

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Escuela Superior de Ciencias Marinas

RESPUESTAS FISIOLOGICAS DE

Tivela stultorum (Mollusca, Lamellibranchia)

A LOS CAMBIOS AMBIENTALES DE SALINIDAD Y TEMPERATURA :

IMPLICACIONES EN SU CULTIVO.

Tesis presentada para

obtener el título de

Oceanólogo por:

María Ivette Vaillard Nava

Ensenada, B. C., febrero de 1981

Con mucho cariño a mis padres:

María Isabel Nava y Rubén Vaillard

Por el respeto que han tenido en mis desiciones  
y por su apoyo de siempre

A mi compañero y gran amigo:

Julio Candela

porque ha transmitido en mi su entusiasmo  
por el conocimiento y nuestra superación

A ti Ana Denisse

por nuestra insustituible amistad

A mi asesor:

Dr Fernando Bückle

Porque su ayuda sincera y firme, fué  
en mi un gran aliciente para continuar

# INDICE

1	Introducción.....	1
2	Materiales y métodos.....	5
3	Resultados.....	16
3.1	Metabolismo estándar.....	16
3.2	Metabolismo activo.....	20
3.3	Tasa de ventilación.....	25
3.4	Relación entre el metabolismo activo y la tasa de ventilación.....	27
3.5	Campo de actividad.....	29
3.6	Excreción de amoniaco.....	30
3.7	Razón O:N.....	35
3.8	Observaciones de las gónadas.....	41
4	Discusión.....	42
4.1	Metabolismo estándar.....	42
4.2	Metabolismo activo.....	45
4.3	Campo de actividad.....	47
4.4	Excreción de amoniaco.....	48
4.5	Razón O:N.....	50
5	Conclusiones.....	54
6	Recomendaciones.....	55
7	Apéndice.....	58
7.1	Prueba de Bartlett.....	58
7.2	Análisis de varianza (ANVA).....	58
7.3	Comparación múltiple de promedios.....	60
7.4	Superficies de respuesta.....	61
8	Agradecimientos.....	63
9	Referencias bibliográficas.....	64

## INDICE DE TABLAS

Tabla	I. - Combinaciones de salinidad y temperatura experimentales .....	8
Tabla	II. - Metabolismo estándar de <u>T. stultorum</u> .....	17
Tabla	III. - Análisis de varianza de los datos del metabolismo estándar .....	17
Tabla	IV. - Metabolismo activo de <u>T. stultorum</u> .....	21
Tabla	V. - Análisis de varianza de los datos del metabolismo activo.....	21
Tabla	VI. - Tasa de ventilación de <u>T. stultorum</u> .....	26
Tabla	VII. - Excreción de amoniaco de <u>T. stultorum</u> .....	31
Tabla	VIII. - Análisis de varianza de los datos de la excreción de amoniaco.....	31
Tabla	IX. - Análisis de varianza de los resultados del experimento de prueba.....	36
Tabla	X. - Promedios de la Razón O:N de <u>T. stultorum</u> ...	37
Tabla	XI. - Análisis de varianza de la Razón O:N .....	37

## INDICE DE FIGURAS

Fig.	1.- Fotografía de los acuarios de mantenimiento.....	6
Fig.	2.- Esquema del diseño experimental .....	9
Fig.	3.- Fotografía del acuario experimental .....	11
Fig.	4.- Superficie de respuesta del metabolismo estándar de <u>T. stultorum</u> .....	18
Fig.	5.- Efecto de la salinidad y la temperatura sobre el metabolismo estándar de <u>T. stultorum</u> .....	19
Fig.	6.- Superficie de respuesta del metabolismo activo de <u>T. stultorum</u> .....	23
Fig.	7.- Metabolismo activo de <u>T. stultorum</u> en función de la salinidad y la temperatura .....	24
Fig.	8.- Relación entre la tasa de ventilación y el metabolismo activo de <u>T. stultorum</u> .....	28
Fig.	9.- Superficie de respuesta de la excreción de amoniaco de <u>T. stultorum</u> .....	32
Fig.	10.- Excreción de amoniaco de <u>T. stultorum</u> en función de la salinidad y la temperatura....	34
Fig.	11.- Superficie de respuesta de la Razón O:N de <u>Tivela stultorum</u> .....	39
Fig.	12.- Efecto de la salinidad y la temperatura sobre la Razón O:N de <u>T. stultorum</u> .....	40

## 1 Introducción

La almeja Pismo Tivela stultorum (Mollusca, Lamellibranchia), como muchos bivalvos es de crecimiento lento, 1 mm. mensual en condiciones de laboratorio durante el invierno (Dr. Bückle, CICESE, Ensenada, B.C., com. pers.). Pocos individuos alcanzan la talla legal antes de los 7 años en la población de la Jolla (U.S.A.) y las mayores tallas encontradas en dicha población están dentro del rango de 140 a 148 mm. de longitud con una edad estimada de 10 años. La tasa de crecimiento de Tivela stultorum en la población de la Jolla muestra una correlación general con la temperatura y la disponibilidad de alimento (Coe, 1947). El mismo autor cita que a períodos de abundancia del recurso, siguen períodos de escasez debido probablemente a condiciones ambientales.

En 1950 la almeja Pismo se encontraba en casi todas las playas arenosas expuestas entre la Bahía de Half Moon en San Francisco California, U.S.A. (lat. 37° 30' N; long. 122° 30' W) y la isla Socorro en la costa de México (lat. 18° 46' N; long. 111° 00' W). Este bivalvo de considerable importancia comercial fué sujeto a una intensa pesquería en California durante la primera mitad de este siglo, que culminó con la prohibición de su pesca para fines comerciales. Desde ese año en adelante la población se ha recuperado muy lentamente (Fitch, 1950).

En Baja California la almeja Pismo ocupa el primer lugar en volúmen de extracción en relación a otros invertebrados marinos de importancia comercial como: mejillón, abulón y langosta. En 1978 en la Playa de San Ramón en San Quintín B.C. se extrajeron alrededor de 3 millones de almejas. A pesar de la importancia de Tivela stultorum en nuestra región son pocos los estudios realizados en el país sobre este recurso (Searcy, 1979 a).

A partir de estos antecedentes la sección de Acuicultura dentro del proyecto "Bivalvos de Baja California; Sección Almeja Pismo" en el Programa de Desarrollo Académico de la Unidad de Ciencias Marinas planteó, como objetivos entre otros: la experimentación sobre el desove de adultos de almeja Pismo y el cultivo de larvas para la obtención de juveniles con los cuales eventualmente se repoblarán las playas de Baja California.

Para lograr estos objetivos es primordial poder asegurar la viabilidad de las larvas obtenidas. Este requisito depende de muchos factores y entre ellos uno de los más importantes es que los adultos, a partir de los cuales se lleva a cabo el desove, estén en condiciones

fisiológicas óptimas. Los aspectos desfavorables en los adultos ocasionan la producción de larvas menos viables que las obtenidas a partir de progenitores en condiciones de tolerancia fisiológica (Gilles, 1972; Bayne, 1975).

Estas condiciones dependen de las respuestas adaptativas de los organismos a los cambios ambientales, sobre todo en los moluscos acuáticos, ya que estos organismos generalmente son sésiles o capaces de efectuar solo movimientos lentos y por lo tanto dependen completamente de su medio ambiente inmediato.

Para conocer las condiciones ambientales óptimas, es importante considerar que los diversos factores abióticos actúan en conjunto sobre los organismos y estos responden al estímulo total y no al efecto de una sola variable ambiental. De esta manera el análisis de las respuestas fisiológicas de los organismos debe hacerse en relación a la combinación de factores ambientales para obtener un esquema general del comportamiento, ya que cuando se trabaja con organismos íntegros muchos factores pueden distorsionar el patrón observado cuando se estudia el efecto de una sola variable por ejemplo la salinidad. Estos factores pueden ser sexo, temperatura, sustrato energético utilizado, preaclimatación y otros (Kinne, 1970).

La salinidad y la temperatura son dos de las variables ambientales que deben considerarse, ya que son críticas para el crecimiento y reproducción de los animales (Gilles, 1972).

Por lo tanto este trabajo se centró en los adultos de almeja Pismo, con el objeto conocer el comportamiento fisiológico de esta especie en respuesta a cambios de salinidad y temperatura, para establecer las condiciones óptimas y de esta manera evitar en lo posible alteraciones en el estado de tolerancia fisiológica de estos organismos.

A fin de conocer cómo el efecto combinado de salinidad y temperatura alteran el comportamiento de las almejas, se estudiaron respuestas fisiológicas tales como; el consumo de oxígeno, en condiciones de mínima actividad motora (estándar) y durante la alimentación (activo), como indicador del metabolismo energético y la excreción de amoniaco como reflejo del metabolismo de las proteínas. El consumo de oxígeno puede utilizarse como una medición del metabolismo energético, debido a que la mayor parte de los organismos obtienen su energía metabólica principalmente a través de la oxidación de los sustratos alimenticios (Schmidt-Nielsen, 1976).

Se han reconocido tres niveles de la tasa metabólica:

metabolismo estándar, activo y de rutina. El primero se refiere al requerimiento energético mínimo para mantener todas las funciones vitales en un organismo inactivo. La tasa metabólica de rutina incluye la demanda energética de las funciones normales y el metabolismo activo es el consumo de oxígeno bajo condiciones de máxima actividad ( Kinne, 1970 ).

La temperatura es una de las variables ambientales que influye principalmente sobre la tasa de consumo de oxígeno en organismos poiquiloterms. Cada uno de los niveles de la tasa metabólica está relacionado con la temperatura en forma diferente ya que pueden seguir vías enzimáticas distintas ( Prosser, 1973 ) y a la vez pueden estar sujetos a modificaciones por factores tales como inanición, edad, tamaño, estación del año, madurez y otros. La dependencia del metabolismo estándar y activo en relación a la temperatura en organismos poiquiloterms ha resultado ser muy variable ( Widdows, 1973 ). En invertebrados marinos del litoral el metabolismo estándar es relativamente independiente de la temperatura ( Mc.Farland y Pickens, 1965 ), esta compensación metabólica, tiene un valor adaptativo en organismos que están sujetos a amplias y rápidas fluctuaciones de la temperatura.

La salinidad ocasiona diferentes clases de reacciones fisiológicas en los organismos acuáticos. Su efecto principal generalmente consiste en la disminución de la tasa respiratoria ocasionada por incrementos en la salinidad ( Dorgelo, 1973 ). Salinidades subnormales ocasionan incremento en el metabolismo oxidativo ( Job, 1969 ). Existe mucha discrepancia en si estas relaciones de metabolismo - salinidad son reflejo del gasto energético de la osmorregulación.

Todos los bivalvos mantienen un flujo de agua a través de sus branquias, no tan solo como un proceso incidental y relacionado con la alimentación, sino también para respirar y eliminar los productos del metabolismo. Este proceso se conoce como tasa de ventilación o de bombeo de agua (Galtsoff 1964), y es controlada por contracciones de la musculatura de las branquias y de los músculos aductores, así como por la actividad de los sifones. Todos estos mecanismos pueden verse influenciados por factores químicos y por la temperatura (Owen, 1966) y a su vez pueden modificar la tasa respiratoria debido a la interrelación que existe entre ésta y la tasa de ventilación. Es por esto que el efecto de la temperatura sobre el metabolismo activo puede explicarse en función del efecto de la temperatura sobre la tasa de ventilación (Widdows, 1973).

El Campo de Actividad usualmente está asociado con

animales que se mueven en busca de alimento, pero también puede ser aplicado en animales prácticamente sésiles con el objeto de distinguir entre el metabolismo en condiciones de inanición ( estándar ) y el metabolismo durante la alimentación ( activo ). La diferencia entre estos metabolismos permite conocer la cantidad de energía disponible para llevar a cabo un trabajo externo.

Los desechos nitrogenados ( amoniaco ) son producidos cuando las proteínas y los ácidos nucleicos son metabolizados. La salinidad influye sobre la excreción de amoniaco a través de procesos de adaptación osmótica. En moluscos eurihalinos incrementos en la salinidad ocasionan decrementos en la tasa de excreción de nitrógeno amoniacal ( Emerson, 1969 ) y el metabolismo oxidativo presenta modificaciones que se reflejan en el decremento del consumo de oxígeno y de la excreción de anhídrido carbónico ( Gilles, 1973 ). En salinidades menores la excreción de amoniaco aumenta así como la desaminación de los aminoácidos, como un primer paso del aumento general del catabolismo de los mismos en su participación en los procesos osmóticos ( Schoffeniels y Gilles, 1972 ). Este incremento puede estar relacionado con el aumento de la tasa respiratoria que ocurre en invertebrados eurihalinos sometidos a "stress" hiposmótico ( Gilles, 1973; Emerson, 1969 ).

La dependencia de la tasa de excreción de amoniaco con la temperatura puede estar relacionada con cambios en el substrato respiratorio asociados con la gametogénesis ( Mann, 1979; Bayne, 1973a ).

Debido a que la excreción de nitrógeno puede resultar de la degradación de las proteínas de la dieta o las constitutivas, los animales en inanición pueden catabolizar estas últimas, así la falta de alimento afecta considerablemente la producción de desechos nitrogenados ( Mayzaud, 1973 ).

Dado que las respuestas de los animales al complejo medio ambiente no son en términos de variables fisiológicas individuales sino como organismos íntegros; la aproximación experimental al comportamiento de los organismos requiere de la integración de los procesos fisiológicos individuales.

Recientemente la integración de varios procesos fisiológicos en relaciones tales como; Campo de crecimiento, Eficiencia de crecimiento y la Razón O:N, han sido sugeridos como posibles índices de la condición fisiológica y del "stress", entendido como cualquier alteración en el estado fisiológico normal de los organismos que lo hagan más vulnerables a variaciones posteriores

(Gabbott y Bayne, 1973; Bayne, 1975).

La integración del consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno amoniacal expresados en equivalentes atómicos en la razón atómica O/N, puede ser un buen indicador de la utilización relativa de las proteínas en el metabolismo energético. Una razón alta del catabolismo de los carbohidratos y lípidos, resulta en una razón O:N alta. El valor teórico mínimo de 7 refleja que solo las proteínas están siendo utilizadas y esto es indicativo de un fuerte desequilibrio fisiológico en los organismos ( Bayne, 1973 a y b; Mayzaud, 1973; Bayne et al., 1976; Widdows, 1978 a).

## 2 Materiales y métodos

Los organismos se capturaron en la playa de San Ramón en San Quintín B.C. Se hicieron tres colectas; la primera el 10 de julio de 1979, durante la marea baja, siendo la temperatura del agua 15 °C. La segunda también durante la baja marea a partir de las 14 horas del 6 de septiembre de 1979. La temperatura del agua en la zona de muestreo era de 16.5 °C y la salinidad de 33.4 partes por mil (‰). La última colecta fué en diciembre del mismo año.

Durante los muestreos se seleccionaban ejemplares de talla comercial (aprox. 120 mm.), para evitar los efectos intrínsecos en las mediciones de los parámetros fisiológicos (Emerson, 1969). Se desecharon las almejas parasitadas externamente (valvas) para evitar sesgo experimental.

Posteriormente las almejas fueron trasladadas al laboratorio de acuicultura de la Unidad de Ciencias Marinas en Ensenada B.C. a 200 km al norte de la zona de muestreo.

En el laboratorio los animales se recibieron en estanques de 1 ton. sin sustrato, se marcaron y midieron para posteriormente trasladarlos a los acuarios de mantenimiento (Fig.1). Cada uno de estos acuarios con una capacidad de 25 l. se implementaron con un filtro químico a base de carbón activado y fibra de celulosa. Posteriormente fueron adaptados con un sustrato arenoso sobre un falso fondo de lámina acanalada de fibra de vidrio.

Los organismos se alimentaron diariamente con microalgas del género Tetraselmis suecica, para lo cual la circulación de agua en los acuarios de mantenimiento era suspendida.



Después de aclimatados los animales a las condiciones del laboratorio (control) de 21 C y 32 ‰, mínimamente por 15 días, se procedió a la fase experimental.

Se llevaron a cabo 9 experimentos en cada uno de los cuales las almejas en grupos generalmente de 12 se sometieron a una de las 9 diferentes combinaciones de salinidad y temperatura especificadas en la Tabla I a continuación.

Dado que los límites de tolerancia de salinidad y temperatura para la almeja Pismo no han sido establecidos hasta el momento, los rangos seleccionados para este trabajo fueron elegidos considerando salinidades y temperaturas superiores e inferiores a las condiciones del medio ambiente natural de estos organismos durante las capturas, mencionadas anteriormente. Los límites de temperatura hacia ambos extremos (13 y 21 °C) están relacionados con los valores máximos y mínimos reportados a lo largo del año en la zona de muestreo (Searcy, 1979 b). y su elección respondió a la necesidad de considerar un rango amplio de este parámetro para poder observar diferencias en las variables fisiológicas medidas. Este mismo criterio se utilizó en la elección del rango de salinidad de 80 ‰ A.M., que corresponde a 26 ‰, a 110 ‰ A.M., equivalente a 35 ‰.

Veintiún grados centígrados y 110 ‰ A.M. es una combinación de salinidad y temperatura que suele ocurrir en condiciones de laboratorio, dado que se trabaja con volúmenes de agua reducidos en donde el aumento de temperatura y el incremento en la salinidad por evaporación es muy factible. Por lo tanto era necesario considerar estas condiciones, ya que el acondicionamiento de los adultos de Tivela stultorum para lograr la obtención de larvas se hará en el laboratorio.

La dilución del agua de mar (A.M.) se realizó con agua destilada y la concentración mayor que 100 ‰ A.M. con sales sintéticas (Instant Ocean). El volumen final de las cámaras, se mantuvo siempre constante a 4 l. La salinidad se midió con un refractómetro (marca A O Goldberg), con una precisión de  $\pm 1$  ‰.

El esquema correspondiente al diseño experimental se muestra en la Fig.2. Este consiste básicamente en dos acuarios experimentales (C1 y C2) que se utilizaban indistintamente y en el sistema para el análisis químico de las muestras de agua (L, M y N). Cada acuario, hecho a base de acrílico, está constituido por 15 cámaras experimentales. Cada cámara era llenada hasta un volumen de 4 l con agua de mar filtrada por un filtro de arena y esterilizada.

S % A.M. T °C	S1 (80 % A.M.)	S2 (100 % A.M.)	S3 (110 % A.M.)
T1 (13 °C)	S1, T1 3er. exp. 8/XI/79	S2, T1 6o. exp. 29/I/80	S3, T1 4o. exp. 14/XI/79
T2 (16 °C)	S1, T2 8o. exp. 9/II/80	S2, T2 2o. exp. 7/VIII/79	S3, T2 7o. exp. 4/II/80
T3 (21 °C)	S1, T3 5o. exp. 18/I/80	S2, T3 1er. exp. 28/VII/79	S3, T3 9o. exp. 14/II/80

Tabla I. - Combinaciones de salinidad (S) expresada en % de agua de mar (% A.M.) y temperatura (°C) experimentales. Se especifica también el orden y las fechas en las que se realizaron los experimentos (exp.) para probar las diferentes condiciones, a partir del 28 de julio de 1979 finalizando el 14 de febrero de 1980.



