



LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Ensayos agudos con *Erodona mactroides*
Bosc, 1801 (Bivalvia) del Río de la Plata,
Uruguay: sobrevivencia frente a cambios
de salinidad y evaluación de tasas de
filtración**

María Paula Milanesi Camejo

**Orientador: Dr. Diego Lercari
Co-Orientador: Dra. Sylvia Bonilla**

Facultad de Ciencias, UdelaR

Setiembre 2015

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia, especialmente a mi madre y mi padre que me animaron y apoyaron a lo largo de toda la carrera. Agradezco a aquellos amigos que hace mucho tiempo están en mi vida por su cariño, por estar en las buenas y por el aguante en los momentos difíciles. Agradezco, también a compañeros y amigos que conocí en Facultad que hicieron de esta una muy linda etapa. Gracias a Natalia por estar siempre pendiente y por nuestras charlas. A Santiago, mi compañero, gracias por estar a mi lado en este camino.

Quiero agradecer muy especialmente a Diego Lercari y Sylvia Bonilla por guiarme a lo largo de este trabajo, por sus tiempos, por su buena disposición en todo momento, por sus valiosos comentarios y sugerencias que aportaron a mi crecimiento profesional. A Eleonora Celentano le agradezco por haberse tomado el tiempo de revisar esta Tesina.

Gracias a todos los integrantes que forman y formaron parte de la Unidad de Ciencias del Mar y a todas las personas que de alguna u otra manera me ayudaron a que el desarrollo de esta Tesina fuera posible.

Índice

Resumen	1
1. Introducción.....	2
1.1 Bioensayos.....	2
1.2 <i>Erodona mactroides</i>	4
1.3 Rol de la salinidad en los invertebrados acuáticos	6
1.4 Filtración en bivalvos	8
1.5 Justificación del estudio.....	9
1.6 Objetivo general y específico.....	11
1.7 Hipótesis de trabajo.....	11
2. Materiales y métodos	13
2.1 Área de muestreo.....	13
2.2 Muestreo de campo.....	13
2.3 Tratamientos en laboratorio.....	14
2.3.1 Aclimatación de los bivalvos	14
2.3.2 Aclimatación del cultivo de cianobacterias y algas.....	15
2.3.3 Diseño experimental.....	16
2.3.4 Análisis de datos	19
3. Resultados.....	21
3.1 Ensayo de sobrevivencia.....	21
3.1.1 Aclimatación de los bivalvos	21
3.1.2 Ensayo agudo de laboratorio	21
3.2 Ensayos de filtración	25
3.2.1 Aclimatación de los bivalvos	25
3.2.2 Aclimatación de las algas	26

3.2.3 Bioensayo 1: Estimación de la tasa de filtración de los individuos de <i>E. mactroides</i> en el tiempo.....	27
3.2.4 Bioensayo 2: Estimación de la tasa de filtración de los organismos de <i>E. mactroides</i> con dos ofertas alimenticias	28
3.2.5 Bioensayo 3: Estimación de la tasa de filtración de los individuos de <i>E. mactroides</i> a diferentes volúmenes de agua	33
4. Discusión	38
4.1 Aclimatación en el laboratorio.....	39
4.2 Ensayo agudo de laboratorio.....	40
4.3. Ensayos de filtración	44
4.3.1 Bioensayo 1: Estimación de la tasa de filtración de los individuos de <i>E. mactroides</i> en el tiempo.....	44
4.3.2 Bioensayo 2: Estimación de la tasa de filtración de los organismos de <i>E. mactroides</i> con dos ofertas alimenticias	48
4.3.3 Bioensayo 3: Estimación de la tasa de filtración de los individuos de <i>E. mactroides</i> a diferentes volúmenes de agua	50
4.3.4. Problemas encontrados y recomendaciones	53
5. Conclusiones y perspectivas.....	55
6. Bibliografía	57

Resumen

Los ensayos de laboratorio, definidos como experimentos en los que se cuantifica la respuesta de los organismos vivos al efecto de una sustancia del ambiente, posibilitan alcanzar múltiples metas. Dentro de las mismas se incluyen: caracterizar los rangos ambientales óptimos de las especies, el establecimiento de los límites de las descargas artificiales, la predicción de consecuencias ambientales producidas por descargas artificiales, la protección de especies importantes y de las estructuras y funciones de los ecosistemas. *Erodona mactroides* es una especie endémica del Atlántico Sudoccidental y de las más abundantes en aguas mixohalinas de algunas regiones de Argentina, Brasil y Uruguay. En nuestro país, es un bivalvo de gran relevancia y cuyo conocimiento ecológico es muy escaso. En este contexto, se implementaron ensayos de laboratorio de corto plazo tomando a *E. mactroides* como especie modelo y utilizando organismos colectados en Playa Penino (Río de la Plata). Se evaluó la respuesta letal (mortalidad) de individuos de talla grande y chica de *E. mactroides* a las variaciones de salinidad (de 0,3 a 20 ‰). Además, se realizaron estimaciones de las tasas de filtración de los bivalvos en relación a distintas variables (e.g. tiempo experimental, tipo de alimento, volumen de agua experimental), así como, para las distintas tallas de individuos de la especie. En general, a partir de estos ensayos, se pudo conocer la potencialidad de esta especie como modelo para estudios de laboratorio y establecer un protocolo de trabajo en laboratorio con la misma. En particular, se observó que la especie está ampliamente adaptada a cambios de salinidad a corto plazo, no evidenciándose una significativa mortandad ni de individuos de talla grande ni chica a valores de salinidad elevados. Sin embargo, se observó una mortalidad diferencial entre las tallas, siendo los individuos de talla chica altamente afectados por la menor salinidad. Por otro lado, el comportamiento de la tasa de filtración de este bivalvo fue muy variable. En primera instancia, la tasa de filtración fue similar, sin evidenciarse una reducción significativa durante 8 horas, en ambas tallas testeadas. Sin embargo, en otros bioensayos la tasa decayó en el tiempo. Además, se evidenció que cuando a los bivalvos se les ofreció como fuente de alimento una cianobacteria y un alga eucariota unicelular, los mismos mostraron una preferencia por las cianobacterias. Los volúmenes de agua experimentales empleados no tuvieron un efecto significativo sobre las tasas de filtración de los organismos. Por último, la filtración de los individuos de talla grande fue mayor con respecto a la de menores tallas, excepto en uno de los bioensayos realizados. De esta manera, el desarrollo de esta Tesina representa un aporte fundamental para el conocimiento de la especie y sienta las primeras bases para futuros trabajos de índole experimental con *E. mactroides*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bioensayos

Los bioensayos han sido herramientas ampliamente utilizadas en el marco de la ecotoxicología, la cual se ocupa del estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico en los ecosistemas acuícolas y terrestres (Larrain, 1995). Éstos se definen como ensayos en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de los organismos vivos o sistemas vivientes (Ronco et al., 2004). Así, la implementación de estos bioensayos posibilita alcanzar múltiples metas, entre ellas, caracterizar los rangos ambientales óptimos de las especies, el establecimiento de los límites de las descargas artificiales, la predicción de consecuencias ambientales producidas por descargas artificiales, la protección de especies importantes y de las estructuras y funciones de los ecosistemas (Cairns & Pratt, 1989).

La aplicabilidad que poseen los bioensayos de laboratorio es amplia. Por ejemplo, mediante la ejecución de estos experimentos se pueden estudiar los posibles efectos letales generados por herbicidas presentes en el agua en sistemas costeros afectados por descargas artificiales (Sauco et al., 2010). Además, los mismos son frecuentemente utilizados como herramienta para el estudio de: toxicidad relacionada a los sedimentos, impacto ecológico producido por sedimentos contaminados, y evaluación de la calidad de los mismos (Chapman & Long, 1983; ASTM, 1992; Luoma & Carter, 1993; Costa et al., 1998). En este contexto, Lacma et al. (2007) mediante ensayos de laboratorio, examinó en qué medida la toxicidad del cromo presente en los sedimentos marinos afecta la mortalidad y la capacidad de enterramiento del bivalvo *Donax obesulus*. Por otra parte, los ensayos ecotoxicológicos se han convertido en herramientas cada vez más importantes en los estudios de evaluación de riesgo en

ecosistemas terrestres y acuáticos (Araújo et al., 2006). Así por ejemplo, ensayos con el pez *Poecilia reticulata* fueron incluidos en programas de biomonitorio para evaluar el proceso de rehabilitación de un lago ácido (Araújo et al., 2006). Asimismo, otros organismos acuáticos, como bacterias, pulgas de agua (*Daphnia*) o algas son utilizados en ensayos ecotoxicológicos (Boluda et al., 2002).

Estos ensayos pueden ser clasificados con respecto a su área de aplicación en: de campo o laboratorio. Además, se pueden distinguir de acuerdo al nivel de organización biológica: desde molecular a ecosistémico, realizándose más comúnmente las pruebas a nivel de organismo (Gandrass & Salomons, 2011). Asimismo, se pueden dividir de acuerdo a la duración de la exposición en agudos, sub-crónicos y crónicos. En este sentido, para la mayoría de los invertebrados y vertebrados, los bioensayos de toxicidad aguda toman un máximo de 96 hrs (Gandrass & Salomons, 2001). Numerosas especies de invertebrados se han utilizado en el desarrollo de trabajos de laboratorio de corto plazo, con el fin de evaluar la toxicidad que diversos agentes pueden producir sobre estos organismos. Así por ejemplo, el cladóceros *Daphnia magna* ha sido utilizado como herramienta para llevar a cabo experimentos de corto plazo, relacionados con la toxicidad producida por contaminantes químicos (Gaete & Paredes, 1996). Asimismo, Iannaccone et al. (2002) utilizó el caracol *Physa venustula* para ensayos agudos en laboratorio, demostrándose el efecto tóxico de ciertos plaguicidas sobre esta especie. Por otro lado, con la especie *Mesodesma mactroides* (Bivalvia) se evidenciaron los efectos adversos derivados de la descarga artificial (i.e. Canal Andreoni) mediante experimentos de laboratorio de corto plazo (Sauco et al., 2013).

En la implementación de los bioensayos, tanto agudos como crónicos, los organismos experimentales son expuestos a concentraciones crecientes de un agente tóxico, con el propósito de determinar algún cambio en éstos durante un cierto periodo de tiempo

(Larrain, 1995), y de esta manera establecer relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas (Silva et al., 2003). Usualmente el cambio es valorado a través de la estimación de valores medios de mortalidad (e.g. Concentración Letal₅₀ ≤96 h) (Dunlop et al., 2007).

La selección del organismo modelo a utilizar en este tipo de pruebas radica en los siguientes aspectos: su alta disponibilidad, abundancia, y amplia distribución, su alta y constante sensibilidad a los tóxicos, su importancia económica, su representatividad en el nivel trófico así como su significado ambiental en relación con el área de estudio. Además, es importante que sean sencillos su cultivo y su adaptabilidad a las condiciones de laboratorio (Ronco et al., 2004). En este contexto, muchos son los grupos de organismos recomendados para la ejecución de bioensayos, y entre ellos los bivalvos han sido ampliamente utilizados, debido a su fácil colección y mantención (Reish & Oshida, 1987).

1.2 *Erodona mactroides* (Bosc, 1801)

Erodona mactroides; comúnmente llamado berberecho de laguna, es una especie endémica del Atlántico Sudoccidental (Bemvenuti & Rosa-Filho, 2000) y de las más abundantes en aguas mixohalinas de ríos, lagunas y estuarios, de algunas regiones de Argentina, Brasil y Uruguay (Costa, 1971; Jorcín, 1996). En Brasil, dicha especie es encontrada a lo largo de las costas de Rio Grande do Sul, presentando una elevada densidad en la Laguna de los Patos (Rosa-Filho & Bemvenuti, 1998; Bemvenuti & Netto, 1998). Dentro de Uruguay, *E. mactroides* ha sido hallada en el Departamento de Colonia, la desembocadura del Río Santa Lucía, y de los arroyos Pando, Solís Chico, Solís Grande, Maldonado, Valizas y Chuy, así como, en las lagunas José Ignacio, Garzón, Rocha, del Diario y de Castillos, y bahía de Montevideo. Además, ocurre en la provincia de Buenos Aires (Olazarri, 1966; Jorcín, 1996; Scarabino, 2006). Este

bivalvo, cavador superficial y suspensívoro (García, 2005), suele encontrarse en fondos arenosos y arena fangosos de aguas salobres y dulces (Ageitos de Castellanos, 1967). En la Tabla 1. se detallan valores de salinidad de algunos de los sitios en los cuales *E. mactroides* ocurre.

Tabla 1. Rangos de salinidad (*Espacial, **Temporal) en algunos sitios en donde *E. mactroides* ocurre. Referencia: 1. Muñiz & Venturini (2001); 2. Rosa & Bemvenuti (2006); 3. Passadore (2007); 4. Meerhoff (2009)

Sitio	Salinidad (‰)	Referencia
A. Solís Grande (Uruguay)	2.6 - 32.0*	1
L. de los Patos (Brasil)	0.5 - 10.5**	2
A. Pando (Uruguay)	<2 - 14.6**	3
L. de Castillos (Uruguay)	0.19 - 6.99**	4
L. de Rocha (Uruguay)	6.16 - 16.26**	4
L. Garzón (Uruguay)	1.5 - 11.6**	4
L. José Ignacio (Uruguay)	6.8 - 21.7**	4

La especie se caracteriza por ser de pequeño tamaño, con concha lisa y blanquecina, y con la valva derecha más grande que la izquierda. Es una especie con elevada tasa de crecimiento y alta estacionalidad, correspondiendo las menores tasas de crecimiento durante los meses de invierno, coincidente con bajas temperaturas y salinidades (Santana & Fabiano, 1999). Se ha visto que los individuos de *Erodona mactroides* pueden presentar tallas de entre 0.42-43.22 mm, como el caso de las registradas para la Laguna de Rocha (Jorcín, 1996). En la Laguna de los Patos los juveniles mostraron ser de tallas menores a 20 mm (Geraldí, 2002; Colling et al., 2010).

En la Laguna de los Patos, la especie mencionada cumple un importante rol trófico, siendo una de las principales especies consumidoras de fitoplancton dentro de los invertebrados bentónicos (Anacleto & Traversim, 2006).

En Uruguay, *E. mactroides* se extrae ocasionalmente y artesanalmente a pequeña escala, por parte de los pescadores con rastras manuales. La comercialización de éste bivalvo se lleva a cabo en la Laguna Garzón, pero además es explotada en las lagunas de Castillos y de Rocha (esporádicamente) y en los arroyos Maldonado y Solís Grande (Santana & Fabiano, 1999; Scarabino et al., 2006; Viana, 2009; Trimble et al., 2010).

Si bien para Uruguay se han documentado investigaciones en donde se hace referencia a esta especie, en esencia, los estudios se han realizado dentro de un contexto de nivel de organización comunitario (Jorcín, 1999; Muniz & Venturini, 2001; Lercari & Defeo, 2006; Cortelezzi et al., 2007; Passadore et al., 2007; Meerhoff, 2009), por lo tanto, la falta de información de carácter poblacional vinculada a este bivalvo es amplia. Es así que se considera necesario el llevar a cabo proyectos de naturaleza particular. *Erodona mactroides* es un bivalvo de gran abundancia, amplia distribución geográfica, e importancia ecológica y económica, entre otros atributos; por lo cual podría ser considerada como posible especie modelo para el trabajo en laboratorio. Así, la información obtenida de la ejecución de ensayos de laboratorio contribuiría al conocimiento de la especie y sentaría las primeras bases para futuros trabajos de experimentación con este bivalvo.

1.3 Rol de la salinidad en los invertebrados acuáticos

La salinidad del medio acuático tiene una fuerte influencia en la distribución y abundancia de los organismos (Begon et al., 2006). La salinidad en áreas costeras se reduce con respecto a la oceánica debido a la escorrentía de agua dulce, generándose así gradientes de salinidad desde condiciones marinas a condiciones completas de agua dulce. Por otra parte, este factor abiótico puede ejercer efectos indirectos mediante la modificación de la composición de especies en una comunidad, y por lo

tanto provocar cambios indirectos en las demás especies, en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Kinne, 1971). Solamente aquellas especies capaces de tolerar frecuentes fluctuaciones en la salinidad podrán explotar y adaptarse a éste gradiente (Raffaelli & Hawkins, 1996).

Así, los organismos acuáticos viven dentro de un rango de salinidad, marcado por los límites inferior y superior de tolerancia, más allá de cuales mueren a corto plazo. Estos límites dependen del origen filogenético, el estado fisiológico, la edad (etapa del ciclo de vida), el sexo o el tamaño del individuo, así como de los valores históricos de salinidad del ambiente (Kinne, 1966). La salinidad afecta las respuestas funcionales y estructurales de los invertebrados, a través de cambios en: la osmoconcentración, la proporción relativa de solutos, el coeficiente de absorción, saturación de oxígeno disuelto, entre otros parámetros. Evaluar detalladamente la tolerancia de las especies a cambios en la salinidad solamente en base a estudios de campo, resulta complejo debido a que los efectos de la salinidad pueden ser modificados simultáneamente por otros factores ambientales, como la luz, la temperatura, el movimiento del agua, los gases disueltos, nutrición, e interacciones biológicas. Sin embargo, información más detallada de la tolerancia a las variaciones de salinidad puede ser obtenida mediante experimentos de laboratorio bajo condiciones ambientales controladas (Kinne, 1971).

Dentro de este marco, numerosos trabajos de laboratorio han demostrado el impacto de la salinidad sobre diversos aspectos vitales de los moluscos bivalvos. En particular, Davis & Calabrese (1964) comprobaron que la salinidad afecta la tolerancia a la temperatura de larvas de la almeja *Mercenaria mercenaria* y de la ostra *Crassostrea virginica*. Por otro lado, se ha demostrado que la salinidad influencia de forma significativa la tasa de filtración del bivalvo *Perna viridis* (Rajesh et al., 2001). Asimismo, se observó que el bivalvo *Scrobicularia plana* cuando se expone a valores bajos de salinidad por largos períodos, inicialmente cierra sus valvas y las abre

gradualmente luego de 5-7 días (Akberali, 1978). Los mejillones también cierran sus valvas frente a los cambios de salinidad (Kim et al., 2001). Además, Marsden (2004) evidenció el efecto de la salinidad sobre la supervivencia, el crecimiento y el estado en la almeja *Austrovenus stutchburyi*.

