

Clearance rate of the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

I. Response to extreme chlorophyll ranges

Tasa de aclaramiento del mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

I. Respuesta a intervalos extremos de clorofila

R Filgueira, MJ Fernández-Reiriz*, U Labarta

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Investigaciones Marinas, C/ Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, Spain. * E-mail: mjreiriz@iim.csic.es

Abstract

Clearance rate (CR) measurements in *Mytilus galloprovincialis* were determined over 16 experiments in which the mussels were exposed to diets characterized by variable chlorophyll content (0.28–104.88 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$) in order to: (1) establish the lower trigger level and the saturation reduction, (2) elucidate whether these thresholds were controlled by an on/off switch or by a progressive response, and (3) determine whether the experimental time exerted an effect on the CR measurement under extreme conditions, quantified in terms of chlorophyll content. The results demonstrated that time exerted a significant effect on CR, which varied throughout the experiment in different diets. The CR response differed fundamentally in the significant reduction of CR after prolonged exposure to low and high chlorophyll-content diets compared with the medium ones. Taking into account the data from the sixth hour onwards, a sharp lower trigger level threshold was established at 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, showing an on/off CR response. The threshold for saturation reduction was about 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ and showed a progressive response to chlorophyll concentration.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*, clearance rate, chlorophyll, seston quantity and quality.

Resumen

Se realizaron 16 experimentos en los que se determinó la tasa de aclaramiento (TA) en *Mytilus galloprovincialis* sometido a dietas con distinto contenido de clorofila (0.28–104.88 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$) con objeto de: (1) establecer su umbral de activación y de saturación, (2) dilucidar si estos umbrales están regidos por una respuesta de tipo encendido/apagado o bien por una respuesta progresiva, y (3) determinar el efecto del tiempo de experimentación en la medida de la TA en condiciones extremas, cuantificadas en términos de contenido en clorofila. Los resultados del presente trabajo pusieron de manifiesto que el tiempo de experimentación ejerce un efecto significativo sobre el comportamiento de la TA, la cual varió a lo largo del experimento con diferentes dietas. La respuesta de la TA difirió fundamentalmente en su reducción significativa tras de una exposición prolongada a dietas con alto o bajo contenido de clorofila en comparación con dietas con contenido medio. Teniendo en cuenta los datos a partir de la sexta hora de experimentación, se observó un abrupto umbral de activación a una concentración de clorofila de 2.08 $\mu\text{g L}^{-1}$, mostrando una respuesta de tipo encendido/apagado. En el caso del umbral de saturación, la concentración de clorofila a partir de la cual se apreció una reducción de la TA se situó en torno a 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, mostrando una reducción progresiva con la concentración de clorofila de la dieta.

Palabras clave: *Mytilus galloprovincialis*, tasa de aclaramiento, clorofila, cantidad y calidad de seston.

Introduction

Current understanding of the bivalve filtration process was preceded by scientific controversy. On the one hand, filtration was considered to be regulated physiologically (Hawkins *et al.* 1996; Bayne 1998, 2001) with the purpose of maximizing energy uptake (Bayne *et al.* 1993). On the other, filtration was determined to be an automated process (Jørgensen *et al.* 1988), whereby under optimal conditions the filtration system is designed to function at maximum capacity (Riisgård 2001a). This argument provoked several studies that reviewed the feeding response of bivalves to environmental changes (Jørgensen

Introducción

El conocimiento actual del proceso de filtración de los bivalvos ha estado precedido por gran controversia científica. Por una parte se consideraba que este proceso era regulado fisiológicamente (Hawkins *et al.* 1996; Bayne 1998, 2001) con el propósito de maximizar la asimilación de energía (Bayne *et al.* 1993). Otros estudios han indicado que la filtración es un proceso automático (Jørgensen *et al.* 1988) en el que, en condiciones óptimas, el sistema de filtración está diseñado para funcionar a su máxima capacidad (Riisgård 2001a). Este argumento dio origen a varios estudios que revisaron la respuesta

1996; Bayne 1998; Riisgård 2001a, b). These studies led to a general agreement that bivalve filter feeding is physiologically regulated (Pascoe *et al.* 2009), according to the indicators of such regulation suggested by Riisgård (2001a, b).

Physiological regulation implies a highly flexible response of bivalve clearance rate (CR) to compensate the quantitative and qualitative changes of the available food in order to maximize energy uptake. Exposure to adverse conditions (e.g., low food quality) could evoke an extreme response in a bivalve, specifically the cessation of filtration activity due to a reduction in the valve gape and retraction of mantle edges (Jørgensen *et al.* 1988). In terms of available food, the range of conditions under which the filtration process is conducted at maximum capacity is limited by a lower and an upper threshold.