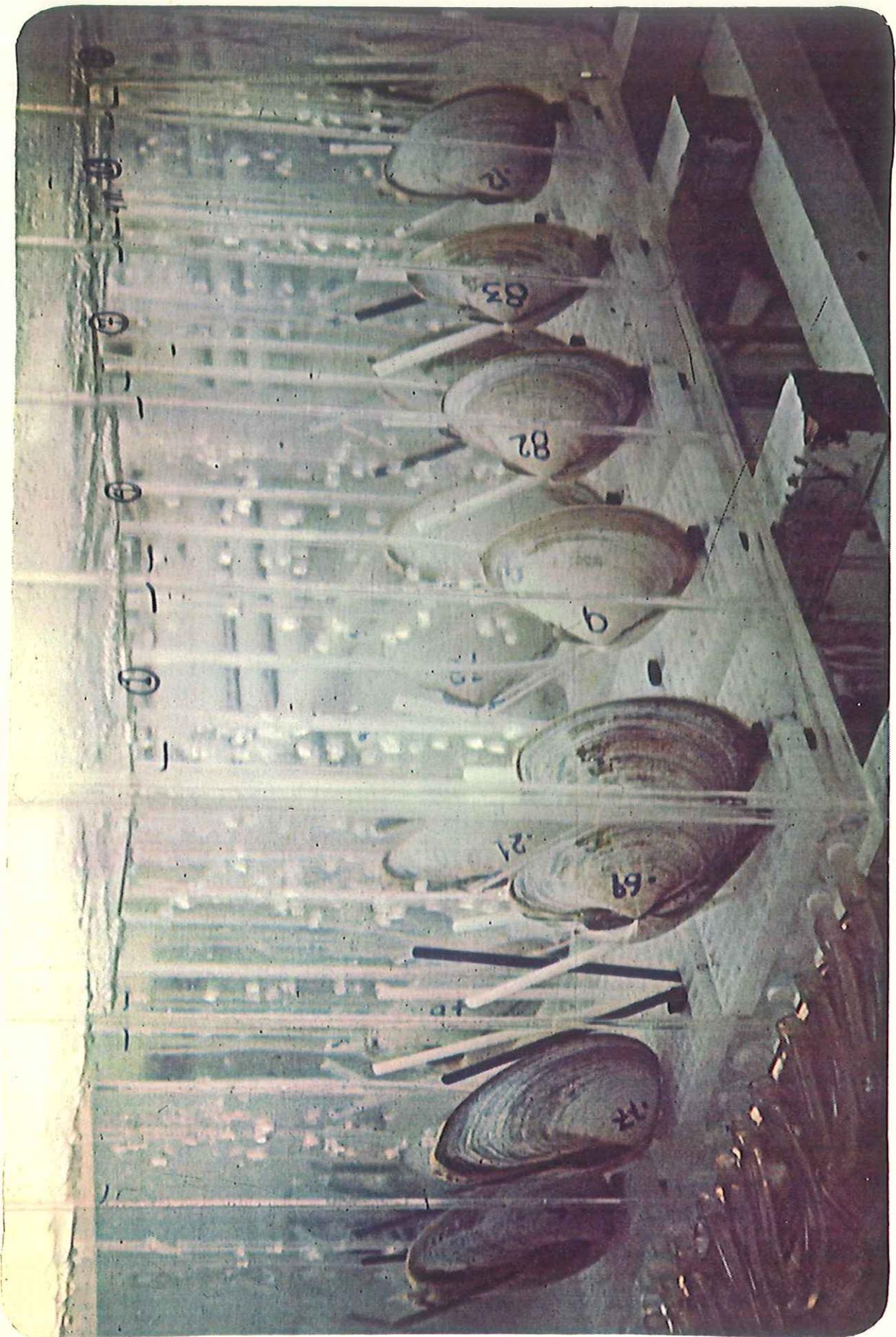
La esterilización se realizó por medio de un sistema de rayos ultravioletas, a través del cual se hacía recircular el agua por un período de mínimo 12 horas.

Las almejas, en grupos de 12 generalmente, se trasladaban a las cámaras del acuario experimental. Las tres cámaras restantes sirvieron de testigos. Aquí las condiciones de salinidad y temperatura eran similares a las que prevalecían en los acuarios de mantenimiento. Posteriormente estas condiciones se variaban por igual en todas las cámaras y gradualmente, en un lapso de 12 horas, hasta alcanzar una de las 9 diferentes combinaciones de salinidad y temperatura especificadas en la Tabla I. En cada temperatura la concentración de oxígeno inicial fué cercana a la saturación.

Las almejas permanecían bajo estas condiciones toda la noche y un día más (36 horas en total), para su adaptación, estimándose así que los animales alcanzan el equilibrio de su medio interno. Solo en el primer experimento, es decir en el que se probó la combinación de 100 ‰ A.M. y 21 °C, el período de aclimatación a las condiciones experimentales fué de 96 horas, debido a fallas en el selector de electrodos que retrasaron la toma de muestras. Durante todo este lapso y desde 24 horas antes de iniciar el experimento las almejas estaban con aireación continua y sin alimento para evitar que las heces interfirieran en los valores de excreción de amoníaco y para poder medir el consumo de oxígeno en condiciones estándar.

La temperatura del agua de las cámaras se variaba gradualmente y además se mantenía igual en todas las cámaras por medio de un sistema termoregulador. En el acuario C1 este sistema consiste en un serpentín de vidrio en la base del acuario que pasa a través de todas las cámaras (Fig. 3), por donde fluía agua a la temperatura seleccionada, controlada e impulsada por medio de un aparato (H) Frigo-Thermomix (marca VWR) que regula la temperatura con una precisión de  $\pm 0.02$  °C. En el acuario C2 el sistema termoregulador es distinto. En él las 15 cámaras están inmersas en agua contenida en el acuario experimental, cuya circulación y temperatura era regulada con el mismo aparato (H).

El diseño diferente de éste último acuario respondió simplemente a la necesidad de mejorar el sistema de serpentín inicialmente diseñado, ya que en este para lograr que la temperatura se igualara en todas las cámaras se requería de más tiempo.



Se midió el consumo de oxígeno en respirómetro cerrado, esto es, se suspendía la aireación y se sellaban las cámaras con una capa de aceite vegetal. Se tomaron muestras iniciales de cada cámara en botellas BOD para conocer la disponibilidad de oxígeno en el tiempo cero, luego se tomaron muestras cada hora durante dos horas.

La determinación de dos horas como tiempo de duración de los experimentos se hizo considerando que en este lapso el consumo de oxígeno de las almejas en promedio, lleva la concentración de oxígeno a un nivel aceptable (5 mg/l) en las cámaras selladas. En más tiempo esta concentración disminuye a niveles de resistencia del organismo.

La concentración de oxígeno se determinó con un electrodo y por medio de un analizador de iones (Orion-901) de sensibilidad  $\pm 0.001$  moles (L de la Fig. 2).

A pesar de la filtración y esterilización del agua de mar, la duración de los experimentos incluyendo el acondicionamiento de las almejas a la salinidad y temperatura experimentales y su aclimatación a las nuevas condiciones (48 horas en total) pudo permitir la proliferación de bacterias. Esta o cualquier otra razón que haya ocasionado variaciones en la concentración de oxígeno en las cámaras experimentales además de las ocasionadas por el consumo de las almejas pudieron detectarse en las cámaras testigo.

Por lo tanto el consumo de oxígeno se calculó primero por diferencia entre las concentraciones de las cámaras experimentales y testigos y luego por diferencias entre las muestras medidas a diferentes tiempos y las muestras iniciales. Este consumo de oxígeno se expresó en ml de  $O_2$  por hora y por peso seco (p.s.) del animal en gramos (ml  $O_2$ /h/p.s.) y corresponde al metabolismo estándar ( $QO_2$ ).

Previamente al cálculo de las diferencias de concentración, los valores originalmente obtenidos a partir del microanalizador en mg/l  $O_2$ , fueron transformados a ml/l  $O_2$  y posteriormente a ml de  $O_2$  al considerar el volumen de agua contenido en las cámaras en el momento de tomar las muestras.

En las mismas muestras seriadas en que se cuantificó la concentración de oxígeno se midió la excreción de amoniaco de los animales. Los procedimientos para análisis y cálculo se llevaron a cabo en forma similar, utilizando el analizador de iones y el electrodo correspondiente.

La excreción amoniacal ( $QNH_3$ ) se expresó como mg de

amoníaco excretado por hora y peso seco del organismo ( $\text{mg NH}_3/\text{h/p. s.}$ ).

Al terminar el análisis de las muestras, la capa de aceite era removida utilizando un sistema Venturi y los animales se trasladaban al otro acuario experimental (C2 de la Fig. 2), previamente preparado a la salinidad y temperatura experimentales. En este acuario las almejas se mantuvieron durante aproximadamente 12 horas para que se recuperaran del "stress" por la manipulación.

Aquí se midió la tasa de ventilación, la cual fué estimada indirectamente, registrando la remoción de células de Tetraselmis suecica vivas por las almejas en las cámaras experimentales.

Jorgensen (1943) citado por Galtsoff (1964), asumiendo que el mecanismo de filtración retiene todas las partículas suspendidas en el agua, calcula la tasa de ventilación a partir de la diferencia entre la concentración de células inicial y la final por medio de la fórmula:

$$m = ( \log \text{conc}_0 - \log \text{conc}_t ) M / \log e \cdot t$$

donde:

$m$  = volumen de agua ( en l ) transportado en una hora

$M$  = volumen de la suspensión en l

$\text{conc}_0$  = concentración de células al principio de la observación

$\text{conc}_t$  = concentración de células después de (t) horas

$e$  = base de los logaritmos neperianos (2.71828)

De esta manera fué calculada la tasa de ventilación de las almejas. La concentración de células fué determinada utilizando el método descrito por Quillard (1973), utilizando hematocitómetros (marca Hausser) en intervalos de una hora durante tres horas consecutivas.

Este tiempo fué determinado considerando que después de tres horas la concentración del alimento en las cámaras decrece, por la filtración de las almejas, hasta niveles en los cuales el número de células no es detectado a partir del método utilizado y además como se mencionó anteriormente debe evitarse el problema de que la concentración de oxígeno llegue a los niveles de resistencia de los organismos.

El grado de precipitación de las células en las cámaras experimentales, así como el posible incremento en el número de células durante algunos de los experimentos ocasionado por la reproducción de T. suecica se midió en las cámaras testigo sin almejas, inoculadas con la misma concentración de células inicial de las cámaras experimentales (de 20 a

130X10 cel/ml). y se substrajo de la cantidad total filtrada por las almejas.

Bajo estas condiciones de actividad ocasionada por la filtración de células de T. suecica, se midió el metabolismo activo de T. stultorum a partir del consumo de oxígeno utilizando el mismo procedimiento para medir el consumo de oxígeno en condiciones estándar.

En los primeros 3 experimentos en los que se probaron las siguientes combinaciones: 21°C y 100 % A.M., 13°C y 80 % A.M. y 13°C y 110 % A.M., el metabolismo activo se midió simultáneamente a la tasa de ventilación. De las cámaras inoculadas con células de T. suecica, se tomaban muestras con botellas BOD, se analizaba la concentración de oxígeno y se tomaba una alícuota de 1 ml que inmediatamente se fijaba con 1 ml de formól al 5% para posteriormente llevar a cabo los conteos de células.

Para evitar el problema de la precipitación de las células de T. suecica, así como para asegurar que la producción de oxígeno por las algas no opacara el consumo de oxígeno de las almejas, a partir del cuarto experimento, se midió primero la tasa de ventilación y después el metabolismo activo. De esta manera, se pudo mantener aireación constante durante la medición de la tasa de ventilación logrando que las células se mantuvieran en suspensión. Las almejas posteriormente eran colocadas de nuevo en el primer acuario (C1 de la Fig. 2) preparado a las mismas condiciones experimentales, se dejaban recuperar por dos horas y se medía el metabolismo activo.

Se calculó el  $Q_{10}$  de la tasa de ventilación de las almejas. Este término se utiliza para todos los procesos de velocidad, que como la tasa de ventilación, son acelerados por la temperatura y se refiere al aumento en la velocidad provocado por un incremento de 10°C en la temperatura (Schmidt-Nielsen, 1976). La fórmula para calcular el  $Q_{10}$  es la siguiente:

$$Q_{10} = \left( R_2 / R_1 \right)^{10/t_2 - t_1}$$

Donde  $R_2$  y  $R_1$  son las tasas de ventilación en dos temperaturas  $t_2$  y  $t_1$ .

Sin embargo no es necesario determinar dos velocidades separadas 10°C para calcular el  $Q_{10}$ . Cualesquiera dos temperaturas pueden ser utilizadas, siempre y cuando su rango de separación sea suficientemente amplio para dar una información válida acerca del efecto de la temperatura. Así se calculó el  $Q_{10}$  de la tasa de ventilación de Tivela

stultorum a las diferentes condiciones de salinidad para los intervalos de 13 a 16 °C y de 16 a 21 °C .

El índice de "stress" para las diferentes condiciones experimentales medido como la razón de oxígeno consumido y el nitrógeno amoniacal excretado se calculó a partir del cociente O/N de cada almeja, para lo cual los valores de consumo de oxígeno estándar y nitrógeno amoniacal fueron transformados en átomos-gramo.

Es importante mencionar que, para corroborar si los resultados de la razón O:N varían si se consideran los valores expresados en función del volumen de las cámaras: ml O<sub>2</sub> y mg NH<sub>3</sub>, como se presentan en este trabajo ó si se considera un volumen estándar de 1 lt (ml/l O<sub>2</sub> y mg/l NH<sub>3</sub>), se llevaron a cabo pruebas a partir de los datos originales, observandose que la razón O:N calculada a partir de ambas fuentes no difiere.

Después de finalizados los experimentos se observaron las gonadas de las almejas al microscopio para identificar sexo y estado gonadal. Posteriormente se extrajo la carne de la concha de los especímenes y se deshidrataron hasta peso constante en una estufa a 100 °C. Este peso seco ( medido en una balanza Sartorius 1204 MP ) se alcanzó en promedio a las 72 horas .

Una vez obtenidas las tasas de consumo y excreción de metabolitos, se procesaron los datos utilizando análisis de varianza ( ANVA ) para dos factores . Previamente se revisó la homogeneidad de estas por medio de la prueba de Bartlett (segun el procedimiento descrito en el Apéndice anexo) y cuando no se confirmó este requisito, se llevo a cabo la transformación logarítmica de los datos para proseguir con el ANVA y las comparaciones multiples entre promedios por el metodo ( SNK ); Student-Newman-Keuls ( Sokal y Rohlf, 1969 ).

La relacion funcional entre las variables fisiológicas y los parámetros ambientales ( salinidad y temperatura ) se obtuvo ajustando los promedios resultantes por mínimos cuadrados a polinomios de segundo grado (Apéndice anexo ). A partir de estas ecuaciones fueron generadas superficies de respuesta que muestran en forma gráfica el efecto combinado de los dos parámetros ambientales sobre las variables medidas. Se calculó también la bondad del ajuste de los valores estimados en relación a los valores originales ( Apéndice ).

### 3 Resultados

#### 3.1 Metabolismo estándar

Los promedios del metabolismo estándar de las almejas en las diferentes condiciones de salinidad y temperatura a las que fueron sometidas se presentan en la Tabla II.

El ANVA para el efecto de los dos factores (Tabla III) demostró que fué la salinidad el parámetro que afectó significativamente ( $p < 0.001$ ) las variaciones observadas en el consumo de oxígeno. El efecto de la temperatura en cambio no fué significativo ( $p > 0.05$ ).

La tasa de consumo de oxígeno de T. stultorum en respuesta a la combinación de salinidad y temperatura es descrita por la siguiente ecuación:

$$Y = 1.951 + (0.0490)T - (0.0514)S + (0.0026)T^2 + (0.0002)S^2 + (0.0002)TS$$

donde: Y =  $QO_2$  expresado en ml  $O_2$  /h/p. s.

T = temperatura (de 13 a 21 °C )

S = salinidad ( de 80 a 110 % A.M. )

La ecuación explica el 70 % de la varianza total en los datos siendo el coeficiente de correlación de 0,84 .

La superficie de respuesta que representa el consumo de oxígeno estándar en función de las dos variables ambientales (Fig. 4) es generada a partir de esta ecuación. Se observa que la respuesta del metabolismo estándar fué creciente hacia salinidades extremas sub y supranormales, en relación a los valores registrados en condiciones normales de salinidad. Se observa también que el metabolismo estándar aumentó al aumentar la temperatura en salinidades altas . La misma tendencia en relación al aumento en la temperatura fué observada en salinidades subnormales. Este comportamiento lo indican las isopletas en la parte superior de la Fig. 4, que corresponde a la salinidad más alta, presentando valores crecientes al aumentar la temperatura, que van desde 0.08 a 0.14 ml  $O_2$ /h/p. s. y de la misma manera en la parte inferior que corresponde a 80 % A.M., en donde los valores ascienden de 0.12 a 0.16 ml  $O_2$ /h/p. s.

En la Fig. 5 se graficaron los promedios de consumo de oxígeno de las almejas en las diferentes salinidades (A) y temperaturas (B). Los puntos representan los promedios y sus respectivas barras el error estándar de los mismos.

TABLA II. - METABOLISMO ESTANDAR DE Tivela stultorum MEDIDO A DIFERENTES CONDICIONES DE SALINIDAD Y TEMPERATURA.

T°C	SALINIDAD % A. M.	ml O <sub>2</sub> / h / p. s.	N
	80	0.098 ± 0.013	6
13	100	0.084 ± 0.010	12
	110	0.067 ± 0.008	12
	80	0.193 ± 0.035	7
16	100	0.088 ± 0.021	10
	110	0.128 ± 0.018	10
	80	0.133 ± 0.027	10
21	100	0.065 ± 0.013	8
	110	0.170 ± 0.021	12

Los valores representan la media ± el error estándar.  
N = numero de almejas

TABLA III. - ANALISIS DEL VARIANZA DE LOS DATOS DE METABOLISMO ESTANDAR.

