perna perna* [430] y *Arca noae* [395]. La proporción de cada uno de

los PUFA podría variar de acuerdo a las poblaciones de bivalvos, el origen, la temperatura y el tipo de alimentación [430].

Dentro de los PUFA, DHA y EPA son esenciales para el crecimiento y buena condición de los bivalvos [395]. La proporción DHA/EPA ≥ 1 ha sido utilizada como indicadora de la presencia de dinoflagelados en la dieta, incrementándose en la red trófica y pudiendo variar según la latitud [431]. Una relación DHA/EPA < 1 es indicadora de una dieta rica en diatomeas, al igual que la alta proporción de C16:1(n-7)cis [410,432,430] y la presencia de C18:4(n-3) [432]. Complementario a lo anterior, en estudios llevados a cabo en el estuario de Bahía Blanca, describieron el comienzo de floraciones de diatomeas cuando la relación C16:1(n-7)/C16:0 en el fitoplancton era ≥ 1 [402]. A su vez, estos autores también encontraron que la dinámica fitoplanctónica se veía reflejada en la composición de FA de la glándula digestiva de *P. magellanicus* con un predominio de DHA en presencia relativamente abundante de dinoflagelados y aumento de EPA durante y posterior a la floración de diatomeas. El uso de los marcadores como C16:1(n-7)/C16:0 y la proporción de DHA/EPA como herramientas prácticas para el estudio de floraciones fitoplanctónicas ha sido reportado [430].

Los mejillones correspondientes a Dex1 y Dex2 habrían sido expuestos a una dieta con proporciones mayores de dinoflagelados al estimarse DHA/EPA ≥ 1 , C16:1(n-7)/C16:0 < 1 y presencia de C18:4(n-3). La única diferencia en Dex3 fue que la relación DHA/EPA permaneció por debajo de 1, lo que podría indicar la finalización de la floración de dinoflagelados. En el mismo sentido, Colombo et al. [425] observaron durante el invierno 2013 que la proporción DHA/EPA era 0,4 y que el marcador C18:4(n-3) no se encontraba presente en el perfil de FA de los mejillones. Estos resultados sugieren la menor representación de dinoflagelados en la dieta, aspecto fortalecido por la ausencia de TPM en bivalvos de la zona al momento de realizado dicho estudio (planilla resultante del monitoreo llevado adelante por Plan Provincial de Prevención y Control de Marea Roja periodo junio-agosto 2013 [276]).

Los PUFA, especialmente los de 20-22 carbonos, pueden llegar a presentar gran variabilidad anual [428]. Se pudo cuantificar en un ~2% al ácido C18:2(n-6)cis. Este FA participa en varias funciones metabólicas, es esencial en la dieta de los animales y se considera como característico de la materia orgánica particulada [402,401]. Ésta también puede contribuir a la dieta de los organismos filtradores sobre todo en ambientes costeros, donde existe gran influencia de agentes terrestres [432,406].

Dalsgaard et al. [432] destacan que la posibilidad de utilizar los mencionados marcadores tróficos constituiría una potencial herramienta de aplicación para complementar el entendimiento de procesos dinámicos del ecosistema y, en este caso en particular, podría ser relacionado a aspectos desconocidos de las FAN productoras de TPM en las costas de Chubut. Éste es un

desafío complejo ya que no es posible discernir fácilmente si un individuo está incorporando o haciendo uso de reservas en su situación actual, usando únicamente un marcador en un momento determinado que no da indicación de la dinámica temporal del crecimiento [432]. Incluso, dentro de las poblaciones fitoplanctónicas, los perfiles de FA están relacionados al periodo del ciclo de vida pudiendo sintetizar diferentes FA durante la fase exponencial de crecimiento poblacional [433]. Para ello, seguimientos específicos de la localidad de interés deben realizarse a lo largo del tiempo, analizando el perfil de FA en los diferentes compartimentos que constituyen el ambiente.

Más allá de los objetivos de este capítulo, los resultados encontrados también aportan al conocimiento de la calidad nutricional del mejillón *M. platensis* como alimento. Teniendo en cuenta que los PUFA son clasificados como los constituyentes lipídicos de la dieta más beneficiosos para la salud humana (tales como DHA, EPA y C20:4(n-6)) [414,413], puede presumirse que una depuración de 2 meses no afectaría notoriamente la calidad del mejillón como alimento ya que luego de ese periodo no disminuyó la proporción de PUFA en el total de FA. Estas son observaciones preliminares que podrían ser útiles para futuras investigaciones que estén específicamente enfocadas en la calidad alimenticia del producto final de una depuración.

CONCLUSIÓN

Durante todos los experimentos de mantenimiento de bivalvos *ex situ* y sin alimento, se observaron pocos individuos muertos y de forma aleatoria. Ello refleja no solo buena salud general de los bivalvos recolectados en el campo, sino también una buena aclimatación a las condiciones de experimentación. Los indicadores de condición seleccionados lograron expresar el efecto de la inanición sobre los bivalvos.

Las vieiras tehuelches, a pesar de sobrevivir durante el periodo de mantenimiento *ex situ*, fueron susceptibles a la inanición demostrando una disminución de su condición y con efectos más acentuados a partir de los 60 días. En contraste, para los mejillones se considera que los indicadores utilizados no evidencian un efecto directo del proceso de depuración *ex situ* de TPM sobre la salud del mejillón. Se percibe que la demanda energética requerida para la metabolización de las toxinas en los mejillones no constituye un desequilibrio para las reservas nutricionales, las cuales no variaron significativamente al acabar el periodo de depuración.

Este capítulo contribuye al abordaje de otros aspectos relativos a la problemática de la intoxicación de bivalvos con TPM en la zona costera de Chubut. Aporta herramientas complementarias a las técnicas analíticas para estudiar las FAN, así como a evaluar aspectos nutricionales de la carne de bivalvos depurados sin suministro de alimento.

CONCLUSIÓN GENERAL

Mediante los diferentes experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis, se logró cumplir con los objetivos planteados:

En el desarrollo del Capítulo 1 se logró evaluar la aplicabilidad de diferentes métodos de biofiltración para el mantenimiento *ex situ* de bivalvos. Los resultados obtenidos permiten establecer mejores condiciones para el mantenimiento de individuos en experimentación, así como también durante la etapa previa en su aclimatación.

El biofiltro bacteriano resultó ser un mecanismo tradicional y seguro que mantuvo los parámetros de calidad del agua en un rango de valores seguros para el cultivo de organismos acuáticos. Por un lado, el conocimiento de composición bacteriana nitrificante y el área real de crecimiento en el sustrato plástico ofrecido permitirían un cálculo balanceado entre las tasas de producción de excreciones nitrogenadas y las tasas de absorción del biofiltro en el sistema. Por otra parte, la búsqueda e incorporación de mecanismos que completen el proceso de desnitrificación (etapa de remoción de nitritos y nitratos), lograría cerrar el círculo de un sistema totalmente equilibrado y sostenible en largos periodos de tiempo. Este sistema puede ser mejorado y optimizado para lograr aún mayores rendimientos mediante nuevas y complementarias investigaciones

La macroalga *Ulva* spp. podría ser una alternativa de biofiltración no solo económica sino también de gran practicidad de manejo y mantenimiento. A pesar de haberse encontrado resultados positivos en los ensayos a pequeña escala, factores extrínsecos a los abarcados en los estudios impidieron un buen desempeño de la macroalga en sistemas de recirculación de escala mayor. Futuras investigaciones son necesarias para dilucidar si tal ineficiencia fue dada por las características de la población utilizada, como el ciclo biológico anual y/o la aptitud de asimilación de compuestos nitrogenados. Ningún indicio de factibilidad fue encontrado en el caso de la especie *U. pinnatifida*.

Respecto a las especies de bivalvos utilizadas en la experimentación, se observó tolerancia de la vieira y el mejillón a concentraciones relativamente elevadas de compuestos nitrogenados. En el caso del mejillón se observó una posible influencia de la temperatura sobre la tasa de excreción. Por otra parte, este factor influiría en la tasa de consumo de oxígeno disuelto únicamente en mejillones provenientes del submareal.

En base a los parámetros que se analizaron, no se encontraron evidencias suficientes que sustenten la hipótesis de memoria ecológica de las poblaciones de mejillones provenientes del intermareal y del submareal. El hábitat de origen de los individuos (intermareal o submareal) no

sería un factor prioritario en las tasas de incremento de nitrógeno disuelto, siendo el tiempo de experimentación (o aclimatación según el contexto) el aspecto de mayor influencia en la estabilidad de un sistema. Esto último incluye la variación de la tasa de excreción y de consumo de oxígeno de los organismos, de acuerdo al metabolismo de reservas a causa de las condiciones experimentales de inanición.

Los experimentos realizados permitieron estimar el rendimiento de un SRC específico para el mantenimiento de mejillones. Se recomienda seleccionar los mecanismos de biofiltración de acuerdo a la escala de trabajo, quedando demostrado que el tipo de acuario elegido puede influir en el desempeño. Se concluye en este capítulo la necesidad de examinar y vigilar cada sistema de diseño nuevo ya que las condiciones pueden influir notoriamente en los parámetros de calidad de agua necesarios para el mantenimiento de organismos marinos.

En el capítulo 2, se evaluó cualitativa y cuantitativamente la dinámica de las toxinas en diferentes bivalvos de interés comercial de la Patagonia. Se realizaron por primera vez en la Argentina ensayos de intoxicación, mediante los cuales se logró describir la cinética de la depuración *ex situ* de las TPM en mejillones *M. platensis* naturalmente intoxicados. El conocimiento generado de las TPM y las FAN desde el aspecto biológico y químico posee una especial significancia para la costa patagónica y toda la Argentina. También se determinaron concentraciones de TPM en mejillones a campo, ampliando y contribuyendo de esta manera a la base de datos del Programa de Monitoreo de Mareas Rojas de la provincia del Chubut.

Se realizaron exitosamente 3 depuraciones de mejillones obteniendo una reducción de TPM superior al 70% en los casos en donde la toxicidad inicial fue mayor a los niveles de seguridad para la protección de la salud humana. Los resultados se ajustaron mayoritariamente a funciones de disminución exponencial, contrastante con la linealidad medida en el seguimiento realizado *in situ*. Por lo anterior, se aportó al conocimiento de los tiempos necesarios para alcanzar concentraciones inocuas y se determinó que *M. platensis* es un depurador de rápido a moderado, incluso en ausencia de alimento. La depuración *ex situ* no solo permitió la disminución de las TPM en tejidos de bivalvos, sino que también impidió la re-intoxicación. Esto último fue particularmente beneficioso para el estudio del perfil de las TPM.

De los experimentos de intoxicación se concluye que el mejillón es capaz de acumular TPM aún en presencia de bajas concentraciones de *A. tamarense/catenella* lo que conllevaría un riesgo para la salud humana en caso de persistencia de eventos de escasa o difícil detección del dinoflagelado. De los ensayos preliminares con la vieira tehuelche, se deduce que esta especie podría presentar una susceptibilidad particular a la presencia y consumo de las TPM. A partir de lo presentado se recomienda seguir desarrollando experiencias sobre la cinética de intoxicación por TPM de bivalvos de interés expuestos a alimento tóxico.

Se logró describir el perfil tóxico de mejillones provenientes de bancos naturales y la metabolización de las toxinas tanto durante el proceso de intoxicación como depuración. A partir de ello se observó que el mejillón *M. platensis* tiene capacidad de acumulación y/o eliminación selectiva, epimerización metabólica y biotransformación de las toxinas. Debido a la presencia de depuración selectiva de acuerdo a análogos de TPM, la aplicación de modelos de dos compartimentos otorgaría mayor comprensión de la detoxificación particular en cada tejido y posibles rutas metabólicas de las toxinas en el mejillón.

Debido a la rápida eliminación/transformación de GTX 1&4 y menor reducción reconocida de GTX 2&3 en el transcurso del tiempo, los resultados mostraron que la proporción relativa entre estos dos grupos de GTX, así como también sus proporciones relativas entre los epímeros α/β , podrían considerarse para detectar la etapa de depuración de bivalvos *in situ*. Sumado a ello, la presencia de dcGTX 3 podría ser utilizada como indicadora de una reciente exposición a *A. tamarense/catenella*.

A partir de lo observado durante los análisis cualitativos de TPM, se resalta la necesidad de aplicar técnicas analíticas en complemento al Bioensayo en Ratón como estrategia de mejora para el sistema de salud y prevención de intoxicaciones. Esta mejora también permitiría ampliar la base de datos de las transformaciones de las TPM durante las diversas FAN acontecidas.

Durante los trabajos realizados en Chile, no solo se logró evaluar al quitosano como facilitador de depuración, sino que también se estudiaron aspectos fisiológicos de los bivalvos durante el periodo de intoxicación. Los resultados para *M. chilensis* difirieron notablemente con las menores tasas halladas para *M. platensis*. Además, *M. chilensis* presentó menor capacidad de transformación de N-sulfocarbamoilos a GTX. Estas discrepancias se relacionan en gran medida a las características experimentales ensayadas con cada especie y la particular susceptibilidad encontrada en los mejillones chilenos utilizados.

A partir de estos ensayos, se observó la particular similitud entre los perfiles de TPM de *A. catenella* de Chile y *A. tamarense/catenella* de Argentina, información complementaria a la nueva caracterización de ambas microalgas como la misma especie. En especial, se resalta la mayor concentración de TPM por célula y la presencia de neoSTX y STX en los dinoflagelados de la costa atlántica, cualidades que posiblemente le confieren a este grupo mayor potencial tóxico.

Se concluye que el uso del quitosano como facilitador de la depuración no sería factible al menos bajo las condiciones ensayadas. Tales resultados obligan a continuar con esta línea de investigación, utilizando nuevos factores de depuración en combinación con la adición de quitosano. Se deberá tener en cuenta, además, la selección de poblaciones con tolerancia a las TPM y/o bivalvos naturalmente intoxicados. Debido a factores naturales, esta última alternativa

no pudo ser ensayada. Los resultados vinculados a las poblaciones de mejillones chilenos informan sobre la susceptibilidad diferencial a las TPM, reafirmando el riesgo presente en la sostenibilidad de la acuicultura y de las poblaciones naturales en algunas regiones frente al incremento de las FAN o su expansión.

Por último, en el Capítulo 3 se evaluó la condición de los bivalvos durante un periodo de mantenimiento *ex situ*. Tales resultados con objetivos prácticos, pueden ser utilizados en procesos de depuración de toxinas, así como también en otros contextos como la aclimatación de los individuos para posterior experimentación. Se observó que los indicadores de condición seleccionados lograron expresar efectos relacionados con la salud de los bivalvos.

La vieira mostró mayor susceptibilidad que el mejillón a un periodo prolongado de inanición, siendo los efectos fuertemente observables a partir de los 60 días. Esto sugiere que, frente a una depuración de TPM, los estudios deberán considerar la pérdida de reservas y masa muscular en la cuantificación de las toxinas. Por otra parte, dependiendo de los tiempos necesarios para la reducción de TPM, influiría en la practicidad y eficiencia del método *ex situ*.

En el caso de los mejillones, los efectos observados estuvieron más relacionados con las condiciones del ambiente natural que al periodo *ex situ*. No se reunió evidencia suficiente para concluir que la depuración *ex situ* de TPM, al menos durante 49 días, afecta la condición de los mejillones. Se percibe que la demanda energética requerida para la metabolización de las toxinas no constituiría realmente un desequilibrio para las reservas nutricionales. Esto se vincula con las condiciones del experimento y el momento del ciclo reproductivo de los individuos. Nuevas investigaciones podrán realizarse en un futuro, en las cuales se evalúe la susceptibilidad de los individuos incluyendo el desarrollo gonadal como factor de estudio.