The upper threshold that causes a reduction in CR is termed “saturation reduction”, which is interpreted as a secondary effect of the mussels under suboptimal conditions or, more specifically, as an overloading of the filtration and/or digestive system (Riisgård 2001a). The physiological theory supports the notion that the reduction in CR is a consequence of a physiological adjustment to maximize energy uptake (Winter 1978, Bayne *et al.* 1993, Velasco and Navarro 2002). This adjustment to adverse conditions involves other preingestive mechanisms of regulation, like the selection and rejection in ctenidio and labial palps (Bayne *et al.* 1993, Ward and Shumway 2004).

The lower threshold below which the organism does not activate the filtration mechanism is termed the “lower trigger level”. Thompson and Bayne (1972) observed an absence of filtration activity before food addition; thereafter the CR increased rapidly. Other authors have also highlighted the existence of this threshold (Winter 1978, see review by Dolmer 2000). Bernard (1983) studied CR under meagre food conditions and identified a lower trigger level, described as an “on/off switch” rather than a progressive control mechanism. Extended exposure under meagre food concentration may also lead to valve closure and CR reduction (Thompson and Bayne 1972). This could be interpreted as a physiological response to reduce the water transport through the gills and mantle cavity, thereby reducing respiration and the metabolic rate (Jørgensen *et al.* 1988).

In the present survey, the CR of *Mytilus galloprovincialis* was studied under a wide range of diets defined in terms of chlorophyll, particulate organic matter, and total particulate matter, variables that play an important role in mussel performance (Freites *et al.* 2003). The experiments were performed for nine hours in order to: (1) establish the lower trigger level and the saturation reduction, (2) elucidate whether these thresholds are controlled by an on/off switch or by a progressive response, and (3) determine whether the experimental time exerts any effect on the CR measurement under extreme conditions of chlorophyll concentration.

alimenticia de los bivalvos a cambios ambientales (Jørgensen 1996, Bayne 1998, Riisgård 2001a, b), y que condujeron al acuerdo general de que la filtroalimentación en los bivalvos es regulada fisiológicamente (Pascoe *et al.* 2009), según los indicadores de esta regulación sugeridos por Riisgård (2001a, b).

La regulación fisiológica implica una gran flexibilidad en la respuesta de la tasa de aclaramiento (TA) en los bivalvos para compensar los cambios cuantitativos y cualitativos del alimento disponible con el propósito de maximizar la asimilación energética. La exposición a condiciones adversas (e.g. alimento de mala calidad) podría inducir una respuesta extrema en los bivalvos, específicamente el cese de la filtración debido a la reducción de la apertura natural de las valvas y la retracción de los bordes del manto (Jørgensen *et al.* 1988). En términos del alimento disponible, el espectro de condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el proceso de filtración a su máxima capacidad se encuentra limitado por un umbral inferior y uno superior.

El umbral superior que causa la reducción de la TA se denomina “umbral de saturación” y se interpreta como un efecto secundario en mejillones en condiciones subóptimas o, más específicamente, como una sobrecarga de su sistema de filtración y/o digestivo (Riisgård 2001a). La teoría fisiológica sustenta la noción de que la reducción de la TA es consecuencia de un ajuste fisiológico para maximizar la asimilación energética (Winter 1978, Bayne *et al.* 1993, Velasco y Navarro 2002). Este ajuste a condiciones adversas involucra mecanismos de regulación, previos a la ingesta, como la selección y el rechazo de material alimenticio a nivel del ctenidio y palpos labiales (Bayne *et al.* 1993, Ward y Shumway 2004).

El umbral inferior por debajo del cual el organismo no activa su mecanismo de filtración se denomina “umbral de activación”. Thompson y Bayne (1972) observaron ausencia de actividad filtradora antes de la adición del alimento, pero a partir de ésta la TA incrementó rápidamente. Otros autores también han notado la existencia de este umbral (Winter 1978, ver la revisión de Dolmer 2000). Bernard (1983) estudió la TA en condiciones alimenticias pobres e identificó un “umbral de activación” que describió como de tipo “encendido/apagado” más que un mecanismo de control progresivo. La exposición prolongada a condiciones alimenticias pobres puede también ocasionar el cierre de las valvas y la reducción de la TA (Thompson y Bayne 1972). Esto podría interpretarse como una respuesta fisiológica para reducir el transporte de agua a través de las branquias y la cavidad paleal, reduciendo así la respiración y la tasa metabólica (Jørgensen *et al.* 1988).