FUENTE DE VARIACION	g l	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
entre temperaturas	2	2.20	1.10	2.33(n. s. )
entre salinidades	2	4.69	2.35	4.97(1)
error	78	36.88	0.47	

(1) p < 0.001, (n. s. ) no significativo

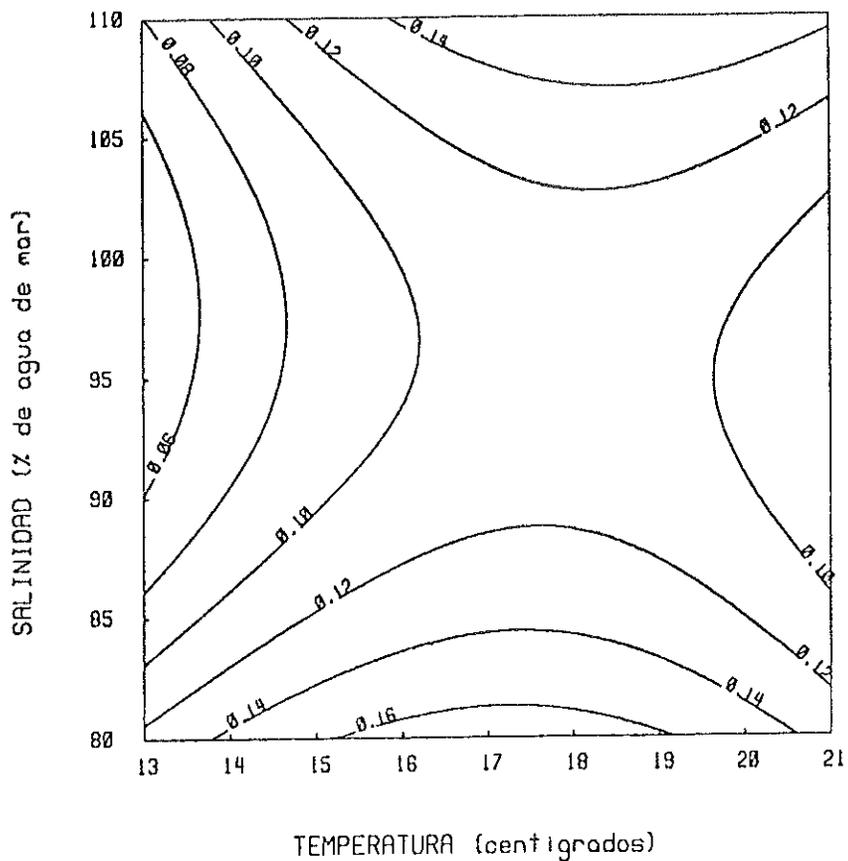


Fig. 4.- VARIACION DEL METABOLISMO ESTANDAR DE *Tivela stultorum* FRENTE A LA COMBINACION DE SALINIDAD Y TEMPERATURA. LAS CURVAS REPRESENTAN LA SUPERFICIE RESPUESTA GENERADA A PARTIR DEL AJUSTE DE LOS PROMEDIOS DE CONSUMO DE OXIGENO A UN POLINOMIO DE SEGUNDO GRADO. LOS VALORES INDICAN - ml O<sub>2</sub> / h / p.s.

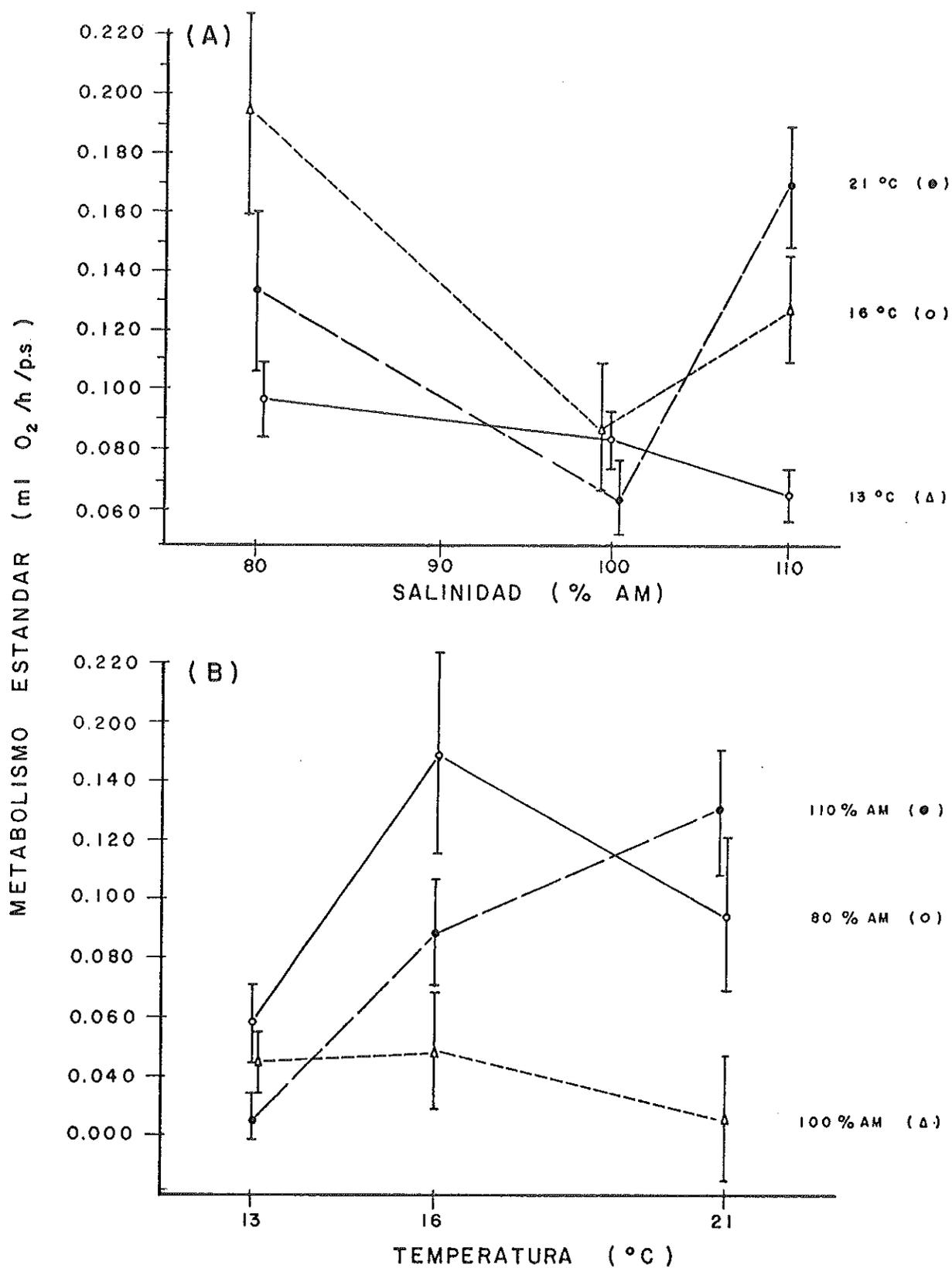


Fig. 5.- EFECTO DE LA SALINIDAD (A) Y LA TEMPERATURA (B) SOBRE EL METABOLISMO ESTANDAR DE *Tivela stultorum*.

En la Fig. 5(A) se observa que el incremento en la tasa metabólica estándar al disminuir la salinidad de 100 a 80 ‰ A.M., descrita anteriormente en la superficie de respuesta (Fig. 4), no fue ajeno a variaciones en la temperatura siendo mayor a 16 que a 21 °C. A 13 °C en cambio el incremento no fue significativo ( $p > 0.05$ ), como lo indicó la prueba de comparación múltiple de promedios (SNK).

Por otro lado la respuesta creciente del metabolismo estándar al aumentar la salinidad de 100 a 110 ‰ A.M., igualmente descrita en la Fig. 4, se debió principalmente al incremento registrado a 21 °C.

A 16 °C se observó la misma tendencia, sin embargo el SNK reveló que el incremento bajo esta temperatura no fue significativo, lo mismo que el decremento observado a 13 °C.

En la Fig. 5(B) se observa claramente el incremento en la tasa metabólica estándar de las almejas al aumentar la temperatura de 13 a 21 °C, en condiciones supranormales de salinidad y se aprecia también que el aumento del consumo de oxígeno en 80 ‰ A.M. como respuesta al incremento de temperatura, se debió al aumento en el rango de 13 a 16 °C. A partir de los 16 °C hasta los 21 °C la tasa metabólica estándar no aumentó, sino al contrario disminuyó. Los resultados del SNK demuestran sin embargo que este decremento no fue significativo, dada la magnitud del error estándar de ambos valores.

En condiciones de salinidad normal, al contrario la tendencia del consumo de oxígeno fue de disminuir al aumentar la temperatura. Pero las diferencias entre los valores para las tres temperaturas no fueron significativas y por lo tanto puede decirse que la tasa metabólica estándar de las almejas en 100 ‰ A.M. fue independiente de variaciones en la temperatura.

### 3.2 Metabolismo activo

El consumo de oxígeno, durante la alimentación, que refleja el metabolismo activo aerobio de los animales se presenta a continuación en la Tabla IV. El análisis de varianza de los promedios para todas las condiciones (Tabla V) revela que fue la temperatura el factor que afectó significativamente ( $p < 0.001$ ) el consumo de oxígeno activo. La salinidad en cambio no tuvo efecto significativo.

TABLA IV. -METABOLISMO ACTIVO DE Tivela stultorum MEDIDO A DIFERENTES CONDICIONES DE SALINIDAD Y TEMPERATURA.

T °C	SALINIDAD % A. M.	ml O <sub>2</sub> / h / p. s.	N
	80	0.131 ± 0.03	6
13	100	0.057 ± 0.011	12
	110	0.078 ± 0.009	9
	80	0.107 ± 0.021	7
16	100	0.127 ± 0.016	11
	110	0.067 ± 0.009	11
	80	0.170 ± 0.021	7
21	100	0.180 ± 0.012	9
	110	0.217 ± 0.012	12

Los valores representan la media ± el error estándar.  
N = numero de almejas

TABLA V. -ANALISIS DEL VARIANZA DE LOS DATOS DE METABOLISMO ACTIVO.

FUENTE DE VARIACION	g l	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
entre temperaturas	2	0.159	0.079	25.74 (1)
entre salinidades	2	0.003	0.002	0.548(n. s. )
error	75	0.23	0.003	

(1) p < 0.001, (n. s. ) no significativo

El efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre el metabolismo activo de Tivela stultorum se describe en la siguiente ecuación:

$$Y = 1.341 - (0.086)T - (0.0120)S + (0.0017)T^2 + (0.0004)S^2 + (0.00002)TS$$

donde: Y =  $QO_2$  activo expresado en ml  $O_2$  /h/p. s.

T = temperatura ( °C )

S = salinidad ( % A.M. )

Esta ecuación provee un buen ajuste con los resultados experimentales ya que explica el 89 % de la varianza total en los datos , con un coeficiente de correlación de 0,94 .

A partir de este polinomio se generó la superficie de respuesta para ilustrar el efecto de los parámetros ambientales sobre el consumo de oxígeno activo (Fig.6).

Esta superficie de respuesta corrobora la menor influencia de la salinidad sobre el metabolismo activo en comparación al efecto de la temperatura. Se observa que para todo el rango de salinidades probado el metabolismo activo aumentó conforme la temperatura aumentaba, desde valores menores de 0.08 hasta 0.20 ml  $O_2$  /h/p. s. El efecto de la salinidad, en cambio, se apreció solo en el rango de 13 a 16°C, en donde la tasa metabólica activa fué creciente al disminuir la salinidad de 110 a 80 % A.M., pero este incremento fué menor que el ocasionado por temperaturas altas, siendo el valor máximo mayor que 0.010, pero menor que 0.014 ml  $O_2$  /h/p. s.

En la Fig. 7 se presentan los promedios de la tasa metabólica activa de las almejas en función de la salinidad (A) y de la temperatura (B). Los puntos representan los promedios y las barras su respectivo error estándar.

En la Fig.7(A) se observa que el incremento del consumo de oxígeno activo al disminuir la salinidad de 100 a 80 % A.M., descrito en la superficie de respuesta de la Fig. 6, se debió al comportamiento observado a 13°C en donde el consumo de oxígeno aumentó en más del 70 % al someter a los organismos al medio diluido. A 16 y 21°C al contrario la tasa metabólica activa tendió a disminuir, pero la prueba SNK indica que el decremento en ambos casos no fué significativo ( $p > 0.05$ ). Al aumentar la salinidad de 100 a 110 % A.M., para 16°C, el consumo de oxígeno descendió significativamente alcanzando un valor de 0.067 ml  $O_2$  /h/p. s. Este comportamiento fué el responsable de la tendencia del metabolismo activo, observada en la superficie de respuesta, de disminuir hacia salinidades supranormales. En 21 y 13°C salinidades altas aumentaron la tasa metabólica activa, pero los incrementos no fueron significativos ( $p > 0.05$ ).

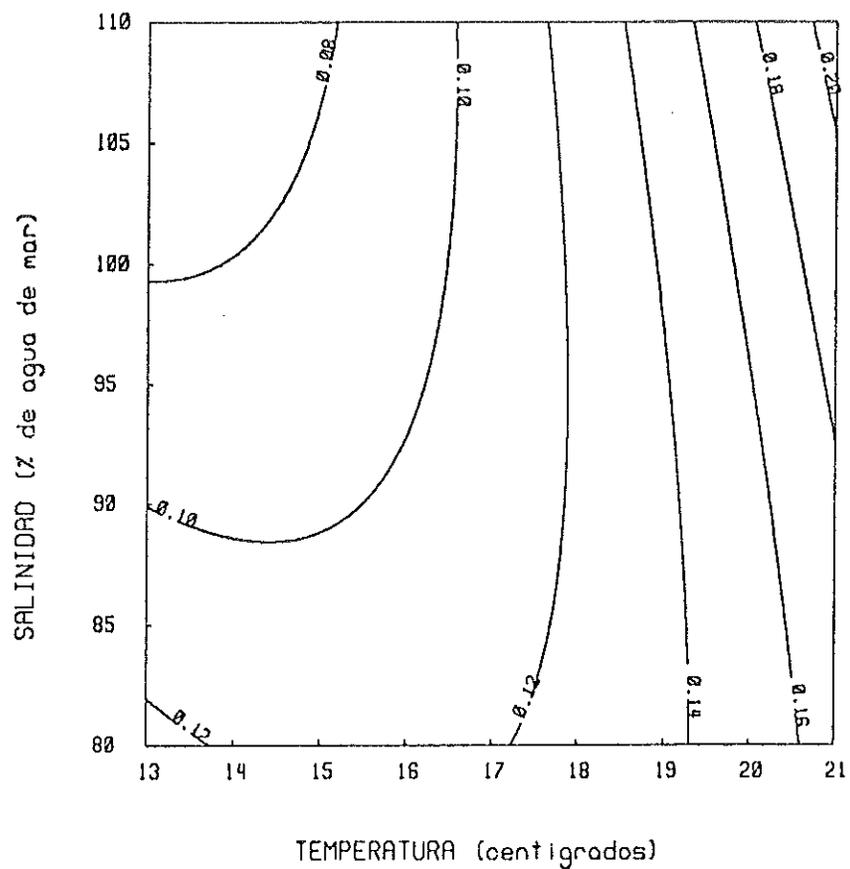


Fig.6.- SUPERFICIE DE RESPUESTA DEL METABOLISMO ACTIVO DE *Tivela stultorum* EN FUNCION DE LA SALINIDAD Y LA TEMPERATURA .  
LOS VALORES SE REFIEREN A ml O<sub>2</sub>/h/p.s.

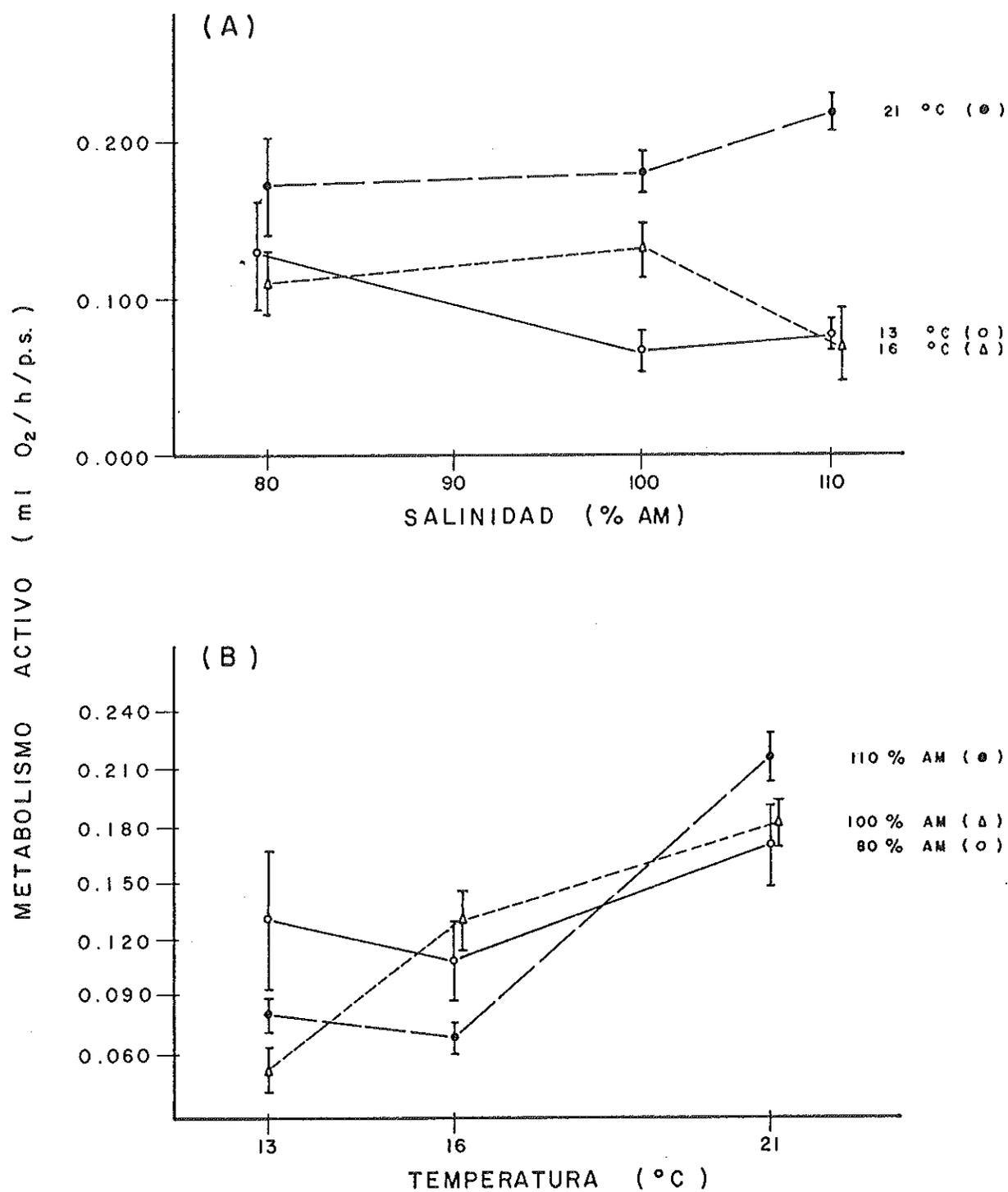


Fig. 7.- METABOLISMO ACTIVO DE *Tivela stultorum* EN FUNCION DE LA SALINIDAD (A) Y LA TEMPERATURA (B)

En la Fig. 7(B) se presenta el efecto que la temperatura tuvo sobre la tasa respiratoria activa. El consumo de oxígeno en 100 % A.M. experimentó un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) al aumentar la temperatura de 13 a 21°C, alcanzando un valor máximo de 0.180 ml O<sub>2</sub>/h/p.s. en relación al mínimo de 0.057 ml O<sub>2</sub>/h/p.s. para 13°C. En la misma figura se observa que a salinidades supranormales el consumo de oxígeno también se incrementó y en forma más marcada, pero solo al aumentar la temperatura de 16 a 21°C. Para el incremento de temperatura de 13 a 16°C en cambio el consumo disminuyó, pero este descenso no fué significativo. Por lo tanto puede considerarse que en este rango el metabolismo activo se mantuvo constante con un valor promedio de 0.072 ml O<sub>2</sub>/h/p.s.