La calidad del agua y la salinidad, los regímenes hídricos, la biota y los ecosistemas costeros se han visto modificadas por diversas fuentes de impacto humano (Irlandi et al., 1997; Serafy et al., 1997; Lercari & Defeo, 1999; 2006; Lercari et al., 2002). Por ejemplo, las descargas artificiales de agua dulce, el incremento de las descargas de efluentes urbanos, industriales y agrícolas y la construcción de embalses y represas han sido identificadas como tales agentes (Irlandi et al., 1997; Serafy et al., 1997; Lercari & Defeo, 1999; 2006; Lercari et al., 2002). Asimismo, el cambio global, también, ha sido atribuido a actividades antropogénicas (e.g. por uso de combustibles fósiles, la agricultura y cambios en el uso de las tierras). Este fenómeno resultaría en un incremento en la temperatura terrestre y marina, el nivel del mar, y precipitaciones más intensas, entre otras consecuencias (IPCC, 2003). En este contexto, los regímenes hídricos y la salinidad costera también se verían alterados (Jackson et al., 2001). Así, entender los posibles efectos que tiene la salinidad sobre los organismos de *E. mactroides* a través de ensayos de laboratorio es de suma relevancia, ya que las consecuencias abióticas y bióticas en los ecosistemas derivadas de la alteración de este factor son amplias (McLeod & Wing, 2008).

1.4 Filtración en bivalvos

Los bivalvos han desarrollado varios mecanismos de alimentación, entre ellos, la alimentación por filtración, que consiste en la remoción de material en suspensión (fitoplancton, bacterias, zooplancton y material particulado) desde la columna de agua (Dame, 1996). Los bivalvos filtradores juegan un rol clave en los ecosistemas

acuáticos, debido a que mediante el consumo de fitoplancton, reciclan los nutrientes y proveen el nexo entre la trama trófica pelágica primaria y la bentónica (Viergutz et al., 2012), re-direccionando, así, el flujo de energía y ciclado de materia en toda la trama trófica (Marroni, 2012). En este sentido, el conocimiento de las tasas de filtración de los bivalvos es fundamental para predecir con precisión el rol de los bivalvos en el control de la disponibilidad fitoplanctónica y otras partículas y la producción primaria (Crandford et al., 2003), y para establecer su potencial uso como técnica de restauración de los ecosistemas y remediación de la eutrofización cultural (Newell & Koch, 2004; Fulford et al., 2007). Por otro lado, debido a la habilidad de los bivalvos de filtrar grandes volúmenes de agua y acumular contaminantes, éstos han sido ampliamente usados para el monitoreo de los cambios temporales y espaciales de la contaminación de los ecosistemas. Dentro de este marco, la tasa de filtración ha sido utilizada como un indicador de toxicidad de corto plazo (Mouabad et al., 2001).

Diversas metodologías han sido utilizadas con el propósito de obtener una estimación de la tasa de filtración de estos organismos. Uno de ellos es el denominado "Clearance method" o método indirecto, en el cual la tasa de filtración se define como el volumen de agua aclarado de partículas suspendidas por unidad de tiempo. El decaimiento del número de partículas en función del tiempo es monitoreado mediante la toma de muestras de agua a intervalos fijos de tiempo, y con la medición de la concentración de las mismas. Si bien el método presenta algunas dificultades (e.g. la concentración de partículas cae durante el experimento) ha demostrado ser un procedimiento confiable y ampliamente utilizado en bivalvos (Riisgård, 2001b).

1.5 Justificación del estudio

La producción bibliográfica acerca del efecto que ejerce la salinidad sobre aspectos tales como la sobrevivencia o fisiología de los individuos a través de experimentos de

laboratorio en bivalvos es extensa (Davis, 1958; Navarro, 1988; Marsden, 2004; Nakamura, 2005; Guzmán-Agüero et al., 2013), no obstante, resalta la notoria carencia de estudios de esta índole en Uruguay. Por otra parte, Lercari & Defeo (2006) destacan el efecto negativo que produce la variabilidad de salinidad generada por factores antropogénicos (e.g. construcción del Canal Andreoni) sobre la macrofauna costera. Además, ya se ha evidenciado la problemática del cambio climático, y se reconoce que el mismo produce alteraciones de salinidad, con la consecuente implicancia sobre las especies (Defeo et al., 2008). A pesar de esto, aún para Uruguay, resta mucho por conocer del impacto producido como consecuencia de los cambios de salinidad asociados a factores antrópicos. Debido a esto, es de crucial importancia analizar los posibles efectos producidos por dicho parámetro, con énfasis en especies de relevancia como lo es *E. mactroides*.

Los bivalvos desempeñan un primordial papel trófico en los ambientes acuáticos, dado que son el nexo entre la trama pelágica y bentónica (Crandford et al., 2003). En este sentido, *E. mactroides* como parte de la trama bentónica podría tener un valioso papel ecosistémico dentro de los sistemas costeros en los cuales habita. Así, el conocimiento de la tasa de filtración de este bivalvo es de suma importancia para sentar las primeras bases hacia el apropiado manejo del recurso.

En particular, evaluar la distribución de valores de susceptibilidad a la salinidad en laboratorio, contribuye a determinar el riesgo que esta especie puede sufrir debido a alteraciones hídricas. La susceptibilidad a cambios en la salinidad se puede derivar mediante experimentos de laboratorio concentración-respuesta que permiten estimar valores medios de mortalidad (e.g. Salinidad letal₅₀:SL₅₀ ≤96 h) (Dunlop et al., 2007). Además, es posible mediante métodos de laboratorio obtener medidas de la tasa de filtración de bivalvos suspensívoros (Riisgård, 2001b). Conjuntando este tipo de información se puede preparar una estrategia para el adecuado empleo de la especie.

En este contexto, en la presente Tesina se planteó una aproximación experimental con la finalidad de obtener un marco de referencia para *Erodona mactroides*.

En particular, se pretende responder las siguientes preguntas:

¿*Erodona mactroides* es potencialmente útil para evaluar efectos de cambios ambientales mediante bioensayos?

¿Cómo afecta la variación de salinidad a la sobrevivencia de *Erodona mactroides*?

1.6 Objetivo general y específico

El objetivo general de esta Tesina es analizar la potencialidad de *Erodona mactroides* como especie modelo para bioensayos de laboratorio a los efectos de evaluar cambios ambientales naturales o antrópicos.

Dentro de este marco, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Establecer un protocolo de laboratorio para mantener a la especie en cautiverio durante periodos prolongados.
- 2) Evaluar la respuesta de la especie a cambios de salinidad.
- 3) Establecer los lineamientos necesarios para la realización de experimentos de laboratorio basados en tasas de filtración.

1.7 Hipótesis de trabajo

En este contexto, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- 1) Considerando que la especie ocurre en regiones de baja salinidad, el aumento de ésta incidiría en la sobrevivencia de los individuos de *Erodona mactroides*, reflejándose en una mayor mortalidad en salinidades mayores, marcadamente diferentes a la que la especie comúnmente habita.

2) Los cambios de salinidad producirán mortalidades diferenciales de individuos de *Erodona mactroides*. Así, los individuos de mayores tallas presentarán una mayor tolerancia frente a cambios de salinidad que los de tallas menores ya que los estadios tempranos son más susceptibles a las variaciones ambientales. Como consecuencia de esto, se predice una mayor mortalidad para individuos de tallas menores.

3) La dinámica de filtrado de los individuos de *Erodona mactroides* varía a lo largo del tiempo, esperándose que la tasa de filtración sea mayor al inicio del experimento, y que la misma vaya disminuyendo con el transcurso del tiempo. A su vez, se predice que la tasa de filtración de los individuos de talla grande sería mayor que la de los individuos de talla chica.

4) La tasa de filtración depende del tamaño de las partículas de alimento. Se espera que los individuos de *Erodona mactroides* tengan preferencia por alimento de menor tamaño. A su vez, se predice se predice que la filtración de los individuos de talla grande sería mayor que la de los individuos de talla chica.

5) Tomando en cuenta que el proceso de filtración está vinculado al volumen de agua, se espera que la tasa de filtración sea mayor cuanto mayor es el volumen de agua. A su vez, se predice se predice que la filtración de los individuos de talla grande sería mayor que la de los individuos de talla chica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de muestreo

El área de muestreo comprendió a la Playa Penino, ubicada en el extremo Sur-Este del Departamento de San José, en la Ciudad del Plata, Uruguay, entre los kilómetros 23 ($34^{\circ} 46' 51,5''\text{S} - 56^{\circ} 21' 25,2''\text{W}$) y 31 ($34^{\circ} 45' 11,7''\text{S} - 56^{\circ} 26' 12,3''\text{W}$), tomando como referencia la ruta 1, siendo sus límites por el sur y suroeste, 8,5 km de franja intermareal y aguas costeras del último tramo de la desembocadura del Río Santa Lucía y el contiguo del Río de la Plata, y por el este, norte y noroeste, la Ruta 1 (nueva), desde el puente que comunica con Santiago Vázquez al km 31 (Arballo & Bresso, 2007). Ésta área con alto dinamismo se caracteriza por la presencia de diferentes tipos de ambientes (aguas estuariales, marismas, pastizales, y campos dunares) lo que posibilita la ocurrencia de una gran diversidad de especies tanto animales como vegetales (Arballo, 1996; Arballo & Bresso, 2007). La playa fue considerada como uno de los lugares más amenazados de la costa uruguaya (EcoPlata, 2000), estando sujeta a las constantes amenazas ocasionadas por la urbanización y contaminación ambiental (Rocha, 1999). Así, en el año 1996, la Municipalidad de San José la declara Reserva Ecológica, y ha sido incluida como parte de la propuesta de ingreso al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) de los Humedales del Santa Lucía bajo la categoría de manejo: Paisaje Protegido (Bernardi, 2007).

2.2 Muestreo de campo

Se realizaron numerosos muestreos de campo previos para la realización de los ensayos pilotos. Asimismo, se realizaron 4 muestreos de campo para los 4 ensayos finales. Estos fueron realizados en condiciones de viento norte (condiciones que

favorecen el acceso a la zona y la extracción de los organismos). En cada muestreo se colectaron entre 250-300 individuos de dos tallas distintas de *Erodona mactroides*. Los organismos fueron extraídos con pala de la superficie de la zona intermareal, colocados en contenedores con arena húmeda, y transportados en oscuridad al laboratorio para su posterior procesamiento. En el sitio de estudio se midió la salinidad y temperatura del agua con un medidor multiparámetro YSI EcoSense EC300.

2.3 Tratamientos en laboratorio

En el laboratorio los organismos fueron limpiados y seleccionados de acuerdo a su estado, descartándose organismos con valvas rotas o rajadas. Además, los bivalvos colectados fueron medidos a lo largo del eje antero-posterior con un calibre Vernier de 0.01 mm de precisión y se clasificaron en dos clases, talla grande (20-25 mm) y talla chica (10-15 mm), previamente al desarrollo de los experimentos.

2.3.1 Aclimatación de los bivalvos (Objetivo 1)

La aclimatación de los bivalvos, previa al desarrollo de los ensayos, se realizó en un cuarto climatizado mantenido a la misma temperatura registrada para el sitio de extracción, durante un periodo de 7 días (Reish & Oshida, 1987). Para esto, los organismos separados por talla se colocaron en contenedores de vidrio de 60 l de capacidad (misma salinidad que en el lugar al momento de colecta) cada una con su propia oxigenación. El medio en el cual se mantuvieron los organismos experimentales consistió en agua potable previamente declorada con sal marina comercial agregada. El agua se cambió cada 2 días para mantener el adecuado estado de la misma (Saucó et al., 2013).

Durante este periodo los individuos permanecieron en completa inanición (Reish & Oshida, 1987). Los factores abióticos (salinidad, temperatura y oxígeno disuelto), y los

individuos se monitorearon cada 24 hrs. La salinidad y la temperatura se midió con un YSI EcoSense EC300 y el oxígeno disuelto con un oxímetro de mano EcoScan DO6. Estos equipos se utilizaron para la medición de estas variables en todos los ensayos. Los organismos muertos se removieron y registraron. La mortandad de los animales colectados no puede superar el 10-20% dentro de uno o dos días luego de colectados (Reish & Oshida, 1987). Se consideraron animales muertos si el pie y los sifones están extendidos, y borde del manto sin reacción o cuando sus valvas están abiertas (Ansell, 1980).

2.3.2 Aclimatación del cultivo de cianobacterias y algas

Para evaluar el comportamiento de las cianobacterias y algas a las nuevas condiciones de luz experimentales se realizó un ensayo exploratorio. Para esto se colocó una concentración inicial de *Cyanobium sp.* (Cianobacteria, MVCC22, Sección Limnología) o *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae, Cultivo de Undecimar) en recipientes de plástico de 1 l de capacidad, cada uno con su propia oxigenación de manera de asegurar la suspensión de los cultivos. Se ejecutaron 3 réplicas para cada cultivo, y la clorofila *a* fue tomada a T=0 hrs, T= 2 hrs, y T= 4 hrs. La clorofila *a in vivo* se midió con un fluorómetro Aquafluor, Turner. Además, se registró la intensidad de la luz fotosintéticamente activa (luz visible) presente en las dos salas donde se mantuvieron los cultivos, y en el cuarto climatizado donde se llevaron a cabo los experimentos. La intensidad de la luz se midió con radiómetro (Li-COR), sensor 4 PI.

Previo a la ejecución de los ensayos de filtración (12 horas), las algas fueron colocadas en los recipientes experimentales a la salinidad, temperatura y luz en la cual se llevó a cabo el experimento con el propósito de lograr la aclimatación de las mismas a las nuevas condiciones experimentales. La aclimatación de 12 horas previas a los ensayos se realizó en base a los resultados obtenidos del previo ensayo exploratorio del comportamiento de las cianobacterias y las algas.

2.3.3 Diseño experimental

Ensayo de sobrevivencia (Objetivo 2)

Con el propósito de evaluar la respuesta letal de los individuos de *Erodona mactroides* a los cambios de salinidad se efectuó un experimento de laboratorio de corto plazo. El experimento se realizó a la misma temperatura ambiental que se mantuvieron durante la aclimatación.

Para este ensayo un total de 60 individuos de talla grande y 60 de talla chica de *E. mactroides* fueron expuestos a diferentes concentraciones de salinidad durante 96 hrs. Se hicieron un total de 6 tratamientos de salinidad (0.3, 5, 10, 15, 20 + un tratamiento control, salinidad del sitio en día de colecta) replicados cada uno 10 veces para cada una de las clases de tallas. Las concentraciones fueron establecidas mediante ensayos de laboratorio de salinidad previos.

Los bivalvos fueron colocados individualmente en frascos de plástico de 1 l de capacidad, cada uno con su propia oxigenación. Las concentraciones de salinidad se alcanzaron mediante diluciones a partir de una solución madre, la cual se preparó con agua de potable previamente dechlorada con sal marina comercial agregada. Cada 24 hrs se contabilizaron y registraron los organismos muertos de cada tratamiento. No más del 10% de mortalidad de individuos puede ocurrir en el control para que el experimento sea aceptable (Reish & Oshida, 1987; Saucó et al., 2013). Además, se midieron los parámetros abióticos mencionados anteriormente.

Ensayos de tasa de filtración (Objetivo 3)

Con el objetivo de establecer un protocolo para experimentos basados en tasas de filtración se realizaron distintos bioensayos de laboratorio con individuos de talla

grande y chica de *Erodona mactroides*. La estimación de la tasa de filtración se basa en medir el decaimiento de la clorofila *a in vivo* como consecuencia de la ingestión de las cianobacterias o las algas por parte de los organismos.

Para los bioensayos se utilizó un cultivo estático de *Cyanobium sp.* (Picocianobacteria) mantenido en medio BG 11 y fotoperiodo 16:8 hrs. luz/oscuridad a 26 °C. Pruebas pilotos revelaron que estas algas son consumidas por los individuos de *Erodona mactroides*, y que la concentración de las mismas decrece dentro de las primeras 4 horas de ensayo. Además, se empleó un cultivo de *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae) para el bioensayo de preferencia de alimento.

Previo a la ejecución de los experimentos se realizó un conteo de las células de cianobacterias y algas para obtener una estandarización entre el número de células/ml y el valor de unidad de fluorescencia (UFR) relativa de clorofila *a in vivo* (proporcionada por el fluorómetro Aquafluor, Turner. Este equipo se utilizó para la medición de la clorofila *a in vivo* en todos los bioensayos.

➤ **Bioensayo 1: Estimación de la tasa de filtración de los individuos de *Erodona mactroides* en el tiempo**

En este bioensayo, los individuos de talla grande y chica se colocaron individualmente en frascos de plásticos de 1 l de capacidad a la misma salinidad de la aclimatación, con una concentración inicial de cultivo de 1.10^5 cel/ml de *Cyanobium sp.* El control fue el tratamiento que contenía solamente cultivo de la cianobacteria. La salinidad experimental se alcanzó mediante diluciones a partir de una solución madre, la cual se preparó con agua potable previamente declorada y sal marina comercial (se repite el protocolo para los siguientes ensayos).

Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento (bivalvos de talla grande, bivalvos de talla chico y cianobacterias solas). Cada uno de los recipientes contó con su propia

oxigenación de manera de asegurar el oxígeno disuelto y la suspensión de las cianobacterias. El volumen de agua que se utilizó en este experimento fue de 0,500 l. El decaimiento de la clorofila *a in vivo* se midió cada 1 hr hasta las 8 hrs, y luego a las 24 hrs. Además, se midieron la salinidad, la temperatura y el oxígeno disuelto a lo largo del bioensayo.

Asumiendo que las partículas son 100% eficientemente retenidas, la tasa de filtración (Riisgård, 2001b) (F) se calculó como: $F = (V/nt) \times \ln(C_0/C_t)$, donde V es el volumen de agua, n, el número de individuos, t, es el tiempo, y C_0 y C_t es la concentración de la cianobacterias al tiempo 0 y t respectivamente.

➤ **Bioensayo 2: Estimación de la tasa de filtración de los organismos de *Erodona mactroides* con dos ofertas alimenticias (Objetivo 3)**

En este bioensayo, los organismos fueron expuestos a dos ofertas alimenticias distintas. Para esto los mismos se colocaron en frascos de plásticos de 1 l de capacidad con una concentración de cultivo inicial de $1 \cdot 10^6$ cel/ml de *Cyanobium sp.* o de *Nannochloropsis sp.*

Se llevaron a cabo 3 tratamientos (bivalvos de talla grande, bivalvos de talla chica y cianobacterias o algas solas) en un volumen de 0,500 l. En este experimento se colocaron 3 organismos por recipiente, y el control fue el tratamiento que contenía solamente algas. Cada uno de los recipientes contó con su propia oxigenación de manera de asegurar el oxígeno disuelto y la suspensión de las cianobacterias y las algas. El decaimiento de la clorofila *a in vivo* se tomó en T=0 hrs, T= 4 hrs, y T= 8 hrs. Además, se midieron la salinidad, la temperatura y el oxígeno disuelto a la largo del bioensayo.

Asumiendo que las partículas son 100% eficientemente retenidas, la tasa de filtración (Riisgård, 2001b) (F) se calculó como: $F = (V/nt) \times \ln(C_0/C_t)$, donde V es el volumen de agua, n, el número de individuos, t, es el tiempo, y C_0 y C_t es la concentración de cianobacterias o algas al tiempo 0 y t respectivamente.