El estudio de ácidos grasos permitió deducir el tipo de dieta al que podrían estar expuestos los mejillones en los periodos evaluados. Con estos resultados se abre una perspectiva del uso de los ácidos grasos como complemento en el seguimiento de las FAN. Futuras investigaciones podrán realizarse evaluando los componentes de ácidos grasos en paralelo a los niveles de toxicidad y composición fitoplanctónica.

A partir de los análisis de ácidos grasos, también se considera la posibilidad de evaluar el efecto de la depuración en la calidad nutricional de los bivalvos. Teniendo en cuenta que los PUFA son clasificados como los constituyentes lipídicos de la dieta más beneficiosos para la salud humana (tales como DHA, EPA y C20:4(n-6)) puede presumirse que la depuración no afectaría notoriamente la calidad del mejillón como alimento ya que no disminuyó la proporción de PUFA en el total de ácidos grasos luego de 60 días. Estas son observaciones preliminares que podrían

ser útiles para futuras investigaciones específicamente enfocadas en la calidad alimenticia del producto final de una depuración.

El Capítulo 3 se relaciona con los primeros capítulos de esta tesis, reafirmando la practicidad y buena conformación de los sistemas de recirculación para el mantenimiento de bivalvos en periodos de mediano a largo plazo. Estas conclusiones se construyen a partir de la baja mortalidad observada y la buena salud de los bivalvos, mostrando siempre manto y tentáculos extendidos e incluso desplazamiento dentro de los receptáculos del sistema.

Esta tesis ha permitido obtener inédito y valioso conocimiento relativo a las FAN productoras de TPM, en particular respecto a la dinámica de las toxinas en mejillones de la costa del Chubut. Contribuye al control de esta problemática en la región y también al área de acuicultura a través de la descripción y ampliación de parámetros de cultivo. Aun cuando no fue factible alcanzar el mismo grado de avance en relación a la vieira tehuelche *A. tehuelchus*, las experiencias realizadas fortalecen el conocimiento de esta especie, vulnerable ecológicamente, pero con gran importancia socio-económica regional. En tal sentido se describen estrategias útiles y fehacientes para su cultivo y mantenimiento *ex situ* y se destaca su sensibilidad frente situaciones estresantes, incluidas las FAN, y los posibles efectos en su condición.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Subsecretaría de Pesca (2003) Política Nacional de Acuicultura. Propuesta de Política Nacional de Acuicultura.76.
- [2] M Pascual, C Castaños (2000) Cultivo de ostras cóncavas en Argentina: desde el criadero hasta la cosecha en el mar. *Ganadería: Secretaria de Agricultura, Pesca y Alimentación*.
- [3] L Luchini (2016) Actualidad de la acuicultura en Argentina. *Revista AquaTIC* (5).
- [4] V Díaz, R Ibáñez, P Gómez, A Urtiaga, I Ortiz (2012) Kinetics of nitrogen compounds in a commercial marine Recirculating Aquaculture System. *Aquacult Eng* 50:20-27.
- [5] A Lovatelli, S Vannuccini, D McLeod (2007), Current status of world bivalve aquaculture and trade, En: *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile*, (Ed: A Lovatelli, A Farías, I Uriarte), FAO Actas de Pesca y Acuicultura, Roma, Italia, p. 45-59.
- [6] GLOBEFISH (2017) *Limited trade in bivalves*. GLOBEFISH - Analysis and information on world fish trade. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/522564/>. 2018
- [7] FAO (2017), *Food outlook: Biannual report on global food markets*, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- [8] GLOBEFISH (2017) *Less bivalves in world trade in 2016. Mussels*. GLOBEFISH - Analysis and information on world fish trade. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/903650/>. 2018
- [9] Sernapesca (2011) *Sernapesca publica estadísticas de exportación de moluscos bivalvos a la Unión Europea*. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Gobierno de Chile. http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=1313:sernapesca-publica-estadisticas-de-exportacion-de-moluscos-bivalvos-a-la-union-europea&catid=1:ultimas&Itemid=69. 2018
- [10] Infopesca - Noticias Comerciales (2018) Pescado Congelado - Argentina.
- [11] Instituto Nacional de Estadística y Censos (2018) Informes Técnicos. Comercio Exterior. Complejos Exportadores. Primer semestre 2018. Ministerio de Hacienda. Presidencia de la Nación. 2, N° 166:30 pp.
- [12] Unidad para el Cambio Rural (UCAR) (2015) Plan de Mejora Competitiva. Clúster de Pesca Artesanal y Maricultura de Península Valdés. *Ministerio de Agroindustria*:125.

- [13] X Hernández (2018) *Argentina exporta más pescado que carne*.
<https://www.infocampo.com.ar/argentina-exporta-mas-pescado-que-carne/>. 2018
- [14] NF Ciocco, ML Lasta, M Narvarte, C Bremec, E Bogazzi, J Valero, JL Orensanz (2006), Capítulo 26 - Argentina, En: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Segunda edición*, (Ed: SE Shumway, G Parsons), Elsevier, p. 1251-1292.
- [15] Instituto Nacional de Estadística y Censos (2018) Exportaciones e importaciones pesqueras - 2017. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Dirección de Planificación y Gestión de Pesquerías. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación.: 43 pp.
- [16] S Panné Huidobro (2015) Producción por Acuicultura en Argentina en el 2015. Dirección de Acuicultura Dirección Nacional de Planificación Pesquera Subsecretaría de Pesca y Acuicultura Ministerio de Agroindustria.
- [17] EA Zampatti, M Pascual, ML Lasta (1990), Cultivo de moluscos en Argentina. El cultivo del mejillón (*Mytilus edulis platensis*) y de la vieira (*Chlamys tenuetcha*), en Argentina, En: *Cultivo de moluscos en America Latina. Memorias segunda reunión grupo de trabajo técnico Ancud (Isla Chiloé - Chile), Noviembre 7-11, 1989*, (Ed: A Hernández), Red Regional de Entidades y Centros de Acuicultura de América Latina, Bogotá, Colombia.
- [18] E Kisner, M Kroeck (2005) Estimación de la talla de primera madurez sexual del mejillón, *Mytilus edulis platensis* (Mollusca: Bivalvia) en el Golfo San Matías. *IBMP Serie Publicaciones IV:21-44*.
- [19] L Gracia Villalobos (2017) *Evaluación de las Floraciones Algales Nocivas en las costas de la provincia del Chubut y su impacto en las pesquerías de moluscos bivalvos.*, Universidad de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina
- [20] Redacción Chubut - diario El Chubut (2018) *Legislatura: El FPV presentó el proyecto para una nueva ley provincial de Pesca*. <http://www.elchubut.com.ar/nota/2018-12-5-0-48-0-legislatura-el-fpv-presento-el-proyecto-para-una-nueva-ley-provincial-de-pesca>. 2018
- [21] [Revistapuerto.com.ar](http://revistapuerto.com.ar) - la otra cara de la pesca (2014) *Diseñan clúster para la pesca artesanal de Península Valdés*. <https://revistapuerto.com.ar/2014/10/disenan-cluster-para-la-pesca-artesanal-de-peninsula-valdes/>. 2018
- [22] Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (2018) *El INIDEP participó en la organización de un taller internacional de pescadores artesanales*. http://inidep.edu.ar/index.php?option=com_k2&view=item&id=509:el-inidep-participo-en-la-organizacion-de-un-taller-internacional-de-pescadores-artesanales&Itemid=511. 2018
- [23] Secretaría de Agroindustria-Ministerio de Producción y Trabajo. Presidencia de la Nación *CHUBUT: El Cluster de Pesca Artesanal y Maricultura empezó a planificar su mejora competitiva*. <http://www.ucar.gob.ar/index.php/prensa/noticias-ucar/1075-chubut-el-cluster-de-pesca-artesanal-y-maricultura-empezo-a-planificar-su-mejora-competitiva>. 2018

- [24] El Chubut (2015) *El Clúster de Pesca Artesanal y Maricultura comenzó a planificar la mejora competitiva de los productores*. <http://www.elchubut.com.ar/nota/2015-1-6-el-cluster-de-pesca-artesanal-y-maricultura-comenzo-a-planificar-la-mejora-competitiva-de-los-productores>. 2018
- [25] M Lasta, N Cicco, C Bremec, A Roux (1998), Moluscos bivalvos y gasterópodos, En: *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 2. Los Moluscos de interés pesquero. Cultivo y estrategias reproductivas de bivalvos y equinoideos*, (Ed: EE Boschi), Contribución INIDEP 1046. Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación, Mar del Plata, Argentina, p. 115-142.
- [26] D Andrinolo, N Santinelli, S Otaño, V Sastre, N Lagos (1999) Paralytic shellfish toxin in mussels and *Alexandrium tamarense* at Valdes Peninsula, Chubut, Patagonia, Argentina: Kinetics of a natural depuration. *J Shellfish Res* 18 (1):203-209.
- [27] ML Lasta, AM Parma, MS Pascual, EA Zampatti (1986) Consideraciones sobre la explotación del mejillón (*Mytilus platensis*) en la costa bonaerense. Resultados de la campaña de prospección del " Banco Faro Querandí"(junio 1981).
- [28] Red de Fortalecimiento para la Maricultura Costera Patagónica (RMCP) (2013) Relevamiento de la Actividad de Maricultura en la Patagonia Argentina. Documento técnico # 1.222.
- [29] Food and Agriculture Organization of the United Nations - for a world without hunger FAO (2018) *National Aquaculture Sector Overview. Argentina*. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_argentina/en. 2018
- [30] MMV Alvarez, R Duffard, M Ferino (2012) Situación actual de las Zonas productivas de moluscos bivalvos de la Provincia de Chubut.1-16.
- [31] M Narvarte, R González, P Filippo (2007) Artisanal mollusk fisheries in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina): An appraisal of the factors contributing to unsustainability. *Fisheries Research* 87 (1):68-76.
- [32] NF Ciocco, ML Lasta, CS Bremec (1998), El Mar argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 2: Los Moluscos de interés pesquero. Cultivos y estrategias reproductivas de bivalvos y equinoideos, En: *Pesquerías de Bivalvos: Mejillón, Vieiras (Tehuelche y Patagónica) y otras especies*, (Ed: EE Boschi), Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. , Mar del Plata, Argentina, p. 143-146.
- [33] NF Ciocco (1995) La marisquería mediante buceo en el Golfo San José. Informe Técnico. *Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica*:1-39.
- [34] MS Pascual, EA Zampatti (1998), Cultivo de Moluscos Bivalvos, En: *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 2. Los Moluscos de interés pesquero. Cultivo y estrategias reproductivas de bivalvos y equinoideos*, (Ed: EE Boschi), Contribución INIDEP 1046.

Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación, Mar del Plata, Argentina, p. 167-194.

[35] Md Agroindustria (2016) *El Cultivo de los moluscos bivalvos marinos en Argentina*. Presidencia de la Nación Argentina.

https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/marina/_archivos//000001-EI%20Cultivo%20de%20los%20moluscos%20bivalvos%20marinos%20en%20Argentina.php. 2018

[36] G Soria, JM Orensanz, EM Morsán, AM Parma, R Amoroso (2016), Capítulo 25 - Scallops: biology, fisheries, and management in Argentina, En: *Scallops: biology, ecology, aquaculture, and fisheries*, (Ed: SE Shumway, GJ Parsons), Developments in aquaculture and fisheries science. Elsevier, Oxford, Reino Unido, p. 1019–1046.

[37] P A., P Gualdoni, B M.I, E E., J Fosati (2012) Situación actual de la mitilicultura en Puerto Almanza. Tierra del Fuego. Argentina. *FACES* 18 (38-39):83-101.

[38] MI Bertolotti, ML Lasta, EA Zampatti (1986) Cultivo experimental de mejillón (*Mytilus edulis platensis*): características biológicas, técnicas y análisis económico de la actividad. *La Industria Cárnica Latinoamericana* 65:42-54.

[39] RdFplMC Patagónica *Producción en criadero*. http://www.mariculturaenred.cenpat-conicet.gob.ar/Produccion_en_Criadero_101.html. 2018

[40] L Maldonado, E Libraghi, EA Sponton (2016) *Ruta de la centolla: agroturismo, producción y alimentación convergen en el fin del mundo*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <https://inta.gob.ar/noticias/ruta-de-la-centolla-agroturismo-produccion-y-alimentacion-convergen-en-el-fin-del-mundo>. 2017

[41] S Ceva, A Espina, E Muzi, M Segura, G Torres (2015), *Somos la Tierra. Historias y retratos de la agricultura familiar en la Argentina*, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina.

[42] I Elías, RC Pereiro (1999) Primer Encuentro Provincial de Pescadores Artesanales de Puerto Madryn. Conclusiones y Recomendaciones (Mimeo).

[43] I Elías, C Carozza, EE Di Giácomo, MS Isla, JM Orensanz, AM Parma, RC Pereiro, MR Perier, RG Perrotta, ME Ré, C Ruarte (2011), Capítulo 2 - Coastal fisheries of Argentina, En: *Coastal fisheries of Latin America and the Caribbean*, (Ed: S Salas, R Chuenpagdee, A Charles, JC Seijo), FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, Roma, Italia, p. 13-48.

[44] L Rocha (2016) *Pesca artesanal: una actividad sustentable, familiar y muy riesgosa - LA NACION* <https://www.lanacion.com.ar/1969915-pesca-artesanal-una-actividad-sustentable-familiar-y-muy-riesgosa>. 2018

[45] C Santa Ana (2004) *Los Derechos de Uso Territorial (DUTS) como alternativa para el manejo sustentable de recursos pesqueros: El caso de la comunidad recolectores de costa de*

El Riacho (golfo San José, Argentina). Universidad de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn, Argentina

[46] AB Goya, S Maldonado (2014), Capítulo 2 - Evolution of PSP toxicity in shellfish from the Beagle Channel (Tierra del Fuego, Argentina): an overview, En: *Molluscan Shellfish Safety*, (Ed: G Sauvé), Springer, Canadá, p. 15-23.

[47] SENASA - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2018) *Marea Roja*. <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/animales-acuaticos/produccion-primaria/marea-roja>. 2018

[48] Gd Chubut. (2018) *Plan Provincial de Marea Roja*. <http://www.chubut.gov.ar/portal/wp-organismos/marearaja/>. 2018

[49] VC D'Agostino, M Degradi, V Sastre, N Santinelli, B Krock, T Krohn, SL Dans, MS Hoffmeyer (2017) Domoic acid in a marine pelagic food web: Exposure of southern right whales *Eubalaena australis* to domoic acid on the Península Valdés calving ground, Argentina. *Harmful Algae* 68:248-257.

[50] AM Gayoso, S Dover, S Morton, M Busman, P Moeller, VK Fulco, L Maranda (2002) Diarrhetic shellfish poisoning associated with *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in Patagonian gulfs (Argentina). *J Shellfish Res* 21 (2):461-463.

[51] JI Carreto, ML Lasta, R Negri, H Benavides (1981), *Los fenómenos de marea roja y toxicidad de moluscos bivalvos en el mar argentino*, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP, Mar del Plata, Argentina.

[52] Y Shimizu (1993) Microalgal metabolites. *Chemical Reviews* 93 (5):1685-1698.