En 80 % A.M. el comportamiento de la tasa metabólica activa fué similar al descrito en condiciones supranormales de salinidad, pero en este caso las diferencias entre los promedios para las tres temperaturas no fueron significativos, es decir, la tasa respiratoria no varió manteniéndose constante en 0.140 ml O<sub>2</sub>/h/p.s.

### 3.3 Tasa de ventilación

La tasa de ventilación de las almejas en las diferentes condiciones experimentales se muestran en la Tabla VI. En la misma tabla se presentan los valores del  $Q_{10}$  de la tasa de ventilación calculado a diferentes salinidades para los intervalos de temperatura de 13 a 16°C y de 16 a 21°C. Los resultados muestran que el  $Q_{10}$  para todas las salinidades y en todos los rangos de temperatura fué mayor de 1, pero menor de 2. Esto demuestra una dependencia relativa de la tasa de ventilación en función de la temperatura. Es relativa porque no es completamente independiente de la temperatura ( $Q_{10}=1$ ), pero tampoco totalmente dependiente de ella ( $Q_{10}>2$ ).

Se observa también que a 110 % A.M. el  $Q_{10}$  calculado para los intervalos de temperatura de 13 a 16°C y de 16 a 21°C es similar (1.58 y 1.61). A 80 % A.M. en cambio el  $Q_{10}$  para esos dos intervalos fué diferente, siendo 1.14 y 2.0 respectivamente, lo que refleja una aclimatación significativa de la tasa de ventilación en condiciones subnormales de salinidad.

TABLA VI : TASA DE VENTILACION DE Tivela stultorum EN DIFERENTES CONDICIONES DE SALINIDAD Y TEMPERATURA EXPRESADA EN lt/h . SE INCLUYEN LOS VALORES Q<sub>10</sub> DE LA TASA DE VENTILACION PARA LOS RANGOS DE TEMPERATURA DE 13 a 16 °C Y DE 16 a 21 °C EN TRES SALINIDADES .

80 % A M			
T °C	TASA DE VENTILACION (lt/h)	INTERVALO DE TEMPERATURA (°C)	Q <sub>10</sub>
13	2.1890		
16	2.2822	13 — 16	1.1489
21	3.2343	16 — 21	2.0084
100 % A M			
13	1.7031		
16	0.4552	13 — 16	
21	0.6329	16 — 21	1.9332
110 % A M			
13	1.8364		
16	2.1095	13 — 16	1.5874
21	2.6784	16 — 21	1.6121

### 3.4 Relación entre el metabolismo activo y la tasa de ventilación

La tasa metabólica activa de T. stultorum en relación a la tasa de ventilación para las diferentes condiciones experimentales probadas en este trabajo fué graficado en la Fig. 8, a partir de los promedios de consumo de oxígeno tabulados en la Tabla IV y los promedios de la tasa de ventilación de la Tabla VI. Las líneas rectas representan las líneas de regresión que fueron calculadas por el método de mínimos cuadrados.

Las ecuaciones de regresión que relacionan el logaritmo del consumo de oxígeno con la tasa de ventilación para las diferentes salinidades fueron las siguientes:

100 % A. M.

$\log \dot{V}O_2 = 1.3588 - 0.3444 \cdot \text{tasa de ventilación}$   
coeficiente de correlación = -0.9020

110 % A. M.

$\log \dot{V}O_2 = -0.2711 + 0.5839 \cdot \text{tasa de ventilación}$   
coeficiente de correlación = 0.9036

80 % A. M.

$\log \dot{V}O_2 = 0.7401 + 0.1501 \cdot \text{tasa de ventilación}$   
coeficiente de correlación = 0.8618

El primer valor de cada ecuación se refiere a la intersección de la línea de regresión con la ordenada y el segundo valor es la pendiente de la línea.

Se observó (Fig. 8) que la relación entre el consumo de oxígeno y la tasa de ventilación fué diferente dependiendo de la salinidad. A 100 % A. M. la tasa metabólica activa disminuyó al aumentar la tasa de ventilación. En condiciones sub y supranormales de salinidad en cambio la tasa respiratoria aumentó al aumentar el volumen de agua bombeado, siendo este incremento mayor en 110 % A. M. que en 80 % A. M. en donde la tasa respiratoria fué casi independiente de la tasa de ventilación como puede observarse claramente comparando los valores de las pendientes de las líneas de regresión para las diferentes salinidades, que indican que la pendiente para 80 % A. M. fué la menor.

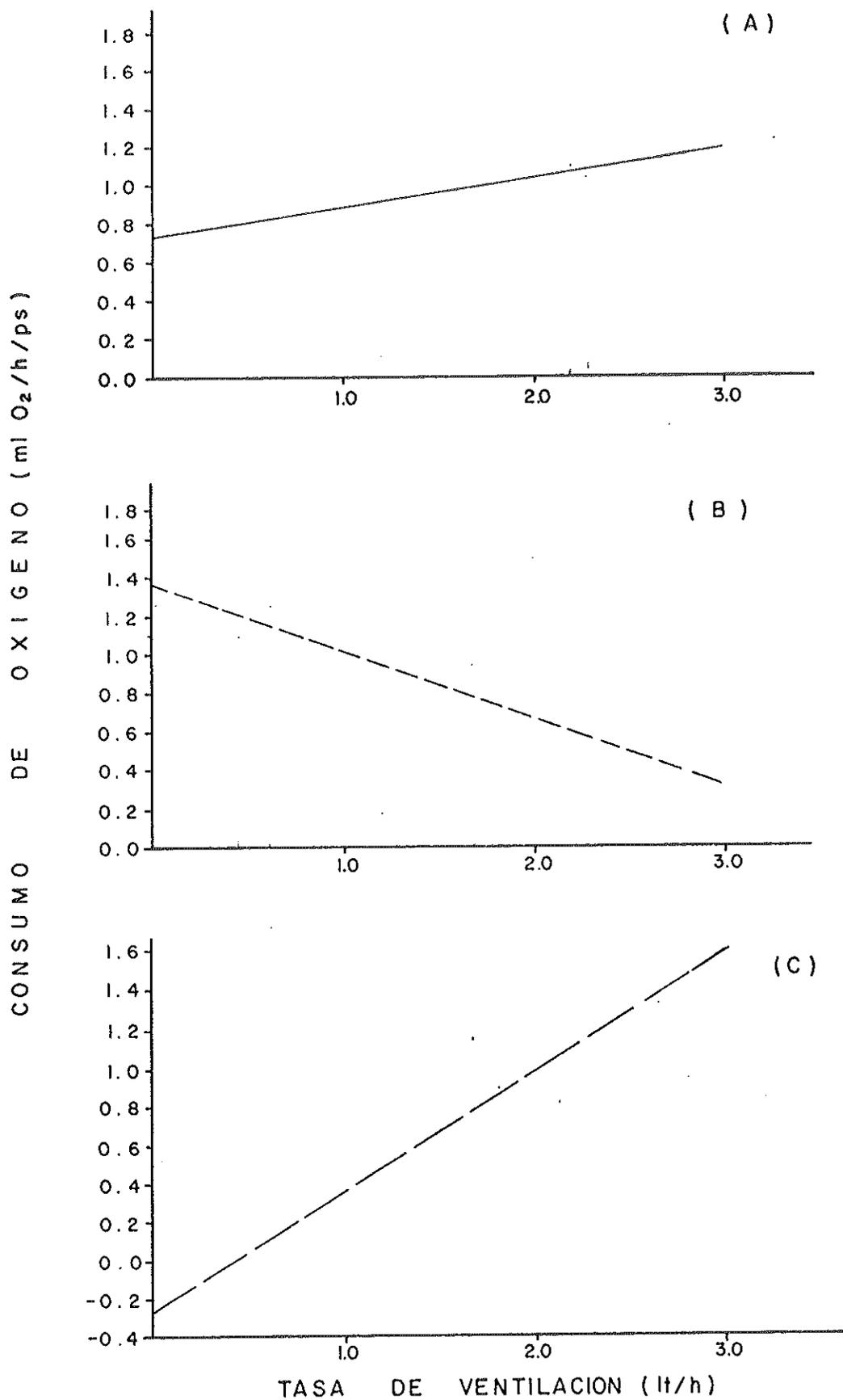


Fig. 8 - RELACION ENTRE EL CONSUMO DE OXIGENO Y LA TASA DE VENTILACION DE *Tivela stultorum* PARA LAS DIFERENTES TEMPERATURAS EN 80% AM (A), 100% AM (B) Y 110% AM (C).

La intersección de las líneas en la ordenada representan el consumo de oxígeno cuando la tasa de ventilación es nula. Para un animal en inanición este valor puede representar el verdadero metabolismo estándar.

Comparando los valores de las intersecciones de las líneas de regresión que relacionan el consumo de oxígeno activo y la tasa de ventilación con los promedios de la tasa respiratoria estándar de Tivela stultorum, calculada a partir de los mismos organismos pero previo a la adición de alimento [Tabla II, pag.17 ], se observa que en condiciones normales de salinidad esta intersección da un valor de 1.36 que fué mayor que los valores del consumo de oxígeno estándar obtenidos para las diferentes temperaturas, que variaron de 0.065 a 0.088 ml O<sub>2</sub>/h/p. s. A 80 % A.M. también el valor de la intersección (0.74) fué mayor que los valores del consumo de oxígeno estándar que fluctuaron entre 0.098 y 0.133 ml O<sub>2</sub>/h/p. s. para las diferentes temperaturas. A 110 % A.M., la intersección fué -0.2711 y por lo tanto menor que el metabolismo estándar que varió entre 0.067 y 0.170 ml O<sub>2</sub> /h/p. s.

Esto indica que para 80 y 100 % A.M. los valores de respiración en condiciones de inanición representaron el verdadero metabolismo estándar de los animales. A 110 % A.M. en cambio los valores del metabolismo estándar fueron mayores de lo que se esperaría considerando una tasa de ventilación igual a cero.

### 3.5 Campo de actividad

El campo de actividad se refiere a la diferencia entre el metabolismo activo y estándar e indica la cantidad de energía disponible para realizar un trabajo externo. En Tivela stultorum como se mencionó en párrafos anteriores: bajo condiciones normales de salinidad, el metabolismo estándar [Fig. 5(B), pag.19] se mantuvo constante en todo el rango de temperaturas probado. El metabolismo activo [Fig. 7(B) pag.24] en cambio, aumentó al incrementarse la temperatura. Sin embargo la diferencia entre ambos tipos de metabolismo ( Campo de actividad ) fué significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) sólo a 21°C, siendo el metabolismo activo 36 % mayor que el estándar.

En el medio más diluido la diferencia entre ambos tipos de metabolismo: estándar y activo no fué significativa ( $p > 0.05$ ) en ninguna de las condiciones experimentales.

A la salinidad más alta el metabolismo estándar de las almejas [Fig. 5(B)] aumentó al incrementarse la temperatura.

El metabolismo activo [Fig. 7(B)] siguió un comportamiento similar pero sólo en el rango entre 16 y 21 C, en el incremento de 13 a 16 C este metabolismo se independizó de la temperatura. La diferencia entre ambos tipos de metabolismo fué significativa ( $p < 0.05$ ) a 16 C donde el consumo de oxígeno estándar fué mayor que el activo en más del 40 %.

### 3.6 Excreción de amoniaco

La concentración de amoniaco producido por las almejas al ser sometidas a las diferentes condiciones experimentales se presenta a continuación en la Tabla VII.

Los resultados obtenidos sugieren que las variaciones en la tasa de excreción amoniacal de *T. stultorum* entre las diferentes condiciones a las que fueron sometidos los organismos son significativas ( $p < 0.001$ ). Estas diferencias se deben al efecto combinado de la salinidad y la temperatura [Tabla VIII].

Se construyó una superficie de respuesta (Fig. 9) para ilustrar el efecto de las 9 combinaciones de salinidad y temperatura sobre la excreción de amoniaco. La ecuación a partir de la cual fué generada tal superficie es:

$$Y = -3.47 + (0.037)T + (0.069)S - (0.002)T^2 + (0.0003)S^2 - (0.0004)TS$$

donde: Y =  $QNH_3$ , expresada en mg  $NH_3$  /h/p. s.

T = temperatura ( °C )

S = salinidad ( % A.M. )

Dicha ecuación explica el 43 % de la variación total de los datos, siendo el coeficiente de correlación 0,65.

En la Fig. 9 se observa que dentro del rango de condiciones probadas hubo un máximo de excreción de amoniaco registrado bajo temperaturas altas y en condiciones subnormales de salinidad. La tendencia general de los valores de excreción a partir de este punto fué de decrecer conforme la temperatura disminuía y hacia los extremos de salinidad (80 y 110 % A.M.), siendo este decremento más marcado hacia salinidades supranormales.

La inclinación de la elipse proyectada en relación a los ejes de salinidad y temperatura (Fig. 9) revela la influencia combinada de estos dos factores sobre la tasa de excreción amoniacal, influencia que fué demostrada por el ANVA (Tabla VIII).

TABLA VII. - EXCRECION DE AMONIACO DE *Tivela stultorum* PARA LAS NUEVE COMBINACIONES DE SALINIDAD Y TEMPERATURA.

T °C	SALINIDAD % A. M.	mg NH <sub>3</sub> / h / p. s.	N
	80	0.023 ± 0.010	5
13	100	0.018 ± 0.002	13
	110	0.002 ± 0.001	2
	80	0.169 ± 0.060	3
14	100	0.039 ± 0.008	10
	110	0.012 ± 0.004	8
	80	0.029 ± 0.007	10
21	100	0.275 ± 0.034	10
	110	0.007 ± 0.002	4

Los valores representan la media ± el error estándar  
N = numero de almejas

TABLA VIII. - ANALISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS DE EXCRECION DE AMONIACO.

FUENTE DE VARIACION	g l	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
entre temperaturas	2	21.34	10.67	25.34(1)
entre salinidades	2	50.22	25.11	59.35(1)
error	49	20.64	0.42	

(1) p < 0.001

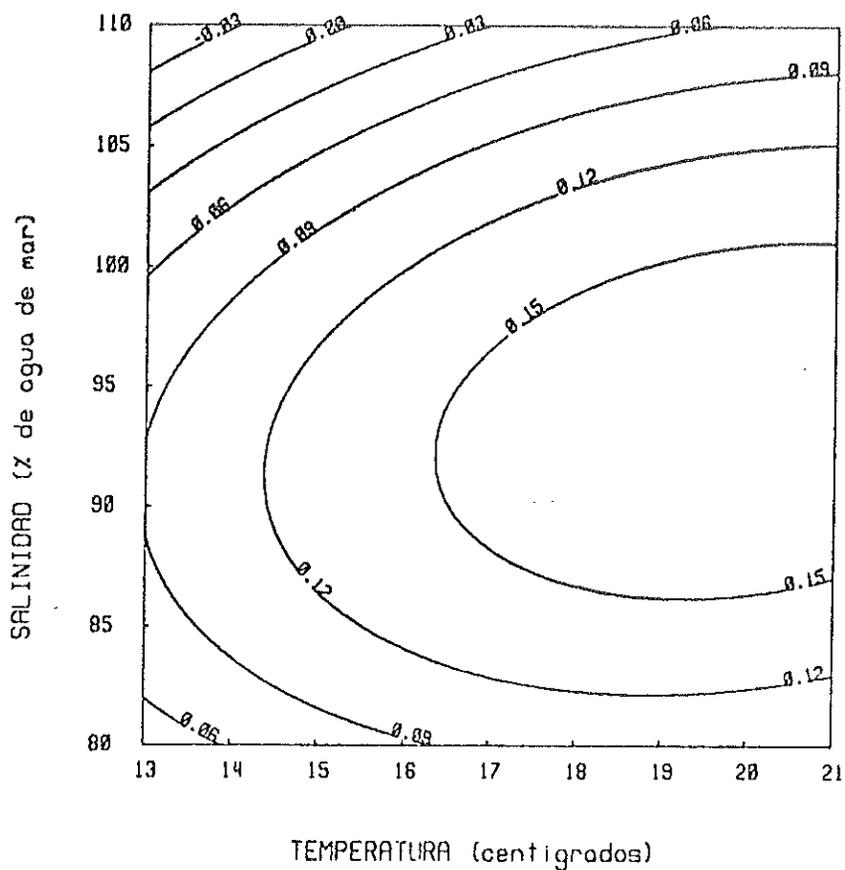


Fig. 9- SUPERFICIE DE RESPUESTA QUE REPRESENTA LA VARIACION DE LA EXCRECION DE AMONIACO DE *Tivela stultorum* FRENTE A LA COMBINACION DE FACTORES AMBIENTALES. LOS VALORES REPRESENTAN  $\text{mg NH}_3 / \text{h} / \text{p.s.}$

Para corroborar las tendencias observadas en la superficie de respuesta de la Fig. 9, se graficó la tasa de excreción de amoniaco en función de la salinidad [Fig. 10(A)] y en función de la temperatura [Fig. 10(B)].

Se observó que la salinidad [Fig. 10(A)] afectó en forma diferente la excreción de amoniaco en las tres temperaturas experimentales.

Es claro que sólo en el rango entre 80 y 100 % A.M. para 13 °C, la excreción fué independiente de la salinidad manteniendose en 0.021 mg NH<sub>3</sub>/h/p.s. Para el resto de las combinaciones probadas la excreción varió significativamente al cambiar la salinidad (p<0.05); A 16 °C el aumento de salinidad de 80 a 110 % A.M. influyó sobre la excreción causando un decremento de la misma del 76 %. A 21 °C la excreción de amoniaco disminuyo hacia los extremos de salinidad ( 80 y 110 % A.M. ) en un 90 y 98 % respectivamente en relación al máximo valor registrado de 0.275 mg NH<sub>3</sub>/h/ p.s. bajo condiciones normales de salinidad ( 100 % A.M. ).