➤ **Bioensayo 3: Estimación de la tasa de filtración de los individuos de *Erodona mactroides* a diferentes volúmenes de agua (Objetivo 3)**

Para esta prueba de laboratorio, los organismos seleccionados se colocaron en frascos de plástico de 1 l de capacidad a diferentes volúmenes de agua (0,150, 0,250, 0,350 l), con una concentración de cultivo inicial de 1.10^6 cel/ml de cianobacterias. La salinidad a la que se mantendrán será igual a la de aclimatación.

Se llevaron a cabo 3 tratamientos (bivalvos de talla grande, bivalvos de talla chica y cianobacterias solas) para cada uno de los volúmenes. En este experimento se colocaron 3 organismos por recipiente, y el control fue el tratamiento que contenía solamente algas. Cada uno de los recipientes contó con su propia oxigenación de manera de asegurar el oxígeno disuelto y la suspensión de las cianobacterias. Las mediciones de clorofila *a in vivo* y factores abióticos se tomaron de igual forma que el bioensayo 2 (véase Pág. 19). El cálculo de la tasa de filtración se realizó como en el bioensayo 1 (véase Pág. 18).

2.3.4 Análisis de datos

Para la estimación de SL_{50} se utilizó el software Probit (versión 1.5). El análisis con este software consiste en la transformación de las mortalidades observadas y de las concentraciones de sal, a escala logarítmica. La relación entre estas variables transformadas es aproximadamente lineal, y a partir de este ajuste se puede calcular el SL_{50} (EPA, 2002).

Para el ensayo de sobrevivencia, las diferencias entre los tratamientos se analizarán mediante la implementación de un Modelo Lineal Generalizado (GLM). Los modelos lineales generalizados (GLM, por sus siglas en inglés) son una extensión de los modelos lineales que permiten utilizar distribuciones no normales de los errores (como Binomiales, Poisson, Gamma, etc.) y varianzas no constantes (Cayuela, 2009). Específicamente, se puede utilizar un GLM cuando la variable de respuesta es binaria (e.g. vivo o muerto) (Cayuela, 2009). Para este ensayo se evaluaron distintos modelos de GLM (Familia Binomial, Enlace Logit) hasta llegar al que ajustaba mejor. Se tomó como variable de respuesta la mortalidad y como factores fijos la salinidad y la talla.

En el caso del **Bioensayo 1** se utilizó un Modelo Lineal Generalizado (Familia Gamma, Enlace Identidad) para evaluar el comportamiento de la tasa de filtración en el tiempo y las diferencias entre la tallas. Para el **Bioensayo 2**, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), ya que los datos verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad. Finalmente, para **Bioensayo 3**, las significancias se evaluaron a través del Mann-Whitney Rank Sum Test y del non-parametric Kruskal-Wallis Test, debido a que no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad, incluso luego de varias transformaciones. Los análisis estadísticos de los datos de todos los bioensayos fueron realizados con el paquete estadístico R.

3. RESULTADOS

3.1 Ensayo de sobrevivencia

3.1.1. Aclimatación de los bivalvos

La salinidad registrada en la playa Penino en el momento de la colecta de los organismos fue de 2,6 ‰, el cual puede considerarse un valor bajo. Durante la etapa de 7 días de aclimatación en el laboratorio, la mortandad de individuos de tallas grande y chica de *Erodona mactroides* fue menor al 10%. Los datos promedios \pm desvío estándar (SD) de las variables abióticas durante el periodo de aclimatación se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores promedios de las variables abióticas \pm desvío estándar (SD) (salinidad, temperatura y O₂) durante la aclimatación para organismos de talla grande y talla chica de *Erodona mactroides*

Variable	Grande	Chica
Salinidad (‰)	2,6 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1
Temperatura (°C)	20,2 \pm 1,6	20,0 \pm 1,7
O₂ (mg/l)	7,0 \pm 1,2	7,1 \pm 1,0

3.1.2. Ensayo agudo de laboratorio

Los valores de salinidad en promedio se mantuvieron durante todo el experimento agudo de laboratorio, en 0,3, 2,6, 5,0, 10,0, 15,0 y 20,0 ‰. Los rangos de temperatura y oxígeno disuelto registrados durante el ensayo de mortalidad fueron 19,6 - 20,0 °C y 6,2 - 6,9 mg/l, respectivamente. En la Fig. 1. se muestra el porcentaje de mortalidad total a lo largo de todo el ensayo para los individuos de talla grande y chica de *E. mactroides*. La mortalidad de los organismos de talla chica (22 %) fue mayor que los organismos de talla grande (6,6 %).

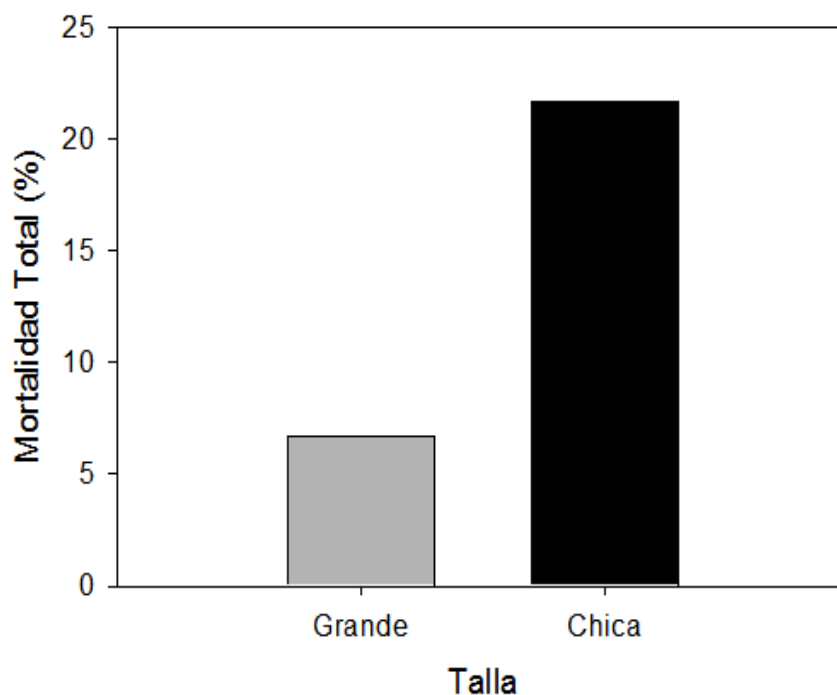


Fig. 1. Mortalidad total de individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides* durante el ensayo agudo de laboratorio.

Los porcentajes de mortalidad en las diferentes salinidades para ambas clases de tallas de *E. mactroides* a las 24, 48, 72 y 96 horas de ensayo se muestran en la Fig. 2. Para el caso de los individuos de talla grande se registró una mortandad del 10% para las salinidades 0,3 y 15 ‰, mientras que no se observaron individuos muertos de talla chica a las 24 horas de comenzado el experimento (Fig. 2, A). Transcurridas 48 horas de experimentación, para el tratamiento 20 ‰ se evidenció 10% de mortalidad para los individuos de talla grande. Asimismo, en los tratamientos 0,3 y 5 ‰, la mortalidad de los individuos de talla chica fue del 10% (Fig. 2, B). A las 72 horas de la implementación del bioensayo, se observó que en las salinidades 0,3 y 10 ‰, murieron el 70% y el 20% de los individuos de talla chica, respectivamente (Fig. 2, C). El porcentaje de mortalidad final para ambas tallas de *E. mactroides* se exhibe en la Fig. 2, D. Para el caso de los individuos de talla grande, la mortandad no superó el 10% en ninguno de los tratamientos finalizado el ensayo. Sin embargo, para los individuos de talla chica, el porcentaje de mortalidad ascendió al 30% en el

tratamiento 10 ‰, y en el resto de los tratamientos no se evidenciaron más organismos muertos.

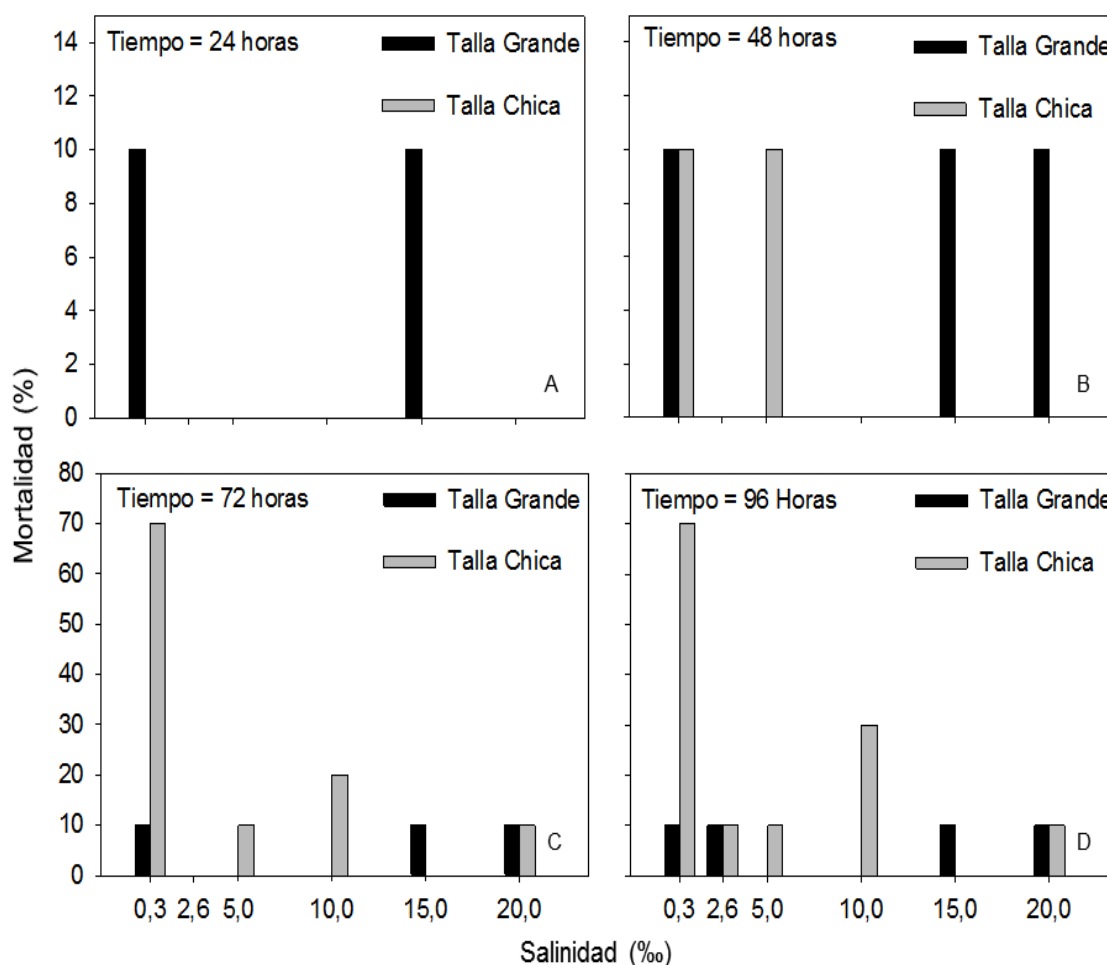


Fig. 2. Mortalidad porcentual de los individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides* en las distintas salinidades a las 24 (A), 48 (B), 72 (C) y 96 (D) horas de bioensayo.

A las 24 horas de comenzado el experimento, solamente se observó mortandad para los individuos de talla grande (Fig. 2, A). A las 48 horas de experimento, la mortalidad en salinidad 0,3 ‰ fue igual para ambas tallas, mientras que en 5 ‰ es mayor para la talla chica que para la grande. En el tratamiento 20 ‰ ocurre lo contrario (Fig. 2, B). A las 72 horas, en el tratamiento 0,3 ‰, el porcentaje de mortalidad es mayor para los individuos de talla chica que grande, así como también para el tratamiento 10 (Fig. 2, C). Al final del experimento, los individuos de talla chica presentaron mayores

mortalidades que los individuos de talla grande en los tratamientos 0,3, 5, 10 ‰. Sin embargo el porcentaje de mortandad fue el mismo en los tratamientos 2,6 y 20 ‰, mientras que fue mayor para los individuos de talla grande en el tratamiento 15 ‰ (Fig. 2, D).

De acuerdo con el modelo de GLM obtenido, la probabilidad de mortalidad, sin discriminar tallas, para el tratamiento 0,3 ‰ es significativamente mayor que para el resto de los tratamientos ($p < 0,05$), salvo para el tratamiento de 10 ‰ que fue marginalmente menor ($p = 0,07$). Además, este modelo mostró que los individuos de talla chica son significativamente más sensibles que los individuos de talla grande ($p < 0,05$). En la Fig. 3. se muestra el histograma para el modelo ajustado. En la Fig. 4. se exhibe los residuos en relación a los valores ajustados para el modelo, y los cuantiles observados en relación a los cuantiles teóricos para el modelo. En ambos casos se observa un patrón homogéneo, por lo que puede considerarse que este modelo ajusta correctamente a los datos obtenidos.

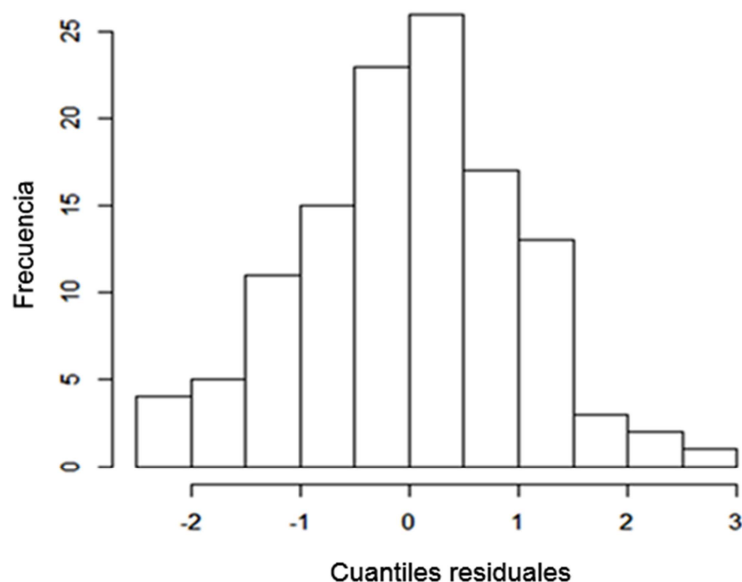


Fig. 3. Histograma del modelo GLM ajustado a los resultados de mortalidad en respuesta a la salinidad de *Erodona mactroides*.

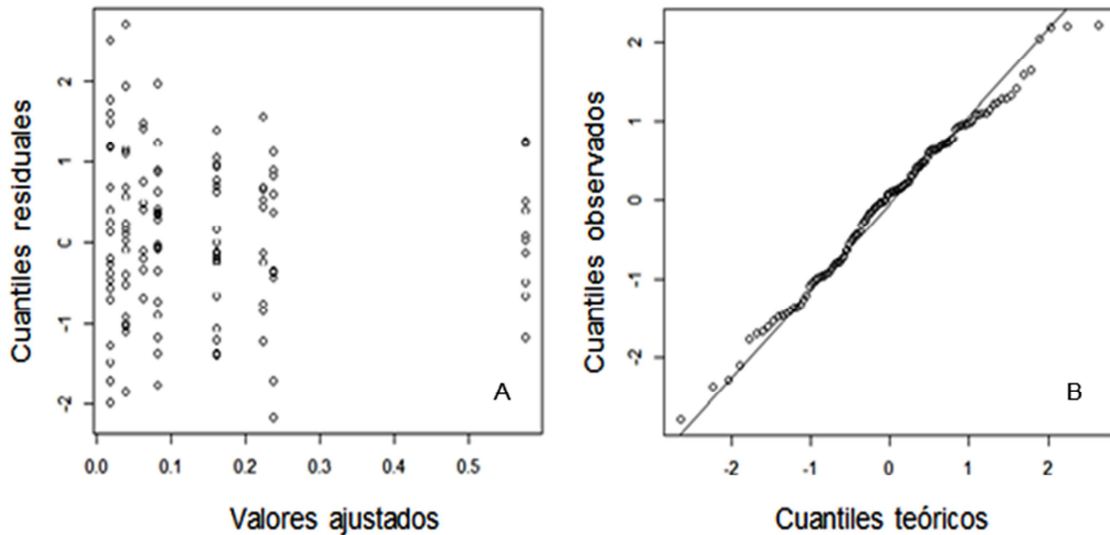


Fig. 4. Cuantiles residuales vs Valores ajustados del modelo GLM ajustado a los resultados de mortalidad en respuesta a la salinidad de *Erodona mactroides* (A), y Cuantiles teóricos observados vs los cuantiles teóricos del modelo GLM ajustado a los resultados de mortalidad en respuesta a la salinidad de *Erodona mactroides* (B).

Los datos de mortalidad para los individuos de talla grande de *E. mactroides* obtenidos en este bioensayo no permitieron la estimación del SL_{50} . Para los individuos de talla chica el SL_{50} a las 96 horas de exposición fue de 1 ‰.

3.2 Ensayos de filtración

3.2.1. Aclimatación de los bivalvos

La salinidad registrada para la playa Penino en el momento de la colecta de los organismos para los bioensayos 1, 2, 3 fue respectivamente 2,5, 0,3 y 1,1 ‰, los cuales son valores de salinidad bajos. La mortalidad de individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides* en los periodos de aclimatación de 7 días de los distintos bioensayos no fue superior al 10%. Los valores medios \pm desvío estándar (SD) de las variables abióticas durante los periodos de aclimatación para los diferentes bioensayos se exhiben en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores promedios \pm desvío estándar (SD) de las variables abióticas medidas durante el periodo de aclimatación para los diferentes bioensayos

	Salinidad (‰)	Temperatura (°C)	O ₂ (mg/)
Bioensayo 1	2,5 \pm 0,1	18,0 \pm 1,2	8,0 \pm 0,6
Bioensayo 2	1,1 \pm 0,1	19,2 \pm 1,0	7,6 \pm 0,9
Bioensayo 3	0,3 \pm 0,1	17,0 \pm 1,7	7,7 \pm 0,7

3.2.2. Aclimatación de las cianobacterias y algas

La intensidad de luz a la cual estuvo sometida *Cyanobium sp.* antes de la realización de los experimentos fue de 8,19 $\mu\text{mol fotonos/m}^2\cdot\text{s}$, mientras que para *Nannochloropsis sp.* fue de 39,48 $\mu\text{mol fotonos/m}^2\cdot\text{s}$. Sin embargo, la intensidad de la luz que recibieron durante la aclimatación y los diferentes ensayos fue de 5,9 $\mu\text{mol fotonos/m}^2\cdot\text{s}$. Para *Cyanobium sp.* se observó un decaimiento de la clorofila *a* con el transcurso del tiempo, mientras que para *Nannochloropsis sp.* se aprecia un aumento de la clorofila *a* en el tiempo. En ambos cultivos las diferencias fueron significativas con el tiempo (Fig. 4).