[53] L Lehane (2000), *Paralytic shellfish poisoning: A review*, Animal Health Science and emergency Management Branch, Agriculture, Fisheries and Forestry, Australia, Canberra.

[54] LM Grattan, S Holobaugh, JG Morris (2016) Harmful algal blooms and public health. *Harmful Algae* 57:2-8.

[55] M Asakawa, G Gomez-Delan, M Barte-Quilantang, K Ito (2015), Capítulo 24 - Paralytic Shellfish Poison (PSP)—producing dinoflagellate and PSP-infested organisms, En: *Marine Protists. Diversity and dynamics*, (Ed: S Ohtsuka, T Suzaki, T Horiguchi, N Suzuki, F Not), Springer, Japón, p. 567-596.

[56] M Mons, H Van Egmond, G Speijers (1998) Paralytic shellfish poisoning; A review. *National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)*:47.

[57] TJ Smayda (1990), Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic, En: *Toxic Marine Phytoplankton*, (Ed: E Granéli, B Sundström, L Edler, DM Anderson), Elsevier, Nueva York, Estados Unidos de América, p. 29-40.

[58] WL Silver, AD Cembella (1995) Dynamic modelling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implications for other marine invertebrates. *Can J Fish Aquat Sci* 52:521-531.

- [59] NG Montoya, MI Reyero, R Akselman, JM Franco, J Carreto (1997) Paralytic shellfish toxins in the anchovy *Engraulis anchoita* from Argentinian coast. *VIII International conference on Harmful algae- Abstracts and Posters Classification. vp. 1997.*
- [60] N Montoya, R Akselman, M Pajaro, R Perrotta, J Carreto (1997) Mortandad de caballa *Scomber japonicus* en la plataforma bonaerense (Mar Argentino) asociada a un florecimiento del dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamarense*. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 11:145-152.
- [61] NG Montoya, JI Carreto (2007) Informe sobre mortandad de aves marinas ocurrida en las costas de Chubut (noviembre de 2006), asociada a la presencia de Toxinas Paralizantes de Moluscos. *INIDEP Programa Medio Ambiente Marino.*
- [62] F Quintana, M Uhart, P García Borboroglu (2001) Causa de mortandad masiva de aves marinas en las costas de Chubut. Reporte no publicado.1–3.
- [63] JR Geraci, DM Anderson, RJ Timperi, DJ St. Aubin, GA Early, JH Prescott, CA Mayo (1989) Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) fatally poisoned by dinoflagellate toxin. *Can J Fish Aquat Sci* 46 (11):1895-1898.
- [64] V Häussermann, CS Gutstein, M Bedington, D Cassis, C Olavarria, AC Dale, AM Valenzuela-Toro, MJ Perez-Alvarez, HH Sepúlveda, KM McConnell (2017) Largest baleen whale mass mortality during strong El Niño event is likely related to harmful toxic algal bloom. *PeerJ* 5:e3123.
- [65] Subsecretaría de Pesca y Acuicultura del Ministerio de Agroindustria (2018) Código Alimentario Argentino. PV-2018-14256438-APN-DERA#ANMAT.
- [66] E Fabro (2018) *Dinoflagelados toxígenos en el Mar Argentino: diversidad, abundancia y toxinas asociadas*. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
- [67] E Fabro, GO Almandoz, M Ferrario, U John, U Tillmann, K Toebe, B Krock, A Cembella (2017) Morphological, molecular and toxin analysis of field populations of *Alexandrium* genus from the Argentina Sea. *J Phycol* 53:1206–1222
- [68] C Wilson, AV Sastre, M Hoffmeyer, VJ Rowntree, SE Fire, NH Santinelli, SD Ovejero, V D'Agostino, CF Marón, GJ Doucette (2016) Southern right whale (*Eubalaena australis*) calf mortality at Península Valdés, Argentina: Are harmful algal blooms to blame? *Mar Mamm Sci* 32 (2):423-451.
- [69] AD Turner, S Tarnovius, AB Goya (2014) Paralytic Shellfish Toxins in the Marine Gastropods *Zidona dufresnei* and *Adelomelon beckii* from Argentina: Toxicity and Toxin Profiles. *J Shellfish Res* 33 (2):519-530.
- [70] DPd Bromatología *Informe Toxina Paralizante de Molusco*. Dirección de Salud Ambiental. Ministerio de Salud de la Provincia del Chubut. <http://www.chubut.gov.ar/portal/wp-organismos/marearaja/>. 2018

- [71] T Song, L Liu, X Song, Y Liang, G Zhuang (2015) Depuration of paralytic shellfish toxins in Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) in natural environment. *Acta Oceanol Sin* 34 (12):170-174.
- [72] R Zárate (2013) Núcleo socio-productivo estratégico. Producción y Procesamiento de Recursos Oceánicos. Documento de referencia. Secretaría de Planeamiento y Políticas en Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Argentina.:54.
- [73] JE Winter, JE Toro, JM Navarro, GS Valenzuela, OR Chaparro (1984) Recent developments, status, and prospects of molluscan aquaculture on the Pacific coast of South America. *Aquaculture* 39 (1-4):95-134.
- [74] A Lovatelli, S Vannuccini, D McLeod (2008), Current status of world bivalve aquaculture and trade, En: *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile*, (Ed: A Lovatelli, A Farías, I Uriarte), FAO Actas de Pesca y Acuicultura., Roma, p. 45-59.
- [75] G Riestra (2005) Fichas Técnicas de Recursos pesqueros. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Montevideo, Uruguay.
<http://www.inape.gub.uy/Fichas%20de%20especies/Mejill%C3%B3n.htm>.
- [76] MM Trivellini, S Van der Molen, F Márquez (2018) Fluctuating asymmetry in the shell shape of the Atlantic Patagonian mussel, *Mytilus platensis*, generated by habitat-specific constraints. *Hydrobiologia*:1-13.
- [77] M Zbawicka, MI Trucco, R Wenne (2018) Single nucleotide polymorphisms in native South American Atlantic coast populations of smooth shelled mussels: hybridization with invasive European *Mytilus galloprovincialis*. *Genet Sel Evol* 50 (1):5.
- [78] FG Dellatorre, MS Pascual, PJ Barón (2007) Feeding physiology of the Argentine mussel *Mytilus edulis platensis* (d'Orbigny, 1846): does it feed faster in suspended culture systems? *Aquacult Int* 15 (6):415-424.
- [79] JM Babarro, MJ Fernández-Reiriz, U Labarta (2000) Metabolism of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from two origins in the Ría de Arousa (north-west Spain). *J Mar Biol Assoc UK* 80 (5):865-872.
- [80] S Barrento, I Lupatsch, A Keay, G Christophersen (2013) Metabolic rate of blue mussels (*Mytilus edulis*) under varying post-harvest holding conditions. *Aquat Living Resour* 26 (3):241-247.
- [81] JE Colt, D Armstrong (1981), Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and molluscs, En: *Bioengineering symposium for fish culture*, (Ed: LJ Allen, EC Kinney), American Fisheries Society Fish Culture, Munich, Alemania, p. 34-47.

- [82] M Frías-Espericueta, F Páez-Osuna (2001) Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones. *Camaronicultura y medio ambiente Universidad Nacional Autónoma de México, México*:224-242.
- [83] TB Lawson (1995), *Fundamentals of Aquacultural Engineering*, Springer, Norwell, Massachusetts.
- [84] TM Losordo, MP Masser, JE Rakocy (1999) Recirculating aquaculture tank production systems. A review of component options. *SRAC Publication-Southern Regional Aquaculture Center* (453):13.
- [85] MP Masser, J Rakocy, TM Losordo (1999) Recirculating aquaculture tank production systems. Management of recirculating systems. . *SRAC Publication-Southern Regional Aquaculture Center* 452.
- [86] F Buzin, B Dupuy, S Lefebvre, L Barillé, J Haure (2015) Storage of Pacific oysters *Crassostrea gigas* in recirculating tank: Ammonia excretion and potential nitrification rates. *Aquacult Eng* 64:8-14.
- [87] JA Camargo, A Alonso (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environ Int* 32 (6):831-849.
- [88] Y Tal, A Nussinovitch, J Van Rijn (2003) Nitrate removal in aquariums by immobilized *Pseudomonas*. *Biotechnol Prog* 19 (3):1019-1021.
- [89] E Orban, G Di Lena, T Navigato, I Casini, A Marzetti, R Caproni (2002) Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chem* 77 (1):57-65.
- [90] N de Vido de Mattio (1984) Variación estacional de la composición bioquímica de la Vieyra *Chlamys tehuelcha* (D'Orbigny) en el Golfo San Jose.
- [91] AD Ansell, P Sivadas (1973) Some effects of temperature and starvation on the bivalve *Donax vittatus* (da Costa) in experimental laboratory populations. *J Exp Mar Biol Ecol* 13 (3):229-262.
- [92] D Pleissner, NT Eriksen, K Lundgreen, HU Riisgård (2012) Biomass composition of blue mussels, *Mytilus edulis*, is affected by living site and species of ingested microalgae. *International Scholarly Research Network of Zoology* 2012.
- [93] B Bayne, C Scullard (1977) Rates of nitrogen excretion by species of *Mytilus* (Bivalvia: Mollusca). *J Mar Biol Assoc UK* 57 (02):355-369.
- [94] G Merino, E Uribe, G Soria, E von Brand (2009) A comparison of larval production of the northern scallop, *Argopecten purpuratus*, in closed and recirculating culture systems. *Aquacult Eng* 40 (2):95-103.
- [95] G Soria, G Merino, E Uribe, E Von Brand (2011) Effect of increasing salinity on weight-specific filtration rate of juvenile scallop *Argopecten purpuratus* reared at two temperatures: Is any effect related to ammonia buildup? *J Shellfish Res* 30 (2):279-286.

- [96] G Husmann, E Philipp, D Abele (2016) Seasonal proliferation rates and the capacity to express genes involved in cell cycling and maintenance in response to seasonal and experimental food shortage in *Laternula elliptica* from King George Island. *Mar Environ Res* 118:57-68.
- [97] S Svensson, L Förlin (2004) Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquat Toxicol* 66 (4):405-418.
- [98] X Xu, W Lee, A Chan, H Lo, P Shin, S Cheung (2016) Microplastic ingestion reduces energy intake in the clam *Atactodea striata*. *Mar Pollut Bull*.
- [99] C Pereira, C Moreirinha, L Teles, RJ Rocha, R Calado, JL Romalde, ML Nunes, A Almeida (2017) Application of phage therapy during bivalve depuration improves *Escherichia coli* decontamination. *Food Microbiol* 61:102-112.
- [100] J Saphoerster (2008) *The physiology of the blue mussel (Mytilus edulis) in relation to ocean acidification*. Universität Rostock, Mecklenburgo-Pomerania Occidental, Alemania
- [101] P Range, M Chícharo, R Ben-Hamadou, D Piló, M Fernandez-Reiriz, U Labarta, MG Marin, M Bressan, V Matozzo, A Chinellato (2014) Impacts of CO₂-induced seawater acidification on coastal Mediterranean bivalves and interactions with other climatic stressors. *Regional Environmental Change* 14 (1):19-30.
- [102] C Lee, S Hong, B-O Kwon, J-H Lee, J Ryu, Y-G Park, S-G Kang, JS Khim (2016) Lethal and sub-lethal effects of elevated CO₂ concentrations on marine benthic invertebrates and fish. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (15):14945-14956.
- [103] MJ Fernández-Reiriz, P Range, XA Álvarez-Salgado, J Espinosa, U Labarta (2012) Tolerance of juvenile *Mytilus galloprovincialis* to experimental seawater acidification. *Mar Ecol Prog Ser* 454:65-74.
- [104] MJ Fernández-Reiriz, P Range, XA Álvarez-Salgado, U Labarta (2011) Physiological energetics of juvenile clams *Ruditapes decussatus* in a high CO₂ coastal ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 433:97-105.
- [105] C Hammen, H Miller, WH Geer (1982) Nitrogen excretion of *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol* 17 (4):1199-1200.
- [106] FJ Millero, ML Sohn (1992), Capítulo 7 - Micronutrients in the ocean, En: *Chemical oceanography*, CRC Press., Boca Raton, FL, p. 334–336.
- [107] JE Huguenin, J Colt (1989), *Design and operating guide for aquaculture seawater systems. Segunda edición*, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.
- [108] Y Collos, PJ Harrison (2014) Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Mar Pollut Bull* 80 (1):8-23.
- [109] G Kormanik, J Cameron (1981) Ammonia excretion in animals that breathe water: a review. *Marine Biology Letters*.

- [110] L Canesi, G Frenzilli, T Balbi, M Bernardeschi, C Ciacci, S Corsolini, C Della Torre, R Fabbri, C Faleri, S Focardi (2014) Interactive effects of n-TiO₂ and 2, 3, 7, 8-TCDD on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 153:53-65.
- [111] C Chen, W Shen, H Gu, L Wu, Z Lin, Q Xue (2016) Vitellogenin's putative role in *Tegillarca granosa's* cadmium detoxification. *Genes & Genomics* 39:1-12.
- [112] H Kuranchie-Mensah, J-L Teyssié, F Oberhänsli, Y Tumnoi, S Pouil, M Warnau, M Metian (2016) Bioconcentration of Ag, Cd, Co, Mn and Zn in the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*) and preliminary human health risk assessment: A radiotracer study. *Bull Environ Contam Toxicol* 97 (3):413-417.
- [113] R Guo, L Pan, P Lin, L Zheng (2017) The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 191:36-51.
- [114] A Pagliarani, P Bandiera, V Ventrella, F Trombetti, MP Manuzzi, M Pirini, AR Borgatti (2008) Response of Na⁺-dependent ATPase activities to the contaminant ammonia nitrogen in *Tapes philippinarum*: possible ATPase involvement in ammonium transport. *Arch Environ Contam Toxicol* 55 (1):49-56.
- [115] J Fang, R Wu, A Chan, C Yip, P Shin (2008) Influences of ammonia–nitrogen and dissolved oxygen on lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*: laboratory evaluation and field validation in Victoria Harbour, Hong Kong. *Mar Pollut Bull* 56 (12):2052-2058.
- [116] EL Thompson, DA Taylor, SV Nair, G Birch, R Coleman, DA Raftos (2012) Optimal acclimation periods for oysters in laboratory-based experiments. *J Molluscan Stud*:eys012.
- [117] A Neori, T Chopin, M Troell, AH Buschmann, GP Kraemer, C Halling, M Shpigel, C Yarish (2004) Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231 (1-4):361-391.
- [118] AD Greiner, MB Timmons (1998) Evaluation of the nitrification rates of microbead and trickling filters in an intensive recirculating tilapia production facility. *Aquacult Eng* 18 (3):189-200.
- [119] P Menasveta, T Panritdam, P Sihanonth, S Powtongsook, B Chuntapa, P Lee (2001) Design and function of a closed, recirculating seawater system with denitrification for the culture of black tiger shrimp broodstock. *Aquacult Eng* 25 (1):35-49.
- [120] J-K Seo, I-H Jung, M-R Kim, BJ Kim, S-W Nam, S-K Kim (2001) Nitrification performance of nitrifiers immobilized in PVA (polyvinyl alcohol) for a marine recirculating aquarium system. *Aquacult Eng* 24 (3):181-194.