En la Fig. 10(B) se presenta el comportamiento de la excreción amoniaca en función de la temperatura. Se puede apreciar claramente que dentro del rango comprendido entre 13 y 16 °C la tasa de excreción amoniaca varió en forma similar bajo todas las condiciones de salinidad probadas, incrementandose conforme la temperatura aumentaba. A la salinidad subnormal se registró el incremento más alto de más del 80 % en relación al valor para 13 °C.

En la misma figura se puede observar que a partir de los 16 °C y a 110 % A.M. la excreción se mantiene independiente de la temperatura en 0.010 mg NH<sub>3</sub>/h/p.s. En la salinidad normal al aumentar la temperatura de 16 a 21 °C la excreción aumenta hasta alcanzar 0.275 mg NH<sub>3</sub>/h/p.s. Este último valor fué 86 % mayor que el incremento alcanzado a 16 °C bajo las mismas condiciones de salinidad. A 80 % A.M. en cambio al aumentar la temperatura de 16 a 21 °C la excreción disminuyó más del 80 % en relación al máximo mencionado en el parrafo anterior para 16 °C.

Con el objeto de encontrar la causa de la pérdida de amoniaco registrada durante los experimentos, aparentemente más marcada en las cámaras experimentales que en las cámaras testigo, se llevo a cabo una prueba. En ésta, una vez realizado el experimento en la forma convencional las almejas (n=3) fueron extraídas y se continuó la toma de muestras durante 3 horas más. Se midió la concentración de amoniaco y se expresó en función del volumen de agua de las cámaras y por hora (mg/l).

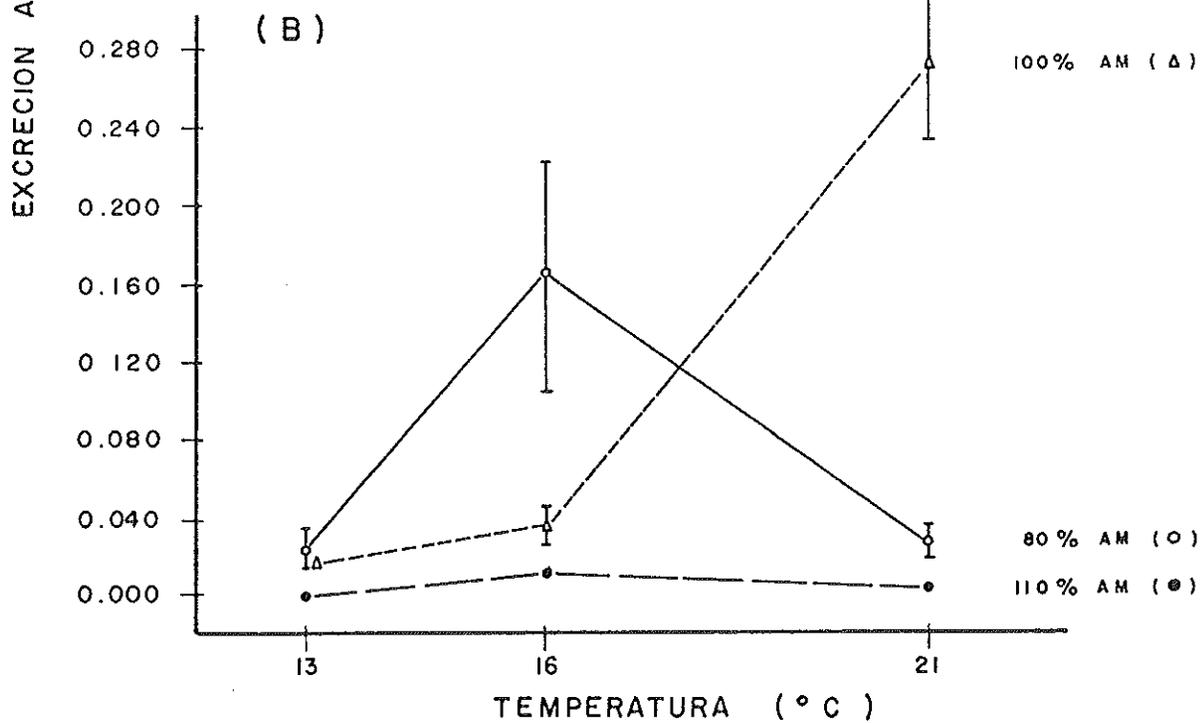
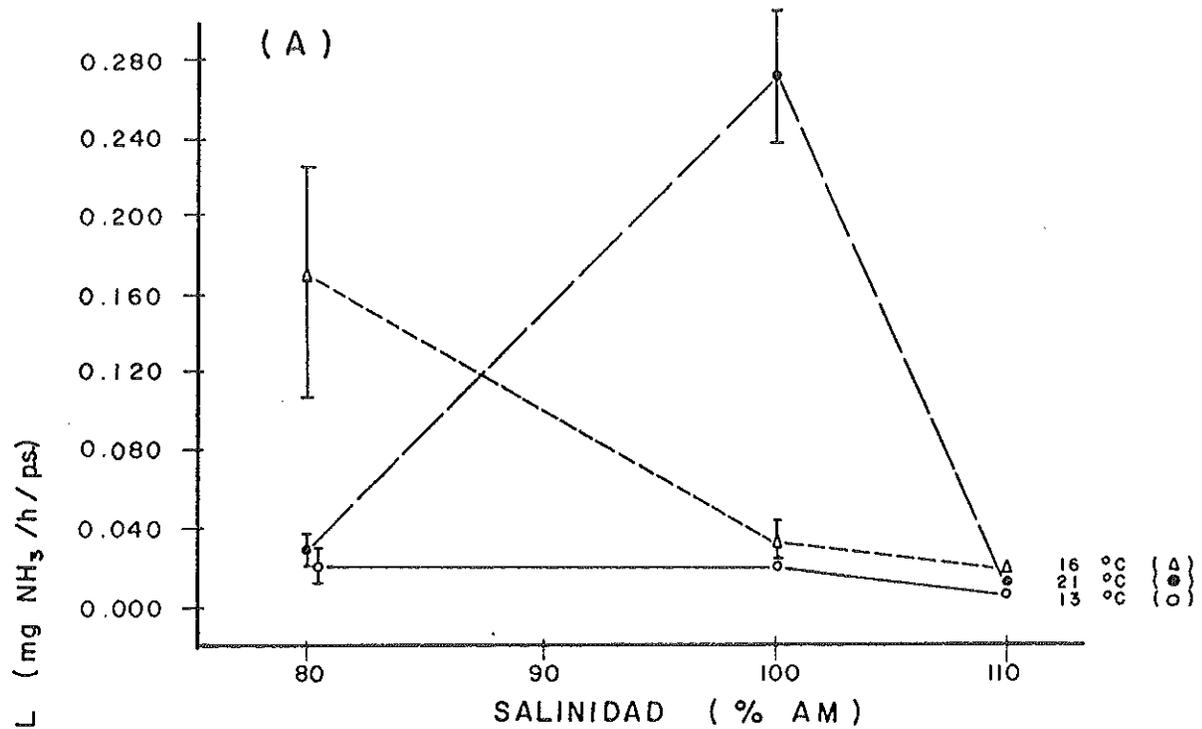


Fig.10.- Respuesta de la excreción amoniacal de *Tivela stultorum* en función de variaciones en la salinidad (A) y la temperatura (B)

Se calculó el ANVA de los datos de amoniaco para las cámaras testigo y para las experimentales y se demostró que hubo una varianza altamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre ellos, siendo la pérdida de amoniaco mayor en las cámaras en donde habían estado las almejas que en los testigos (Tabla IX).

Por lo tanto se puede concluir que las almejas transfieren al agua bacterias que traen consigo, lo que aumenta la concentración de las mismas en las cámaras experimentales en mayor cantidad que en las cámaras testigo que no contienen almejas. A esto se debe que una vez extraído los organismos la asimilación bacteriana (Bayne, 1973 a; Mayzaud, 1973) y por ende la subestimación de los valores de excreción continúe en las cámaras experimentales y en mayor proporción que en las cámaras testigo.

### 3.7 Razón O:N

La razón O:N refleja la utilización relativa de las proteínas como fuente de energía en el metabolismo (Mayzaud, 1973; Bayne, 1973b; Bayne *et al.*, 1976; Widdows, 1978 a). Una razón alta del catabolismo de las proteínas con respecto al catabolismo de los carbohidratos y lípidos resulta en una razón O:N baja. En la Tabla X, a continuación, se observa que la razón O:N de Tivela stultorum para las combinaciones de las salinidades normal y subnormal y las tres temperaturas probadas y también en 110 % A.M. y 16 °C, fueron menores del mínimo teórico de 7, con un rango de 0.845 a 7.0. A salinidad alta, 13 y 21 °C los valores fueron de 25.8 y 11.32 respectivamente.

Los resultados del ANVA [Tabla XI] demuestran que la salinidad fué el factor determinante en las variaciones de la razón O:N. La temperatura en cambio no influyó significativamente ( $p > 0.001$ ) sobre este índice fisiológico.

Se calculó un polinomio de segundo grado para describir los efectos de la salinidad y la temperatura sobre la razón O:N de Tivela stultorum. La ecuación explica el 85 % de la varianza total en los datos y fué la siguiente:

$$Y = 111.0 - (14.57)T + (0.20)S + (0.48)T^2 - (0.04)S^2 + (0.004)TS$$

donde: Y = Razón atómica O/N

T = Temperatura ( de 13 a 21 °C )

S = Salinidad ( de 80 a 110 % A.M. )

TABLA IX : ANALISIS DE VARIANZA PARA PROBAR LA SIGNIFICANCIA DEL EFECTO DE LAS BACTERIAS EN LA ASIMILACION DE AMONIACO EN LAS CAMARAS EXPERIMENTALES Y EN LAS CAMARAS TESTIGO .

FUENTE DE VARIACION	g. l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
ENTRE GRUPOS	1	25.32	25.32	28.6136 ( 1 )
EN CADA GRUPO	17	15.04	0.89	
TOTAL	18	40.37		

( 1 ) < P 0.001

TABLA X .- COCIENTE DEL CONSUMO DE OXIGENO ESTANDAR Y EL NITROGENO AMONIAICAL EXCRETADO, EXPRESADOS EN EQUIVALENTES ATOMICOS (RAZON O:N) DE Tivela stultorum EN 9 COMBINACIONES DIFERENTES DE SALINIDAD Y TEMPERATURA.

T C	SALINIDAD % A. M.	RAZON O:N	N
	80	2.725 ± 0.887	4
13	100	1.911 ± 0.267	12
	110	25.80 ± 14.42	2
	80	0.845 ± 0.135	2
16	100	1.027 ± 0.259	9
	110	7.00 ± 1.959	7
	80	2.368 ± 0.898	4
21	100	0.111 ± 0.043	7
	110	11.325 ± 2.866	4

Los valores representan la media ± el error estándar  
N = número de almejas

TABLA XI.- ANALISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS DE LA RAZON O:N

FUENTE DE VARIACION	g l	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
entre temperaturas	2	0.578	0.289	0.399(n. s. )
entre salinidades	2	74.744	37.372	51.562(1)
error	42	30.440	0.725	

(1) p < 0.001; (n. s. ) no significativo

La superficie de respuesta del índice O:N en función de los dos parámetros abióticos considerados generada a partir de esta ecuación (Fig. 11) indica que salinidades subnormales y temperaturas mayores de 13 °C ocasionaron valores de la razón O:N de Tivela stultorum por debajo del mínimo teórico de 7. Al aumentar la salinidad de 80 a 110 % A.M. en el rango entre 13 y 16 °C la razón O:N aumentó hasta alcanzar valores mayores de 15.0

En la Fig. 12 se graficó la respuesta de la razón O:N de las almejas a variaciones de la salinidad (A) y de la temperatura (B). Los puntos representan los promedios y las barras el error estándar.

Se observa [Fig. 12(A)] que la respuesta creciente de la razón O:N al aumentar la salinidad y al disminuir la temperatura, descrita en la superficie de respuesta de la Fig. 11, se debió al incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de este cociente al aumentar la salinidad de 100 a 110 % A.M. Este comportamiento no fué ajeno a las variaciones de temperatura siendo mayor a 13 y a 21 °C que a 16 °C, como se aprecia claramente en la Fig. 12(B) en los promedios correspondientes a 110 % A.M.

Este efecto tan marcado de salinidades supranormales sobre la razón O:N impidió que en la superficie de respuesta (Fig. 11) se apreciara el efecto de salinidades bajas, pero en la Fig. 12(A) si se puede observar en más detalle que tanto a 13 como a 21 °C la razón O:N aumentó al disminuir la salinidad de 100 a 80 % A.M., mientras que a 16 °C la respuesta fué diferente, siendo la razón O:N menor al disminuir la salinidad en el rango mencionado. Sin embargo la prueba SNK reveló que sólo el incremento reportado a 21 °C fué significativo ( $p < 0.05$ ). A 13 y 16 °C las diferencias entre los valores para 80 y 100 % A.M. no fueron significativas, por lo que puede decirse que en ambas temperaturas la razón O:N se mantuvo independiente del descenso en la salinidad.

En lo que respecta al efecto de la temperatura sobre la razón O:N, la Fig. 12(B) indica que en condiciones subnormales de salinidad, se observó la misma tendencia en el cociente O:N reportada en condiciones supranormales de salinidad. Es decir, hubo un incremento de este índice fisiológico hacia los extremos de temperatura (13 y 21 °C). Sin embargo la prueba SNK reveló que para el caso de 80 % A.M., la diferencia entre los valores para las tres temperaturas no es significativa, por lo tanto bajo condiciones subnormales de salinidad la razón O:N de las almejas fué independiente de variaciones en la temperatura.

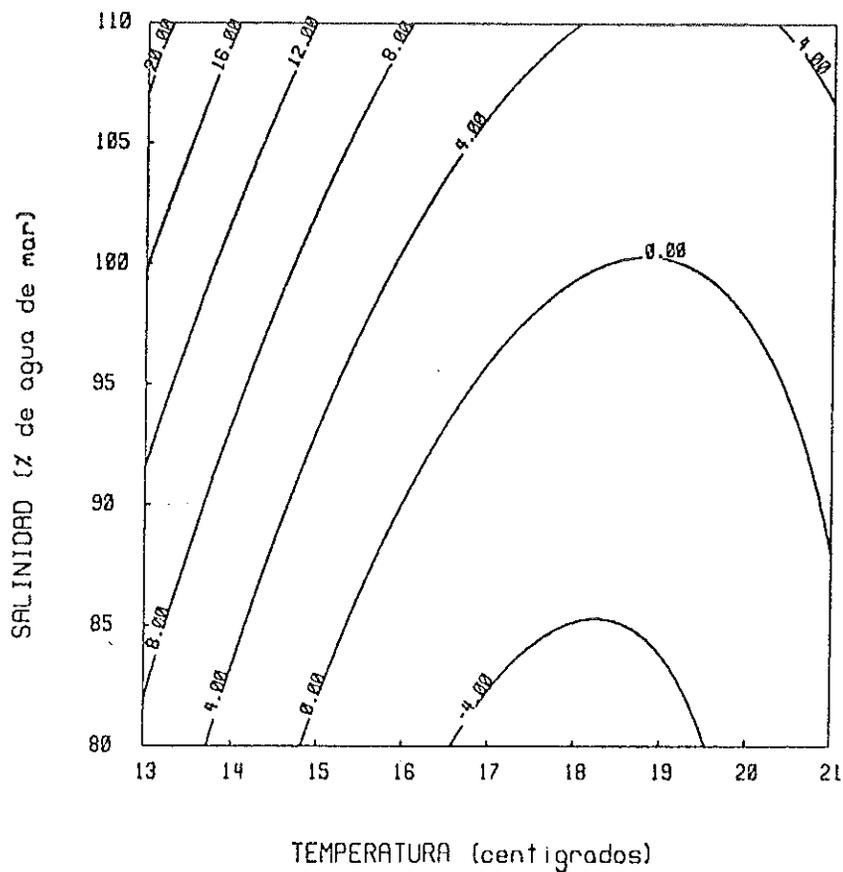


Fig.II.- SUPERFICIE DE RESPUESTA DE LA RAZON O:N DE *Tivela stultorum* FRENTE A LA COMBINACION DE SALINIDAD Y TEMPERATURA. LOS VALORES SE REFIEREN AL COCIENTE DEL OXIGENO CONSUMIDO Y EL NITROGENO AMONIACAL EXCRETADO EXPRESADOS EN EQUIVALENTES ATOMICOS.