En este trabajo se estudió la TA de *Mytilus galloprovincialis* bajo un amplio espectro de dietas definidas en términos de clorofila, materia orgánica particulada y material particulado total, que son elementos que juegan un papel importante en el desarrollo de los mejillones (Freites *et al.* 2003). Los experimentos se realizaron durante nueve horas para: (1) establecer los umbrales de activación y saturación, (2) dilucidar si estos umbrales son controlados por un mecanismo de tipo encendido/apagado o por una respuesta progresiva, y (3) determinar

Material and methods

Acclimation of experimental mussels

Mytilus galloprovincialis (Lamarck 1819) were collected from a cultivation raft in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). Individuals 60 mm in length were selected (60 ± 2.1 mm length and 1.3 ± 0.39 g dry meat weight) and epibionts were removed (fig. 1). The mussels were maintained for seven days prior to the beginning of the experiment in 19-L tanks with 20 to 25 individuals per tank. The tanks were of open-flow design, containing filtered (10 μ m) seawater (Cartridge CUNO Super Micro-Wynd 10 μ m) at 15–16°C and a salinity of 35.5. The filtered seawater was enriched with a mixture of microalgae (Tahitian *Isochrysis* aff. *galbana*, T-ISO) and pulverized sediment (lyophilized, ground, and sieved to guarantee a size between 3 and 30 μ m) from the seafloor below the rafts (40:60 microalgae:sediment, by weight). Flow was regulated at a constant level by a peristaltic pump, so that particulate matter load was maintained at 1.2 mg L⁻¹ with 50% organic content, which simulates the average diet of mussels in the Ría de Arousa.

Experimental diets

The experimental diets were prepared by mixing microalgae and pulverized sediment in variable proportions (table 1). The seawater in the food holding tank was filtered by a cartridge filtration system (CUNO Super Micro-Wynd 10, 5, and 1 μ m; CUNO Betapure 0.5 μ m) with an effective pore size of 0.5 μ m, followed by UV treatment. The diet tank was strongly aerated in order to maintain homogeneity and avoid particle sedimentation.



Figure 1. Selection and cleaning of mussels *Mytilus galloprovincialis* collected from a cultura raft in Ría de Arousa (Galicia, NW Spain).
 Figura 1. Selección y limpieza de mejillones *Mytilus galloprovincialis* recolectados de una batea de cultivo en la Ría de Arousa (Galicia, NO de España).

si el tiempo de experimentación ejerce algún efecto en la medida de TA bajo condiciones extremas de concentración de clorofila.

Material y métodos

Aclimatación de los mejillones experimentales

Se utilizaron *M. galloprovincialis* (Lamarck 1819) recolectados de una batea de cultivo en la Ría de Arousa (Galicia, NO de España), seleccionando individuos de 60 mm de longitud (60 ± 2.1 mm de largo y 1.3 ± 0.39 g de peso seco de la carne) a los que se retiraron los epibiontes (fig. 1). Los mejillones se mantuvieron durante 7 días antes del experimento en tanques de 19 L con 20 a 25 individuos por tanque. Los tanques eran de flujo abierto y contenían agua de mar filtrada (cartucho CUNO Super Micro-Wynd de 10 μ m) a 15–16°C y 35.5 de salinidad. El agua de mar fue enriquecida con una mezcla de microalgas (*Isochrysis* aff. *galbana* de Tahití, T-ISO) y sedimento pulverizado (liofilizado, molido y tamizado para garantizar un tamaño de 3–30 μ m) del lecho marino bajo las bateas (40:60 microalgas:sedimento en peso). El flujo se mantuvo constante mediante una bomba peristáltica, de manera que la carga de material particulado se mantuviera en 1.2 mg L⁻¹ con 50% de contenido orgánico simulando la dieta de los mejillones en la Ría de Arousa, en promedio.

Dietas experimentales

Las dietas experimentales se prepararon mezclando proporciones variables de microalgas y sedimento (tabla 1). El agua de mar en el tanque del alimento era filtrada por un sistema de cartucho (CUNO Super Micro-Wynd de 10, 5 y 1 μ m; CUNO Betapure de 0.5 μ m) con un tamaño de poro efectivo de 0.5 μ m, y tratada con luz UV. El tanque con la dieta se mantuvo con aereación intensa para mantener la homogeneidad y evitar la sedimentación de partículas.