- [121] L-F Pedersen, R Oosterveld, PB Pedersen (2015) Nitrification performance and robustness of fixed and moving bed biofilters having identical carrier elements. *Aquacult Eng* 65:37-45.
- [122] M von Ahnen, L-F Pedersen, PB Pedersen, J Dalsgaard (2015) Degradation of urea, ammonia and nitrite in moving bed biofilters operated at different feed loadings. *Aquacult Eng* 69:50-59.
- [123] BM Gonzalez-Silva, KR Jonassen, I Bakke, K Østgaard, O Vadstein (2016) Nitrification at different salinities: Biofilm community composition and physiological plasticity. *Water Res* 95:48-58.
- [124] Z Huang, X Song, X Li, R Wan, D Dong, R Shi, J Zhai (2016) Analysis of microbial diversity of submerged biofilters in recirculating aquaculture system (RAS) for grouper (*Epinephelus moara*) based on high-throughput DNA sequencing *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* 32 (1):242-247.
- [125] AB Hooper, KR Terry (1973) Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J Bacteriol* 115 (2):480-485.
- [126] A Schuenhoff, M Shpigel, I Lupatsch, A Ashkenazi, FE Msuya, A Neori (2003) A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture* 221 (1):167-181.
- [127] M Piriz, M Eyra, C Rostagno (2003) Changes in biomass and botanical composition of beach-cast seaweeds in a disturbed coastal area from Argentine Patagonia. *J Appl Phycol* 15 (1):67-74.
- [128] GN Casas, ML Piriz, ER Parodi (2008) Population features of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae: Laminariales) in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 88 (1):21-28.
- [129] V Teso, G Bigatti, G Casas, ML Piriz, P Penchaszadeh (2009) Do native grazers from Patagonia, Argentina, consume the invasive kelp *Undaria pinnatifida*? *Rev Mus Argent Cienc Nat Nueva Ser* 11 (1):7-14.
- [130] ME Rechimont (2011) *Patrón de distribución y abundancia de invertebrados bentónicos en costas del Golfo Nuevo.*, Universidad Nacional de la Patagonia., Puerto Madryn, Argentina
- [131] R Langton, K Haines, R Lyon (1977) Ammonia-nitrogen production by the bivalve mollusc *Tapes japonica* and its recovery by the red seaweed *Hypnea musciformis* in a tropical mariculture system. *Helgol Wiss Meeresunters* 30 (1-4):217-229.
- [132] S Ellner, A Neori, MD Krom, K Tsai, MR Easterling (1996) Simulation model of recirculating mariculture with seaweed biofilter: development and experimental tests of the model. *Aquaculture* 143 (2):167-184.
- [133] JD Strickland, TR Parsons (1972), *A practical handbook of seawater analysis. Segunda edición*, Fisheries Research Board of Canada in SearchWorks catalog, Ottawa, Canadá.

- [134] TR Parsons (2013), *A manual of chemical & biological methods for seawater analysis*, Pergamon Press, Nueva York, Estados Unidos de América.
- [135] M Zepka Baumgarten, JM Rocha, H Niencheski (1996), *Manual de análisis en oceanografía química*, FURG, Río Grande, Brasil.
- [136] K Burnham, D Anderson (2002), *Model selection and inference: a practical information-theoretic approach. Segunda Edición*, Springer-Verlag.
- [137] R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015.
- [138] J Navarro, C Gonzalez (1998) Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture* 167 (3):315-327.
- [139] JM Navarro (2001), Ciencia y acuicultura. Fisiología energética de pectínidos Iberoamericanos, En: *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica*, (Ed: AN Maeda-Martinez), Limusa, Distrito Federal, México, p. 61–76.
- [140] BA MacDonald, VM Bricelj, SR Shumway (2006), Physiology: energy acquisition and utilization, En: *Scallops: biology, ecology, aquaculture, and fisheries. Segunda edición*, (Ed: SE Shumway, GJ Parsons), Developments in aquaculture and fisheries science. Elsevier, Oxford, Reino Unido, p. 123-227.
- [141] G Soria, G Merino, E von Brand (2007) Effect of increasing salinity on physiological response in juvenile scallops *Argopecten purpuratus* at two rearing temperatures. *Aquaculture* 270 (1):451-463.
- [142] HM Jansen, Ø Strand, M Verdegem, A Smaal (2012) Accumulation, release and turnover of nutrients (CNP-Si) by the blue mussel *Mytilus edulis* under oligotrophic conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 416:185-195.
- [143] CE Epifanio, RF Srna (1975) Toxicity of ammonia, nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Mar Biol* 33 (3):241-246.
- [144] W Cheng, I-S Hsiao, J-C Chen (2004) Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 17 (3):193-202.
- [145] PL Cahill, CL Hurd, M Lokman (2010) Keeping the water clean — Seaweed biofiltration outperforms traditional bacterial biofilms in recirculating aquaculture. *Aquaculture* 306 (1-4):153-159.
- [146] AI Torres, MN Gil, JL Esteves (2004) Nutrient uptake rates by the alien alga *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta)(Nuevo Gulf, Patagonia, Argentina) when exposed to diluted sewage effluent. *Hydrobiologia* 520 (1-3):1-6.
- [147] MN Gil, AI Torres, JL Esteves (2005) Uptake of sewage derived nitrogen by *Ulva rigida* (Chlorophyceae) in Bahía Nueva (Golfo Nuevo, Patagonia, Argentine). *Hydrobiologia* 532:39-43.

- [148] M Krom, S Ellner, J Van Rijn, A Neori (1995) Nitrogen and phosphorus cycling and transformations in a prototype 'non-polluting' integrated mariculture system, Eilat, Israel. *Mar Ecol Prog Ser* 118 (1):25-36.
- [149] Y Mao, H Yang, Y Zhou, N Ye, J Fang (2009) Potential of the seaweed *Gracilaria lemaneiformis* for integrated multi-trophic aquaculture with scallop *Chlamys farreri* in North China. *J Appl Phycol* 21 (6):649-656.
- [150] ANZECC/ARMCANZ (2000), Australian and New Zealand Guidelines for fresh and marine water quality, En: *Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand*, (Artarmon, Australia).
- [151] GE Batley, SL Simpson (2009) Development of guidelines for ammonia in estuarine and marine water systems. *Mar Pollut Bull* 58 (10):1472-1476.
- [152] USEPA (1989) Ambient water quality criteria for ammonia (saltwater) EPA 440/5-88-004. *Washington, DC: US Environmental Protection Agency Office of Water*.
- [153] GD Boardman, SM Starbuck, DB Hudgins, X Li, DD Kuhn (2004) Toxicity of ammonia to three marine fish and three marine invertebrates. *Environmental Toxicology: An International Journal* 19 (2):134-142.
- [154] CE Bower, DT Turner (1981) Accelerated nitrification in new seawater culture systems: effectiveness of commercial additives and seed media from established systems. *Aquaculture* 24:1-9.
- [155] MH Huesemann, AD Skillman, EA Crecelius (2002) The inhibition of marine nitrification by ocean disposal of carbon dioxide. *Mar Pollut Bull* 44 (2):142-148.
- [156] S Spotte (1974), Capítulo 1 - Aquarium Techniques: Closed-System Marine Aquariums, En: *Experimental marine biology*, (Ed: RN Mariscal), Academic Press, ICN, London, p. 1-19.
- [157] RF Srna, A Baggaley (1975) Kinetic response of perturbed marine nitrification systems. *Journal (Water Pollution Control Federation)*:472-486.
- [158] M Poxton, S Allouse (1982) Water quality criteria for marine fisheries. *Aquacult Eng* 1 (3):153-191.
- [159] JP Truchot (1990) Respiratory and ionic regulation in invertebrates exposed to both water and air. *Annu Rev Physiol* 52 (1):61-74.
- [160] BA Seibel, PJ Walsh (2003) Biological impacts of deep-sea carbon dioxide injection inferred from indices of physiological performance. *J Exp Biol* 206 (4):641-650.
- [161] CE Zobell, DQ Anderson (1936) Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *The Biological Bulletin* 71 (2):324-342.
- [162] S Chen, J Ling, J-P Blancheton (2006) Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacult Eng* 34 (3):179-197.

- [163] P Harrison, L Druehl, K Lloyd, P Thompson (1986) Nitrogen uptake kinetics in three year-classes of *Laminaria groenlandica* (Laminariales: Phaeophyta). *Mar Biol* 93 (1):29-35.
- [164] S Campbell, J Bité, T Burridge (1999) Seasonal patterns in the photosynthetic capacity, tissue pigment and nutrient content of different developmental stages of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) in Port Phillip Bay, South-Eastern Australia. *Bot Mar* 42 (3):231-242.
- [165] T Chopin, AH Buschmann, C Halling, M Troell, N Kautsky, A Neori, GP Kraemer, JA Zertuche-González, C Yarish, C Neefus (2001) Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *J Phycol* 37 (6):975-986.
- [166] YT Moustafa, G Bougaran, M Callier, J-P Blancheton (2014) Bio-physiological response of biofilter algal candidate *Ulva* sp. to different nitrogen forms and fluxes. *International journal of plant physiology and biochemistry* 6 (7):71-79.
- [167] A Neori (1996) The type of N-supply (ammonia or nitrate) determines the performance of seaweed biofilters integrated with intensive fish culture. *Isr J Aquacult/Bamidgeh* 48 (1):19-27.
- [168] CS Lobban, PJ Harrison, MJ Duncan (1985), *The physiological ecology of seaweeds*, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- [169] A Hatcher, J Grant, B Schofield (1997) Seasonal changes in the metabolism of cultured mussels (*Mytilus edulis* L.) from a Nova Scotian inlet: the effects of winter ice cover and nutritive stress. *J Exp Mar Biol Ecol* 217 (1):63-78.
- [170] B Bayne (1973) Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. *Netherlands Journal of Sea Research* 7:399-410.
- [171] ID Marsden, MA Weatherhead (1999) Shore-level induced variations in condition and feeding of the mussel *Perna canaliculus* from the east coast of the South Island, New Zealand. *N Z J Mar Freshwat Res* 33 (4):611-622.
- [172] P Mayzaud, R Conover (1988) O: N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine ecology progress series Oldendorf* 45 (3):289-302.
- [173] J Widdows, P Donkin, P Salkeld, J Cleary, D Lowe, S Evans, P Thomson (1984) Relative importance of environmental factors in determining physiological differences between two populations of mussels (*Mytilus edulis*). *Marine ecology progress series Oldendorf* 17 (1):33-47.
- [174] JM Shick, J Widdows, E Gnaiger (1988) Calorimetric studies of behavior, metabolism and energetics of sessile intertidal animals. *Am Zool* 28 (1):161-181.
- [175] J Widdows, J Shick (1985) Physiological responses of *Mytilus edulis* and *Cardium edule* to aerial exposure. *Mar Biol* 85 (3):217-232.
- [176] U Labarta, MJ Fernández-Reiriz, JM Babarro (1997) Differences in physiological energetics between intertidal and raft cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser* 152:167-173.
- [177] C Peterson, R Black (1988) Responses of growth to elevation fail to explain vertical zonation of suspension-feeding bivalves on a tidal flat. *Oecologia* 76 (3):423-429.

- [178] L Freites, MJ Fernández-Reiriz, U Labarta (2002) Lipid classes of mussel seeds *Mytilus galloprovincialis* of subtidal and rocky shore origin. *Aquaculture* 207 (1-2):97-111.
- [179] K Arranz, U Labarta, MJ Fernández-Reiriz, E Navarro (2016) Allometric size-scaling of biometric growth parameters and metabolic and excretion rates. A comparative study of intertidal and subtidal populations of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Hydrobiologia* 772 (1):261-275.
- [180] JM Babarro, MJ Fernández-Reiriz, U Labarta (2000) Feeding behavior of seed mussel *Mytilus galloprovincialis*: environmental parameters and seed origin. *J Shellfish Res* 19 (1):195-201.
- [181] KB Storey, JM Storey (1990) Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *The Quarterly Review of Biology* 65 (2):145-174.
- [182] AP Camacho, U Labarta, R Beiras (1995) Growth of mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis*) on cultivation rafts: influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability. *Aquaculture* 138 (1-4):349-362.
- [183] JM Babarro, U Labarta, MJ Fernández-Reiriz (2003) Growth patterns in biomass and size structure of *Mytilus galloprovincialis* cultivated in the Ría de Arousa (north-west Spain). *J Mar Biol Assoc UK* 83 (1):151-158.
- [184] LM Dickie, P Boudreau, K Freeman (1984) Influences of stock and site on growth and mortality in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Can J Fish Aquat Sci* 41 (1):134-140.
- [185] PD Rawson, TJ Hilbish (1991) Genotype-environment interaction for juvenile growth in the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Evolution* 45 (8):1924-1935.
- [186] R Conover, E Corner (1968) Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. *J Mar Biol Assoc UK* 48 (1):49-75.
- [187] S Zhu, S Chen (2001) Impacts of Reynolds number on nitrification biofilm kinetics. *Aquacult Eng* 24 (3):213-229.
- [188] J Colt, J Lamoureux, R Patterson, G Rogers (2006) Reporting standards for biofilter performance studies. *Aquacult Eng* 34 (3):377-388.
- [189] L Hargrove, P Westerman, T Losordo (1996) Nitrification in three-stage and single-stage floating bead biofilters in a laboratory-scale recirculating aquaculture system. *Aquacult Eng* 15 (1):67-80.
- [190] SJ Campbell (1999) Uptake of ammonium by four species of macroalgae in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Mar Freshw Res* 50 (6):515-522.
- [191] J Tomasso (1994) Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev Fish Sci* 2 (4):291-314.
- [192] JC Widman, SL Meseck, G Sennefelder, DJ Veilleux (2008) Toxicity of un-ionized ammonia, nitrite, and nitrate to juvenile bay scallops, *Argopecten irradians irradians*. *Arch Environ Contam Toxicol* 54 (3):460-465.

- [193] B Bayne (1973) Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. *J Mar Biol Assoc UK* 53 (01):39-58.
- [194] IM Heisterkamp, A Schramm, LH Larsen, NB Svenningsen, G Lavik, D de Beer, P Stief (2013) Shell biofilm-associated nitrous oxide production in marine molluscs: processes, precursors and relative importance. *Environ Microbiol* 15 (7):1943-1955.
- [195] Y Zhen, J Aili, W Changhai (2010) Oxygen consumption, ammonia excretion, and filtration rate of the marine bivalve *Mytilus edulis* exposed to methamidophos and omethoate. *Mar Freshwat Behav Physiol* 43 (4):243-255.
- [196] L Yang, L-S Chou, WK Shieh (2001) Biofilter treatment of aquaculture water for reuse applications. *Water Res* 35 (13):3097-3108.
- [197] R Crab, Y Avnimelech, T Defoirdt, P Bossier, W Verstraete (2007) Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270 (1):1-14.
- [198] SA V.B. (2005) Skalar Methods - Analysis: Nitrate + Nitrite - Catnr. 461-031+DIAMOND issue 081505/MH/99235956. Breda (The Netherlands).10.
- [199] SJ Osoro, NA Lagos, V San Martin, PH Manríquez, CA Vargas, R Torres, JM Navarro, MJ Poupin, GS Saldías, MA Lardies (2017) Plasticity and inter-population variability in physiological and life-history traits of the mussel *Mytilus chilensis*: A reciprocal transplant experiment. *J Exp Mar Biol Ecol* 490:1-12.
- [200] A Mallet, C Carver, S Coffen, K Freeman (1987) Winter growth of the blue mussel *Mytilus edulis* L.: importance of stock and site. *J Exp Mar Biol Ecol* 108 (3):217-228.
- [201] JM Spitzer (1937) Physiologisch-oekologische Untersuchungen über den Exkretstoffwechsel der Mollusken. *Zoolfb* 4:57-96.
- [202] W Potts (1967) Excretion in the molluscs. *Biological Reviews* 42 (1):1-41.
- [203] I Gestoso, F Arenas, C Olabarria (2016) Ecological interactions modulate responses of two intertidal mussel species to changes in temperature and pH. *J Exp Mar Biol Ecol* 474:116-125.
- [204] I Okumus (1993) *Evaluation of suspended mussel (Mytilus edulis L.) culture and integrated experimental mariculture with salmon in Scottish sea lochs*. University of Stirling, Escocia
- [205] J Widdows (1985), Physiological measurements., En: *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*, (Ed: BL Bayne, DA Brown, K Burns et al.), Praeger, New York, USA., p. 3-45.
- [206] S Cheung, RY Cheung (1995) Effects of heavy metals on oxygen consumption and ammonia excretion in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Mar Pollut Bull* 31 (4-12):381-386.
- [207] S Lefebvre, C Bacher, A Meuret, J Hussenot (2001) Modelling nitrogen cycling in a mariculture ecosystem as a tool to evaluate its outflow. *Estuar Coast Shelf Sci* 52 (3):305-325.