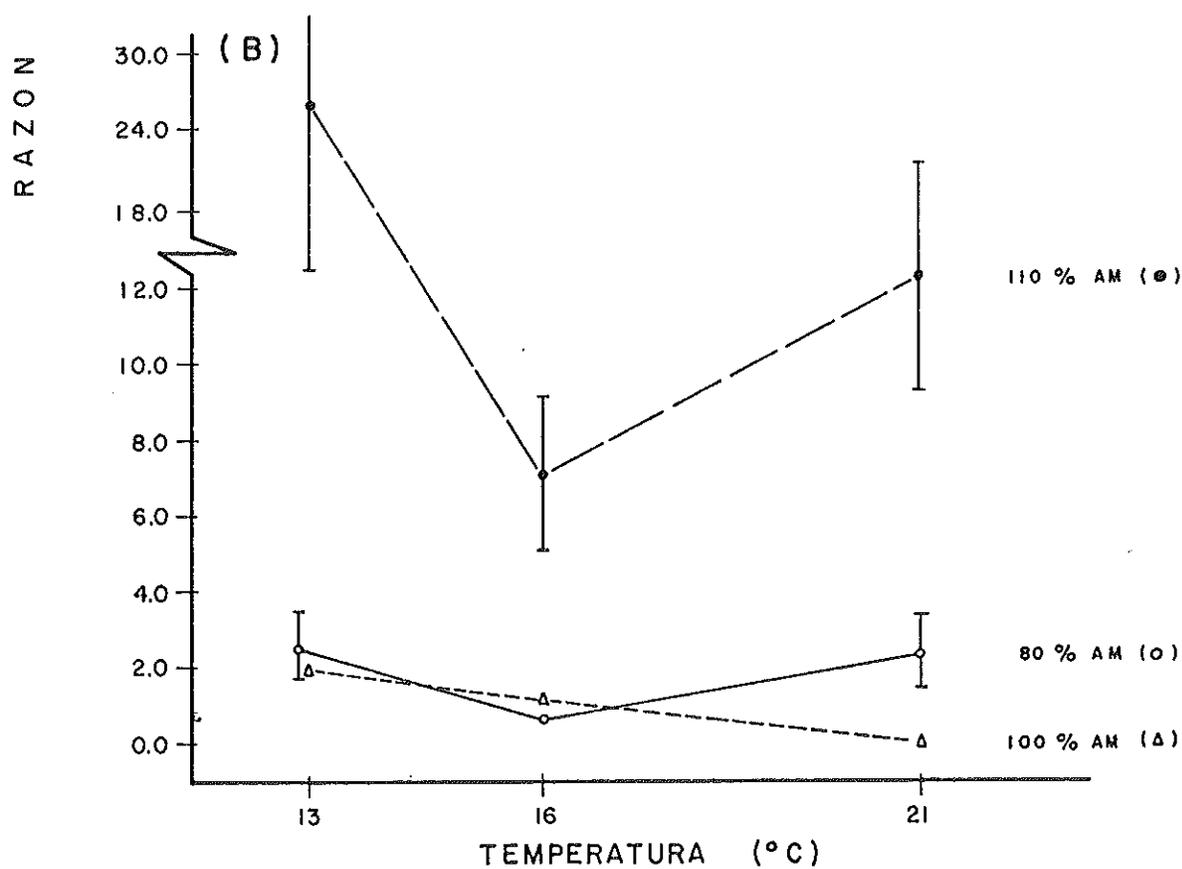
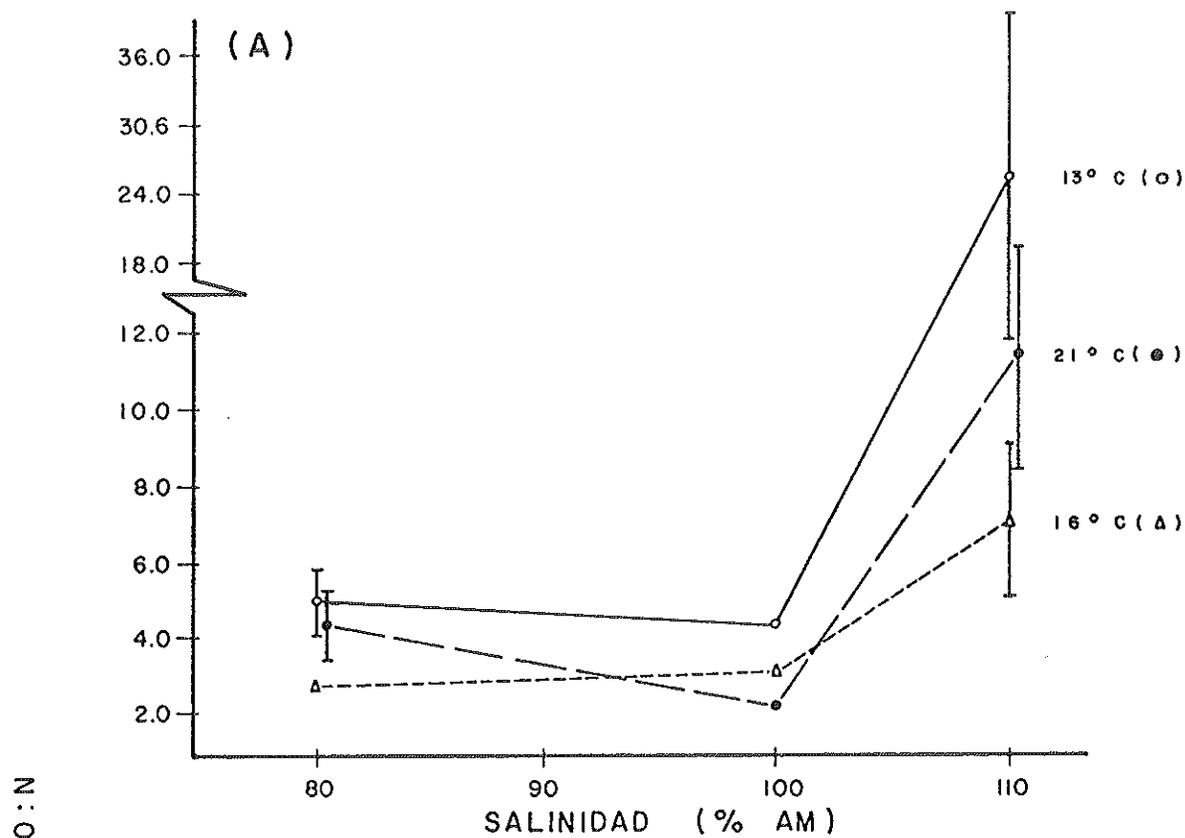


Fig.12.- EFECTO DE LA SALINIDAD (A) Y LA TEMPERATURA (B) SOBRE LA RAZON ATOMICA DEL OXIGENO CONSUMIDO Y EL NITROGENO AMONIAICAL EXCRETADO (RAZON O:N) DE *Tivela stultorum*.

Lo mismo puede decirse para condiciones supranormales de salinidad, pero solo en el incremento de temperatura de 16 a 21°C, ya que para el rango de 13 a 16°C, el incremento reportado al disminuir la temperatura si fué significativo ( $p < 0.05$ ).

En condiciones normales de salinidad hubo un incremento de la razón O:N de más del 90 % al someter a los organismos a temperaturas inferiores (13 y 16°C) a la temperatura de aclimatación (21°C).

### 3.8 Observaciones de las gónadas

A partir del primer experimento, hasta el quinto, es decir en las pruebas que se realizaron entre el 28 de julio de 1979 y el 18 de enero de 1980, el sexo de las almejas fué fácil y claramente determinado por medio de observaciones del tejido gonádico. Se identificaron huevos maduros en las hembras y espermatozoides móviles en los machos. Esto sugiere que los experimentos y por lo tanto las condiciones probadas en este período fueron hechas a partir de animales maduros y en época de reproducción. Esta última característica fué reconfirmada por la presencia de desoves durante el desarrollo de estos experimentos.

Es importante aclarar que los resultados obtenidos a partir de las almejas desovadas no se tomaron en consideración al hacer los promedios de las variables fisiológicas medidas.

Del sexto experimento al último de ellos realizado el 17 de febrero de 1980, la identificación del sexo de las almejas no fué posible debido a que las células reproductoras no pudieron ser identificadas. Esto sugiere que los experimentos realizados durante este tiempo se llevaron a cabo a partir de animales que habían pasado la época de reproducción. Esto coincide con la ausencia de desoves durante el desarrollo de estas pruebas.

## 4 Discusión

### 4.1 Metabolismo estándar

Los moluscos son animales osmoconformes, su sangre permanece normalmente isosmótica con respecto al medio ambiente, entonces la capacidad de estos organismos para soportar el "stress" salino depende principalmente de los mecanismos de regulación isosmótica. Estos mecanismos están relacionados con la habilidad de variar el nivel de los compuestos intracelulares que participan en los procesos osmóticos para la regulación del volumen celular. En los invertebrados estos compuestos son principalmente aminoácidos libres (Schoffeniels y Gilles, 1972).

Existe mucha controversia sobre si el costo osmorregulatorio se refleja o no en la tasa metabólica (Job, 1969; Gilles, 1973; Kinne, 1975). Sin embargo, los resultados obtenidos con invertebrados eurihalinos sugieren que un decremento en la salinidad del medio está asociada con un incremento en el consumo de oxígeno y de la misma manera salinidades supranormales suelen disminuir la tasa respiratoria (Schoffeniels y Gilles, 1972; Gilles, 1973).

Los resultados obtenidos para T. stultorum en este estudio coinciden con los mencionados anteriormente, en lo que respecta al efecto de salinidades subnormales sobre la tasa metabólica, ya que el consumo de oxígeno de las almejas aumentó al disminuir la salinidad de 100 a 80 ‰ A.M. [Figs. 4 y 5(A)].

Schoffeniels y Gilles (1972) consideran que esta variación en la tasa metabólica es consecuencia de que el mecanismo para la regulación de los compuestos orgánicos, que participan en la regulación osmótica, puede depender por lo menos parcialmente de los mecanismos que controlan la síntesis y degradación de los mismos. Es posible que haya un aumento en el consumo de oxígeno, como reflejo del metabolismo oxidativo durante el "stress" hiposmótico, consecuencia del gasto energético ocasionado por la degradación de estas sustancias para lograr que la concentración intracelular iguale a la del medio.

Estos compuestos no son excretados como tales al medio ambiente, sino que primero son desaminados para posteriormente ser eliminados del fluido intracelular, con el subsecuente aumento en la tasa de excreción de amoníaco (Gilles, 1975). Este tipo de respuesta ha sido observada en varias especies de moluscos tales como Macoma incospicua y

Mya arenaria (Emerson, 1969), así como en Modiolus demissus (Bartberger y Pierce, 1976) en los cuales la excreción amoniacal aumentó al disminuir la salinidad. Por lo tanto el aumento del consumo de oxígeno al someter a los organismos a un medio más diluido va acompañado de un incremento en la tasa de excreción de amoniaco.

Esta relación se cumplió en T. stultorum en 16 y 13°C. El incremento de la tasa respiratoria de las almejas a 16°C en condiciones subnormales de salinidad [Fig. 5(A)] coincide con el aumento en la tasa de excreción de amoniaco bajo las mismas condiciones [Fig. 10(A)]. A 13°C cuando no se registró un incremento significativo en el consumo de oxígeno [Fig. 5(A)], tampoco la excreción de amoniaco varió significativamente [Fig. 10(A)]. A 21°C en cambio a pesar de que la tasa metabólica estándar aumentó al disminuir la salinidad [Fig. 5(A)], la tasa de excreción amoniacal no aumentó sino al contrario tuvo un descenso significativo [Fig. 10(A)].

Es muy probable que éste efecto contrario se deba a que la concentración de amoniaco en el experimento en el que se probó 21°C en 100 % A.M. haya sido sobreestimada, dado que debido a fallas de tipo técnico el periodo de adaptación de los organismos a las condiciones experimentales fué más largo (93 horas) de lo normal (de 12 a 36 horas), lo que pudo ocasionar que la concentración de amoniaco en las cámaras previo a la toma de muestras aumentara debido a la concentración de metabolitos.

La respuesta de la tasa de excreción amoniacal de T. stultorum en condiciones supranormales de salinidad confirman los resultados de otros autores para invertebrados acuáticos eurihalinos, en lo referente a los cambios provocados por altas salinidades (Emerson, 1969; Gilles, 1973; Kinne, 1975)

Esos investigadores afirman que al aumentar la salinidad del medio la excreción amoniacal experimenta un decremento, tal respuesta ocurre también en las almejas al aumentar la salinidad de 100 a 110 % A.M. [Fig. 10(A)]. Este decremento no es ajeno a las variaciones en la temperatura, siendo mayor a 21°C que a 16 y 13°C.

Este tipo de respuesta es una vez más reflejo del metabolismo de los aminoácidos como parte de los compuestos orgánicos que actúan durante el "stress" salino. Salinidades supranormales causan aumento en la concentración intracelular de aminoácidos libres, con el objeto de lograr el equilibrio isosmótico en relación al medio externo más concentrado y esto se refleja en una disminución en la tasa de excreción amoniacal y normalmente está relacionado con un

decremento en el consumo de oxígeno.

Los resultados obtenidos en éste estudio muestran que en T. stultorum la tasa respiratoria disminuyó en salinidades supranormales, pero solo a 13°C. A 21 y 16°C en cambio el consumo de oxígeno aumentó al aumentar la salinidad siendo el incremento mayor a 21 que a 16°C [Fig. 5(A)].

La respuesta diferente en temperaturas altas esta relacionada con la participación de la temperatura en los cambios sobre la tasa respiratoria inducidos por variaciones en la salinidad. Temperaturas supranormales tienden a incrementar la dependencia de la tasa metabólica a cambios en la salinidad, mientras que temperaturas subnormales frecuentemente reducen esta dependencia (Kinne, 1970).

Un efecto similar tuvo la temperatura sobre la tasa respiratoria de T. stultorum en condiciones supranormales de salinidad, opacando el efecto de los procesos osmoregulatorios sobre el metabolismo, que si es observado en el comportamiento de la tasa de excreción amoniacal, como se mencionó anteriormente.

También en condiciones subnormales de salinidad el efecto de la temperatura sobre la tasa metabólica pudo detectarse, ya que en estas condiciones el incremento en la tasa respiratoria no fué ajeno al efecto de la temperatura, siendo mayor a 16 que a 21 y 13°C.

El incremento mayor en 16°C que a la temperatura más alta de 21°C, parece estar relacionado con el hecho de que el experimento en el que se probó la combinación de 80 % A.M. y 16°C fué realizado una vez concluida la época de desove, comparado con los experimentos en los que se probaron las combinaciones de 80 % A.M. y 21°C, así como 80 % A.M. y 13°C. Sin embargo esto no significa que las diferencias en el estado de madurez de las almejas haya opacado el efecto de la temperatura, ya que habiendo realizado los experimentos en los que se probaron 13 y 21°C en la misma época el consumo de oxígeno fué mayor a 21 que a 13°C.

En condiciones normales de salinidad, en cambio, el metabolismo estándar de Tivela stultorum fué independiente de la temperatura [Fig. 5(B)]. Este comportamiento, no es ajeno pero tampoco muy común entre los moluscos y se debe a que así como otros organismos poiquiloterms, éstos animales pueden ser menos dependientes de variaciones en la temperatura del medio, lo cual lo logran mediante el ajuste de su metabolismo o mediante la regulación de su medio interno (Job, 1969).

Esto se ha observado en gran número de invertebrados marinos que habitan en la zona de entre mareas como Mutilus edulis (Widdows, 1973) y el crustáceo Palaemonetes vulgaris. (Mc.Farland y Pickens, 1965).

Prosser (1973) considera que, esta compensación del metabolismo en relación a la temperatura o aclimatación térmica, puede considerarse como adaptativa pues otorga a los organismos de cierta independencia con los factores ambientales.

#### 4.2 Metabolismo activo

A diferencia del metabolismo estándar las variaciones observadas en el metabolismo activo al someter las almejas a las 9 condiciones experimentales se debieron principalmente al efecto de la temperatura y no al de la salinidad, siendo el consumo de oxígeno mayor al incrementarse esta variable de 13 a 21 °C.

Esta variación en la respuesta de los diferentes tipos de metabolismo en relación a la temperatura es común, pero en organismos poiquiloterms ha resultado ser tan variable que existe mucha discrepancia al respecto. Widdows (1973) encontró que en M. edulis, el metabolismo activo y el de rutina dependen de la temperatura a comparación del metabolismo estándar y considera que estas diferencias pueden explicarse en términos de actividad, es decir: la actividad (tasa de ventilación) propiciada por la presencia de alimento en las mediciones del metabolismo de rutina y activo si es afectada por la temperatura y a su vez el grado de actividad modifica el metabolismo.

La influencia que la temperatura tiene sobre la tasa de filtración y particularmente sobre el volumen de agua filtrado más que sobre la eficiencia de filtración en los lamelibranquios es bien conocida (Owen, 1966) y es el reflejo del efecto que la temperatura tiene sobre todos los procesos que intervienen en la regulación del flujo de agua, como son la apertura y cierre de las valvas, así como el movimiento de los cilios de las branquias.

En Tivela stultorum la dependencia del metabolismo activo en relación a la temperatura en condiciones supranormales de salinidad, puede también explicarse en función de la actividad, ya que la tasa de bombeo de agua, calculada para ésta salinidad resultó ser relativamente dependiente de la temperatura.

Un comportamiento similar ha sido reportado en otros

bivalvos como Crassostrea virginica, que incrementa regularmente su tasa de bombeo en el rango de temperatura de 8 a 16°C, siendo este incremento menor entre 16 y 28°C y aumentando entre 28 y 32°C (Owen, 1966).

En 80 % A.M. también la tasa de bombeo de agua fué relativamente dependiente de variaciones en la temperatura, pero además se aclimató a los cambios en este factor ambiental duplicándose ( $Q_{10}=2$ ) para un incremento de 5°C en temperatura altas (de 16 a 21°C) y manteniéndose independiente de la temperatura cuando el incremento fué de 3°C en temperaturas inferiores (Tabla VI).

Esta aclimatación de la tasa de ventilación en 80 % A.M. pudo ser la responsable de que el metabolismo activo en estas condiciones no variara al aumentar la temperatura.

En condiciones normales de salinidad el valor de  $Q_{10}$  para el rango entre 16 y 21°C ( $Q_{10}=1.93$ ), también reflejó dependencia de la tasa de ventilación en relación a la temperatura bajo estas condiciones. Pero para el incremento de 13 a 16°C el  $Q_{10}$  no pudo calcularse porque en este caso la tasa de ventilación no aumentó sino al contrario disminuyó, siendo el valor para 13°C mayor en comparación con los valores para 16 y 21°C (Tabla VI).

Este comportamiento no coincide con los resultados obtenidos para el incremento en la temperatura en las demás condiciones de salinidad probadas y tampoco concuerda con la relación encontrada entre la tasa de ventilación y la temperatura por otros autores. Es posible que esto se deba a algún error de tipo experimental, además es importante considerar que los resultados obtenidos del transporte de agua no pueden ser muy precisos pues la fórmula a partir de la cual fueron calculados está basada en dos asunciones incorrectas: 1o., que todas las partículas suspendidas son removidas del agua al pasar por las branquias y 2o. que la dispersión de las partículas en suspensión no cambia durante la prueba (Galtsoff, 1964). Aunque la última asunción fué reafirmada en este trabajo al hacer la corrección de la precipitación de las células de T. suecica por medio de los resultados de precipitación en las cámaras testigo.

La dependencia del metabolismo activo de T. stultorum en relación a la temperatura no se explica solo en función del efecto de la temperatura sobre la actividad sino también por la relación que existe entre la actividad y el consumo de oxígeno como se observa en la Fig. 8

Así, a 80 % A.M. la independencia de la tasa metabólica activa en relación a la temperatura [Fig. 7(B)],

debida a la aclimatación de la tasa de ventilación (Tabla VI), está también relacionada con el menor incremento del consumo de oxígeno al aumentar la tasa de ventilación en éstas condiciones (Fig. 8), comparado con el efecto que tuvo ésta actividad sobre el consumo de oxígeno a 110 % A.M., donde la tasa de ventilación aumentó al aumentar la temperatura (Fig. 8).

Job (1969) sugiere que el costo metabólico de la osmorregulación no puede ser establecido apropiadamente si el animal en estudio está en un estado de actividad incontrolada y que solo puede medirse a partir de la tasa metabólica estándar, esto explica el por qué en T. stultorum no se apreció el efecto de la salinidad sobre el consumo de oxígeno activo [Fig. 7(A)], siendo que los resultados revelan que la salinidad tuvo una influencia importante sobre el consumo de oxígeno en condiciones estándar [Tabla III].

#### 4.3 Campo de actividad

El campo de actividad, es decir la diferencia entre el metabolismo estándar y el activo, ha sido medido principalmente en organismos que se mueven en busca de alimento para conocer la cantidad de energía disponible para llevar a cabo un trabajo externo. Sin embargo recientemente ha sido estimado en especies sésiles ó "casi sésiles" para diferenciar entre el metabolismo en inanición y el metabolismo durante la alimentación, ya que parece ser que más que un simple reflejo de la actividad, esta diferencia proporciona información acerca del requerimiento energético durante y después de la alimentación (Thompson y Bayne, 1972).