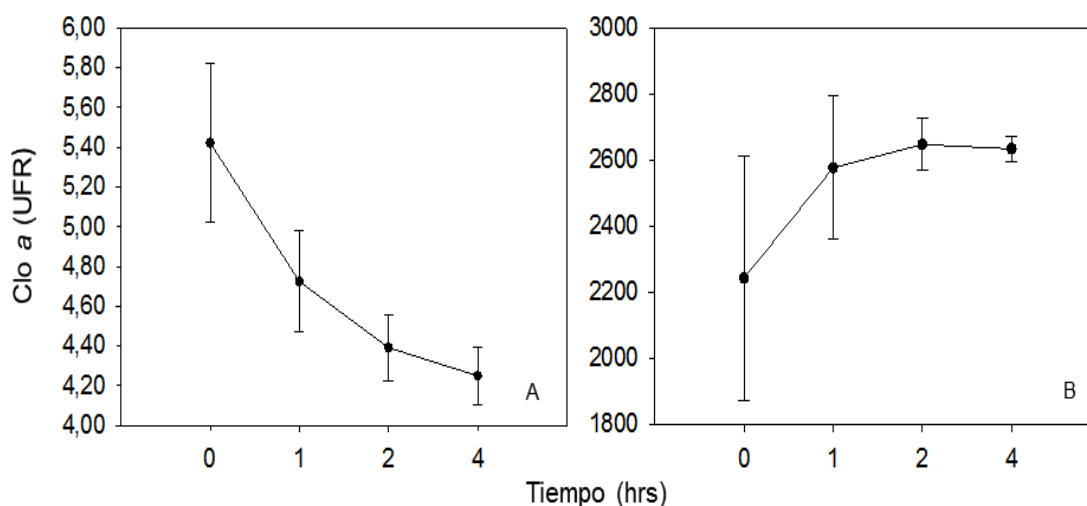


Fig. 4. Clorofila *a* (Clo *a*) para *Cyanobium sp.* (A) y *Nannochloropsis sp.* (B) en el tiempo. Se indica el valor promedio (●) \pm desvío estándar (SD, |).

3.2.3 Bioensayo 1: Estimación de la tasa de filtración de los individuos

de *Erodona mactroides* en el tiempo

Durante todo el experimento de estimación de la tasa de filtración, los valores de salinidad, temperatura y oxígeno disuelto en promedio se mantuvieron en 2,5 ‰, 17,2 °C y 8,0 mg/l, respectivamente. Para los tratamientos con ambas tallas se observó una disminución de la biomasa fitoplanctónica como fluorescencia de la clorofila *a* durante el transcurso del ensayo (Fig. 5.). La biomasa de *Cyanobium sp.* en el control se mantuvo constante a lo largo de las 8 horas, sin embargo, a las 24 horas se observó un aumento de la misma. La tasa de filtración promedio para los individuos de talla grande fue de $0,029 \pm 0,02$ l/h ind, mientras que para los individuos de talla chica fue de $0,047 \pm 0,02$ l/h ind (Fig. 6).

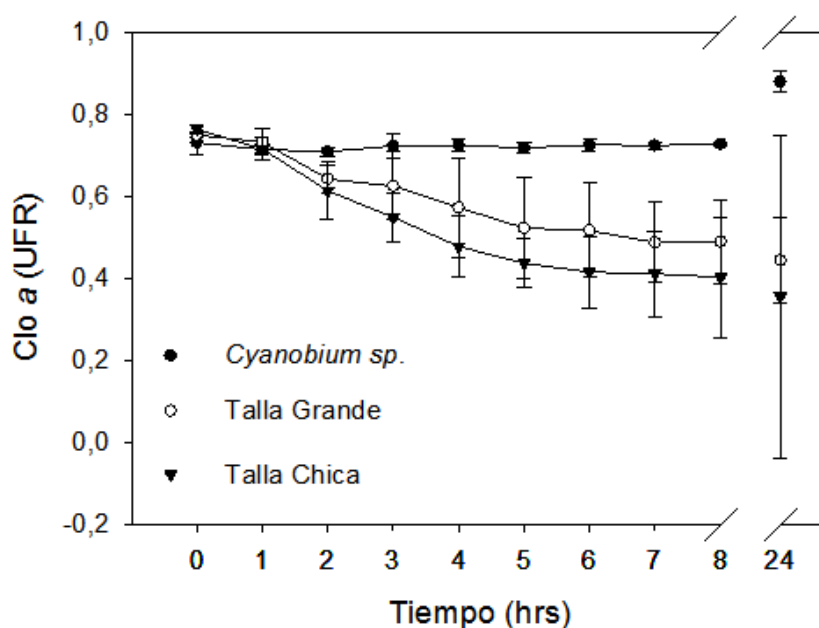


Fig. 5. Clorofila *a* (Cio *a*) de *Cyanobium sp.* (Control) y en los tratamientos con individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides* durante 8 y a las 24 horas de bioensayo. Se indican los valores promedios \pm desvío estándar (SD).

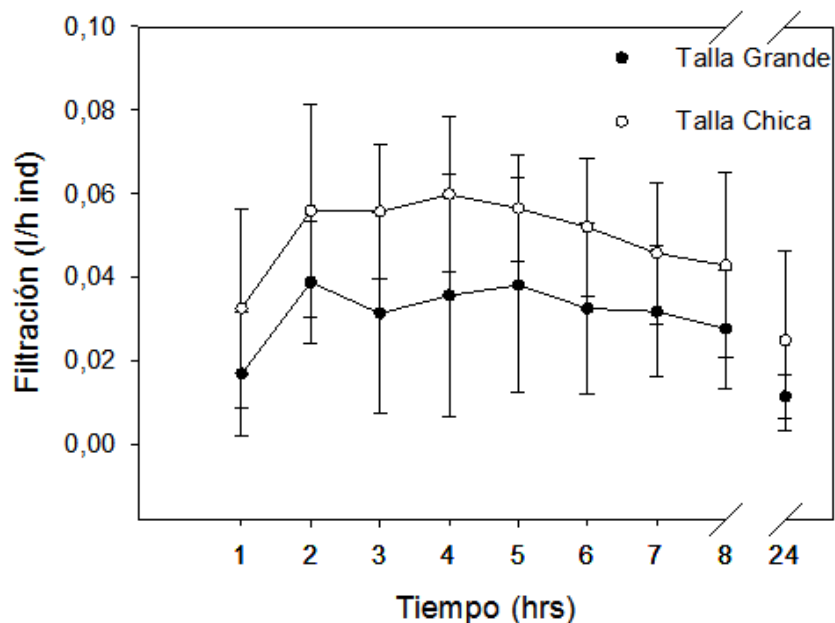


Fig. 6. Tasa de filtración promedio \pm desvío estándar para individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides* durante las 8 horas y 24 horas de bioensayo.

El GLM realizado únicamente con los valores hasta las 8 horas de experimentación no arrojó valores estadísticamente significativos entre los diferentes tiempos ($p > 0,05$), lo que se demuestra que la tasa de filtración fue similar y ocurriendo cambios menores a lo largo del mismo. Además, el análisis mostró diferencias significativas entre tallas, siendo la tasa de filtración mayor para la talla chica ($p < 0,05$).

3.2.4 Bioensayo 2: Estimación de la tasa de filtración de los organismos de *Erodona mactroides* con dos ofertas alimenticias

En el experimento de estimación de tasas de filtración con oferta alimenticia, los valores promedio de salinidad, temperatura y oxígeno disuelto se mantuvieron en 1,1 ‰, 19,0 °C y 7,6 mg/l. La tasa de filtración promedio para *Cyanobium sp.* y *Nannochloropsis sp.* fue de $0,036 \pm 0,040$ l/h ind y $0,014$ l/h \pm $0,011$ l/h ind, respectivamente. Las diferencias entre una y otra especie fueron significativas para ambas tallas ($p < 0,05$) (Fig. 7). Los individuos de talla chica mostraron una filtración

promedio de $0,008 \pm 0,006$ l/h ind, la cual fue significativamente menor comparada con la de los individuos de talla grande, que fue en promedio de $0,041 \pm 0,037$ l/h ind ($p < 0,05$) (Fig. 8). Por otro lado, se observó que la tasa de filtración a las 4 horas de ensayo fue significativamente mayor ($0,032 \pm 0,041$ l/h ind) que a las 8 horas de ensayo ($0,017 \pm 0,013$ l/h ind) ($p < 0,05$) (Fig. 9).

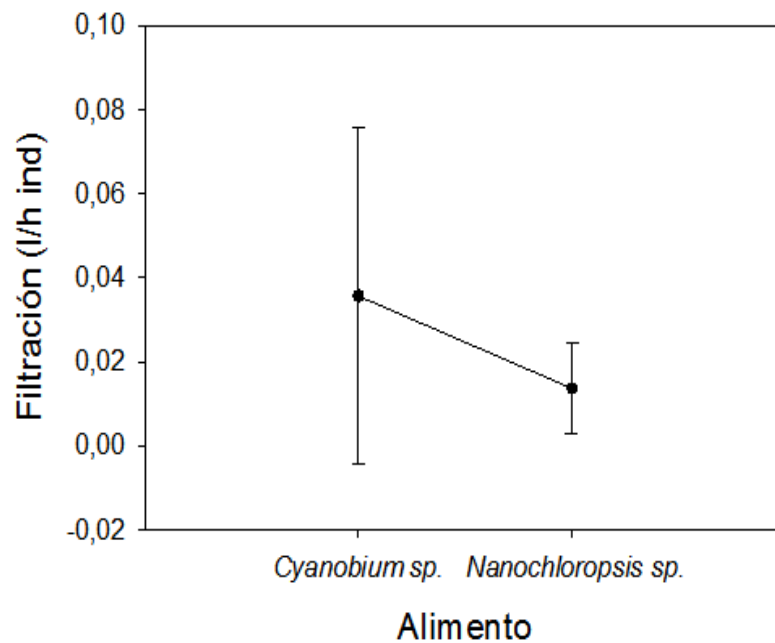


Fig. 7. Tasa de filtración promedio (●) ± desvío estándar (SD, |) de ambos alimentos ofrecidos para ambas tallas de *Erodona mactroides* estudiadas.

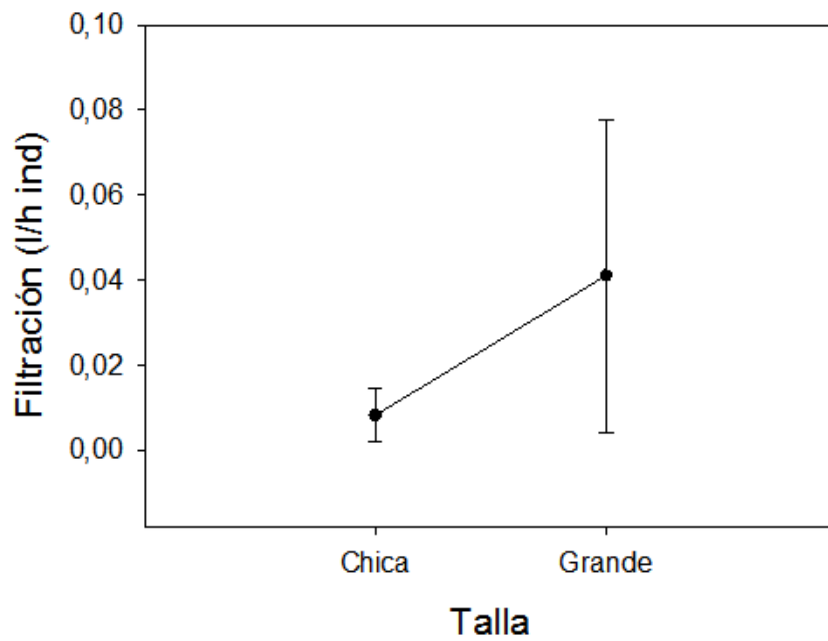


Fig. 8. Tasa de filtración promedio (●) ± desvío estándar (SD, |) para los individuos de talla grande y talla chica de *Erodona mactroides* de ambos alimentos ofertados.

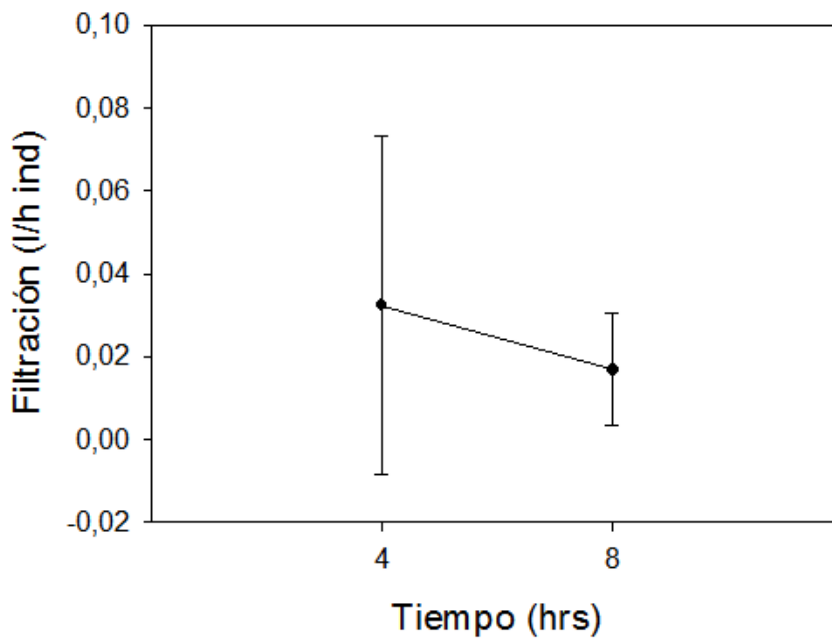


Fig. 9. Tasa de filtración promedio (●) ± desvío estándar (SD, |) en las 4 y 8 horas de ensayo de los dos alimentos ofertados a dos tallas de *Erodona mactroides*.

La filtración de *Cyanobium sp.* tanto por los individuos de talla grande y como por los de talla chica fue mayor comparada con la filtración de *Nannochloropsis sp.* (Fig. 10). La filtración promedio por parte de los individuos grandes para el primer y segundo alimento son: $0,059 \pm 0,046$ l/h ind y $0,023 \pm 0,006$ l/h ind, respectivamente. Para los individuos de talla chica la filtración promedio fue $0,012 \pm 0,006$ l/h ind y $0,004 \pm 0,002$ l/h ind, para *Cyanobium sp.* y *Nannochloropsis sp.*, respectivamente. No se observó una tasa de filtración diferencial de los alimentos entre una y otra talla ($p>0,05$) (Fig. 10.). Tanto para los individuos de talla grande como chica, la tasa de filtración promedio fue mayor a las 4 horas de ensayo comparado con la de 8 horas de ensayo (Fig. 11). A las 4 horas de experimentación la tasa de filtración promedio para los individuos de talla grande fue de $0,055 \pm 0,049$ l/h ind, mientras que para las 8 horas fue de $0,027 \pm 0,011$ l/h ind. La tasa de filtración promedio para los individuos de talla chica fue $0,010 \pm 0,007$ l/h ind y $0,007 \pm 0,005$ l/h ind, a las 4 y 8 horas de ensayo, respectivamente. No se evidenció una tasa de filtración diferencial entre una talla y otra para el tiempo de experimentación ($p>0,05$) (Fig. 11). Por otro lado, se evidenció que la tasa de filtración a las 4 horas de ensayo, para ambas algas es mayor que a las 8 horas de ensayo, por lo que no existe una tasa de filtración diferencial en el tiempo entre algas ($p>0,05$) (Fig. 12). Las interacciones entre alga, talla y tiempo no fueron significativas ($p>0,05$).

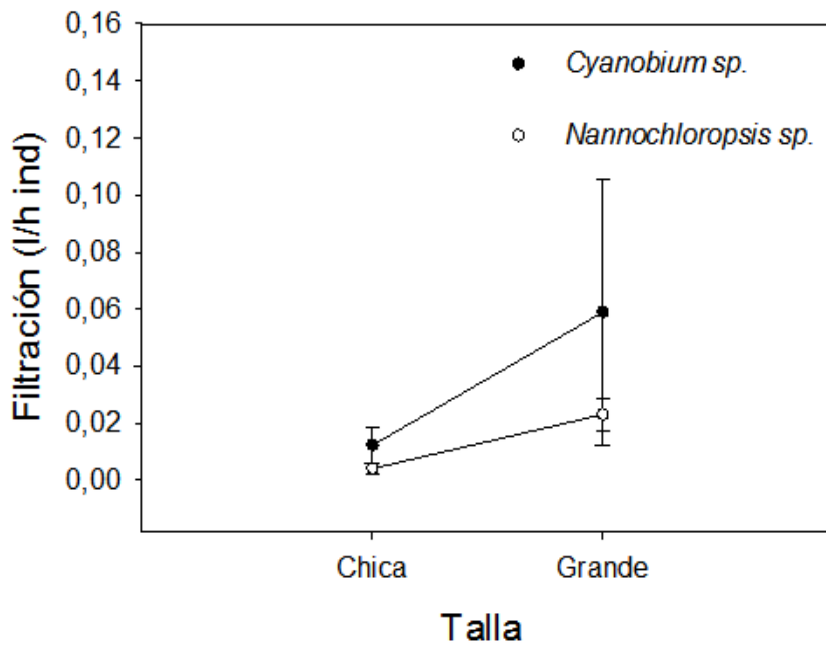


Fig. 10. Tasa de filtración promedio \pm desvío estándar para los individuos de talla grande y talla chica de *Erodona mactroides* con dos ofertas alimenticias.

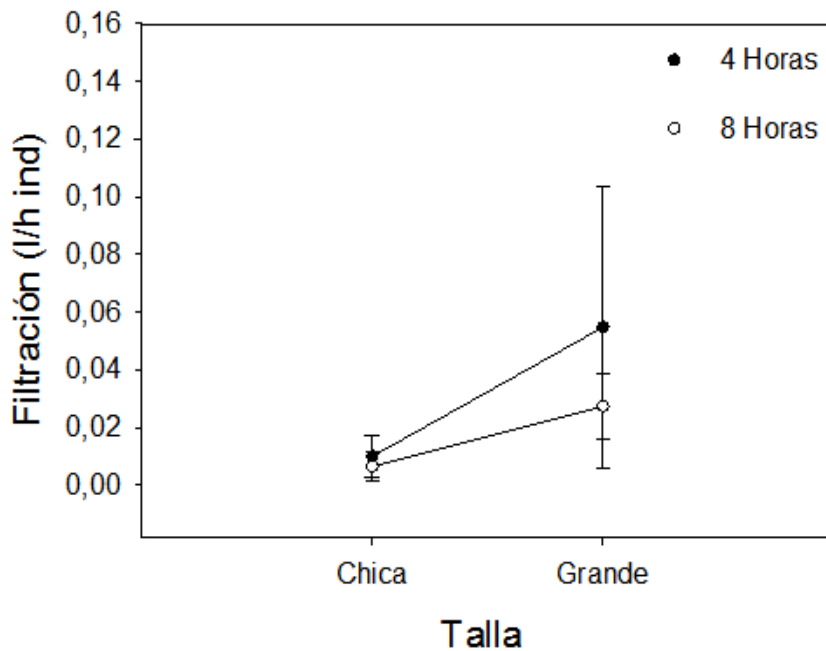


Fig. 11. Tasa filtración promedio \pm desvío estándar para los individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides* a las 4 y 8 horas de ensayo.