- [208] Y Sato, T Hirano, K Niwa, T Suzuki, N Fukunishi, T Abe, S Kawano (2016) Phenotypic differentiation in the morphology and nutrient uptake kinetics among *Undaria pinnatifida* cultivated at six sites in Japan. *J Appl Phycol* 28 (6):3447-3458.
- [209] MC Gauna, JF Escobar, M Odorisio, EJ Cáceres, ER Parodi (2016) Spatial and temporal variation in algal epiphyte distribution on *Ulva* sp.(Ulvales, Chlorophyta) from northern Patagonia in Argentina. *Phycologia* 56 (2):125-135.
- [210] LC Ajjabi, M Abaab, R Segni (2018) The red macroalga *Gracilaria verrucosa* in co-culture with the Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis*: productivity and nutrient removal performance. *Aquacult Int* 26 (1):253-266.
- [211] C Crossland, J Marshall Crossland (2008) ASEAN Marine Water Quality. Management Guidelines and Monitoring Manual. Parte I. *Australian Marine Science and Technology Ltd (AMSAT)*:444 pp.
- [212] Canadian Council of Ministers of the Environment (2003) Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: nitrate ion. *Winnipeg, Canada: CCMI*.
- [213] A Alonso (2005) *Valoración de la degradación ambiental y efectos ecotoxicológicos sobre la comunidad de macroinvertebrados bentónicos en la cabecera del río Henares*. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares (Madrid), España
- [214] Canadian Council of Ministers of the Environment (2012) Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life.
- [215] S Sagert, DK Jensen, P Henriksen, T Rieling, H Schubert (2005) Integrated ecological assessment of Danish Baltic Sea coastal areas by means of phytoplankton and macrophytobenthos. *Estuar Coast Shelf Sci* 63 (1-2):109-118.
- [216] PM Glibert (2016) Margalef revisited: a new phytoplankton mandala incorporating twelve dimensions, including nutritional physiology. *Harmful Algae* 55:25-30.
- [217] C Bunse, J Pinhassi (2017) Marine bacterioplankton seasonal succession dynamics. *Trends Microbiol* 25 (6):494-505.
- [218] T Wyatt (2014) Margalef's mandala and phytoplankton bloom strategies. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 101:32-49.
- [219] DM Anderson, AD Cembella, GM Hallegraeff (2012) Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Ann Rev Mar Sci* 4:143-176.
- [220] E Granéli, JT Turner (2006), *Ecology of harmful algae*, Springer, Países Bajos.
- [221] B Reguera, L Velo-Suárez, R Raine, MG Park (2012) Harmful Dinophysis species: A review. *Harmful Algae* 14:87-106.
- [222] B Reguera, R Alonso-Rodríguez, A Moreira, S Méndez (2011) Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas. COI de UNESCO y OIEA, Paris y Viena 2011. Manuales y Guías de la COI, 59 2011.

- [223] F Taylor, P Harrison (2002) Harmful algal blooms in western Canadian coastal waters. *Harmful algal blooms in the PICES region of the North Pacific PICES Scientific Report (23)*:77-88.
- [224] E Berdalet, M Montresor, B Reguera, S Roy, H Yamazaki, A Cembella, R Raine (2017) Harmful algal blooms in fjords, coastal embayments, and stratified systems: Recent progress and future research. *Oceanography* 30 (1):46-57.
- [225] C Hernández, P Díaz, C Molinet, M Seguel (2016) Exceptional climate anomalies and northwards expansion of paralytic shellfish poisoning outbreaks in southern Chile. *Harmful Algae News* 54:1-2.
- [226] TJ Smayda (1997) Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol Oceanogr* 42 (5part2):1137-1153.
- [227] A Zingone, HO Enevoldsen (2000) The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast Manage* 43 (8):725-748.
- [228] D Rubio, L Roa, D Soto, F Velasquez, N Gregorcic, J Soto, M Martinez, A Kalergis, A Vasquez (2015) Purification and characterization of saxitoxin from *Mytilus chilensis* of southern Chile. *Toxicon* 108:147-153.
- [229] FAO (2005), 2 Intoxicación Paralítica por Mariscos (PSP), En: *Biotoxinas Marinas*, (Ed: FAO), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia, p. 5-52.
- [230] S Hall, G Strichartz, E Moczydlowski, A Ravindran, PB Reichardt (1990), Capítulo 3 - The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology, En: *Marine Toxins: Sources, Chemistry and Pharmacology*, (Ed: S Hall, G Strichartz), American Chemical Society Publications, Washington, DC, p. 29-65.
- [231] WW Carmichael (1994) The toxins of cyanobacteria. *Sci Am* 270 (1):78-86.
- [232] J Oyaneder Terrazas, HR Contreras, C García (2017) Prevalence, Variability and Bioconcentration of Saxitoxin-Group in Different Marine Species Present in the Food Chain. *Toxins* 9 (6):190.
- [233] M Wiese, PM D'agostino, TK Mihali, MC Moffitt, BA Neilan (2010) Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar Drugs* 8 (7):2185-2211.
- [234] FAO/WHO (2016), *Technical paper on Toxicity Equivalency Factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs*, Food and Agriculture Organization of the United Nation. World Health Organization, Roma, Italia.
- [235] KD Cusick, GS Saylor (2013) An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: Genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Mar Drugs* 11 (4):991-1018.
- [236] AP Thottumkara, WH Parsons, J Du Bois (2014) Saxitoxin. *Angew Chem Int Ed Engl* 53 (23):5760-5784.

- [237] D-Z Wang, S-F Zhang, Y Zhang, L Lin (2016) Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: A molecular overview. *J Proteom* 135:132-140.
- [238] JM Navarro, K González, B Cisternas, JA López, OR Chaparro, CJ Segura, M Córdova, B Suárez-Isla, MJ Fernandez-Reiriz, U Labarta (2014) Contrasting physiological responses of two populations of the razor Clam *Tagelus dombeii* with different histories of exposure to Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). *Plos One* 9 (8):13 pp.
- [239] JM Navarro, W Labraña, OR Chaparro, B Cisternas, A Ortíz (2016) Physiological constraints in juvenile *Ostrea chilensis* fed the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Estuaries and Coasts* 39 (4):1133-1141.
- [240] JM Harding, R Mann, P Moeller, MS Hsia (2009) Mortality of the veined rapa whelk, *Rapana venosa*, in relation to a bloom of *Alexandrium monilatum* in the York River, United States. *J Shellfish Res* 28 (2):363-367.
- [241] M Helm, B Hepper, B Spencer, P Walne (1974) Lugworm mortalities and a bloom of *Gyrodinium aureolum* Hulburt in the eastern Irish Sea, autumn 1971. *J Mar Biol Assoc UK* 54 (4):857-869.
- [242] G Boalch (1979) The dinoflagellae bloom on the coast of south west England, August-September 1978. *J Mar Biol Assoc UK* 59 (2):515-517.
- [243] MP Lesser, SE Shumway (1993) Effects of toxic dinoflagellates on clearance rates and survival in juvenile bivalve molluscs. *J Shellfish Res* 12 (2):377-381.
- [244] SE Shumway (1990) A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J World Aquacult Soc* 21 (2):65-104.
- [245] VM Bricelj, SE Shumway (1998) Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev Fish Sci* 6 (4):315-383.
- [246] C García, F Pérez, C Contreras, D Figueroa, A Barriga, A López-Rivera, OF Araneda, HR Contreras (2015) Saxitoxins and okadaic acid group: accumulation and distribution in invertebrate marine vectors from Southern Chile. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32 (6):984-1002.
- [247] C Detree, G Núñez-Acuña, S Roberts, C Gallardo-Escárate (2016) Uncovering the complex transcriptome response of *Mytilus chilensis* against saxitoxin: Implications of harmful algal blooms on mussel populations. *PLoS one* 11 (10):1-20.
- [248] TK Hattenrath-Lehmann, RJ Ossiboff, CA Burnell, CD Rauschenberg, K Hynes, RL Burke, EM Bunting, K Durham, CJ Gobler (2017) The role of a PSP-producing *Alexandrium* bloom in an unprecedented diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) mortality event in Flanders Bay, New York, USA. *Toxicon* 129:36-43.
- [249] AM Gayoso, VK Fulco (2006) Occurrence patterns of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech populations in the Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina), with observations on ventral pore occurrence in natural and cultured cells. *Harmful Algae* 5 (3):233-241.

- [250] NG Montoya, VK Fulco, MO Carignan, JI Carreto (2010) Toxin variability in cultured and natural populations of *Alexandrium tamarense* from southern South America - Evidences of diversity and environmental regulation. *Toxicon* 56 (8):1408-1418.
- [251] SM Etheridge (2010) Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* 56 (2):108-122.
- [252] SE Shumway, TL Cucci (1987) The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquat Toxicol* 10 (1):9-27.
- [253] AD Turner, B Stubbs, L Coates, M Dhanji-Rapkova, RG Hatfield, AM Lewis, S Rowland-Pilgrim, A O'Neil, P Stubbs, S Ross (2014) Variability of paralytic shellfish toxin occurrence and profiles in bivalve molluscs from Great Britain from official control monitoring as determined by pre-column oxidation liquid chromatography and implications for applying immunochemical tests. *Harmful Algae* 31:87-99.
- [254] N Arnich, A Thébault (2018) Dose-response modelling of paralytic shellfish poisoning (PSP) in humans. *Toxins* 10 (4):141.
- [255] I Sunesen, AS Lavigne, A Goya, EA Sar (2014) Episodios de toxicidad en moluscos de aguas marinas costeras de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) asociados a algas toxígenas (marzo de 2008-marzo de 2013). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 49 (3):327-339.
- [256] N Montoya, R Akselman, M Carignan, J Carreto (2006) Pigment profile and toxin composition during a red tide of *Gymnodinium catenatum* Graham and *Myrionecta rubra* (Lohman) Jankowski in coastal waters off Mar del Plata, Argentina. *Afr J Mar Sci* 28 (2):199-202.
- [257] B Krock, CM Borel, F Barrera, U Tillmann, E Fabro, GO Almandoz, M Ferrario, JEG Cardona, BP Koch, C Alonso (2015) Analysis of the hydrographic conditions and cyst beds in the San Jorge Gulf, Argentina, that favor dinoflagellate population development including toxigenic species and their toxins. *J Mar Syst* 148:86-100.
- [258] N Santinelli, AV Sastre, JL Esteves (2002), Episodios de algas nocivas en la Patagonia Argentina, En: *Floraciones Aalgales nocivas en el Cono Sur Americano*, (Ed: EA Sar, ME Ferrario, B Reguera), Ministerio de Ciencia y Tecnología. Instituto Español de Oceanografía Vigo, Pontevedra, Madrid, España., p. 199-216.
- [259] U John, RW Litaker, M Montresor, S Murray, ML Brosnahan, DM Anderson (2014) Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist* 165 (6):779-804.
- [260] S Fraga, N Sampedro, J Larsen, Ø Moestrup, AJ Calado (2015) Arguments against the proposal 2302 by John & al. to reject the name *Gonyaulax catenella* (*Alexandrium catenella*). *Taxon* 64 (3):634-635.

- [261] RI Figueroa, A Cuadrado, A Stuken, F Rodriguez, S Fraga (2014) Ribosomal DNA organization patterns within the dinoflagellate genus *Alexandrium* as revealed by FISH: life cycle and evolutionary implications. *Protist* 165 (3):343-363.
- [262] VA Guinder, U Tillmann, B Krock, A Delgado, T Krohn, J Garzón Cardona, K Metfies, C López Abbate, R Silva, R Lara (2018) Plankton multiproxy analyses in the Northern Patagonian Shelf, Argentina: community structure, phycotoxins and characterization of *Alexandrium* strains. *Frontiers in Marine Science* 5:394.
- [263] DM Anderson, TJ Alpermann, AD Cembella, Y Collos, E Masseret, M Montresor (2012) The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14:10-35.
- [264] L Pérez, N Santinelli, V Sastre, A Pérez, R Peralta, M Bergalio (2013) Morfología y presencia estacional de *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech en estaciones costeras del Golfo San Jorge (Patagonia, Argentina). *Naturalia Patagónica* 6:50-60.
- [265] JM Burkholder, RV Azanza, Y Sako (2006), Capítulo 5 The Ecology of Harmful Dinoflagellates, En: *Ecology of harmful algae*, (Ed: E Granéli, JT Turner), Springer, p. 53-66.
- [266] N Santinelli (2008) *Fitoplancton de un ambiente costero sometido a perturbación antrópica: Bahía Nueva, Provincia de Chubut*. Universidad Nacional San Juan Bosco, Trelew. Argentina
- [267] AV Sastre, NH Santinelli, ME Solís, Pérez, L.B., S Díaz Ovejero, L Gracia Villalobos, A Cadaillón, VC D'Agostino (2018), Harmful marine microalgae in coastal waters of Chubut (Patagonia, Argentina), En: *Plankton ecology of the Southwestern Atlantic*, (Ed: MS Hoffmeyer, M Sabatini, FP Brandini, DL Calliari, NH Santinelli), Springer, p. 495-515.
- [268] JI Carreto, NG Montoya, R Akselman, R Negri, M Carignan, DA Cucchi Colleoni (2004) *Differences in the PSP Toxin Profiles of Mytilus edulis during spring and autumn blooms of Alexandrium tamarense off Mar del Plata coast, Argentina*. Harmful Algae 2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, Florida, Estados Unidos de América, 6.
- [269] G Bigatti, MD De Vivar, M Cumplido, RN Vilela, M Avaro, V Sastre, M Gil (2017) Fatty acids and contaminants in edible marine gastropods from Patagonia. *J Mar Biol Assoc UK*:1-9.
- [270] A Andrade, A Branca, D Baulde (2004) Brote de Intoxicación por Veneno Paralizante de Molusco.1-4.
- [271] D Baulde (2010) Brote de intoxicación por veneno paralizante de molusco. Enero 2010.:7 pp.
- [272] CA Elbusto, AC Ballabene de Rico, CM Campero, ÉE Ramirez, CR Villanueva (1981) Toxina paralizante de los moluscos del mar argentino. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 15 (3):447-456.