En este trabajo se calculó el campo de actividad de la almeja Tivela stultorum. Se observó que a comparación de lo que se ha reportado para otros bivalvos, como M. edulis (Thompson y Bayne, 1972; Widdows, 1973), no hubo un incremento inmediato del consumo de oxígeno como respuesta a la inoculación de alimento en las cámaras experimentales, después de un periodo de inanición, excepto a 21°C y bajo condiciones normales de salinidad, siendo el metabolismo activo mayor que el estándar. A 16°C y 110 % A.M. al contrario el consumo de oxígeno en condiciones actividad fué menor que el metabolismo estándar.

Este último resultado es reflejo de que la tasa metabólica estándar de T. stultorum en condiciones supranormales de salinidad fué sobreestimada, lo cual es demostrado por el hecho de que el consumo de oxígeno estándar fué mayor que el valor mínimo que se obtiene

considerando una tasa de ventilación nula a partir de la relación entre el consumo de oxígeno activo y la tasa de ventilación [Fig. 8]. Esta sobreestimación fue consecuencia del efecto que la temperatura tuvo sobre el metabolismo estándar en estas condiciones de salinidad causando un aumento del metabolismo más allá del nivel estándar [Fig. 5(B)].

El hecho de que el valor mínimo, a pesar de ser negativo, se considere para verificar si el metabolismo estándar fue mayor o menor del metabolismo que se esperaría con una tasa de ventilación cero, no implica que se acepte la existencia de tasas metabólicas negativas. Las intersecciones son producto de una extrapolación a partir de una regresión lineal y por lo tanto pueden estar sujetas tanto a error de tipo experimental, como a los ajustes del procesamiento estadístico. Se considera que esta fue la razón de la intersección negativa encontrada en este estudio en condiciones supranormales de salinidad y lo que se toma en cuenta es principalmente la tendencia general del ajuste, que indica que para una tasa de bombeo mínima el consumo de oxígeno en condiciones hipersalinas tiende a ser muy bajo.

El comportamiento observado a 21 °C y 100 % A.M. se debió a que bajo estas condiciones el costo de la regulación osmótica fue menor. Esta característica se demuestra en el hecho de que la tasa metabólica estándar haya sido inferior a 100 % A.M. en comparación con los valores más altos registrados a 80 y 110 % A.M. [Fig. 5(A)]. Este mayor campo de actividad está asociado con una tasa de ventilación más alta, que se refleja en un aumento del consumo de oxígeno.

En salinidades subnormales la tasa metabólica estándar no fue sobrestimada ya que los valores reales fueron menores que el mínimo consumo de 0.74 calculado para una tasa de ventilación igual a cero [Fig. 8] y sin embargo tampoco hubo diferencia significativa entre el metabolismo activo y el estándar. El metabolismo activo en estas condiciones no fue mayor que el estándar, debido a que el costo energético de la osmorregulación fue mayor como lo demuestra la tasa metabólica estándar mayor a 80 % A.M., comparada con el consumo de oxígeno en condiciones normales de salinidad [Fig. 5(A)].

#### 4.4 Excreción de amoníaco

Gran parte de la discusión de los resultados de la tasa de excreción amoniacal de las almejas, ha sido considerada al hablar del comportamiento de la tasa respiratoria de

estos organismos, dada la importancia de relacionar ambos parámetros fisiológicos para explicar las respuestas observadas.

Resta por discutir el efecto de la temperatura sobre la excreción de amoniaco y al respecto es importante mencionar que el incremento en la tasa de excreción amoniacal observada en T. stultorum bajo condiciones normales de salinidad, como consecuencia del aumento en la temperatura de 13 a 21°C (Fig. 10 B), coincide con los resultados obtenidos por Mann (1979) para la almeja de Manila (Tapes philippinarum). En esta especie la tasa de excreción amoniacal fue mayor a 16 y 18°C que a 12 y 14°C. El mismo autor sugiere que esta dependencia de la tasa de excreción de amoniaco con la temperatura, esta asociada con cambios en el substrato respiratorio predominante en relación con la producción de las gónadas.

Una relación similar entre el incremento en la excreción de amoniaco y cambios en el substrato respiratorio de carbohidratos a proteínas y la gametogénesis ha sido descrita para poblaciones de Mutilus edulis (Bayne, 1973a) y poblaciones del laboratorio de Crassostrea gigas y Ostrea edulis (Mann, 1979).

En Tivela stultorum parece no cumplirse esta relación. La respuesta creciente de la tasa de excreción amoniacal al aumentar la temperatura en condiciones normales de salinidad esta relacionada con los experimentos que se llevaron a cabo durante la época de desove (julio y agosto) y no durante la gametogénesis. De acuerdo a las observaciones hechas a lo largo de este trabajo y los resultados de las investigaciones previas sobre ciclo reproductor de esta especie (Searcy, 1979 b), este periodo se inicia a partir de marzo una vez concluida la época de reabsorción de gametos, caracterizada por la disminución en el porcentaje de almejas sexables.

Comparando los resultados de este trabajo con los de otros autores en lo referente al efecto que la temperatura tiene sobre la excreción de amoniaco, se observa que Mercenaria mercenaria y Crassostrea virginica (Srna y Baggaley, 1976) la tasa de excreción amoniacal tiende a disminuir al aumentar y disminuir bruscamente la temperatura de 16 a 10°C y de 16 a 20°C. En Tivela stultorum se presentó este mismo comportamiento pero a 80 % A.M. y habiendo aclimatado a los organismos en las diferentes temperaturas una vez alcanzadas [Fig. 10(B)].

Convirtiendo los promedios de excreción de T. stultorum de mg NH<sub>3</sub>/h/p.s. a µg N-NH<sub>3</sub>/h/p.s. habiendo hecho la corrección a volumen estándar y transformando los datos de

las especies mencionadas anteriormente de  $\mu\text{M NH}_3/24\text{h/p. s.}$  a  $\mu\text{g N-NH}_3/\text{h/p. s.}$  se observa que los valores para M. mercenaria y T. stultorum para 10 y 20°C, 13 y 21°C respectivamente fueron similares, siendo del orden de 8.75 y 12.25  $\mu\text{g N-NH}_3/\text{h/p. s.}$  para la primera y de 8.4 y 10.0  $\mu\text{g N-NH}_3/\text{h/p. s.}$  para T. stultorum. Solo a 16°C el valor reportado en este trabajo de 104.1 fué mayor en comparación a 44.33  $\mu\text{g N-NH}_3/\text{h/p. s.}$  en M. mercenaria.

#### 4.5 Razón O:N

La razón O:N ha sido poco estudiada en bivalvos y en la mayoría de los trabajos, se ha utilizado como índice del "stress" provocado por la alimentación ó por exposición a temperaturas crecientes. Esta razón ha sido medida en el mejillón Mytilus edulis a lo largo del año y los resultados demuestran que efectivamente cambios en este índice están relacionados con cambios bioquímicos en los tejidos, así durante la mayor parte del año la razón O:N permanece constante con valores promedios de un rango de 70 a 110, pero aumenta en el verano hasta alcanzar valores mayores de 300, debido a que en esta época los carbohidratos y lípidos contribuyen principalmente en el metabolismo energético (Bayne, 1973a).

En este trabajo se midió el efecto combinado de la salinidad y la temperatura sobre la razón O:N de Tivela stultorum. Los valores de éste índice para casi todas las condiciones fueron extremadamente bajos con un rango de 0.845 a 7.0. Solo a salinidad alta 13 y 21°C los valores fueron mayores siendo 25.8 y 11.32 respectivamente (Tabla X).

Estos resultados son muy bajos comparados con el mínimo teórico 7, calculado considerando el catabolismo de las proteínas exclusivamente. Sin embargo Mayzaud (1973) trabajando con diferentes especies de zooplankton reporta también valores de este índice menores de 2 y considera que debido a que el valor mínimo de 7 es calculado a partir de los requerimientos energéticos de los mamíferos, no necesariamente es extrapolable para todas las especies y adjudica los valores bajos, a la alta tasa de excreción amoniacal comparada con la respiración, como consecuencia de la inanición de los animales bajo experimentación.

Efectos similares por la inanición, han sido reportados en Mytilus edulis por Bayne (1973a), para Donax vittatus por Ansell y Sivadas (1973) citado por Bayne *et al.* (1976). Ultimamente, Widdows (1978 b) encontró que la inanición o simplemente una alimentación escasa resultan en valores de

la razón O:N bajos de aproximadamente 20 en comparación a los valores de 40 ó 50 característicos de animales que han sido mantenidos con concentraciones altas de alimento.

De todo lo anteriormente expuesto, se deduce que es probable que los valores tan bajos de la razón O:N encontrados para T. stultorum, sean consecuencia de la falta de alimento, ya que para llevar a cabo los experimentos los animales permanecían sin alimentación por lo menos 48 horas antes de la toma de muestras, con el objeto de evitar que las heces interfirieran en los valores de excreción de amoniaco y para poder medir el consumo de oxígeno en condiciones estándar.

Además las almejas previo a su utilización en los experimentos fueron aclimatadas durante aproximadamente 15 días a las condiciones del laboratorio, durante los cuales el suplemento de alimento no siempre fué adecuado, es posible entonces que los animales hayan agotado sus fuentes de reserva, lo que los obligó a degradar sus proteínas constitutivas en una proporción mayor.

Mayzaud (1973) sugiere que cuando esto sucede, los organismos durante el periodo de inanición en la parte experimental, además de que degradan sus proteínas como fuente de energía son incapaces de mantener su metabolismo en un nivel basal, lo que los obliga a degradar sus proteínas constitutivas en una proporción mayor para asegurar un nivel viable del metabolismo oxidativo. Esta degradación puede aumentar conforme el contenido del substrato metabólico disminuye lo que conlleva a un catabolismo de las proteínas elevado independientemente de que la tasa respiratoria permanezca más o menos constante, esto puede explicar los valores tan bajos en la razón O:N

Cabe la posibilidad de que los valores tan bajos para la razón O:N de Tivela stultorum se deban a la sobreestimación de los valores de excreción de amoniaco o al contrario a la subestimación del consumo de oxígeno. Sin embargo la primera posibilidad puede rechazarse, considerando los resultados del experimento de prueba en el que se midió la concentración de amoniaco en las cámaras testigo y en las experimentales (Tabla IX), habiendo extraído las almejas, en el cual se demostró que lejos de haber una sobreestimación de los valores de excreción, estos fueron subestimados debido a que las bacterias que traen consigo las almejas y que liberan en el agua de las cámaras experimentales ocasionaron un descenso en la concentración de amoniaco mayor en relación al decremento registrado en las cámaras testigo.

Sin embargo lo que se pretendía en este trabajo, era

observar si las diferentes condiciones de salinidad y temperatura a las que fueron sometidas las almejas provocaban variaciones en la razón O:N. Esto se hizo con el objeto de conocer que combinación de estos dos factores es la óptima para las almejas, tomando en cuenta que valores bajos de este índice indican una mayor utilización de las proteínas como fuente de energía, comparada con el catabolismo de los carbohidratos y lípidos. Esta situación es característica de un fuerte desequilibrio fisiológico. Y efectivamente se observó que hubo diferencias entre los valores de este índice para las diferentes condiciones experimentales, siendo la salinidad el factor que influyó principalmente (Tabla XI), de tal manera que la razón O:N tuvo una respuesta creciente al aumentar la salinidad de 100 a 110 % A.M. en todo el rango de temperaturas probado [Figs. 11y12(A)]. Al someter a los organismos al medio más diluido, la razón O:N se mantuvo igual que bajo condiciones normales de salinidad, excepto a 21 °C donde este cociente aumentó al disminuir la salinidad de 100 a 80 % A.M.

El incremento registrado en condiciones hipersalinas, fué reflejo del efecto que la temperatura tuvo sobre las variaciones provocadas por la salinidad. De tal manera que aunque el comportamiento esperado era que el consumo de oxígeno disminuyera como respuesta al aumento en la salinidad, la temperatura interactuó incrementando el metabolismo. Este efecto fué mayor conforme más alta era la temperatura. La excreción de amoniaco en cambio disminuyó al aumentar la salinidad en relación a los valores registrados a 100 % A.M., siendo este descenso mayor a 21 que a 16 y 13 °C [Fig. 10(A)]. Esto ocasionó valores del cociente O:N altos.

Esto pareciera indicar que la combinación de las tres temperaturas probadas y salinidad elevada son las condiciones óptimas para los adultos de Tivela stultorum, lo cual es contrario a la conclusión a la que se llega a partir del análisis de los datos de la tasa metabólica en cuanto que salinidades supranormales hacen más sensibles a las almejas a incrementos en la temperatura, ocasionando aumento en la tasa respiratoria, que puede ser perjudicial ya que obliga a los organismos a gastar energía que podría ser utilizada en funciones como el crecimiento y la reproducción.

Lo que sucede es que al comparar el efecto de varias salinidades, las diferencias observadas en la tasa de excreción amoniacal, que a su vez modifican los valores de la razón O:N, no pueden considerarse como reflejo de una mayor o menor utilización de las proteínas como fuente de energía en relación al catabolismo de los carbohidratos y/o lípidos. Más bien son el producto de los procesos de

regulación isosmótica que en el caso del "stress" hipersalino ocasionan una disminución en la tasa de excreción amoniacal, como reflejo de la menor degradación de los aminoácidos libres que participan en los procesos de regulación osmótica para mantener la concentración intracelular isosmótica con respecto al medio externo más concentrado. Por lo tanto la razón O:N no pudo utilizarse como índice del "stress" provocado por el efecto de la salinidad.

Sin embargo este cociente si es aplicable para medir el efecto de la temperatura sobre el estado general del metabolismo. En el mejillón Mutilus edulis, se ha observado un incremento de corta duración en la razón O:N al aumentar la temperatura 7°C, lo que refleja un periodo de utilización de los carbohidratos durante los primeros estadios de la aclimatación a la temperatura (Bayne et al. 1976).

En Tivela stultorum, se observó que en condiciones normales de salinidad la razón O:N varió al cambiar la temperatura aumentando en un 46 % al disminuir la temperatura de 21 a 13°C [Fig. 12(B)]. La misma tendencia se observó en condiciones supranormales de salinidad, principalmente en el rango comprendido entre 13 y 16 C.

En el primer caso, es decir bajo salinidades normales, el aumento en la razón O:N fué ocasionado por una disminución significativa de la tasa de excreción amoniacal al disminuir la temperatura de 21 a 13°C [Fig. 10(B)], mientras que el metabolismo estándar se mantuvo casi constante. [Fig. 5(B)]. Este es un mecanismo para compensar cambios en la temperatura e indica un catabolismo bajo de las proteínas como consecuencia de la menor demanda energética.

En el segundo caso los valores altos de la razón O:N coinciden con el aumento en la tasa respiratoria de las almejas al incrementarse la temperatura, mientras que la excreción de amoniaco se mantuvo prácticamente constante al cambiar la temperatura pero con valores promedios muy bajos en comparación a los reportados en las demás condiciones.

Esto significa que para Tivela stultorum, temperaturas inferiores, similares a las que prevalecen en su medio ambiente natural son menos "estresantes" que temperaturas altas.

## 5 Conclusiones

1.- La almeja Pismo Tivela stultorum en condiciones normales de salinidad compensa variaciones en la temperatura manteniendo su metabolismo estándar independiente de incrementos de esta variable. Salinidades sub y supranormales impiden a las almejas compensar cambios de la temperatura. Esta termodependencia las hace más sensibles a incrementos de ésta, ocasionando aumento en la tasa respiratoria que puede ser perjudicial, ya que esto ocasiona gasto de energía que podría ser utilizada en otras actividades fisiológicas importantes como el crecimiento y la reproducción.

2.- La respuesta diferente de los dos tipos de metabolismo en relación a la temperatura se debe al hecho de que la actividad (tasa de ventilación) si se ve afectada por la temperatura. El grado de actividad a su vez modifica el metabolismo de una manera directamente proporcional.

3.- Temperaturas supranormales incrementaron la dependencia de la tasa metabólica de T. stultorum a cambios en la salinidad opacando el efecto de los procesos osmoregulatorios sobre el metabolismo, que si fué observado en el comportamiento de la tasa de excreción amoniacal.

4.- En condiciones normales de salinidad la tasa de excreción de amoniaco de las almejas aumentó al aumentar la temperatura de 13 a 21 °C. Este incremento no parece estar asociado con el efecto de la temperatura sobre el ciclo gametogénico.

5.- La razón O:N no pudo utilizarse para las almejas como índice del "stress" provocado por variaciones en la salinidad. Las modificaciones en la tasa de excreción amoniacal como respuesta a los cambios de salinidad, que finalmente repercuten en los valores de la razón O:N, no pueden ser considerados como reflejo de una mayor o menor utilización de las proteínas como sustrato energético, si no que reflejan la participación de los aminoácidos libres en la regulación isosmótica.

6.- La razón O:N se utilizó como índice del "stress" producido por cambios en la temperatura en cada una de las salinidades probadas. En condiciones normales de salinidad, temperaturas inferiores, similares a las que prevalecen en el medio ambiente natural de las almejas (13 °C) son menos "estresantes" que temperaturas elevadas.

## 6 Recomendaciones

Dado que cuando las almejas, son sometidas a un incremento en la salinidad del agua 10 % por arriba de lo normal (35 ppm), pierden la capacidad de mantener su metabolismo estándar independiente de variaciones en la temperatura y dado que un aumento en la salinidad de esa magnitud es muy común que suceda en el laboratorio, como consecuencia de la evaporación. Es conveniente que las almejas adultas, se mantengan en el laboratorio en agua a temperatura constante y similar a la que prevalece en su medio ambiente natural (13°C), ya que a esta temperatura los animales presentaron una menor demanda energética.

Se sugiere, para el mantenimiento de adultos de almeja Pismo en el laboratorio el empleo de estanques circulares de fibra de vidrio de 1 tonelada, adaptados con filtro biológico. Es conveniente adaptar estos estanques con un sistema termorregulador para mantener la temperatura del agua similar a la del medio ambiente natural.

En lo que respecta al diseño experimental, la ausencia de un flujo continuo de agua en los acuarios experimentales (C1 y C2 de la Fig.1), limitó la duración de los experimentos, debido a la concentración de metabolitos, así como a la disminución en la concentración de oxígeno una vez cerrado el sistema por debajo del mínimo requerimiento para los organismos. Sin embargo este diseño permitió las mediciones de todas las variables fisiológicas en forma simultánea, para cada organismo por separado y con 15 réplicas incluyendo los testigos. Además permitió que la temperatura se mantuviera constante e igual en todas las cámaras experimentales.

Dada la importancia del sustrato en estos organismos se sugiere, para trabajos posteriores, el empleo de algún sustrato inerte durante el desarrollo experimental.