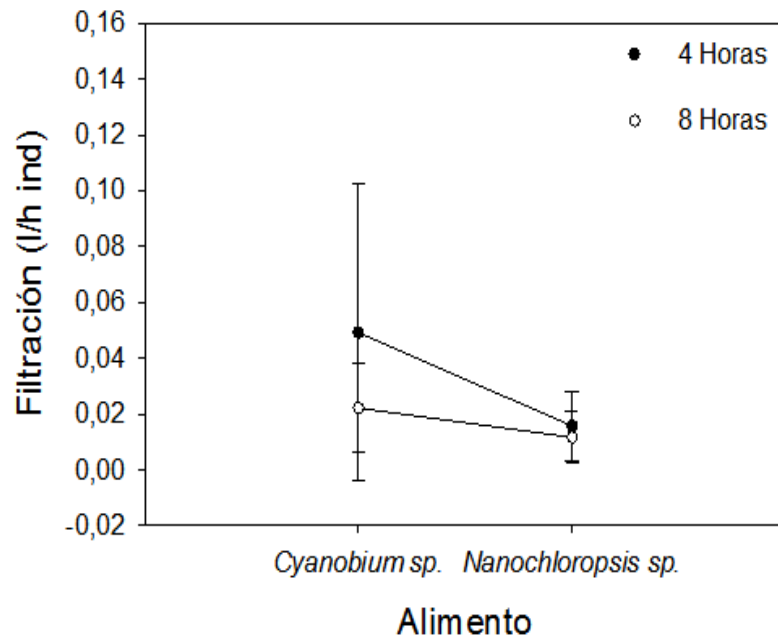


Fig. 12. Tasa de filtración promedio \pm desvío estándar para ambas ofertas alimenticias a *Erodona mactroides* en las 4 y 8 horas de ensayo.

3.2.5 Bioensayo 3: Estimación de la tasa de filtración de los individuos de *Erodona mactroides* a diferentes volúmenes de agua

Los valores promedios de salinidad, temperatura y oxígeno disuelto a lo largo del experimento de evaluación de tasas de filtración a diferentes volúmenes de agua, se ubicaron en 0,3 ‰, 18,0 °C y 7,6 mg/l. La tasa de filtración promedio para los volúmenes de agua 0,15 l, 0,25 l y 0,35 l fueron respectivamente $0,010 \pm 0,011$ l/h ind, $0,021 \pm 0,026$ l/h ind y $0,018 \pm 0,023$ l/h ind. Las mayores tasas de filtración ocurrieron en los volúmenes de 0,25 l y 0,35 l, aunque las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) (Fig. 13). Los individuos de talla grande mostraron una tasa de filtración de $0,032 \pm 0,019$ l/h ind, la cual fue mayor que la de los individuos de talla chica, que fue de $0,001 \pm 0,001$ l/h ind. (Fig. 14.). Las diferencias entre una y otra talla fueron significativas ($p < 0,05$). A las 4 horas de comenzado el experimento, la tasa de filtración fue casi el doble ($0,021 \pm 0,026$ l/h ind) que a las 8 horas de experimentación

($0,011 \pm 0,011$ l/h ind) (Fig. 15.), pero, no se observaron diferencias significativas entre los tiempos ($p > 0,05$).

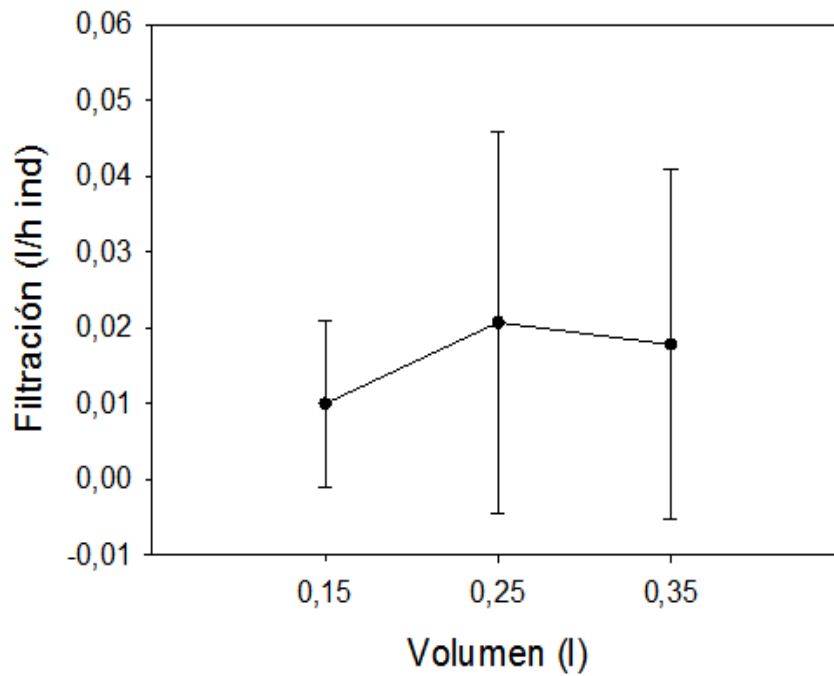


Fig. 13. Tasa de filtración promedio (●) \pm desvío estándar (SD, |) para los tres volúmenes de agua para ambas tallas de *Erodona mactroides*.

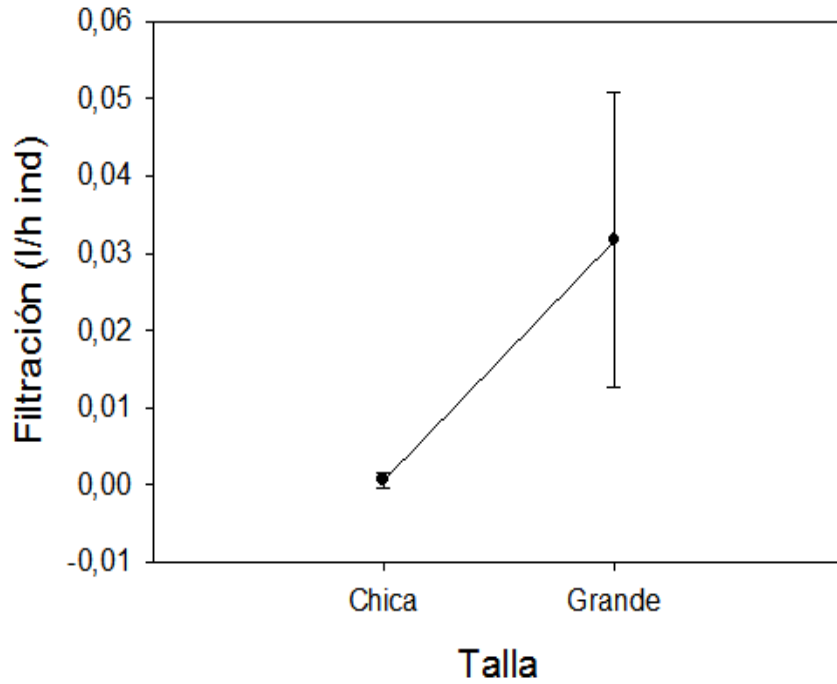


Fig. 14. Tasa de filtración promedio (●) ± desvío estándar (SD, |) para los individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides*.

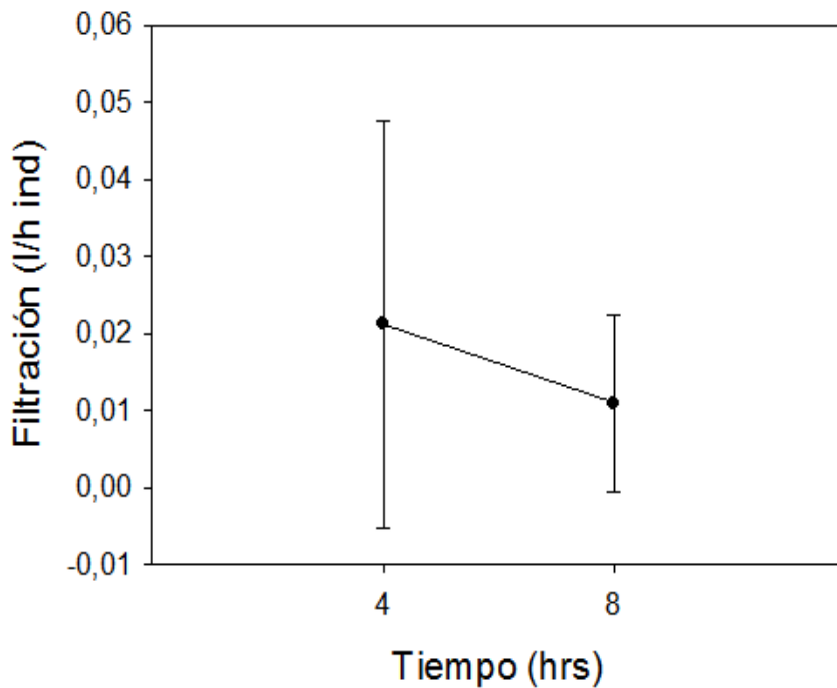


Fig. 15. Tasa de filtración promedio (●) ± desvío estándar (SD, |) para las 4 y 8 horas de ensayo para ambas tallas de individuos de *Erodona mactroides*.

En el caso de los individuos de talla grande, la mayor filtración se observó en el volumen de agua de 0,25 l, seguido por el volumen de agua de 0,35 l, aunque las diferencias no fueron significativas (Fig. 16.). Las tasas de filtración promedio para el volumen de 0,15 l, 0,25 l y 0,35 l fueron: $0,019 \pm 0,008$ l/h ind, $0,041 \pm 0,020$ l/h ind y $0,035 \pm 0,022$ l/h ind, respectivamente. Para el caso de los individuos de talla chica, la mayor filtración ocurrió en los volúmenes de agua de 0,15 l y 0,35 l, aunque las diferencias tampoco fueron significativas (Fig. 16.). Las respectivas tasas de filtración promedio para el volumen de 0,15 l, 0,25 l y 0,35 l fueron: $0,001 \pm 0,001$ l/h ind, $0,000 \pm 0,001$ l/h ind y $0,001 \pm 0,001$ l/h ind, respectivamente. Existe una tasa de filtración diferencial entre una talla y otra para los diferentes volúmenes ($p < 0,05$) (Fig. 16). Por otro lado, la tasa de filtración promedio en los individuos de talla grande fue mayor a las 4 horas que a las 8, siendo las diferencias significativas ($p < 0,05$) (Fig. 17.). Sin embargo, en los individuos de talla chica ocurrió a la inversa, pero las diferencias no fueron significativa ($p > 0,05$) (Fig. 17.). La filtración promedio para los individuos de talla grande a las 4 horas de experimentación fue de $0,042 \pm 0,022$ l/h ind, mientras que, para las 8 horas de experimentación la filtración fue de $0,021 \pm 0,007$ l/h ind. En cambio, para los individuos de talla chica, la filtración promedio fue $< 3,3 \cdot 10^{-4}$ l/h ind a las 4 horas de comenzado el ensayo, mientras que a las 8 horas fue de $0,001 \pm 0,001$ l/h ind. Por lo tanto, existe una tasa de filtración diferencial en el tiempo entre una talla y la otra ($p < 0,05$) (Fig. 17.).

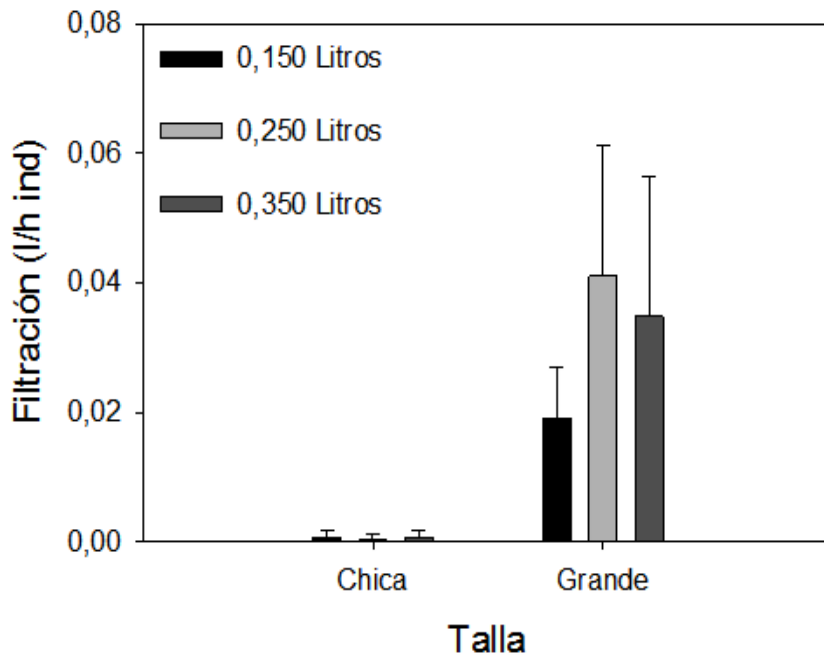


Fig. 16. Tasa de filtración promedio \pm desvío estándar de los individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides* para cada uno de los volúmenes de agua.

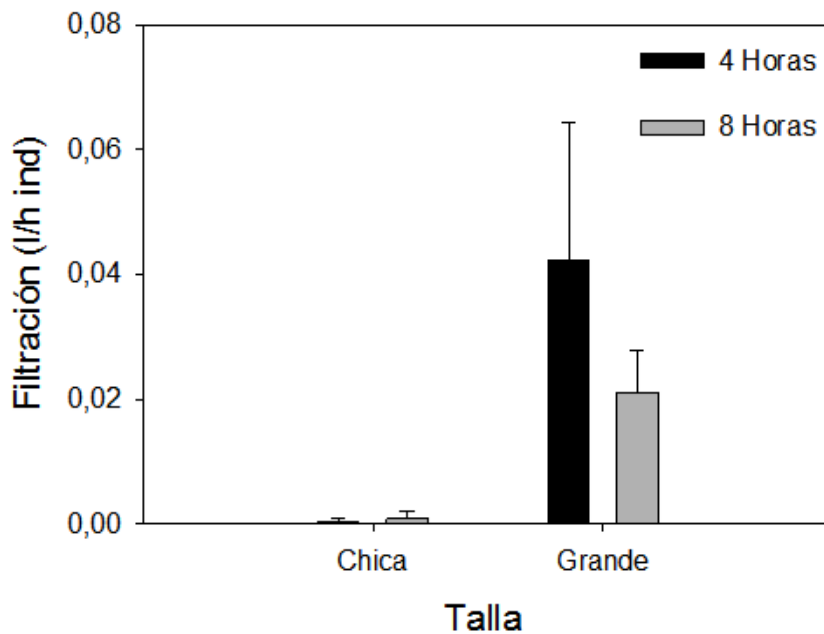


Fig. 17. Tasa de filtración promedio \pm desvío estándar de los individuos de talla grande y chica de *Erodona mactroides* para las 4 y 8 horas de bioensayo.

4. DISCUSIÓN

El conocimiento de los límites de tolerancia a la salinidad mediante ensayos de laboratorio es de suma importancia, ya que la misma ejerce una fuerte influencia en la distribución y abundancia de los organismos marinos y estuarinos (Begon et al., 2006). Así, del desarrollo de esta Tesina se obtuvieron los primeros resultados experimentales en laboratorio acerca de los efectos a corto plazo de las variaciones de la salinidad sobre la mortalidad de los individuos de la especie *Erodona mactroides* del Río de la Plata (Uruguay). En lo general, se obtuvo un bajo porcentaje de mortalidad total tanto de los individuos de talla grande (6,6%) como chica (22%) durante todo el experimento (96hs). Los individuos de *E. mactroides* no se vieron significativamente afectados por las altas salinidades. Sin embargo, para el caso particular de la salinidad 0,3 ‰, la tasa de mortalidad fue diferencial con respecto a las otras salinidades al final del experimento: 70% de mortandad para los individuos de talla chica y solo 10% de mortandad para los individuos de talla grande.

Por otro lado, a partir de los ensayos de tasa de filtración implementados en esta Tesina se pudieron alcanzar las primeras estimaciones de las tasas de filtración tanto de individuos de talla grande como chica de *E. mactroides*. En este contexto, se evaluó la dependencia de la tasa de filtración de los bivalvos con el tiempo, así como, la estimación de la misma a distintas ofertas alimenticias y volúmenes de agua. Para el caso del **Bioensayo 1** se observó que los individuos mostraron una filtración similar en el tiempo. Sin embargo, en el **Bioensayo 2**, la tasa de filtración de los individuos decayó de las 4 a las 8 horas de experimentación. Además, en el caso del **Bioensayo 2**, se obtuvo que los individuos preferían *Cyanobium sp.* frente *Nannochloropsis sp.* Por otra parte, la filtración entre los diferentes volúmenes en el **Bioensayo 3** no fueron significativas. Los individuos de talla grande mostraron mayores filtraciones que los individuos de talla chica en dos de los experimentos.

4.1 Aclimatación en el laboratorio

Los bivalvos han sido ampliamente utilizados para bioensayos de toxicidad en laboratorio, debido a que poseen diversos atributos que los hacen aptos para la realización de los mismos (Reish & Oshida, 1987). Una de las características que los hace importantes como especies modelos es su amplia distribución y abundancia, así como, su fácil colección (Reish & Oshida, 1987; Ronco et al., 2004). En este sentido, *E. mactroides* es una especie sedentaria que se encuentra en abundancia en varios sistemas costeros de nuestro país como orillas de ríos, arroyos, lagunas y playas estuarinas (Olazarri, 1966; Jorcín, 1996; Scarabino, 2006). En particular, la especie se encuentra en altas densidades en la Playa Penino, lo cual permitió su recolección en grandes cantidades y en diferentes épocas del año.