- [273] J Vecchio, O Gómez, J Orosco, J Tartaglione, G Gricman (1986) Intoxicación por veneno paralizante de moluscos (marea roja). *Medicina* 46 (6):705-708.
- [274] A Andrade, A Branca, D Baulde (2001) Brote de Intoxicación por Veneno Paralizante de Molusco.1-6.
- [275] D Baulde (2011) Brote de intoxicación por veneno paralizante de molusco. Diciembre 2011.:4 pp.
- [276] Departamento Provincial de Bromatología (2013) *Plan Provincial de Prevención y Control de Marea Roja*. Dirección de Salud Ambiental. Ministerio de Salud de la Provincia del Chubut. <http://www.chubut.gov.ar/portal/wp-organismos/marearaja/>. 2018
- [277] JL Esteves, N Santinelli, V Sastre, R Díaz, O Rivas (1992) A toxic dinoflagellate bloom and PSP production associated with upwelling in Golfo Nuevo, Patagonia, Argentina. *Hydrobiologia* 242 (2):115-122.
- [278] D Andrinolo, N Santinelli, S Otaño, V Sastre, N Lagos (1999) Paralytic shellfish toxin in mussels and *Alexandrium tamarense* at Valdes Peninsula, Chubut, Patagonia, Argentina Kinetics of a natural depuration. *Journal of Shellfish Research* 18 (1):203-209 p.
- [279] R Sharma, K Venkateshvaran, CS Purushothaman (2011) Bioaccumulation and depuration of paralytic shellfish toxin in *Perna viridis* and *Meretrix meretrix* from Mumbai, India. *Indian J Mar Sci* 40 (4):542-549.
- [280] I Novaczek, M Madhyastha, R Ablett (1992) Depuration of domoic acid from live blue mussels *Mytilus edulis*. *Can J Fish Aquat Sci* 49:312-318.
- [281] I Kacem, G Giménez Papiol, P de la Iglesia, J Diogène, B Hajjem, N Bouaïcha (2015) Comparative toxicity and Paralytic Shellfish Poisoning toxin profiles in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Oyster *Crassostrea gigas* collected from a Mediterranean lagoon in Tunisia: A food safety concern. *Int J Food Prop* 18 (5):1075-1085.
- [282] NG Montoya, MO Carignan, JI Carreto (2018), *Alexandrium tamarense/catenella* blooms in the Southwestern Atlantic: Paralytic shellfish toxin production and its trophic transference, En: *Plankton ecology of the southwestern atlantic*, (Ed: MS Hoffmeyer, M Sabatini, FP Brandini, DL Calliari, NH Santinelli), Springer, p. 453-476.
- [283] SAGPYA. Capítulo XXIII. Productos de la pesca 23.24 Reglamento sanitario de explotación y comercialización de moluscos bivalvos vivos para consumo humano directo. (2006) Resolución SAGPYA 829/2006. Decreto 4238/68
- [284] M Fernández, A Míguez, E Cacho, A Martínez, J Diogéne, T Yasumoto (2002), Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas, En: *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*, (Ed: EA Sar, ME Ferrario, B Reguera), Ministerio de Ciencia y Tecnología. Instituto Español de Oceanografía Vigo, Pontevedra, Madrid, España., p. 77-120.

- [285] Y Oshima (1995), Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxin in marine organisms, En: *Harmful Marine Algal Blooms*, (Ed: P Lassus, G Arzul, E Erard, P Gentien, C Marcaillou), Lavoisier Science Publishers, París, Francia, p. 475-480.
- [286] P Lassus, JM Fremy, M Ledoux, M Bardouil, M Bohec (1989) Patterns of experimental contamination by *Protogonyaulax tamarensis* in some French commercial shellfish. *Toxicon* 27 (12):1313-1321.
- [287] VM Bricelj, AD Cembella, D Laby (2014) Temperature effects on kinetics of paralytic shellfish toxin elimination in Atlantic surfclams, *Spisula solidissima*. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 103:308-317.
- [288] SE Shumway, S Sherman-Caswell, JW Hurst (1988) Paralytic shellfish poisoning in Maine: monitoring a monster. *J Shellfish Res* 7 (4):643-652.
- [289] K Sekiguchi, S Sato, T Ogata, S Kaga, M Kodama (2001) Accumulation and depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* fed *Alexandrium tamarense*. *Mar Ecol Prog Ser* 220:213-218.
- [290] CY Chen, HN Chou (2002) Fate of paralytic shellfish poisoning toxins in purple clam *Hiatula rostrata*, in outdoor culture and laboratory culture. *Mar Pollut Bull* 44 (8):733-738.
- [291] SE Shumway, SA Sherman, AD Cembella, R Selvin (1994) Accumulation of paralytic shellfish toxins by surfclams, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1897) in the Gulf of Maine: seasonal changes, distribution between tissues, and notes on feeding habits. *Nat Toxins* 2 (4):236-251.
- [292] P Lassus, M Ledoux, M Bardouil, M Bohec (1993) Influence of initial toxicity and extraction procedure on paralytic toxin changes in the mussel. *Toxicon* 31 (3):237-242.
- [293] C Velásquez, JM Navarro (2014) Feeding and intoxication–detoxification dynamics in two populations of the mussel *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) with different histories of exposure to paralytic shellfish poisoning (PSP). *Mar Freshwat Behav Physiol* 47 (3):185-195.
- [294] MI Reyero, N Santinelli, S Otaño, V Sastre, E Maroño, JM Franco, A Andrade (1998) PSP Profiles of molluscs and phytoplankton containing *Alexandrium tamarense* (Lebour) in two patagonian gulfs (Argentina). *Harmful Algae T Xunta de Galicia & IOC of UNESCO* 507 (508):1-4.
- [295] B Ben-Gigirey, ML Rodriguez-Velasco, A Otero, JM Vieites, AG Cabado (2012) A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish. *Toxicon* 60 (5):864-873.
- [296] AD Turner, S Tarnovius, D Medina, M Salhi (2015) Use of a liquid chromatographic method for assessment of paralytic shellfish poisoning toxin profiles in mussels and clams from Uruguay. *J Shellfish Res* 34 (3):1129-1140.
- [297] K Ichimi, T Suzuki, M Yamasaki (2001) Non-selective retention of PSP toxins by the mussel *Mytilus galloprovincialis* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicon* 39 (12):1917-1921.

- [298] T Suzuki, K Ichimi, Y Oshima, T Kamiyama (2003) Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin profiles and short-term detoxification kinetics in mussels *Mytilus galloprovincialis* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 2 (3):201-206.
- [299] LM Botana, A Alfonso, MR Vieytes, MC Louzao, AM Botana, C Vale, N Vilariño (2017) Determination of Saxitoxin, Tetrodotoxin and Common Phycotoxins. *Analysis of Food Toxins and Toxicants, 2 Volume Set*:431.
- [300] KS Tan, J Ransangan (2015), Factors Influencing the Toxicity, Detoxification and Biotransformation of Paralytic Shellfish Toxins, En: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, (Ed: DM Whitacre), Springer, p. 1-25.
- [301] JI Carreto, C ElBusto, H Sancho, M Carignan, T Yasumoto, Y Oshima (1996) Comparative studies on paralytic shellfish toxin profiles of marine snails, mussels and an *Alexandrium tamarense* isolate from the Mar del Plata coast (Argentina). *Rev Invest Desarr Pesq* (10):101-107.
- [302] MJ Botelho, C Vale, JG Ferreira (2015) Profiles of paralytic shellfish toxins in bivalves of low and elevated toxicities following exposure to *Gymnodinium catenatum* blooms in Portuguese estuarine and coastal waters. *Chemosphere* 138:1028-1036.
- [303] V Bricelj, J Lee, A Cembella (1991) Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Mar Ecol Prog Ser*:33-46.
- [304] JJ Sullivan (1983) *Paralytic Shellfish Poisoning: Analytical and Biochemical investigations.*, University of Washington., Seattle, Estados Unidos de América
- [305] S Sakamoto, S Sato, T Ogata, M Kodama (2001) Formation of intermediate conjugates in the reductive transformation of gonyautoxins to saxitoxins by thiol compounds. *Fish Sci* 66 (1):136-141.
- [306] V Bricelj, J Lee, A Cembella, D Anderson (1990) Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Prog Ser* 63 (2):177-188.
- [307] EA Smith, F Grant, CM Ferguson, S Gallacher (2001) Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Appl Environ Microbiol* 67 (5):2345-2353.
- [308] RW Kwong, W-X Wang, PK Lam, K Peter (2006) The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. *Aquat Toxicol* 80 (1):82-91.
- [309] C McLeod, N Dowsett, G Hallegraef, DT Harwood, B Hay, S Ibbott, N Malhi, S Murray, K Smith, J Tan (2017) Accumulation and depuration of paralytic shellfish toxins by Australian abalone *Haliotis rubra*: Conclusive association with *Gymnodinium catenatum* dinoflagellate blooms. *Food Control* 73:971-980.

- [310] C Molinet, E Niklitschek, M Seguel, P Díaz (2010) Trends of natural accumulation and detoxification of paralytic shellfish poison in two bivalves from the Northwest Patagonian inland sea. *Rev Biol Mar Oceanogr* 45 (2):195-204.
- [311] JI Carreto, NG Montoya, AC Colleoni, R Akselman (1998) *Alexandrium tamarense* blooms and shellfish toxicity in the Argentine Sea: a retrospective view. *Harmful microalgae*:131-134.
- [312] A Cembella (1998), Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae, En: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, (Ed: DM Anderson, A Cembella, GM Hallegraeff), NATO ASI Series, Berlin, p. 381 – 403.
- [313] J Winter (1973) The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuous automatic recording apparatus. *Mar Biol* 22 (4):317-328.
- [314] MJ Fernández-Reiriz, JM Navarro, A Contreras, U Labarta (2008) Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: Feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat Toxicol* 87 (4):245-251.
- [315] JM Navarro, AM Contreras, OR Chaparro (2008) Short-term feeding response of the mussel *Mytilus chilensis* exposed to diets containing the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Rev Chil Hist Nat* 81:41-49.
- [316] JM Navarro, AM Contreras (2010) An integrative response by *Mytilus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar Biol* 157 (9):1967-1974.
- [317] VM Bricelj, L Connell, K Konoki, SP MacQuarrie, T Scheuer, WA Catterall, VL Trainer (2005) Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434 (7034):763-767.
- [318] PA Villanueva, JM Navarro (2016) Pre-ingestive selection efficiency in two populations of the razor clam *Tagelus dombeii* with different histories of exposure to paralytic shellfish poisoning (PSP). *Mar Freshwat Behav Physiol* 49 (4):291-300.
- [319] A Moroño, J Franco, M Miranda, M Reyero, J Blanco (2001) The effect of mussel size, temperature, seston volume, food quality and volume-specific toxin concentration on the uptake rate of PSP toxins by mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *J Exp Mar Biol Ecol* 257 (1):117-132.
- [320] AY Escobedo-Lozano, N Estrada, F Ascencio, G Contreras, R Alonso-Rodriguez (2012) Accumulation, biotransformation, histopathology and paralysis in the Pacific calico scallop *Argopecten ventricosus* by the paralyzing toxins of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Mar Drugs* 10 (5):1044-1065.
- [321] JM Navarro, BL Aguila, F Machmar, OR Chaparro, AM Contreras (2011) Dynamic of intoxication and detoxification in juveniles of *Mytilus chilensis* (Bivalvia: Mytilidae) exposed to paralytic shellfish toxins. *Aquat Living Resour* 24 (01):93-98.

- [322] J Blanco, MI Reyero, J Franco (2003) Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 42 (7):777-784.
- [323] G Pizarro, C Garrido, C Zamora, C Alarcón, R Raimapo, P Salgado, H Pacheco, L Guzmán, B Paz, P Álvarez-Chaver (2015) Distribución de *Alexandrium catenella* y de toxinas paralizantes en el fitoplancton y mariscos entre el estrecho de magallanes y tierra del fuego (primavera 2010). *Revista Ciencia y Tecnología del Mar* 36:2013-2014.
- [324] JI Carreto, MO Carignan, NG Montoya (2001) Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *A. minutum*. *Mar Ecol Prog Ser* 223:49-60.
- [325] B Krock, CG Seguel, AD Cembella (2007) Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae* 6 (5):734-744.
- [326] L MacKenzie, M de Salas, J Adamson, V Beuzenberg (2004) The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: comparative morphology, toxicity and molecular genetics. *Harmful Algae* 3 (1):71-92.
- [327] M Asakawa, R Beppu, K Ito, M Tsubota, H Takayama, M Keisuke (2006) Accumulation of Paralytic Shellfish Poison (PSP) and biotransformation of its components in oysters *Crassostrea gigas* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *食品衛生学雑誌* 47 (1):28-32.
- [328] AD Cembella, SE Shumway, R Larocque (1994) Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal and spatial scales in natural populations. *J Exp Mar Biol Ecol* 180 (1):1-22.
- [329] AM Contreras, ID Marsden, MH Munro (2012) Physiological effects and biotransformation of PSP toxins in the New Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*. *J Shellfish Res* 31 (4):1151-1159.
- [330] RJ Pollero, ME Ré, RR Brenner (1979) Seasonal changes of the lipids of the mollusc *Chlamys tehuelcha*. *Comp Biochem Physiol* 64 (2):257-263.
- [331] I Uriarte (2008), Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile, En: *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile*, (Ed: A Lovatelli, A Farías, I Uriarte), FAO Actas de Pesca y Acuicultura., Roma, Italia, p. 61-75.
- [332] CORFO (2017) *Pogramas tecnológicos estratégicos: Creación de un "Consortio Tecnológico para la Acuicultura Oceánica" Capacidades Tecnológicas*. Corporación de Fomento de la Producción (CORFO). Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Gobierno de Chile. https://www.corfo.cl/sites/cpp/convocatorias/2017_1_consortio_tecnologico_para_la_acuicultura_oceanica. 2018

- [333] H Brattström, A Johanssen (1983) Ecological and regional zoogeography of the marine benthic fauna of Chile: Report no. 49 of the Lund University Chile Expedition 1948–49. *Sarsia* 68 (4):289-339.
- [334] JE Toro, MA Sanhueza, JE Winter, CM Senn, P Aguila, AM Vergara (1995) Environmental effects on the growth of the Chilean oyster *Ostrea chilensis* in five mariculture locations in the Chiloé Island, Southern Chile. *Aquaculture* 136 (1):153-164.
- [335] M Bagnara Vivanco, G Maltrain Donoso (2008), Descripción del sector mitilicultor en la región de Los Lagos, Chile: evolución y proyecciones, En: *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile*, (Ed: A Lovatelli, A Farías, I Uriarte), FAO Actas de Pesca y Acuicultura, Roma, Italia, p. 189–198.
- [336] EA Díaz (2010), *Mitílidos en la Región de Los Lagos. Condiciones de trabajo en la industria del chorito*, Dirección del Trabajo. Departamento de estudios. Gobierno de Chile, Santiago, Chile.
- [337] M Seguel (2008), Manejo de cultivos bivalvos contaminados con marea roja., En: *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile*, (Ed: A Lovatelli, A Farías, I Uriarte), FAO Actas de Pesca y Acuicultura., Roma, p. 309–316.
- [338] P Muñoz (1985) Revisión taxonómica de los dinoflagelados de Chile. *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 21 (1):31-60.
- [339] N Lagos (2003) Paralytic shellfish poisoning phycotoxins: occurrence in South America. *Comments Toxicol* 9:1-19.
- [340] L Guzmán, H Pacheco, G Pizarro, C Alarcón (2002), *Alexandrium catenella* y veneno paralizante de los mariscos en Chile, En: *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*, (Ed: EA Sar, ME Ferrario, B Reguera), Ministerio de Ciencia y Tecnología. Instituto Español de Oceanografía Vigo, Pontevedra, Madrid, España, p. 235-255.
- [341] C Molinet, A Lafon, G Lembeye, CA Moreno (2003) Patrones de distribución espacial y temporal de floraciones de *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech 1985, en aguas interiores de la Patagonia noroccidental de Chile. *Rev Chil Hist Nat* 76 (4):681-698.
- [342] C García, P Mardones, A Sfeir, N Lagos (2004) Simultaneous presence of paralytic and diarrhetic shellfish poisoning toxins in *Mytilus chilensis* samples collected in the Chiloe Island, Austral Chilean fjords. *Biol Res* 37 (4):721-731.
- [343] GLOBEFISH (2017) *Production for bivalves lower in 2016*. GLOBEFISH - Analysis and information on world fish trade. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/887775/>. 2018