El material particulado total (MPT) y la materia orgánica particulada (MOP) de las dietas se determinó por gravimetría en filtros Whatman GF/C de 25 mm, pre-incinerados (450°C, 4 h). Tras filtrar por triplicado 1 L de cada dieta, se eliminaron las sales lavando con 100 mL de una solución isotónica de formato de amonio (0.5M). A continuación los filtros se secaron a 110°C por 24 h y se pesaron para determinar el MPT. La MOP se determinó tras incinerar los filtros durante 4 h a 450°C, por medio de una balanza analítica (Sartorius Micro M3P).

La clorofila de las dietas se determinó por espectrofotometría. Se filtró, por triplicado, 1 L de cada dieta a través de filtros Whatman GF/F de 25 mm, congelados a –20°C para propiciar la ruptura celular y facilitar la extracción de clorofila. La extracción se realizó agregando 5 mL de acetona al 90% y dejando reposar la solución por 12 h (a 4°C). Entonces la solución se centrifugó a 4500 rpm, a 10°C y por 10 min, para separar el extracto de los restos del filtro. La clorofila se cuantificó

Table 1. Characteristics of the experimental diets fed *Mytilus galloprovincialis*: total particulate matter (TPM), particulate organic matter (POM), quality (POM/TPM), and chlorophyll content (Chla). The density of microalgal cells can be calculated by the equivalence $1 \mu\text{g L}^{-1} \approx 2500 \text{ cells mL}^{-1}$.
 Tabla 1. Características de las dietas experimentales suministradas a *Mytilus galloprovincialis*: material particulado total (TPM), materia orgánica particulada (POM), calidad (POM/TPM) y contenido de clorofila (Chla). La densidad de células microalgales puede calcularse mediante la equivalencia $1 \mu\text{g L}^{-1} \approx 2500 \text{ cél mL}^{-1}$.

Diet*		TPM (mg L^{-1})	POM (mg L^{-1})	Quality (POM/TPM)	Chla ($\mu\text{g L}^{-1}$)
TPM	m:s				
1.2	1:99	1.17 ± 0.020	0.28 ± 0.007	0.27 ± 0.001	0.28 ± 0.027
1.2	1:99	1.30 ± 0.015	0.40 ± 0.006	0.31 ± 0.001	0.30 ± 0.014
1.2	3:97	1.26 ± 0.167	0.36 ± 0.036	0.28 ± 0.009	0.62 ± 0.028
1.2	3:97	1.32 ± 0.056	0.41 ± 0.015	0.31 ± 0.021	0.75 ± 0.042
1.2	5:95	1.13 ± 0.049	0.36 ± 0.022	0.32 ± 0.017	1.38 ± 0.014
1.2	7:93	1.35 ± 0.056	0.43 ± 0.008	0.32 ± 0.011	1.95 ± 0.014
1.2	7:93	1.27 ± 0.078	0.36 ± 0.012	0.28 ± 0.011	2.00 ± 0.042
1.2	9:91	1.25 ± 0.062	0.37 ± 0.015	0.29 ± 0.005	2.08 ± 0.036
3.0	13:87	2.83 ± 0.253	0.95 ± 0.028	0.34 ± 0.020	8.03 ± 0.476
1.2	40:60	1.30 ± 0.018	0.66 ± 0.003	0.51 ± 0.005	9.14 ± 0.230
1.0	40:60	1.27 ± 0.068	0.67 ± 0.016	0.53 ± 0.020	9.82 ± 0.111
6.0	13:87	5.17 ± 0.149	1.76 ± 0.012	0.34 ± 0.012	15.08 ± 0.597
3.0	40:60	3.46 ± 0.554	1.68 ± 0.096	0.49 ± 0.049	26.91 ± 0.451
3.0	80:20	2.62 ± 0.061	2.31 ± 0.046	0.88 ± 0.008	45.68 ± 2.025
6.0	40:60	5.51 ± 0.329	2.94 ± 0.115	0.53 ± 0.011	54.26 ± 0.213
6.0	80:20	5.28 ± 0.094	4.65 ± 0.146	0.88 ± 0.012	104.88 ± 2.965

* Theoretical characteristics of the diets in terms of TPM and microalgae:sediment proportion (m:s).