Asimismo, es importante que la mantención de los mismos sea sencilla, y su adaptabilidad a las condiciones de laboratorio (Reish & Oshida, 1987; Ronco et al., 2004). En el laboratorio, su reducido tamaño corporal permitió mantener un gran número de individuos dentro de pocos contenedores, sin afectar la calidad del agua, lo cual reduce los costos de mantenimiento de los organismos y facilita la manipulación de los mismos. Durante el periodo de aclimatación de 7 días, los parámetros físicos (salinidad, temperatura y oxígeno disuelto), se mantuvieron dentro de los rangos de valores encontrados para su hábitat natural (Jorcín, 1996, 1999; Meerhoff, 2009). Además, la baja tasa de mortalidad registrada (<10%) durante 7 días de aclimatación, indica una rápida adaptación a las condiciones de laboratorio. Asimismo, los individuos de *E. mactroides*, pudieron sobrevivir durante este periodo sin ser alimentados. Estas características sugieren *E. mactroides* podría ser adecuada como especie modelo para diversos estudios de laboratorio de corto plazo relacionados a toxicidad, sin sufrir tasas de mortalidades muy elevadas.

4.2 Ensayo agudo de laboratorio

La capacidad de un animal para regular la concentración osmótica interna óptima en contra de los gradientes externos es lo que determina la tolerancia a la salinidad de la especie (Hart et al., 1991). Así, los límites de salinidad superior e inferior para un individuo dependerán de su genética, de las condiciones fisiológicas, de la edad (etapa del ciclo de vida), sexo y tamaño del individuo, y la historia de salinidad previa (Kinne, 1966). Los rangos de salinidad dentro de los cuales los organismos pueden sobrevivir son diferentes entre las especies (Sundaram & Shaffe, 1989; Pattillo et al., 1995; Verween et al., 2006; Carvalho et al., 2015).

De acuerdo con los resultados derivados del ensayo agudo de supervivencia se rechaza la **Hipótesis 1 - Predicción 1: mayor mortalidad en salinidades mayores**, ya que los individuos no se vieron significativamente afectados por el aumento de la salinidad. Los individuos de talla grande pueden tolerar un rango de salinidad de entre 0,3 a 20 ‰, en un corto plazo. Por otra parte, se evidenció que los individuos de talla chica presentaron una alta mortalidad en la menor salinidad, sugiriendo su gran sensibilidad a condiciones de extrema baja salinidad. Por lo tanto, los individuos de talla chica tolerarían a corto plazo valores de salinidad mayores, estando 0,3 ‰ por debajo del rango de salinidad que tolerarían los individuos de talla chica de esta especie. Se ha visto en algunos taxones, los rangos de tolerancia a la salinidad entre jóvenes y adultos pueden ser diferentes debido a capacidad osmorregulatorias distintas (Kefford et al., 2007). Amplios rangos de tolerancia a la salinidad han sido notados en otras especies estuarinas. Así por ejemplo, los adultos de la especie *Mytopsis leucophaeata* (Bivalvia) pueden vivir en un rango de salinidad desde 0,1 hasta 26,4 ‰ (Verween et al., 2006; Pattillo et al., 1995). Asimismo, los juveniles de las especies *Rangia cuneata* (Bivalvia) son capaces de resistir salinidades desde 0,0 hasta 30 ‰, si bien su rango óptimo de supervivencia es entre 5 hasta 18 ‰.

La supervivencia de *E. mactroides* en un extenso gradiente de salinidad indica que es capaz de soportar un cambio osmótico importante, lo cual mostraría ser consistente con la distribución de la especie contemplada en algunos sistemas acuáticos. Los resultados obtenidos de estos bioensayos coinciden con observaciones de campo espacio-temporales llevadas a cabo en la Laguna de Rocha y Castillos (ver Tabla 1). En estas lagunas la especie se distribuye en un extenso rango de salinidad, desde 0,50 hasta 19,30 ‰ en la primer laguna, y desde 0,0 hasta 26,0 ‰ para la segunda (Jorcín, 1996, 1999). Asimismo, en la Laguna de los Patos se ha encontrado a la especie en un amplio rango de salinidad (Bemvenuti, 1987; Bemvenuti & Netto, 1998). En la Laguna Castillos, la especie desarrolla sus máximas densidades poblacionales en sitios donde las salinidades son intermedias (salinidad máxima observada para los sitios desde 9,9 hasta 13,6) (Jorcín, 1999). Por otro lado, en la Laguna de Rocha, se encuentran las mayores densidades de los individuos desde 1,32 hasta 14,15 ‰ (Jorcín, 1996) (ver Tabla 1).

Según Kinne (1966), los animales estuarinos presentan mecanismos compensatorios de regulación para contrarrestar las condiciones de salinidad perjudiciales, entre ellos, regulación iónica, regulación del volumen celular y osmorregulación. Muchos animales muestran la habilidad de regular la composición iónica de sus fluidos celulares (Kinne, 1966). Cuando ocurre un rápido cambio de salinidad, las células de la mayoría de los tejidos pueden invocar un mecanismo de decrecimiento o aumento del volumen celular en respuesta al estrés osmótico, presumiblemente mitigando las consecuencias funcionales de un cambio de volumen (Neufeld & Wrigth, 1996). Así, las células de los tejidos de los bivalvos tienen una gran habilidad para regular el volumen celular por pérdida o ganancia de solutos osmóticamente activos (Neufeld & Wrigth, 1996). Por otro lado, la capacidad que tienen los animales estuarinos de osmorregular, les permite el mantenimiento de la osmolaridad interna en un gradiente de salinidad de hasta 20 o 30 ‰ y esto los hace fisiológicamente independientes de fluctuaciones de

salinidad a corto plazo (Kinne, 1966). Además, otro mecanismo de respuesta de los bivalvos a las condiciones de estrés del ambiente externo es el cierre de las valvas, la retracción de las partes sensibles y la inactividad (Kinne 1966; Verdelhos et al., 2015), lo cual ayuda temporalmente a soportar los cambios dramáticos del ambiente. El cierre prolongado de las valvas causa anoxia y acumulación de productos de desecho, como tal el organismo puede ser obligado a regular el volumen celular, y abrir las valvas con el fin de soportar las demandas de oxígeno y alimento y liberación de los desechos nitrogenados. Sin embargo, en casos graves, los organismos pueden no ser capaces de hacer frente a la alta tensión osmótica y morir como consecuencia de su incapacidad para regular el volumen celular (Verdelhos et al., 2015).

La respuesta de *E. mactroides* frente al estrés ambiental generado por los cambios de salinidad fue dependiente del tamaño. Al final del experimento, los individuos de tallas menores presentaron una mortalidad significativa con respecto a los individuos de talla grande, por lo cual se acepta la **Hipótesis 2 - Predicción 2: mayor mortalidad en individuos de tallas menores debido a la susceptibilidad y menor tolerancia a cambios de salinidad.** La capacidad de un animal para regular la concentración osmótica interna óptima en contra de los gradientes externos es lo que determina la tolerancia a la salinidad de la especie (Hart et al., 1991). Se ha observado que esta habilidad depende, entre otros factores, del tamaño corporal del individuo y de la etapa del ciclo de vida (e.g. juveniles, adultos) (Hart et al., 1991; Kefford et al., 2007). En la Laguna de los Patos, los juveniles menores a 20 mm fueron considerados juveniles (Geraldí, 2002, Colling et al., 2010), por lo que se podrían considerar los individuos de talla pequeña utilizados en esta Tesina como juveniles de *E. mactroides*. Kefford (2007), distingue que la tolerancia a la salinidad en algunos taxones es distinta en las etapas jóvenes que las adultas debido a que regulan sus fluidos a una osmolaridad distinta y además, la osmolaridad de los fluidos internos que uno y otro estadio pueden soportar pueden ser distintos. Por lo tanto, las diferencias en las tallas de los

organismos y el estadio de ciclo de vida en el que se encuentran, podrían explicarse por diferentes habilidades osmorregulatorias, que resultan en límites de tolerancia a la salinidad distintos entre las clases de tallas.

Los rangos de salinidad tolerados por bivalvos se muestran sumamente variables entre especies. Por ejemplo, en bioensayos de laboratorio realizados con el bivalvo *Paphia malabarica*, se evidenció una mortandad del 100% cuando la salinidad fue de 0 y 5 ‰, en ambas tallas de individuos (Mohan & Velayudhan, 1998), pero, en el rango de salinidad de 10-15 ‰, se evidenció una mortalidad mayor en individuos de talla chica que grande. Sin embargo, en la especie de bivalvo *Mesodesma mactroides*, los resultados obtenidos son diferentes. En esta especie se observó una mortalidad diferencial de tallas cuando la salinidad externa era de 10 g/l, observándose a las 96 horas de experimentación una mayor tolerancia para los individuos de talla chica que grande (Carvalho et al., 2015).

Las respuestas a nivel poblacional de estos efectos individuales muestran que las consecuencias del decaimiento de la abundancia de bivalvos como resultado de alteraciones salinas pueden ser amplias. Por un lado, el decaimiento de la abundancia de éstos organismos en un sistema puede afectar negativamente el tamaño de la población, distribución y demografía de los individuos (McLeod & Wing, 2008). Además, la disminución de las poblaciones puede producir un incremento de la inestabilidad del sedimento y turbidez, la pérdida de hábitat para epibiontes y el incremento de concentraciones de seston, decaimiento de los depredadores y de las especies de niveles tróficos superiores. Asimismo, puede provocar una disociación entre los procesos bénticos y pelágicos, con una pérdida potencial del flujo de carbono hacia la red alimentaria infaunal y un cambio a un alimento basado en detritus con amplio reciclaje bacteriano de fuentes de carbono menos lábiles. Esto a su vez podría

reducir la productividad de los niveles tróficos superiores de estas comunidades (McLeod & Wing, 2008).

4.3 Ensayos de filtración

En general, los valores de tasas de filtración encontradas en bivalvos son ampliamente variables (Sylvester et al., 2005; Petsana et al., 2009; Marroni, 2012). Las distintas tasas de filtración de *Erodona mactroides* encontradas en este trabajo pueden deberse a varios aspectos, entre ellos, el tiempo de experimentación (Filgueira et al. 2009), concentración y tipo de fuente alimenticia ofrecida (Riisgård et. al., 2003; Filgueira et al. 2009; Marroni, 2012), el volumen de agua experimental empleado (Tantanasarit et al., 2013), así como, el tamaño corporal de los individuos (Riisgård, 2001b; Marroni, 2012). Algunos de los valores de tasas de filtración encontradas para esta especie en este trabajo están dentro del rango de valores observados para *Dreissena polymorpha* (Bivalvia). Los organismos de talla grande (20-25 mm) y de talla chica (10-15 mm) de *D. polymorpha* cuando se les suministró como alimento la clorofita unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, presentaron una tasa de filtración de 0,041-0,250 l/h ind y 0,032 l/h ind, respectivamente (Berg et al., 1996).

4.3.1 Bioensayo 1: Estimación de la tasa de filtración de los individuos de *E. mactroides* en el tiempo

El comportamiento de la tasa de filtración a lo largo del tiempo resalta la importancia de ésta variable en los ensayos (Filgueira, 2009; Marroni, 2012). En el bioensayo 1, la tasa de filtración de los individuos tanto de talla grande como chica de *Erodona mactroides* durante las 8 horas de experimentación fue similar, para una concentración inicial de células de aproximadamente 1.10^5 cel/ml por recipiente. Con este resultado se rechaza la **Hipótesis 3 - Predicción 3: la tasa de filtración será mayor al inicio del experimento e irá disminuyendo con el transcurso del tiempo**. En los bivalvos,

la compensación de los cambios cuantitativos y cualitativos del alimento disponible, con el propósito de maximizar la asimilación energética, implica una gran flexibilidad de la tasa de filtración (Riisgård 2001; Filgueira et al., 2009). Así, en términos de alimento disponible, el espectro de condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el proceso de filtración a su máxima capacidad ocurre dentro de un rango óptimo de concentración de alimento, limitado por un umbral inferior y otro superior (Riisgård, 2001; Filgueira et al., 2009), fuera de los cuales se observa una reducción de la tasa de filtración en los bivalvos (Riisgård, 2001; Filgueira et al., 2009). Por lo tanto, la concentración inicial de cianobacterias utilizadas en este bioensayo podría ser óptima para que los organismos mantengan una tasa de filtración constante durante al menos 8 horas, sin evidenciarse una reducción significativa de la misma en el tiempo.

En otros estudios, también, se han encontrado tasas de filtración constantes en el tiempo. Así, Filgueira et al. (2009) encontraron que la filtración del bivalvo *Mytilus galloprovincialis* no varía a lo largo del tiempo cuando la dieta contenía entre 2.08 y 26.91 $\mu\text{g Clo a/l}$, fuera de estos límites se observó una reducción de la misma en el tiempo. Por otra parte, Riisgård & Randlov (1981), encontraron que la tasa de filtración de *Mytilus edulis* fue independiente del tiempo cuando la concentración de células de la diatomea *Phaedactylum tricurnutum*, era aproximadamente 1×10^3 cel/ml, mientras que, Winter (1973) observó una tasa de filtración más o menos constante en este bivalvo ocurría cuando la concentración de la clorofita *Dunaliella marina* está en un rango de $1-4 \times 10^3$ cel/ml.

Se ha postulado que la superficie branquial de un bivalvo es proporcional al cuadrado del largo de la valva del organismo (L^2) (Jones et al, 1992; Riisgård, 2001b). A su vez, la capacidad filtradora de un organismo es directamente proporcional al área branquial, por lo tanto, la tasa de filtración es también proporcional a L^2 (Jones et al, 1992; Riisgård, 2001b). Así los individuos de mayor tamaño presentarían mayores

tasas de filtración que los individuos de menores tamaños. Muchos estudios con bivalvos muestran que la filtración se relaciona con el tamaño de los organismos (Widdows, 1979; Rajesh et al., 2001; Riisgård, 2001b; Resgalla et al., 2007; Marroni, 2012, y las referencias de estos documentos). Sin embargo, en este bioensayo los resultados fueron opuestos, el porcentaje de remoción de alimento de la columna de agua, y por lo tanto, la tasa de filtración, fue mayor en los individuos de tallas menores que mayores. Con este resultado, también se rechaza la **Hipótesis 3 - Predicción 3: tasa de filtración mayor en individuos de talla grande que chica**. Las tasas de filtración de los individuos pueden ser excepcionalmente bajas cuando los individuos están expuestos a condiciones adversas como el estrés (Filgueira, 2007), probablemente debido a algún disturbio de manipulación durante el experimento o a eventos desconocidos ocurridos en el ambiente previamente a la recolección (e.g. inanición prolongada, anoxia, etc.). Asimismo, un alimento disponible que no sea representativo del hábitat natural podría causar una reducción de la tasa de filtración (Filgueira, 2007). Además, se ha observado que la tasa de filtración, por ejemplo, en mejillones son dependientes de las condiciones de alimentación previas o del periodo de inanición luego de haber sido colectado los bivalvos (Riisgård et al., 2006).

Por otro lado, el mantenimiento de los organismos en el laboratorio se lleva a cabo como un proceso de aclimatación bajo ciertas condiciones experimentales (e.g. temperatura, salinidad, disponibilidad de alimento), pero, estas condiciones la fisiología de los organismos puede verse alterada (Resgalla et al., 2007). El proceso de aclimatación resulta en una alteración en la tasa de ventilación y en una concomitante reducción (o incremento) en los costos metabólicos del bombeo de agua a través de las branquias del bivalvo (Resgalla et al., 2007). En este sentido, si bien los individuos de ambas tallas fueron aclimatados a las mismas condiciones y no se registró mayor mortalidad, la fisiología de los mismos pudo haberse modificado, lo cual quizás en el

caso de los individuos de talla grande resultado en una menor tasa de filtración en este experimento.

Asimismo, es incierto a qué condiciones ambientales previas al estudio estuvieron expuestos los bivalvos en su hábitat natural. Algunos parámetros ambientales (e.g. cambios de salinidad, temperatura) han sido descritos como agentes que cambian la fisiología de los bivalvos (Navarro, 1988; Marsden, 2004; Guzmán-Agüero et al., 2013). Igualmente, el reducido número de réplicas utilizado en el bioensayo, así como, la toma de una única medida de fluorescencia por recipiente, pueden haber arrojado estimaciones de las tasas de filtración inexactas. De esta forma, todos estos aspectos mencionados anteriormente podrían haber ocasionado que la tasa de filtración en los individuos de talla grande fuera menor con respecto a la de los individuos de talla chica.

Más allá de esto, los resultados hallados en este experimento concuerdan con los encontrados por los autores Tantanasarit et al. (2013), en donde los organismos de tallas menores mostraron una mayor tasa de filtración que los individuos de tallas mayores. Estos autores explican que las bajas tasas de filtración en bivalvos de talla chica son observadas cuando la concentración de alimento a la que son expuestos es densa. Esto ocasionaría la obstrucción de sus branquias, visualizándose en una menor filtración por parte de los mismos (Tantanasarit et al, 2013). En los otros dos experimentos (discutidos más abajo), la concentración de alimento utilizada fue mayor con respecto a este bioensayo, lo cual puede haber derivado en una menor tasa de filtración de los individuos de talla chica en comparación con los individuos de talla grande.

4.3.2 Bioensayo 2: Estimación de la tasa de filtración de los organismos de *Erodona mactroides* con dos ofertas alimenticias

Los bivalvos filtradores seleccionan el alimento en base a características cualitativas y cuantitativas del mismo (Ward & Shumway, 2004). En este sentido, el tamaño de las partículas de alimento juega un rol muy importante en la modulación de las tasas de filtración en bivalvos (Ward & Shumway, 2004; Pestana et al., 2009). En el caso del bioensayo 2, la tasa de filtración de los individuos de *E. mactroides* fue significativamente mayor para *Cyanobium* sp. (Picoplancton), que para *Nannochloropsis* sp. (Nanoplancton). *Cyanobium* es un género de cianobacterias unicelular, pequeñas, generalmente de 1 - 2 μm de largo, y cerca de 1 μm de ancho, oval, elipsoide a forma de varilla (Guiry & Guiry, 2015). En cambio, *Nannochloropsis* es un género de algas de la clase Eustigmatophyceae unicelulares, sub-esféricas de 2 - 4 μm de diámetro, o cilíndricas de 3 - 4x1,5 μm (Guiry & Guiry, 2015). Así, las diferencias en las tasas de filtración observadas en este bivalvo para uno y otro alimento pueden explicarse debido al diferente tamaño de las mismas, confirmando la **Hipótesis 4 - Predicción 4: mayor preferencia de *Erodona mactroides* por alimento de menor tamaño.**

En un experimento de laboratorio realizado con el bivalvo *Limnoperna fortunei*, también, se observaron tasas de filtración diferenciales de acuerdo al tamaño de las algas empleadas (Pestana et al., 2009). En este caso, la especie filtró selectivamente las partículas que eran la mitad de tamaño de la otra ofertada (Pestana et al., 2009). Esto coincide con los resultados obtenidos en esta Tesina, en el sentido en que la filtración de *Cyanobium* sp. por parte de los bivalvos fue casi 3 veces mayor que para *Nannochloropsis* sp. Por otro lado, cuando a los bivalvos de *Mytilus edulis* (diámetro de valvas de 1.5 a 25 mm) se les suministró como alimento picoplancton (tamaño promedio de 0,7 - 1 μm) y nanoplancton (tamaño promedio de 6,6 μm), se constató

que los individuos filtraron promedialmente el doble de algas nanoplanctónicas que picoplanctónicas (Jacobs et al., 2015). Es así que, además, del tamaño de la partícula, otros aspectos propios de las fuentes de alimentos (e.g. forma de la célula, flexibilidad, densidad, propiedades de la superficie de la célula), así como características inherentes de los organismos filtradores (e.g. morfología de los cilios laterofrontales del ctenidio) podrían estar mediando la captura de las partículas parte de los bivalvos, (Ward & Shumway, 2004). La remoción selectiva de las partículas por tamaño por parte de los bivalvos, puede resultar en cambios en los grupos de fitoplancton presentes en un sistema (Jacobs et al., 2015). La información del potencial efecto de las tasas de filtración de los bivalvos en relación al tamaño de la partícula, en las redes pelágicas proporciona una estimación más realista del efecto de las grandes poblaciones de animales filtradores en la capacidad de carga de los ecosistemas (Jacobs et al., 2015).