- [344] GLOBEFISH (2017) *Prices of bivalves sky high. Mussels*. GLOBEFISH - Analysis and information on world fish trade. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/1053835/>. 2018
- [345] FAO (2018), *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- [346] N Lagos, M Rutman, J Blamey, MP Ocaranza, M Chiong, JP Hinrichsen, C Lopez (2001) *Procedure for detoxification of shellfish, contaminated with paralytic shellfish toxins*. US 6,171,626 B1. United States Patent.
- [347] JF Lawrence, M Maher, W Watson-Wright (1994) Effect of cooking on the concentration of toxins associated with paralytic shellfish poison in lobster hepatopancreas. *Toxicon* 32 (1):57-64.
- [348] C-K Wong, P Hung, KLH Lee, T Mok, K-M Kam (2009) Effect of steam cooking on distribution of paralytic shellfish toxins in different tissue compartments of scallops *Patinopecten yessoensis*. *Food Chem* 114 (1):72-80.
- [349] RENAPRA (2009) Enfermedades transmitidas por alimentos. Intoxicación Paralítica por Moluscos.
- [350] A Reboreda, J Lago, MJ Chapela, JM Vieites, LM Botana, A Alfonso, AG Cabado (2010) Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon* 55 (2-3):235-243.
- [351] W Xie, X Liu, X Yang, C Zhang, Z Bian (2013) Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisoning toxins in the oyster *Ostrea rivularis* Gould—Chitosan facilitates the toxin depuration. *Food Control* 30 (2):446-452.
- [352] GAF Robert (1992), *Chitin Chemistry*, The Macmillan press, Londres.
- [353] ES de Alvarenga (2011), Capítulo 5 - Characterization and properties of chitosan, En: *Biotechnology of biopolymers*, (Ed: M Elnashar), InTech, p. 91-109.
- [354] M Rinaudo (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science* 31 (7):603-632.
- [355] F Al Sagheer, M Al-Sughayer, S Muslim, MZ Elsabee (2009) Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydr Polym* 77 (2):410-419.
- [356] S Lu, X Song, D Cao, Y Chen, K Yao (2004) Preparation of water-soluble chitosan. *J Appl Polym Sci* 91 (6):3497-3503.
- [357] JD Giraldo (2015) *Un futuro para la quitina y el quitosano*. <https://www.researchgate.net/publication/277302279>. 2018
- [358] FAO (2016), *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.

- [359] MNR Kumar (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 46 (1):1-27.
- [360] JB Dima (2013) *Procesamiento integral de las especies patagónicas de cangrejos marinos de valor comercial Ovalipes trimaculatus y Platyxanthus patagonicus*. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
- [361] S Mao, X Shuai, F Unger, M Simon, D Bi, T Kissel (2004) The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. *Int J Pharm* 281 (1):45-54.
- [362] C Pillai, W Paul, CP Sharma (2009) Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science* 34 (7):641-678.
- [363] MM Beppu, CC Santana (2002) Influence of calcification solution on in vitro chitosan mineralization. *Materials Research* 5 (1):47-50.
- [364] A Lavoie, J Noüe (1983) Harvesting microalgae with chitosan. *J World Aquacult Soc* 14 (1-4):685-694.
- [365] ME Badawy (2012) A new rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of a biopolymer chitosan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2012.
- [366] JB Dima, C Sequeiros, NE Zaritzky (2015) Hexavalent chromium removal in contaminated water using reticulated chitosan micro/nanoparticles from seafood processing wastes. *Chemosphere* 141:100-111.
- [367] J Widdows (1985), Physiological procedures, En: *The effects of stress and pollution on marine animals*, (Ed: B Bayne, p. 161-178.
- [368] J Coughlan (1969) The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar Biol* 2 (4):356-358.
- [369] RJ Conover (1966) Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol Oceanogr* 11:338-345.
- [370] JM Franco, P Fernández-Vila (1993) Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase High Performance Liquid Chromatography, with postcolumn reaction and Fluorimetric Detection. *Chromatographia* 35 (9-12):613-620.
- [371] M Bardouil, M Bohec, M Cormerais, S Bougrier, P Lassus (1993) Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Shellfish Res* 12 (2):417-422.
- [372] M Bardouil, M Bohec, S Bougrier, P Lassus, P Truquet (1996) Feeding responses of *Crassostrea gigas* (Thunberg) to inclusion of different proportions of toxic dinoflagellates in their diet. *Oceanol Acta* 19 (2):177-182.
- [373] MJ Fernández-Reiriz, JM Navarro, B Cisternas, JM Babarro, U Labarta (2013) Enzymatic digestive activity and absorption efficiency in *Tagelus dombeii* upon *Alexandrium catenella* exposure. *Helgol Mar Res* 67 (4):653-661.

- [374] JM Navarro, J Widdows, OR Chaparro, A Ortíz, C Mellado, PA Villanueva (2018) Pre-ingestive selection capacity and endoscopic analysis in the sympatric bivalves *Mulinia edulis* and *Mytilus chilensis* exposed to diets containing toxic and non-toxic dinoflagellates. *PLoS one* 13 (2):e0193370.
- [375] D Wildish, P Lassus, J Martin, A Saulnier, M Bardouil (1998) Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 11 (1):35-43.
- [376] A Clement, A Aguilera, C Fuentes (2002) Análisis de marea roja en Archipiélago de Chiloé, contingencia verano 2002. *XXII Congreso de Ciencias del Mar*:28-30.
- [377] JM Navarro, C Duarte, PH Manríquez, MA Lardies, R Torres, K Acuña, CA Vargas, NA Lagos (2016) Ocean warming and elevated carbon dioxide: multiple stressor impacts on juvenile mussels from southern Chile. *ICES J Mar Sci* 73 (3):764-771.
- [378] JM Navarro, R Torres, K Acuña, C Duarte, PH Manríquez, M Lardies, NA Lagos, C Vargas, V Aguilera (2013) Impact of medium-term exposure to elevated pCO₂ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*. *Chemosphere* 90 (3):1242-1248.
- [379] AC Braga, C Camacho, A Marques, A Gago-Martínez, M Pacheco, PR Costa (2018) Combined effects of warming and acidification on accumulation and elimination dynamics of paralytic shellfish toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Res* 164:647-654.
- [380] A Aguilera-Belmonte, I Inostroza, JM Franco, P Riobó, PI Gómez (2011) The growth, toxicity and genetic characterization of seven strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated during the 2009 summer outbreak in southern Chile. *Harmful Algae* 12:105-112.
- [381] E Jaime, G Gerdts, B Luckas (2007) In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues. *Harmful Algae* 6 (3):308-316.
- [382] D Compagnon, G Lembeye, N Marcos, N Ruiz-Tagle, N Lagos (1998) Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the bivalve *Aulacomya ater* and two carnivorous gastropods *Concholepas concholepas* and *Argobuccinum ranelliformes* during an *Alexandrium catenella* bloom in southern Chile. *J Shellfish Res* 17 (1):67-73.
- [383] R Zamorano, M Marín, F Cabrera, D Figueroa, C Contreras, A Barriga, N Lagos, C García (2013) Determination of the variability of both hydrophilic and lipophilic toxins in endemic wild bivalves and carnivorous gastropods from the Southern part of Chile. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30 (9):1660-1677.
- [384] R Mann (1978) A comparison of morphometric, biochemical and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. *Energy and environmental stress in aquatic systems*:484-497.

- [385] M Bressan, MG Marin (1985) Seasonal variations in biochemical composition and condition index of cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) in the lagoon of Venice (North Adriatic). *Aquaculture* 48 (1):13-21.
- [386] Ib Okumuş, HP Stirling (1998) Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture* 159 (3-4):249-261.
- [387] D Zandee, J Kluytmans, W Zurburg, H Pieters (1980) Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Netherlands Journal of Sea Research* 14 (1):1-29.
- [388] E Orban, G Di Lena, T Navigato, I Casini, R Caproni, G Santaroni, G Giulini (2007) Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chem* 101 (3):1063-1070.
- [389] N De Vido de Mattio (1983) Composición química de la cholga *Aulacomya ater ater* (Molina). II. Variación estacional. *CENPAT Argentina Contribución* (73).
- [390] V Ventrella, M Pirini, A Pagliarani, F Trombetti, MP Manuzzi, AR Borgatti (2008) Effect of temporal and geographical factors on fatty acid composition of *M. galloprovincialis* from the Adriatic sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149 (2):241-250.
- [391] A Sokołowski, AS Bawazir, E Sokołowska, M Wołowicz (2010) Seasonal variation in the reproductive activity, physiological condition and biochemical components of the brown mussel *Perna perna* from the coastal waters of Yemen (Gulf of Aden). *Aquat Living Resour* 23 (02):177-186.
- [392] RA Cruz (1982) Variación mensual del índice de condición del molusco *Anadara tuberculosa* (Pelecypoda: Arcidae) en Punta Morales, Puntarenas, Costa Rica. *Rev Biol Trop* 30 (1).
- [393] BJ Lomovasky, G Malanga, J Calvo (2004) Seasonal changes in biochemical composition of the clam, *Eurhomalea exalbida* (bivalvia: veneridae), from the beagle channel, Argentina. *J Shellfish Res* 23 (1):81-88.
- [394] D Arrieche, B Licet, N García, C Lodeiros, A Prieto (2002) Índice de condición, gonádico y de rendimiento del mejillón marrón *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), del morro de Guarapo, Venezuela. *Interciencia* 27 (11):613-619.
- [395] I Dupčić Radić, M Carić, M Najdek-Dragić, N Jasprica, J Bolotin, M Peharda, A Bratoš Cetinić (2014) Biochemical and fatty acid composition of *Arca noae* (Bivalvia: Arcidae) from the Mali Ston Bay, Adriatic Sea. *Mediterr Mar Sci*:520-531.
- [396] D Gallardi, T Mills, S Donnet, CC Parrish, HM Murray (2017) Condition and biochemical profile of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) cultured at different depths in a cold water coastal environment. *J Sea Res* 126:37-45.

- [397] J Irisarri, M-J Fernández-Reiriz, U Labarta (2015) Temporal and spatial variations in proximate composition and Condition Index of mussels *Mytilus galloprovincialis* cultured in suspension in a shellfish farm. *Aquaculture* 435:207-216.
- [398] J Colombo (2014) *Relación entre la composición química y el ciclo reproductivo del mejillón Mytilus edulis platensis en el Golfo San Jorge.*, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Argentina
- [399] JA Robledo, M Santarem, P González Fernández, A Figueras Huerta (1995) Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture* 133 (3-4):311-322.
- [400] R Freitas, LR Pinto, M Sampaio, A Costa, M Silva, A Rodrigues, V Quintino, E Figueira (2012) Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuar Coast Shelf Sci* 110:43-53.
- [401] J Kluytmans, J Boot, R Oudejans, D Zandee (1985) Fatty acid synthesis in relation to gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol* 81 (4):959-963.
- [402] GE Napolitano, RJ Pollero, AM Gayoso, BA Macdonald, RJ Thompson (1997) Fatty acids as trophic markers of phytoplankton blooms in the Bahia Blanca estuary (Buenos Aires, Argentina) and in Trinity Bay (Newfoundland, Canada). *Biochem Syst Ecol* 25 (8):739-755.
- [403] B Bayne (1976), Aspects of reproduction in bivalve molluscs, En: *Estuarine Processes: Uses, Stresses, and Adaptation to the Estuary*, Elsevier, Plymouth, Inglaterra, p. 432-448.
- [404] G Pazikowska, A Szaniawska (1988) Variations in energy and lipid content in *Mytilus edulis* from the Gulf of Gdańsk. *Oceanologia* 25:99-107.
- [405] C Marcaillou, J Haure, F Mondeguer, A Courcoux, B Dupuy, C Pénisson (2010) Effect of food supply on the detoxification in the blue mussel, *Mytilus edulis*, contaminated by diarrhetic shellfish toxins. *Aquat Living Resour* 23 (3):255-266.
- [406] F Ruano, P Ramos, M Quaresma, NM Bandarra, IP Da Fonseca (2012) Evolution of fatty acid profile and condition index in mollusc bivalves submitted to different depuration periods. *Rev Port Cienc Vet* 107 (581-582):75-84.
- [407] A Blanco (2000), *Química biológica*, El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.
- [408] A Fernández, U Grienke, A Soler-Vila, F Guihéneuf, DB Stengel, D Tasdemir (2015) Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. *Food Chem* 177:43-52.
- [409] E Prato, A Danieli, M Maffia, F Biandolino (2010) Lipid and fatty acid compositions of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the Mar Grande of Taranto (Southern Italy): feeding strategies and trophic relationships. *Zool Stud* 49 (2):211-219.

- [410] SM Colombo, A Wacker, CC Parrish, MJ Kainz, MT Arts (2016) A fundamental dichotomy in long-chain polyunsaturated fatty acid abundance between and within marine and terrestrial ecosystems. *Environmental Reviews* 25 (2):163-174.
- [411] J Aizpun de Moreno, V Moreno, A Malaspina (1971) Estudio sobre el mejillón (*Mytilus platenis* d 'Orb) en explotación comercial del sector bonaerense, Mar Argentino. II. Ciclo anual en los principales componentes bioquímicos. *Documento Técnico FAO* 21:1-15.
- [412] PS Sastry (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24 (2):69-176.
- [413] B Valenzuela, K Nieto (2003) Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Revista chilena de pediatría* 74 (2):149-157.
- [414] FAO (2010), *Fats and fatty acids in human nutrition: report of an expert consultation*, Food and Agriculture Organization of the United Nation, Roma, Italia.
- [415] S Svensson (2003) Depuration of Okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture* 218 (1):277-291.
- [416] X Yan, T Yao, Y Zhang, Z Huo, Y Zhao, F Yang, G Zhang (2009) Effects of starvation and refeeding in winter on the growth, survival, and biochemical composition of different size *Ruditapes philippinarum*. *Ying yong sheng tai xue bao* 20 (12):3063-3069.
- [417] P Galvao, R Longo, JPM Torres, O Malm (2015) Estimating the potential production of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) reared in Three Tropical Bays by different methods of condition indices. *J Mar Biol*:1-11.
- [418] M Dubois, KA Gilles, JK Hamilton, Pt Rebers, F Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28 (3):350-356.
- [419] OH Lowry, NJ Rosebrough, AL Farr, RJ Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1):265-275.
- [420] N Zöllner, K Kirsch (1962) Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Z Gesamte Exp Med* 135 (6):545-561.
- [421] G Lepage, CC Roy (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27 (1):114-120.
- [422] S Budge, C Parrish, C McKenzie (2001) Fatty acid composition of phytoplankton, settling particulate matter and sediments at a sheltered bivalve aquaculture site. *Mar Chem* 76 (4):285-303.
- [423] Y Hong-Sheng, W Jian, Z Yi, W Ping, H Yi-Chao, Z Fu-Sui (2001) Impact of starvation on survival, meat condition and metabolism of *Chlamys farreri*. *Chin J Oceanol Limnol* 19 (1):51-56.