El efecto de las bacterias en los resultados de consumo de oxígeno y excreción de metabolitos se tomó en consideración al hacer las correcciones a partir del comportamiento observado en las cámaras testigo. Sin embargo en el caso de las mediciones de la excreción de amoníaco se recomienda seguir midiendo las variaciones en la concentración de amoníaco en las cámaras una vez finalizado los experimentos y habiendo extraído los organismos. De esta manera se incluye el efecto de las bacterias que traen consigo las almejas y que no son consideradas en las cámaras testigo sin almejas. El empleo de antibióticos puede ser otra alternativa para solucionar el problema de la proliferación de bacterias en las cámaras experimentales.

La medición de la tasa de ventilación por el método indirecto de remoción de células, resultó ser relativamente sencillo. El empleo de cámaras testigo inoculadas con alimento, pero sin almejas, sirvió para corregir la precipitación mecánica de las células. Este inconveniente fué eliminado al mantener la aireación durante la toma de muestras para los conteos de células, pero esta medida favoreció la reproducción de las células de I. suecica. Por lo tanto se recomienda, para trabajos posteriores, el empleo de algún material inerte.

Por otro lado, el empleo de electrodos específicos para cada variable medida y del microanalizador de iones resultó ser muy práctico para los análisis de las muestras. Sobre todo en el caso de las mediciones de oxígeno, ya que el electrodo es fácil de calibrar y usar, no necesita reactivos, incluye corrección por salinidad y da lecturas estables en poco tiempo.

El requisito del método de calibración estándar para los análisis, en el sentido de que las muestras y los reactivos deben de estar a la misma temperatura fué muy problemático e implicó incluir en el diseño experimental un baño termoregulado (k de la Fig.2). Se recomienda para trabajos posteriores el empleo del método "known adition" que no exige el requisito mencionado (Orion Research, 1978).

## A P E N D I C E

## 7 Apéndice

### 7.1 Prueba de Bartlett

La homogeneidad de las varianzas es una condición importante para el análisis de varianzas. La prueba de Bartlett es frecuentemente utilizada cuando se comparan las varianzas de mas de dos grupos. La formula para probar la igualdad de varianzas es:

$$X^2 = 2.3026 \left\{ \left[ \sum (n_i - 1) \right] \log s^2 - \sum (n_i - 1) \log s_i^2 \right\}$$

donde:

2.3026 = constante para transformar los logaritmos comunes a naturales

a = numero de grupos (tratamientos)

n - 1 = grados de libertad de cada grupo

$\log s$  = logaritmo del promedio pesado de las varianzas

$\log s_i$  = logaritmo de la varianza de cada grupo

$$\text{si } X_{\alpha}^2_{[a-1]} < X^2$$

donde:

$\alpha$  = nivel de confianza

a-1 = numero de grupos comparados - 1

se rechaza la  $H_0$  = las varianzas son homogeneas

### 7.2 Análisis de varianza (ANVA)

A los resultados de cada variable fisiológica medida bajo las diferentes combinaciones de salinidad y temperatura se les aplicó el ANVA con el objeto de confirmar si la variabilidad en los resultados era debido al efecto de los diferentes tratamientos o debida al error, esto es a las variaciones entre las almejas en cada tratamiento provocadas por factores intrínsecos de los organismos ó por el error experimental.

Debido a que el numero de observaciones por tratamiento era diferente y desproporcional y debido a que se midió el efecto de dos factores (salinidad y temperatura), se utilizó el metodo de promedios cuadrados pesados (Steel y Torrie, 1960).

Esta es una prueba estadística paramétrica para el análisis de datos obtenidos a partir de la combinación de dos factores cuando existe interacción. Prueba los efectos principales y no da información acerca de la interacción a menos que uno de los dos factores contenga solo dos niveles. Este método requiere que cada una de las combinaciones posibles a partir de los dos factores contenga por lo menos una observación.

Para calcular los efectos principales los datos se ordenan de la siguiente manera:

T°C \ S%AM	S 1	S 2	S 3
T 1	$\bar{X}_{11}$	$\bar{X}_{12}$	$\bar{X}_{13}$
T 2	$\bar{X}_{21}$	$\bar{X}_{22}$	$\bar{X}_{23}$
T 3	$\bar{X}_{31}$	$\bar{X}_{32}$	$\bar{X}_{33}$

El cuadrado medio (CM) se obtiene dividiendo la suma de cuadrados (SC) entre los grados de libertad y la suma de cuadrados se calcula a partir de las siguientes ecuaciones:

Fuente de variación	g. l.	SC	CM
Temperatura	$r-1$	$c\left\{\sum w_i (\sum \bar{x}_{ij}/c)^2 - [\sum w_i (\sum \bar{x}_{ij}/c)]^2\right\} / \sum w_i$	$SC/r-1$
Salinidad	$c-1$	$r\left\{\sum v_j (\sum \bar{x}_{ij}/r)^2 - [\sum v_j (\sum \bar{x}_{ij}/r)]^2\right\} / \sum v_j$	$SC/c-1$
Error			

donde :

$r$  = numero de renglones (temperaturas probadas)  
 $c$  = numero de columnas (salinidades probadas)  
 $w_i = 1/\sum_j (1/n_{ij})$ ;  $(1/n_{ij})$  = recíproco del numero de observaciones  
 $v_j = 1/(\sum_i 1/n_{ij})$   
 $\sum \bar{x}_{ij}$  = suma de los promedios de los renglones (temperatura)  
 $\sum \bar{x}_{ij}$  = suma de los promedios de las columnas (salinidad)

El error, esto es la varianza dentro de cada tratamiento se calcula reordenando los datos de la siguiente manera:

T1S1	T2S2	T3S3	T1S2	T2S1	T3S1	T1S3	T2S3	T3S2
------	------	------	------	------	------	------	------	------

y resolviendo el ANVA por el método descrito para un solo factor con diferente número de observaciones por tratamiento (Sokal y Rohlf, 1969). Las fórmulas para la prueba son:

Fuente de variación	g. l.	SC	CM
entre grupos	$a-1$	$\sum (\sum x)^2 / n_i - (\sum \sum x)^2 / \sum n_i$	$SC/a-1$
error	$\sum n_i - a$	total - entre grupos	$SC / \sum n_i - a$
Total	$\sum n_i - 1$	$\sum \sum x^2 - (\sum \sum x)^2 / \sum n_i$	

donde :

$a$  = número de tratamientos

$n$  = número de observaciones en cada tratamiento

La prueba de significancia utilizada fue la prueba  $F$  y

$F_s = \text{CM entre tratamientos} / \text{CM del error}$

$F_s$  es comparada con los valores para  $F_{\alpha} [a-1, n-a]$   
donde :

$\alpha$  = nivel de confianza

$a-1$  = número de tratamientos

$n-a$  = número total de observaciones -  $a$

Si  $F_{\alpha} [a-1, n-a] > F_s$

se rechaza  $H_0$  = no hay diferencia significativa entre tratamientos

### 7.3 Comparación múltiple de promedios.

La comparación múltiple de los promedios se lleva a cabo por medio de la prueba Student-Newman-Keuls (SNK). Esta es una prueba "a posteriori" utilizada una vez que el ANVA ha demostrado que las diferencias entre los resultados son significativas, esto es que el efecto de los tratamientos es mayor que el error. Difiere del ANVA en que se comparan promedios y no varianzas. Se utilizó para reafirmar los resultados del ANVA, señalando la significancia de las diferencias observadas entre cada nivel de los dos factores probados.

El procedimiento, consiste en calcular las diferencias entre los promedios que se quieren comparar. Para que estas

diferencias sean significativas deben ser iguales o mayores que:

$$LSR = Q_{\alpha[k,r]} \sqrt{CM \text{ del error} \cdot \sqrt{n_1 + n_2 / 2(n_1)(n_2)}}$$

donde:

$$CM \text{ del error} = \frac{\sum (n_i - 1) s_i^2}{\sum (n_i - 1)}$$

n = numero de observaciones a partir de las cuales se obtuvo el promedio

a = numero de promedios a comparar el promedio

S = varianza

$Q_{\alpha[k,r]}$  = es el valor crítico del rango "studentizado" para los k promedios que dentro de toda la serie de promedios existentes ser'an comparados y cuando la suma de los grados de libertad de todos los promedios es (r)

#### 7.4 Superficies de respuesta

El objetivo de este trabajo fué cuantificar la relación entre las respuestas del organismo y las condiciones experimentales. Esta relación funcional es desconocida y la alternativa es describirla en forma empírica (Alderdice, 1972). Normalmente la forma más sencilla de esta relación es expresada a partir de la regresión lineal de la respuesta de la variable medida (Y) a diferentes valores del parámetro experimental (X), siendo:

$$Y = b_0 + b_1 X$$

Donde:  $b_0$ , es la intersección con la ordenada y  $b_1$  es la pendiente de la relación lineal entre Y y X.

Cuando se utiliza un polinomio de segundo orden se añade en la ecuación anterior el término  $b_2 X^2$ , para dar la curvatura más simple que origina una forma de segundo orden.

Cuando la respuesta de un organismo se considera en función de dos variables ( $X_1, X_2$ ), entonces la relación lineal genera un plano en  $X_1, X_2$ . La expresión es:

$$Y = b_0 X + b_1 X_1 + b_2 X_2$$

Muy a menudo los datos biológicos medidos en función de dos variables ambientales, describen un superficie curva. la curvatura simple puede ser descrita por una ecuación de segundo orden de la forma:

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_1^2 + a_4 X_2^2 + a_5 X_1 X_2$$

Y = variable dependiente

$X_1, X_2$  = variables independientes

a = coeficientes de regresión (para  $i=0, 1, \dots, 5$ )

A partir de esta ecuación se puede interpolar los valores dentro del rango experimental de las variables consideradas.

En nuestro caso en particular, los promedios de las variables fisiológicas ( $QO_2, QNH_3$ ) fueron ajustados por minimos cuadrados a polinomios de segundo grado de la forma:

$$Y = a_0 + a_1 T + a_2 S + a_3 T^2 + a_4 S^2 + a_5 TS$$

donde:

Y = variable fisiológica ( $QO_2, QNH_3$ )

T = Temperatura ( $^{\circ}C$ )

S = Salinidad (% A.M.)

a = coeficientes de regresión (para  $i= 0, 1, \dots, 5$ )

A partir de esta ecuación se obtuvieron los valores esperados Y de las variables dependientes. Se generaron superficies de respuesta de segundo grado que muestran el efecto combinado de los dos factores sobre las respuestas fisiológicas.

El porcentaje de la bondad de ajuste de la superficie de respuesta es:

$$100 \% \cdot R^2 = SSr/SSt$$

donde:

R = bondad del ajuste

SSr = varianza de la suma de cuadrados de los valores esperados Y debido a la regresión

SSt = de la suma de cuadrados de las variables dependientes debida al efecto de los tratamientos.

El coeficiente de correlación multiple ( R ) se calculó a partir de la raíz cuadrada del porcentaje de la bondad del ajuste ( R ).

$$R = \sqrt{R^2}$$

## 8 Agradecimientos

Deseo agradecer a la M. en C. Sonia Espina, por la ayuda que me brindó en el planteamiento de este trabajo de tesis y por su colaboración durante el desenvolvimiento del mismo.

Al Dr. Fernando Bückle por su valiosa participación en el diseño e implementación del modelo experimental y por su continuo interés en el logro del mismo.

Al Oc. Julio Candela por su ayuda en la formulación de los programas de computación que facilitaron el procesamiento de la información obtenida y por sus valiosas críticas a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al P.O. Carlos Chain por su incondicional apoyo durante la fase experimental.

Al Oc. Victor Gendrop por su apoyo y valiosas críticas sobre el escrito final.

Al P.O. Marco Antonio Cadena y las personas que con él colaboraron en la implementación del laboratorio de Zooplankton (C. I. C. E. S. E.) por su ayuda en la obtención de alimento para propósitos de alimentación de los organismos. De la misma manera al P.O. Carlos Granados por su participación en el suministro de microalgas para el mismo propósito en el laboratorio de la U. C. M.

A los dibujantes Sergio Ramos, Manuel Noriega y Ramón Castillo por su ayuda en la realización de las gráficas de este trabajo.

a Marcos Merino por su colaboración en materia audiovisual.

A la Secretaria de Educación Pública que a través del proyecto Bivalvos de Baja California, sección Almeja Pismo, brindó el apoyo económico que hizo posible la realización de este trabajo.

## 9 Referencias bibliográficas

- Alderdice, D.F. (1972). Factor combinations. In Marine Ecology, (Kinne, O., ed.), Wiley-Interscience, N.Y. I(3): 1659-1722
- Bartberger, C.A. y Pierce, S.K. (1976). Relationship between ammonia excretion rates and hemolymph nitrogenous compounds of a euryhaline bivalve during low salinity acclimatation. Biol. Bull., 150(1): 1-13
- Bayne, B.L. (1973 a). Physiological changes in Mutilus edulis induced by temperature and nutritive stress. J.Mar.Biol.Ass. U.K., 53: 39-58
- Bayne, B.L. (1973 b). Aspects of the metabolism of Mutilus edulis during starvation. Netherlands Journal of Sea Research, 7: 399-410
- Bayne, B.L. (1975). Aspects of physiological conditions in Mutilus edulis (L.) with special reference to the effects of oxygen tension and salinity. Proc., 9th.Europ.Mar.Biol.Symp.: 213-238
- Bayne, B.L.; Widdows, J. y Thompson, R.J. (1976). Physiological integrations. In Marine Mussels: their ecology and physiology. (B.L.Bayne, ed.), Cambridge University Press: 261-291
- Bayne, B. L. y Widdows, J. (1978). The physiological ecology of two populations of Mutilus edulis. Oecologia (Berl.), 37: 137-162
- Coe, W.R. (1947). Nutrition, growth and sexuality of the Pismo clam Tivela stultorum. J.Exp.Zool., 104 (1):1-24
- Dorgelo, J. (1973). Comparative Ecophysiology of gammarids (Crustacea: Amphipoda) from marine, brackish and fresh-water habitats exposed to the influence of salinity-temperature combinations. III Oxygen uptake. Netherland Journal of Sea Research, 7: 253-266
- Emerson, D.N. (1969). Influence of salinity on ammonia excretion rates and tissue constituents of euryhaline invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 29: 1115-1133
- Fitch, J.E. (1950). The Pismo clam. Cal. Fish and Game 36(3): 285-312

- Gabbot, P.A. y Bayne, B.L. (1973). Biochemical effects of temperature and nutritive stress on Mytilus edulis (L.) J. Mar. Biol. Ass. U.K., 53: 269-286
- Galtsoff, G.S. (1964). The american oyster Crassostrea virginica (G.). Fishery Bull. of Fish and Wildlife Service: 200-214
- Gilles, R. (1972). Biochemical Ecology of Mollusca. In Chemical Zoology, ( Florkin M. and Scheer B.T., ed.) Academic Press, N. Y., VII: 467-499
- Gilles, R. (1973). Oxygen consumption as related to the amino-acid metabolism during osmoregulation in the blue crab Callinectes sapidus. Netherlands Journal of Sea Research: 280-289
- Gilles, R. (1975). Mechanisms of ion and osmoregulation. In Marine Ecology. (Kinne, O., ed.) Wiley, London. II(1): 259-347
- Guillard, R.R. (1973). Division rates. In Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements. (Stein, J.R., ed.) Cambridge, U.K. (IV): 289-313
- Job, S.V. (1969). The respiratory metabolism of Tilapia mosambica (teleostei) . I The effect of size, temperature and salinity. Marine. Biol., 2: 121-126
- Kinne, O. (1970). Temperature: Animals-Invertebrates. In Marine Ecology (Kinne, O., ed.) Wiley, London I(1): 407-514
- Kinne, O. (1975). Mechanisms of heterotrophy: output of non-utilized energy and matter-excretion. In Marine Ecology, (Kinne, O., ed.) Wiley, London, II(1): 179-201
- Mann, R. (1979). The effect of temperature on growth physiology and gametogenesis in the manila clam Tapes philippinarum. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 38: 121-133
- Mayzaud, P. (1973). Respiration and nitrogen excretion of zooplankton. II Studies of the metabolic characteristics of starved animals. Marine Biology, 21: 19-28

- Mc Farland, W.N. y Pickens, P.E. (1965). The effects of season, temperature and salinity on standar and active oxigen consumption of the grass shrimp Palaemonetes vulgaris (Say.). *Can. J. Zool.* 43: 571-585
- Orion Research Inc., Cambridge, Mass. Analytical Methods Guide Research, (1978)
- Owen, G. (1966). Feeding. In "Physiology of mollusca", (Wilbur and Yonge, ed.) Academic Press. N.Y., II: 1-51
- Prosser, C.L. (1973). Comparative Physiology (Saunders, ed.), Phyladelphia. 3th. ed., 966 pp.
- Searcy, R. (1979 a). La almeja Pismo (Tivela stultorum): Aspectos biológicos y producción en Baja California. En el reporte del proyecto: Bivalvos de Baja California (sección almeja Pismo). Universidad Autónoma de Baja California, Unidad de Ciencias Marinas, Ensenada, B.C.: 4-17
- Searcy, R. (1979 b). Variaciones en la talla comercial promedio y notas sobre el ciclo reproductor de la almeja Pismo (Tivela stultorum) en San Ramón, B.C. En el reporte del proyecto: Bivalvos de Baja California (sección almeja Pismo). Universidad Autónoma de Baja California, Unidad de Ciencias Marinas, Ensenada, B.C.: 29-38
- Schmidt-Nielsen, K. 1976. Fisiología animal. (Ediciones Omega, S.A.), Barcelona. 499 pp.
- Schoffeniels, E. y Gilles, R. (1972). Ionoregulation and Osmoregulation. In "Chemical Zoology" (Florkin, M. and Scheer, B.T., ed.), Academic Press, N.Y., VII (14): 393-420
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1969) effects of body size, food concentration and season on the physiology of Mutilus edulis. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 58: 109-124
- Srna, R.F. y Baggaley, A. (1976). Rate of excretion of ammonia by the hard clam Mercenaria mercenaria and the american oyster Crassostrea virginica. *Marine Biology*, 36: 251-258
- Steel and Torrie. (1960). Principles and Procedures of Statistics. (Mc Graw-Hill, ed.) N.Y., 499 pp.

- Thompson, R.J. y Bayne, B.L. (1972). Active metabolism associated with feeding in the mussel Mytilus edulis (L.). J. Exp. Mar Biol. Ecol., 9: 111-124
- Widdows, J. (1973). The effect of temperature on the metabolism and activity of Mytilus edulis (L.). Netherlands Journal of Sea Research, 7: 387-398
- Widdows, J. (1978 a). Physiological indices of stress in Mytilus edulis. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 58: 125-142
- Widdows, J. (1978 b). Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of Mytilus edulis. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 58: 109-124