En este ensayo, la filtración de los organismos de talla grande fue superior a la de los individuos de talla chica, confirmándose la **Hipótesis 4 - Predicción 4: tasa de filtración mayor en individuos de talla grande que chica**. Estos resultados coinciden con los encontrados por Marroni (2012), en donde las tasas de filtración de los individuos de talla grande como chica de *Diplodon parallelopipedon*, fueron mayores que las observadas para *Corbicula fluminea*, bivalvo de menor tamaño en comparación con el primero. Asimismo, tasas de filtración mayores en individuos de tallas grande con respecto a los de talla menores también se han observado en bivalvos de las especies *Perna viridis*, *Paphia malabarica* y *Crassostrea madrasensis* (Rajesh et al., 2001).

En el bioensayo 2 se observó una reducción de la tasa de filtración tanto en los individuos de talla grande como chica de *E. mactroides* desde las 4 horas hasta las 8 horas de experimentación cuando la concentración de alimento inicial fue de aproximadamente 1.10^6 cel/ml por recipiente. Las reducciones de las tasas de filtración

en el tiempo se han correlacionado con altas concentraciones de alimento (Riisgård 2001). El decrecimiento de las tasas de filtración por saturación como resultado del reducimiento de la apertura de las valvas fue interpretada como una reacción de saciamiento o sobrecarga del sistema digestivo o como una regulación fisiológica de la tasa de filtración en base a necesidades nutricionales (Riisgård, 2001). Otros autores establecen que la reducción en la tasa de filtración es consecuencia de un ajuste fisiológico para lograr una optimización de la energía (Filgueira et al., 2009). Clausen & Riisgård (1996) reportaron que el mejillón *Mytilus edulis* responde a altas concentraciones de alimento (1.10^4 a $2,4.10^4$ cel/ml, equivalente a 17 a 31 $\mu\text{g Clo a/l}$) reduciendo la tasa de filtración alrededor de un 40%. Por otro lado, Filgueira et al. (2009) evidenció un patrón de reducción de la tasa de filtración del bivalvo *Mytilus galloprovincialis* en el tiempo ante condiciones elevadas de alimento. En este bioensayo no se observaron tasas de filtración diferenciales entre una y otra talla de individuos de *E. mactroides* para ninguna de las variables de este experimento (i.e. consumo de alimento, filtración en el tiempo). Asimismo, tampoco se observó una tasa diferencial de filtración para uno u otro alimento en el tiempo.

4.3.3 Estimación de la tasa de filtración de los individuos de *E. mactroides* a diferentes volúmenes de agua

La información que existe acerca de la relación entre las tasas de filtración y la densidad de los bivalvos expresada en términos del agua que rodea a cada individuo (L/ind) es escasa (Tantanasarit et al., 2013). La tasa de filtración varía con la densidad de los organismos, por lo tanto, la densidad de los bivalvos es una parte fundamental de cómo se calculan las tasas de filtración (Konrad, 2014). Así, a bajas densidades de bivalvos, la filtración no cambia apreciablemente la concentración de seston y la cantidad de seston aclarado de la columna de agua se puede aproximar a una tasa de filtración multiplicada por la densidad de los bivalvos filtradores (escala lineal). Sin

embargo, cuando las densidades de los filtradores son mayores, el agua puede filtrarse varias veces, y ocurre una retroalimentación negativa entre la tasa de filtración y la densidad de los individuos (esto es, la tasa de filtración decrece con el incremento de la densidad) (Konrad, 2014).

En este bioensayo se observó que las mayores tasas de filtración ocurrieron en los volúmenes de agua de 0,25 l y 0,35 l, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Esto rechaza la **Hipótesis 5 - la primera Predicción 5: tasa de filtración mayor cuanto mayor es el volumen de agua**. Estos resultados no coinciden con los encontrados por Tantanasarit (2013) para el mejillón de la especie *Perna viridis*. Mediante ensayos de laboratorio se evidenció que la tasa de filtración de esa especie crece conforme aumenta el volumen de agua empleado, y que ésta condición representa bajas densidades del mejillón (Tantanasarit, 2013).

Al igual que en el bioensayo 2, las tasas de filtración obtenidas para este experimento fueron mayor en los individuos de talla grande que chica de *E. mactroides*. Este resultado confirma la **segunda predicción de la Hipótesis 5: tasa de filtración mayor en individuos de talla grande que chica**. Los individuos de talla chica presentaron valores promedios de tasas de filtración muy bajos y en el tratamiento en donde el volumen de agua fue 0,25 l, la misma fue en promedio cero. Una posible explicación para este valor de tasa de filtración igual a cero, es que los bivalvos presentan una innata variación temporal en la actividad filtradora, es decir, tienen periodos de descanso, en donde se detiene el filtrado y ocurre el cierre de sus valvas (McIvor, 2004). Se espera que una proporción de los bivalvos puedan estar no filtrando durante los experimentos, siendo otra fuente potencial de variación en las estimaciones de la tasa de filtración (McIvor, 2004). En un ensayo de laboratorio realizado con las especies de bivalvos *Anodonta anatina*, *Unio pictorum*, *Unio tumidus* y *Pseudanodonta complanata*, se observó que una proporción de individuos de todas

estas especies no filtraban durante los experimentos, a pesar de estar expuestos todos los organismos a las mismas condiciones experimentales (Mclvor, 2004), resaltándose de esta manera la variación en el comportamiento de los bivalvos. La filtración en los bivalvos se relaciona linealmente con la apertura de las valvas (Riisgård et al., 2003), y el ritmo del movimiento de estas valvas puede ser endógeno (Morton, 1970). Este ritmo en los bivalvos depende las condiciones de luz-oscuridad (Englund & Heino, 1994), y los cuales pueden verse interrumpidos cuando se traen los organismos al laboratorio (Mclvor, 2004). Se ha apreciado, por ejemplo, que el bivalvo *Anodonta antina* presenta un ritmo diurno de apertura de las valvas, con sus valvas mayoritariamente abiertas durante la noche, y momento en el cual se estarían alimentando, y menos durante la mañana. Por lo tanto, la ausencia de filtración de los individuos de talla chica puede deberse a la alteración del ritmo endógeno y que se encontraran descansando durante el experimento.

Por otro lado, la reducida filtración de los bivalvos de talla chica puede deberse a que los organismos se encontrasen estresados (Filgueira, 2007), debido a algún disturbio causado producto de la manipulación durante el experimento. Por lo tanto, estos aspectos mencionados podrían explicar la baja tasa de filtración observada en los bivalvos de esta talla durante este bioensayo, en donde las medidas de fluorescencia pueden haber sido tomadas durante periodos de descanso de algunos de los bivalvos.

En particular, para los individuos de talla grande la filtración en promedio a las 4 horas de comenzado el experimento si fue significativamente mayor que a las 8 horas de experimentación, lo cual coincide con el ensayo anterior. Sin embargo, en los individuos de talla chica no ocurrió lo mismo, debido al comportamiento diferencial entre los individuos. Esto es, menor cantidad de individuos se encontraban filtrando a las 4 horas de ensayo que a las 8 horas, resultando en una mayor tasa de filtración promedio en el tiempo final de experimentación.

4.3.4 Problemas encontrados y recomendaciones

Los resultados obtenidos en los bioensayos relacionados a las tasas de filtración parecen ser en algunos casos discordantes con la amplia bibliografía consultada e incluso entre los experimentos. Una gran mayoría de estudios han demostrado que la filtración es mayor en los individuos de tallas mayores (Widdows, 1979; Rajesh, 2001; Riisgård, 2001b; Resgalla et al., 2007; Marroni, 2012, y las referencias de estos documentos). Sin embargo, en el desarrollo de esta Tesina, en el **Bioensayo 1**, la tasa de filtración fue mayor en los individuos de talla chica que en los de talla grande, mientras que, en los **Bioensayos 2 y 3**, ocurrió lo contrario. En este sentido, para el diseño experimental se recomienda aumentar el número de réplicas a utilizar, así como tomar medidas de fluorescencia por triplicado de los cambios en la cantidad de alimento. Asimismo, podría ser conveniente medir las tasas de filtración de los individuos con otra metodología (e.g. método directo, método de la cámara de flujo continuo, método de succión, etc.), con el propósito de lograr comparaciones entre las mismas. Por otra parte, como se ha visto que los individuos pueden tener durante el día periodos en los cuales no se encuentran filtrando (McIvor, 2004), y que la fase de alimentación puede variar de acuerdo al momento del día (Englund & Heino, 1994), se sugiere realizar mayor número de estimaciones de las tasas de filtración a lo largo de 24 horas.

En general, la tasa de filtración decrece a medida que la concentración de partículas se incrementa (Winter 1978; Dame 1996). Esta observación implica que los bivalvos regulan la cantidad de agua desde la cual las partículas son removidas en relación a la concentración de alimento (Winter 1978; Dame 1996). Winter (1978) proporcionó una relación entre la concentración de alimento y la tasa de filtración. Así, a medida que la concentración de alimento crece a partir de un cierto valor umbral, la tasa de filtración crece rápido y permanece constante hasta que un máximo de alimento es ingerido.

Tan pronto como el máximo de ingestión es alcanzado, la tasa de filtración continuamente decrece, mientras que la tasa de ingestión permanece constante (Winter, 1978; Dame, 1996). En este contexto, comparando el **Bioensayo 1** con el **Bioensayo 2**, se observan diferentes tasas de filtración para los individuos. Estas diferencias pueden ser debidas a la concentración de alimento empleada en cada uno. Además, las tasas de filtración encontradas para los individuos de talla grande parecen ser contradictorias con el modelo propuesto por Winter (1978), ya que se observó una mayor filtración a mayor concentración de alimento disponible. En este contexto, se requiere un estudio más detallado del efecto de la cantidad de algas suministradas a los organismos, tomando en cuenta que en esta Tesina no se realizó un experimento en conjunto, para estudiar dicha variable. Diversos estudios han demostrado la importancia que tiene la densidad del alimento sobre la filtración de los bivalvos (Widdows, 1979; Riisgård & Randlov, 1981; Riisgård, 1996; Riisgård, 2001; Rajesh et al., 2001; Filgueira et al., 2009), así como también, quedó evidenciado con los bioensayos llevados a cabo en este trabajo.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El desarrollo de esta Tesina permitió responder las preguntas planteadas y contrastar las hipótesis propuestas. La implementación de los bioensayos permitieron conocer las bondades que presenta *Erodona mactroides* como especie modelo para su uso en el laboratorio. Su amplia distribución, abundancia en espacio y tiempo, su fácil colecta, manejo y mantención en el laboratorio son algunos de los importantes atributos de la misma. Asimismo, su baja tasa de mortalidad observada durante los 7 días, demuestra que es una especie altamente adaptada a las condiciones de laboratorio, sugiriendo su potencialidad para trabajos de corto y largo plazo en laboratorio.

Por otro lado, con el desarrollo del ensayo de sobrevivencia se pudo testear los efectos de los cambios de salinidad sobre los individuos de *E. mactroides*. En este sentido, los organismos son capaces de tolerar un amplio rango de salinidad, al menos en un periodo corto de tiempo. Además, se logró evidenciar si existían diferencias significativas entre los individuos de talla grande y chica de esta especie. Los individuos de menores tallas se vieron más afectados que los de talla grande a muy baja salinidad.

La realización de los ensayos relacionados con la filtración del bivalvo, posibilitaron por primera vez, la obtención de tasas de filtración de la especie, así, como, los lineamientos necesarios para el desarrollo de futuros experimentos de laboratorio basados en tasas de filtración. En este contexto, se evaluó cómo el tiempo de experimentación, el tipo de alimento y el volumen de agua a utilizar en los bioensayos, juegan un papel fundamental a la hora de la estimación de las tasas de filtración. Se evidenciaron distintas tasas de filtración en relación a estas condiciones experimentales. Además, se evaluó como varía la tasa de filtración en función de la

talla del organismo, siendo en dos ocasiones la filtración mayor para los individuos de talla grande que chica.

Del desarrollo de esta Tesina se deriva un protocolo de trabajo en laboratorio con esta especie, resaltando cuales son las condiciones óptimas para su tratamiento y la posible mantención de la especie durante largos periodos de tiempo. El conocimiento de los atributos de esta especie, así como, las tasas de supervivencia a cambios de salinidad y de sus tasas de filtración, brinda nuevas posibilidades para la realización de trabajos de laboratorio de distintas índole con la misma.

Aunque este estudio, provee la primera línea de base para futuros trabajos con la especie, aún resta mucho por conocer de la biología de la misma. Escasos son los trabajos de índole particular realizados para nuestro país sobre este bivalvo. En este contexto, se requiere cuantificar las poblaciones naturales y ahondar en el rol que pueda tener la salinidad sobre variables fisiológicas o comportamentales de los individuos. Además, sería valioso profundizar en la obtención de valores de otras tasas fisiológicas (e.g. tasa de ingestión, tasa de consumo de oxígeno, tasas de excreción), así como, en las tasas de crecimiento de este bivalvo, en laboratorio y en el campo. Por otro lado, se desconoce en qué medida ciertos parámetros ambientales individualmente y en combinación con otros afectan la supervivencia o fisiología de este bivalvo. En este sentido, poco se sabe del papel de la temperatura, en un escenario de cambio climático, sobre la supervivencia o aspectos fisiológicos de la especie. Igualmente, se requiere investigar el eventual efecto que pueden tener los contaminantes derivados de actividades antropogénicas sobre el comportamiento de los individuos de esta especie. En este contexto, los ensayos de laboratorio muestran ser una muy buena herramienta y ampliamente utilizados en estudios de mortalidad y fisiología.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ageitos de Castellanos Z. (1967). Catálogo de los moluscos bonaerenses. Anales Comunicaciones de Investigación Científica. 8: pp. 390.
- Akberali H.B. (1978). Behaviour of *Scrobicularia plana* (da Costa) in water of various salinities. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 33: 237-249.
- ASTM. (1992). Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. En: Annual Book of ASTM Standards, Water and Environmental Technology, Vol. 11.04, ASTM, Philadelphia, pp. 1367-1390.
- Anacleto E.I. & Traversim E.T. (2006). Relações tróficas no plâncton em um ambiente estuarino tropical: Lagoa dos Patos (RS), Brasil. Saúde & Ambiente em revista 1(2): 26-39.
- Ansell A.D., Barnett P.R.O., Bodoy A. & Massé H. (1980). Upper Temperature Tolerances of Some European Molluscs. I. *Tellina fabula* and *T. tenuis*. Marine Biology 58: 33-39.
- Araújo C., Cohin-de-Pinho S., Santos J., Delgado F., Santana L., Chastinet C. & da Silva E. (2006). In situ and laboratory bioassays using *Poecilia reticulata* Peters, 1859 in the biomonitoring of an acidic lake at Camaçari, BA, Brazil. Chemosphere 65: 599-603.
- Arballo E. & Bresso A. (2007). Reserva Natural Playa Penino. CSDBAO, Aves Uruguay, Bird Life International, Vida Silvestre Uruguay & Fondo de las Américas, Ciudad del Plata, pp. 100.
- Arballo E. (1996). Playa Penino y las aves migratorias. En: Almanaque del Banco de Seguros del Estado, Barreiro & Ramos, Montevideo, pp. 208-215.
- Begon M., Townsend C.R. & Harper J.L. (2006). Ecology: From individuals to ecosystems, 4ª ed., Blackwell Publishing Ltd., Malden, pp. 738.

- Bemvenuti C. (1987). Macrofauna bentônica da região estuarial da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Simpósio sobre ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. Sínteses dos conhecimentos, Cananeia, SP. Brasil 1: 428-458.
- Bemvenuti C.E. & Rosa-Filho J. (2000). Estrutura e dinâmica das associações de macroinvertebrados bentônicos dos ambientes estuarinos do Rio Grande do Sul: um estudo de caso. En: Taller Avaliação e ações prioritárias para a zona costeira e marinha, Projeto PROBIO (Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira). Porto Seguro, pp. 49.
- Bemvenuti C.E. & Netto S.A. (1998). Distribution and seasonal patterns of the sublittoral benthic macrofauna os Patos Lagoon (South Brazil). Revista Brasileira de Biología 58: 211-221.
- Berg D.J., Fisher S.W. & Landrum P.F. Clearance and processing of algal particles by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Journal of Great Lake Research 22(3): 779-788.
- Bernardi L.B. (2007). Contribuição das áreas verdes à conservação da natureza: análise na região oeste de Montevideu, Uruguai. Tesis de Maestría, Universidad de São Paulo, Brasil.
- Boluda R., Quintanilla J.F., Bonilla J.A., Sáez E. & Gamón M. (2002). Application of the Microtox® test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain). Chemosphere 46: 355-369.
- Cairns J. & Pratt R. (1989). The scientific basis of bioassays. Hydrobiologia, 188-189: 5-20.
- Carvalho Y.B.M., Romano L.A. & Poersch L.H.S. (2015). Effect of low salinity on the yellow clam *Mesodesma mactroides*. Brazilian Journal of Biology 75(1): 8-12.
- Cayuela L. (2009). Modelos Lineales Generalizados (GLM). EcoLab, Centro Andaluz de Medio Ambiente, Universidad de Granada, España, pp. 58-87.
- Chapman P. & Long E.R. (1983). The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. Marine Pollution Bulletin 14: 81-84.