- [424] A Lucas, PG Beninger (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44 (3):187-200.
- [425] J Colombo, M Varisco, T Isola, C Croveto, E Rost, S Risso (2016) Composición química proximal y perfil de ácidos grasos del mejillón *Mytilus edulis* provenientes de cultivos y bancos naturales en el Golfo San Jorge, Argentina. *Rev Biol Mar Oceanogr* 51 (2):293-299.
- [426] S Baker, D Hornbach (2001) Seasonal metabolism and biochemical composition of two unionid mussels, *Actinonaias ligamentina* and *Amblema plicata*. *J Molluscan Stud* 67 (4):407-416.
- [427] P Dare, D Edwards (1975) Seasonal changes in flesh weight and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Conwy Estuary, North Wales. *J Exp Mar Biol Ecol* 18 (2):89-97.
- [428] J De Moreno, R Pollero, V Moreno, R Brenner (1980) Lipids and fatty acids of the mussel (*Mytilus platensis* d'Orbigny) from South Atlantic waters. *J Exp Mar Biol Ecol* 48 (3):263-276.
- [429] G Li, J Li, D Li (2010) Seasonal variation in nutrient composition of *Mytilus coruscus* from China. *J Agric Food Chem* 58 (13):7831-7837.
- [430] EL Allan, ST Ambrose, NB Richoux, PW Froneman (2010) Determining spatial changes in the diet of nearshore suspension-feeders along the South African coastline: stable isotope and fatty acid signatures. *Estuar Coast Shelf Sci* 87 (3):463-471.
- [431] SM Budge, CC Parrish (1998) Lipid biogeochemistry of plankton, settling matter and sediments in Trinity Bay, Newfoundland. II. Fatty acids. *Org Geochem* 29 (5-7):1547-1559.
- [432] J Dalsgaard, MS John, G Kattner, D Müller-Navarra, W Hagen (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv Mar Biol* 46:227-340.
- [433] PK Shin, KM Yip, W Xu, W Wong, SG Cheung (2008) Fatty acid as markers to demonstrating trophic relationships among diatoms, rotifers and green-lipped mussels. *J Exp Mar Biol Ecol* 357 (1):75-84.

ANEXO 1

Tabla 32. Perfil de ácidos grasos (FA) depuración *ex situ* Dex1. SFA: FA saturados; MUFA: FA monoinsaturados; PUFA: FA poliinsaturados. CCI: Control de Campo Inicial; FD: Fin de la Depuración y CCF: Control de Campo al Final de la Depuración.

	Dex1CCI		Dex1FD			Dex1CCF		
	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	$\mu\text{g g}^{-1}$ Media	DE	%	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	
SFA								
C14:0	282,74	3,07	386,45	70,50	2,81	443,84	2,67	
C15:0	79,01	0,86	115,16	23,37	0,84	128,28	0,77	
C16:0	ácido palmítico	896,92	9,73	1155,28	83,52	8,39	1236,44	7,45
C17:0		149,25	1,62	166,93	52,43	1,21	216,55	1,30
C18:0		462,59	5,02	431,69	98,36	3,13	565,12	3,40
C20:0		7,84	0,08	8,97	2,16	0,07	15,57	0,09
C21:0		2,24	0,02	3,32	0,39	0,02	5,02	0,03
C22:0		9,05	0,10	15,15	5,16	0,11	19,90	0,12
C23:0		9,79	0,11	14,55	4,32	0,11	17,34	0,10
C24:0		12,36	0,13	16,61	5,11	0,12	24,68	0,15
MUFA								
C14:1(n-5)		4,10	0,04	10,01	6,22	0,07	10,44	0,06
C15:1(n-5)		0,09	0,00	3,25	4,64	0,02	0,99	0,01
C16:1(n-7)cis	ácido palmitoleico	549,25	5,96	848,43	97,02	6,16	795,33	4,79
C17:1(n-7)		0,84	0,01	35,21	9,93	0,26	56,55	0,34
C18:1(n-9)cis	ácido oleico común	176,31	1,91	276,46	52,02	2,01	385,62	2,32
C18:1(n-9)trans		248,32	2,69	304,75	30,97	2,21	293,90	1,77
C20:1(n-7)		106,52	1,15	129,41	6,89	0,94	182,60	1,10
C20:1(n-9)cis	ácido eicosenoico	675,91	7,33	811,80	100,83	5,89	1051,80	6,34
C22:1(n-9)cis		17,73	0,19	23,25	1,38	0,17	24,68	0,15
C24:1(n-9c)		31,26	0,34	37,04	6,79	0,27	45,37	0,27
PUFA								
C18:2(n-6)cis	ácido linoleico	172,01	1,87	265,55	55,98	1,93	365,81	2,20
C18:3(n-6)	ácido linolénico	4,38	0,05	6,40	1,18	0,05	3,65	0,02
C18:4(n-3)		58,45	0,63	138,80	38,02	1,01	195,61	1,18
C20:4(n-3)		548,06	5,94	747,14	235,66	5,42	957,66	5,77
C20:4(n-6)	AA	255,69	2,77	206,58	25,84	1,50	187,39	1,13
C20:2(n-6)cis	ácido araquidónico	22,57	0,24	43,75	7,47	0,32	87,49	0,53

C20:5(n-3)	EPA ácido eicosapentaenoico	1624,66	17,62	2882,35	383,90	20,92	3188,81	19,21
C22:2(n-6)		792,33	8,59	879,69	237,09	6,39	915,54	5,52
C22:4(n-6)		84,46	0,92	121,81	60,40	0,88	112,38	0,68
C22:5(n-3)		274,71	2,98	565,11	137,77	4,10	653,28	3,94
C22:6(n-3)	DHA ácido docosahexaenoico	1500,62	16,27	2999,07	764,91	21,77	4272,37	25,74
Ac 5,13 docosadienoico		162,66	1,76	124,76	9,52	0,91	137,47	0,83
Total FA µg g-1		9222,76		13774,74	2282,8		16597,48	
SFA (%)		20,73		16,91			16,10	
MUFA (%)		19,63		18,19			17,15	
PUFA (%)		59,64		64,90			66,74	
Σ omega-3		4006,50	43,44	7332,47		53,23	9267,72	55,84
Σ omega-6		1331,46	14,44	1523,78		11,06	1672,26	10,08
C16:1(n-7c)/C16:0		0,61		0,73			0,64	
C22:6(n-3)/C20:5(n-3)		0,92		1,04			1,34	

Tabla 33. Perfil de ácidos grasos depuración *ex situ* Dex2. SFA: FA saturados; MUFA: FA monoinsaturados; PUFA: FA poliinsaturados. CCI: Control de Campo Inicial; FD: Fin de la Depuración y CCF: Control de Campo al Final de la Depuración.

		Dex2CCI		Dex2FD			Dex2CCF	
		$\mu\text{g g}^{-1}$	%	$\mu\text{g g}^{-1}$ Media	DE	%	$\mu\text{g g}^{-1}$	%
SFA								
C14:0		358,09	2,40	209,31	52,07	1,82	314,58	2,13
C15:0		131,39	0,88	91,89	16,05	0,80	120,51	0,82
C16:0	ácido palmítico	1154,30	7,73	907,03	103,63	7,88	1073,57	7,27
C17:0		214,16	1,43	151,04	17,16	1,31	240,82	1,63
C18:0		553,97	3,71	415,06	38,78	3,60	569,48	3,85
C20:0		13,49	0,09	6,83	0,80	0,06	10,01	0,07
C21:0		6,79	0,05	3,03	0,12	0,03	5,83	0,04
C22:0		19,33	0,13	11,77	0,65	0,10	25,05	0,17
C23:0		19,71	0,13	14,70	1,84	0,13	20,80	0,14
C24:0		22,42	0,15	16,09	0,71	0,14	24,53	0,17
MUFA								
C14:1(n-5)		4,69	0,03	1,62	0,36	0,01	6,32	0,04
C15:1(n-5)		0,67	0,00	0,19	0,09	0,00	1,65	0,01
C16:1(n-7)cis	ácido palmitoleico	689,31	4,62	504,26	156,23	4,38	518,37	3,51
C17:1(n-7)		53,30	0,36	23,82	18,27	0,21	29,35	0,20
C18:1(n-9)cis	ácido oleico común	358,85	2,40	229,42	41,94	1,99	265,21	1,79
C18:1(n-9)trans		278,79	1,87	227,19	61,51	1,97	290,77	1,97
C20:1(n-7)		135,26	0,91	121,85	47,02	1,06	138,91	0,94
C20:1(n-9)cis	ácido eicosenoico	1017,68	6,82	860,81	115,95	7,48	1090,24	7,38
C22:1(n-9)cis		21,60	0,14	12,66	5,89	0,11	17,92	0,12
C24:1(n-9c)		33,53	0,22	26,55	7,05	0,23	27,80	0,19
PUFA								
C18:2(n-6)cis	ácido linoleico	358,56	2,40	200,29	57,60	1,74	244,80	1,66
C18:3(n-6)	ácido linolénico	8,52	0,06	3,72	2,18	0,03	3,69	0,02
C18:4(n-3)		120,43	0,81	56,65	24,59	0,49	64,29	0,44
C20:4(n-3)		930,16	6,23	735,74	13,25	6,39	1202,91	8,14
C20:4(n-6)	AA ácido araquidónico	229,28	1,54	358,03	176,84	3,11	674,54	4,57
C20:2(n-6)cis		47,94	0,32	39,38	22,42	0,34	37,90	0,26

C20:5(n-3)	EPA ácido eicosapentaenoico	2506,63	16,80	1896,42	629,46	16,47	2072,07	14,02
C22:2(n-6)		846,62	5,67	859,50	79,03	7,46	1428,28	9,67
C22:4(n-6)		143,55	0,96	124,57	14,80	1,08	191,06	1,29
C22:5(n-3)		606,63	4,06	443,15	86,29	3,85	542,39	3,67
C22:6(n-3)	DHA ácido docosahexaenoico	3855,97	25,84	2735,98	622,88	23,76	3203,49	21,68
Ac 5,13 docosadienoico		182,87	1,23	227,30	50,96	1,97	318,93	2,16
Total FA µg g-1		14924,53		11515,82	1784,75		14776,05	
SFA (%)		16,71		15,93			16,28	
MUFA (%)		17,38		17,32			16,15	
PUFA (%)		65,91		66,75			67,57	
Σ omega-3		8019,83	53,74	5867,94		50,96	7085,14	47,95
Σ omega-6		1634,48	10,95	1585,49		13,77	2580,27	17,46
C16:1(n-7c)/C16:0		0,60		0,55			0,48	
C22:6(n-3)/C20:5(n-3)		1,54		1,48			1,55	

Tabla 34. Perfil de ácidos grasos depuración *ex situ* Dex3. SFA: FA saturados; MUFA: FA monoinsaturados; PUFA: FA poliinsaturados. CCI: Control de Campo Inicial; FD: Fin de la Depuración y CCF: Control de Campo al Final de la Depuración.

	Dex3CCI		Dex3FD			Dex3CCF		
	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	$\mu\text{g g}^{-1}$ Media	DE	%	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	
SFA								
C14:0	352,82	2,90	145,91	171,88	1,76	506,66	3,52	
C15:0	96,56	0,79	63,67	39,07	0,77	100,65	0,70	
C16:0	ácido palmítico	1136,27	9,33	946,51	173,54	11,40	1625,32	11,29
C17:0		174,35	1,43	165,83	15,09	2,00	166,07	1,15
C18:0		518,76	4,26	600,15	51,99	7,23	703,08	4,88
C20:0		12,82	0,11	8,74	2,19	0,11	20,94	0,15
C21:0		4,50	0,04	4,46	1,58	0,05	3,25	0,02
C22:0		16,65	0,14	12,22	4,30	0,15	18,99	0,13
C23:0		14,45	0,12	9,95	2,70	0,12	13,96	0,10
C24:0		17,86	0,15	13,67	4,20	0,16	17,91	0,12
MUFA								
C14:1(n-5)		6,22	0,05	4,51	7,08	0,05	12,66	0,09
C15:1(n-5)		4,69	0,04	3,96	1,90	0,05	8,93	0,06
C16:1(n-7)cis	ácido palmitoleico	697,32	5,73	319,09	407,56	3,84	974,19	6,77
C17:1(n-7)		0,38	0,00	8,94	15,48	0,11	33,44	0,23
C18:1(n-9)cis	ácido oleico común	210,33	1,73	92,53	74,95	1,11	394,16	2,74
C18:1(n-9)trans		303,25	2,49	216,17	97,58	2,60	393,67	2,73
C20:1(n-7)		145,92	1,20	111,33	59,95	1,34	196,59	1,37
C20:1(n-9)cis	ácido eicosenoico	845,88	6,95	654,43	207,63	7,88	1048,98	7,28
C22:1(n-9)cis		51,71	0,42	19,68	23,88	0,24	73,88	0,51
C24:1(n-9c)		42,31	0,35	15,35	13,52	0,18	42,27	0,29
PUFA								
C18:2(n-6)cis	ácido linoleico	219,90	1,81	80,26	30,08	0,97	307,95	2,14
C18:3(n-6)	ácido linolénico	6,79	0,06	53,49	4,44	0,64	10,55	0,07
C18:4(n-3)		99,07	0,81	12,12	19,14	0,15	116,38	0,81

C20:4(n-3)		654,96	5,38	420,23	143,79	5,06	621,22	4,31
C20:4(n-6)	AA ácido araquidónico	371,20	3,05	442,33	39,02	5,33	349,35	2,43
C20:2(n-6)cis		32,54	0,27	12,02	4,32	0,14	55,19	0,38
C20:5(n-3)	EPA ácido eicosapentaenoico	2323,81	19,09	1378,52	305,09	16,61	3079,03	21,38
C22:2(n-6)		917,42	7,53	775,07	314,70	9,34	819,84	5,69
C22:4(n-6)		179,68	1,48	126,18	16,85	1,52	89,29	0,62
C22:5(n-3)		447,24	3,67	266,53	62,11	3,21	443,90	3,08
C22:6(n-3)	DHA ácido docosahexaenoico	2042,91	16,78	1137,45	427,56	13,70	1916,62	13,31
Ac 5,13 docosadienoico		226,95	1,86	180,14	96,61	2,17	235,24	1,63
Total FA µg g-1		12175,52		8301,45	1518,3		14400,16	
SFA (%)		19,26		23,78			22,06	
MUFA (%)		18,96		16,64			22,07	
PUFA (%)		61,78		59,58			55,86	
Σ omega-3		5567,99	45,73	3214,86		38,73	6177,14	42,90
Σ omega-6		1727,53	14,19	1489,36		17,94	1632,18	11,33
C16:1(n-7c)/C16:0		0,61		0,30			0,60	
C22:6(n-3)/C20:5(n-3)		0,88		0,82			0,62	