- Clausen I. & Riisgård H.U. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: no regulation of the filter-pump to nutritional needs. Marine Ecology Progress Series 141: 37-45.
- Colling L.A., Bemvenuti C.E. & Pinotti, R.M. (2010). Temporal variability of the bivalve *Erodona mactroides* Bosc, 1802 during and after the *El Niño* phenomenon (2002/2003) in a subtropical lagoon, southern Brazil. Acta Limnologica Brasiliensia 22(4): 410-423.
- Cortelezzi A., Rodrigues Capítulo A., Boccardi L. & Arocena R. (2007). Benthic assemblages of a temperate estuarine system in South America: Transition from a freshwater to an estuarine zone. Journal of Marine Systems 68: 569-580.
- Costa C.M.B. (1971). Importância paleoecológica e estratigráfica de *Erodona mactroides* Daudin (Mollusca, Bivalvia). Iheringia 4: 3-18.
- Costa F. O., Correia A.D. & Costa M.H (1998). Acute Marine Sediment Toxicity: A Potential New Test with the Amphipod *Gammarus locusta*. Ecotoxicology and Environmental Safety 40: 81-87.
- Crandford P., Down M., Grant J., Hargrave B. & McGladdery S. (2003). Ecosystem level effects of marine bivalve aquaculture. En: Hargrave B.T., Cranford P., Down M., Grant B., Mc Gladdery S. & Burrige L.E. (Eds.), A scientific review of the potential environmental effects of aquaculture in aquatic ecosystems. DFO Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2450, Ottawa, pp. 51-95.
- Dame R.F. (1996). Organismic level processes. En: Dame R.F. (Ed.), Ecology of marine bivalves: An ecosystem approach. CRC Press Inc, Boca Ratón, pp. 35-74.
- Davis H.C. & Calabrese A. (1964). Combined effect of temperature and salinity on development of eggs and growth of larvae of *M. Mercenaria* and *C. Virginica*. Fishery Bulletin 63(3): 643-655.
- Davis H.C. (1958). Survival and growth of clam and oyster larvae at different salinities. Biological Bulletin. 114: 296-307.

- Defeo O., Vincent P., Acuña A., Amestoy F., de Álava A., Castiñeira E., Delfino E., Fagúndez C., García Olaso F., García Píngaro R., Gutiérrez O., Horta S., Laporta P., Marianovich P., Martínez G., Panario D., Passadore C., Puig P., Ríos M., Sezephegyi M.N. & Trimble M. (2008). Zona Costera. En: <http://www.ambiental.net>. Consultado: 07/07/2012.
- Dunlop J.E., Horrigan N., McGregor G., Kefford B.J., Choy S. & Prasad R. (2007). Effect of Spatial variation on salinity tolerance of macroinvertebrates in Eastern Australia and implications for ecosystem protection trigger values. *Environmental Pollution* 151(3): 621-630.
- EcoPlata. (2000). Diagnóstico Ambiental y Socio-Demográfico de la Zona Costera Uruguay del Río de la Plata. Informe EcoPlata. CIID, PNUD, MVOTMA, UNESCO & EcoPlata, Montevideo, pp. 180.
- Englund V. & Heino M. (1994). Valve movement of *Anodonta antina* and *Unio tumidus* (Bivalvia, Unionidae) in a eutrophic lake. *Annales Zoologici Fennici* 31: 257-262
- EPA. (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. EPA, Ohio, pp. 266.
- Filgueira R., Fernández-Reiriz M.J. & U Labarta U. (2009). Clearance rate of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. I. Response to extreme chlorophyll ranges. *Ciencias Marinas* 35(4): 405-417.
- Filgueira R. (2007). Comportamiento alimentario del mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) en las condiciones tróficas de las Rías Gallegas. Tesis de Doctorado, Universidad de Vigo, España.
- Fulford R.S, Breitburg D.L., Newell R.I.E., Kemp W.M. & Luckenbach M. (2007). Effects of oyster population restoration strategies on phytoplankton biomass in Chesapeake Bay: a flexible modeling approach. *Marine Ecology Progress Series* 336: 43-61.

- Gaete H. & Paredes K. (1996). Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el cladóceros *Daphnia magna*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 12(1): 23-28
- Gandrass J. & Salomons W. (2001). Bioassays as a tool for the assessment of the quality of dredged material. En: Gandrass J. & Salomons W. (Eds), Dredged Material in the Port of Rotterdam - Interface between Rhine Catchment Area and North Sea. GKSS Research Centre, Max-Planck-Strasse, Germany, pp. 307-322.
- Garcia L. (2005). Dinâmica de curto prazo da macrofauna bentônica em uma enseada estuarina da Lagoa dos Patos: Efeitos antrópicos e mecanismos de persistência e resiliência. Tesis de Doctorado, Universidad Federal do Rio Grande, Brasil.
- Geraldi R.M. (2002). *Distribuição espacial, recrutamento, crescimento e mortalidade de Erodona mactroides* Bosc, 1802 (Mollusca, Pelecypoda) na Lagoa dos Patos, RS - Brasil. Tesis de Doctorado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil.
- Guiry M.D. & Guiry G.M. (2015). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. En: <http://www.algaebase.org>. Consultado: 29/08/2015.
- Guzmán-Agüero J.E., Nieves-Soto M., Hurtado M.A., Piña-Valdez P. & Garza-Aguirre M. (2013). Feeding physiology and scope for growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) acclimated to different conditions of temperature and salinity. Aquaculture International 21(2): 283-297.
- Hart B.T., Bailey P., Edwards R., Hurtle K., James K., McMahon A., Meredith C. & Swadling K. (1991). A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. Hydrobiologia 210: 105-144.
- Iannaccone O., Caballero C. & Alvaríño L. (2002). Empleo del caracol de agua dulce *Physa venustula* Gould como herramienta ecotoxicológica para la evaluación de riesgos ambientales por plaguicidas. Agricultura Técnica 62: 212-225

- IPCC. (2003). Cambio Climático 2001. Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de Trabajo I, II, III al tercer informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. OMM, PNUMA, Gineva, pp. 207.
- Irlandi E., Maciá S. & Serafy J. (1997). Salinity reduction from freshwater canal discharge: effects on mortality and feeding of an urchin (*Lytechinus variegatus*) and a gastropod (*Lithopoma tectum*). Bulletin of Marine Science 61:869-897.
- Jackson R.B., Carpenter S.R, Dahm C.N., McKnight D.M., Naiman R.J., Postel S.L. & Running W.S. (2001). Water in a Changing World. Issues in Ecology 9:1-16
- Jacobs P., Troost K., Riegman R. & van der Meer J. (2015). Length- and weight-dependent clearance rates of juvenile mussels (*Mytilus edulis*) on various planktonic prey items. Helgoland Marine Research 69: 101-122.
- Jones H.D., Richards O.G. & Southern T.A. (1992). Gill dimensions, water pumping and body size in mussel *Mytilus edulis* L. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 155: 213-237.
- Jorcín A. (1996). Distribución, abundancia y biomasa de *Erodona mactroides* Daudin 1801 (Mollusca, Bivalvia), en la Laguna de Rocha (Dpto. De Rocha, Uruguay). Revista Brasileira de Biología 56: 155-162.
- Jorcín A. (1999). Temporal and spatial variability in the macrozoobenthic community along a salinity gradient in the Castillos Lagoon (Uruguay). Archiv für Hydrobiologie 146(3): 369-384.
- Kefford B.J., Nugegoda D., Zalizniak L., Fields E.J. & Hassell K.L. (2007). The salinity tolerance of freshwater macroinvertebrate eggs and hatchlings in comparison to their older life-stages: a diversity of responses. Aquatic Ecology 41: 335-348.
- Kim W.S., Huh H.T. & Lee T.W. (2001). Effects of salinity on endogenous rhythm of the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). Marine Biology 138: 157-162.
- Kinne O. (1966). Physiological aspects of animal life in estuaries with special reference to salinity. Netherlands Journal of Sea Research 3(2): 222-244.

- Kinne O. (1971). Salinity: Animal invertebrates. En: Kinne O. (Ed.), Marine Ecology Vol. 1. Environmental Factors. Wiley Interscience, London, pp. 821-995.
- Konrad C.P. (2014). Approaches for Evaluating the Effects of Bivalve Filter Feeding on Nutrient Dynamics in Puget Sound, Washington. Scientific Investigations Report 2013-5237, Virginia, pp. 32.
- Lacma J., Iannacone J. & Vera G. (2007). Toxicidad del cromo en sedimento usando *Donax obesulus* Reeve 1854 (Pelecypoda: Donacidae). Ecología Aplicada 6(1,2): 93-99.
- Larrain A. (1995). Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. Ciencia y Tecnología del Mar CONA (N° Especial): 39-47.
- Lercari D. & Defeo O. (1999). Effects of freshwater discharge in sandy beach populations: the mole crab *Emerita brasiliensis* in Uruguay. Estuarine, Coastal and Shelf Science 49: 457-468.
- Lercari D. & Defeo O. (2006). Efectos del Canal Andreoni en playas de Rocha: deterioro ambiental y su efecto en la biodiversidad. En: Menafrá R., Rodríguez-Gallego L., Scarabino F. & Conde D. (Eds.), Bases para la Conservación y el Manejo de la Costa Uruguaya. Vida Silvestre Uruguay, Montevideo, pp. 631-636.
- Lercari D., Defeo O. & Celentano E. (2002). Consequences of a freshwater canal discharge on the benthic community and its habitat on an exposed sandy beach. Marine Pollution Bulletin 44: 1397-1404.
- Luoma S.M. & Carter J.L. (1993). Understanding the toxicity of contaminants in sediments: Beyond the bioassay-based paradigm. Environmental Toxicology and Chemistry 12: 793-796.
- Marroni M.S. (2012). Rol de la herbívora de bivalvos nativos y exóticos en un reservorio somero del Uruguay: implicancias en las técnicas de biomanipulación. Tesis de Maestría, Universidad de la República, Uruguay.

- Marsden I.D. (2004). Effects of reduced salinity and seston availability on growth of the New Zealand little-neck clam *Austrovenus stutchburyi*. Marine Ecology Progress Series 266: 157-171.
- Mclvor A.L. (2004). Freshwater mussels as biofilters. Tesis de Doctorado, Universidad de Cambridge, Reino Unido,
- McLeod R.J. & Wing S.R. (2008). Influence of an altered salinity regime on the population structure of two infaunal bivalve species. Estuarine Coastal and Shelf Science 78: 529-540.
- Meerhoff E.I. (2009). Variación espacio temporal de las comunidades macrobentónicas de cinco lagunas costeras del Uruguay. Tesis de Maestría, Universidad de la República, Uruguay.
- Mohan M.K & Velayudhan T.S. (1998). Studies on the salinity tolerance of the venerid clam, *Paphia malabarica* (Chemnitz). Journal of the Marine Biological Association of India 40(1-2): 185-188.
- Morton B. (1970). The rhythmical behaviour of *Anodonta cygnea* L. and *Unio pictorum* L and its biological significance. Forma Functio 2: 110-120.
- Mouabad A., Ait Fdil A., Maarouf A. & Pihan J.C. (2001). Pumping behaviour and filtration rate of the freshwater mussel *Potomida littoralis* as a tool for rapid detection of water contamination. Aquatic Ecology 35: 51-60.
- Muniz P. & Venturini N. (2001). Spatial distribution of the macrozoobentos in the Solís Grande Stream Estuary (Canelones-Maldonado, Uruguay). Revista Brasileira de Biología. 61(3): 409-420.
- Nakamura Y. (2005). Suspension feeding of the ark shell *Scapharca subcrenata* as a function of environmental and biological variables. Fishery Science 771: 875-883.
- Navarro J.M. (1988). The effect of salinity on the physiological ecology of *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) (Bivalvia: Mytilidae). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 122: 19-33.

- Neufeld D.S. & Wrigth S.H. (1996). Salinity change and cell volume: the response of tissues from the estuarine mussel *Geukensia demissa*. *The Journal of Experimental Biology* 199: 1619-1630.
- Newell R.I. & Koch E.W. (2004). Modeling seagrass density and distribution in response to changes in turbidity stemming from bivalve filtration and seagrass sediment stabilization. *Estuaries* 27(5): 793-806.
- Olazarri J. (1966). Los moluscos de agua dulce del Dpto. de Colonia, Uruguay, Parte I: Pelecypoda. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 2: 15-37.
- Passadore C., Giménez L. & Acuña A. (2007). Composition and intra-annual variation of the macroinfauna in the estuarine zone of the Pando Stream (Uruguay). *Revista Brasileira de Biología* 67: 197-202.
- Pattillo M., Rozas L.P. & Zimmerman R.J. (1995). A review of salinity for selected invertebrates and fishes of Gulf of Mexico Estuaries. A Final report to the Environmental Protection Agency, Gulf of Mexico Program, Mexico, pp. 62.
- Pestana D., Ostrensky A., Pereira Boeger W.A. & Pie M.R. (2009). The Effect of Temperature and Body Size on Filtration Rates of *Limnoperna Fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) under Laboratory Conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52(1) 135-144.
- Raffaelli D. & Hawkins S. (1996). Four major environmental gradients. En: Raffaelli D. & Hawkins S. (Eds.), *Intertidal Ecology*. Chapman & Hall, London, pp. 1-16.
- Rajesh K.V., Mohamed K.S. & Kripa V. (2001). Influence of algal cell concentration, salinity and body size on the filtration and ingestion rates of cultivable Indian bivalves. *Indian Journal of Marine Science* 30: 87-92.
- Reish D.L. & Oshida P. (1987). *Manual of methods in aquatic environment research*. Part 10, Short-term static bioassays. FAO Fisheries Technical Paper, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 64.

- Resgalla Jr.C., Brasil E.S. & Salomão L.C. (2007). Physiological rates in different classes of sizes of *Perna perna* (Linnaeus, 1758) submitted to experimental laboratory conditions. *Brazilian Journal of Biology* 66(1B): 325-336.
- Riisgård H.U. & Randlov A. (1981). Energy budgets, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. *Marine Biology* 61: 227-234.
- Riisgård H.U. (2001). Physiological regulation versus autonomous filtration in filter-feeding bivalves: starting points for progress. *Ophelia* 54(3): 193-209.
- Riisgård H.U. (2001b). On measurement of filtration rates in bivalves - the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series* 211: 275-291.
- Riisgård H.U., Kittner C. & Seerup D.F. (2003). Regulation of opening state and filtration rate in filter feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 284: 105-127.
- Riisgård H.U., Lassen J. & Kittner C. (2006). Valve-gape response times in mussels (*Mytilus edulis*)-effects of laboratory preceding-feeding conditions and *in situ* tidally induced variation in phytoplankton biomass. *Journal of Shellfish Research* 25(3): 901-911.
- Rocha G. (1999). Playa Penino y la conservación de los hábitats costeros de Uruguay. *Cotinga* 11: 68-70.
- Ronco A., Díaz Báez M. & Pica Granados Y. (2004) Conceptos generales. En: Castillo Morales G. (Eds.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*, México, pp. 188.
- Rosa L.C. & Bemvenuti C.E. (2006). Temporal variability of the estuarine macrofauna of the Patos Lagoon, Brazil. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 4(1): 1-9
- Rosa-Filho J.S. & Bemvenuti C.E. (1998). Caracterización de las comunidades macrobentónicas de fondos blandos en regiones estuarinas de Rio Grande do Sul (Brasil). *Thalassas* 18: 43-56.

- Santana O. & Fabiano G. (1999). Medidas y mecanismos de administración de los recursos de las lagunas costeras del litoral Atlántico del Uruguay (Lagunas José Ignacio, Garzón, De Rocha y De Castillos). Plan de Investigación Pesquera URU/92/003. INAPE & PNUD, Montevideo, pp. 165+apéndice.
- Sauco S., Eguren G., Heinzen C. & Defeo O. (2010). Effects of herbicides and freshwater discharge on water chemistry, toxicity and benthos in a Uruguayan sandy beach. *Marine Environmental Research* 70: 300-307.
- Sauco S., Gómez J., Barboza R.F., Lercari, D. & Defeo O. (2013). Modified Whole Effluent Toxicity Test to Assess and Decouple Wastewater Effects from Environmental Gradients. *Plos One* 8(6): 1-5
- Scarabino F., Zaffaroni J.C., Clavijo C., Carranza A. & Nin M. (2006). Bivalvos marinos y estuarinos de la costa uruguaya:faunística, distribución, taxonomía y conservación. En: Menafrá R., Rodríguez-Gallego L., Scarabino F. & Conde D. (Eds.), *Bases para la Conservación y el Manejo de la Costa Uruguaya*. Vida Silvestre Uruguay, Montevideo, pp. 157-170.
- Serafy J.E., Lindeman K.C. Hopkins T.E & Ault J.S. (1997). Effects of freshwater canal discharge on fish assemblages in a subtropical bay: field and laboratory observations. *Marine Ecology Progress Series* 160:161-172.
- Silva J., Torrejón G., Bay-Schmith E. & Larrain A. (2003). Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) usando un tóxico de referencia. *Gayana* 67(1): 87-96.
- Sundaram K.S. & Shafee M.S. (1989) Salinity tolerance of some bivalves of Ennore estuary. *Journal of Marine Biological Association of India* 31: 299-302
- Sylvester F., Dorado J., Boltovskoy D., Juárez A. & Cataldo D. (2005). Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiologia* 534: 71-80.

- Tantanasarit C., Babel S., Englande A.J. & Meksumpun S. (2013). Influence of size and density on filtration rate modeling and nutrient uptake by green mussel (*Perna viridis*). *Marine Pollution Bulletin* 68: 38-45.
- Trimble M., Ríos M., Passadore C., Szephegyi M., Nin M., García F., Fagúndez C. & Laporta P. (2010). Ecosistemas costeros uruguayos: una guía para su conocimiento. Informe Arena. Averaves, Cetáceos Uruguay & Karumbé, Montevideo, pp. 335.
- Verdelhos T., Marquesa J.C. & Anastácioa P. (2015). The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule*, illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay. *Ecological Indicators* 52: 96-104.
- Verween A., Vincx M. & Degraer S. (2006). *Mytilopsis leucophaeata*: the brackish water equivalent of *Dreissena polymorpha*? A review. En: Van der Velde G., Rajagopal S. & Bij de Vaate, A. (Eds.). *The Zebra Mussel in Europe*, Backhuys Publisher, Leiden, Weikersheim, pp. 29-44.
- Viana F. (2009). *La zona costera del Uruguay: biodiversidad y gestión*, Santillana S.A., Montevideo, pp. 159.
- Viergutz C., Linn C. & Weitere M. (2012). Intra- and interannual variability surpasses direct temperature effects on the clearance rates of the invasive clam *Corbicula fluminea*. *Marine Biology* 159: 2379-2387.
- Ward J.E. & Shumway S.E. (2004). Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 300: 83-130.
- Widdows J., Fieth P. & Worrall C.M. (1979). Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus*. *Marine Biology* 50: 195-207.

Winter J.E. (1973). The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by continuous automatic recording apparatus. *Marine Biology* 22: 317-328.

Winter J.E. (1978). Review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* 13: 1-33.