Total particulate matter (TPM) and particulate organic matter (POM) of the diets were measured gravimetrically on pre-ashed (450°C , 4 h) 25-mm Whatman GF/C filters. After 1 L of each diet was filtered in triplicate, the salts were eliminated by washing with 100 mL of an isotonic solution of ammonium formate (0.5 M). Subsequently, the filters were dried at 110°C for 24 h and weighed to determine the TPM. The POM was determined after ashing the filters for 4 h at 450°C , using an analytical balance (Sartorius Micro M3P).

Chlorophyll of the diets was determined by spectrophotometry. One liter of each diet was filtered, in triplicate, through 25-mm Whatman GF/F filters. The filters were frozen at -20°C to facilitate cellular rupture and improve chlorophyll extraction. The extraction was achieved by adding 5 mL acetone (90%) and allowing the solution to stand for 12 h (at 4°C). Thereafter, the solution was centrifuged at 4500 rpm at 10°C for 10 min to separate the extract from the remains of the filter. Quantification of chlorophyll was performed using the following equation for chromophyte algae (Jeffrey and Welschmeyer 1997):

$$\text{Chla} = [(11.47 \times E_{664} - 0.4 \times E_{630}) \times v] / V$$

where Chla is the chlorophyll concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$), E_{664} and E_{630} are the absorbances at 664 and 630 nm, v is the acetate volume used in the extraction (mL), and V is the volume of the

mediante la siguiente ecuación para algas cromofitas (Jeffrey y Welschmeyer 1997):

$$\text{Chla} = [(11.47 \times E_{664} - 0.4 \times E_{630}) \times v] / V$$

donde Chla es la concentración de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$), E_{664} y E_{630} las absorbancias a 664 y 630 nm respectivamente, v el volumen de acetato usado en la extracción (mL) y V el de la dieta filtrada (mL). También se midió la absorbancia a 750 nm para determinar si los restos del filtro afectaban las mediciones de absorbancia.

Diseño experimental

En la tabla 1 se muestran las características (MPT, MOP, calidad = MOP:MPT y contenido de clorofila) de las 16 dietas estudiadas. Se utilizaron 7 cámaras individuales con un mejillón cada una y una cámara de control sin mejillón para determinar la TA de los mejillones expuestos a cada dieta. En cada tratamiento se usaron diferentes mejillones. La TA se estimó con el método de cámara de flujo continuo (Filgueira *et al.* 2006), con mediciones cada 1.5 a 2.0 h, en un total de 9 h. Las primeras 1.5 h se consideraron de aclimatación y por lo tanto no se representaron gráficamente. Algunos mejillones desovaron durante el experimento, por lo que fueron descartados de los análisis. La contaminación de uno de los tanques de

filtered diet (mL). The absorbance at 750 nm was also measured to determine whether the remains of the filter affected the absorbance measurement.

Experimental design

The characteristics (TPM, POM, quality (POM/TPM) and chlorophyll content) of the 16 studied diets are shown in table 1. Seven individual chambers with one mussel each and one control chamber with no mussels were used to determine the CR in mussels exposed to each diet. Different mussels were used in each treatment. The CR was estimated with the flow-through chamber method (Filgueira *et al.* 2006). The CR measurement was performed every 1.5–2.0 h for a total period of 9 h. The first 1.5 h were considered acclimation period and are therefore not represented in the figures. Some mussels spawned during the experiments and they were removed from the analyses. A contamination problem in one food tank forced the premature termination of the experiment after 7 h in the 45.68 and 104.88 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ diets. The characteristics of the diet were determined three times throughout the experiment.

Standardization of CR

In all cases, CR was standardized to a mussel length of 60 mm using the following formula:

$$\text{CR}_{\text{std}} = \text{CR}_{\text{exp}} \times (L_{\text{std}}/L_{\text{exp}})^b$$

where CR_{std} is the standardized clearance rate, CR_{exp} the experimental clearance rate, L_{std} the standardization length, L_{exp} the length of the experimental individual, and b the exponent relating the CR to length. A value of 1.72 was employed as a CR length standardization exponent (Filgueira *et al.* 2008).

Statistical analyses

Correlation between the diet characteristics was performed with Pearson's correlation coefficient. The effect of time on CR response was analyzed by linear regression. The effect of diet characteristics on CR was analyzed by non-linear models, which were estimated using the Levenberg-Marquardt algorithm and least squares as a loss function. Statistical analyses were performed using the SPSS 11.5 computer program (SPSS Inc., Chicago).

Results

Experimental diets

The characteristics of the experimental diets (table 1) showed a statistically significant correlation: Pearson's correlation coefficient (PCC) $\text{Chla vs TPM} = 0.771$, $P < 0.001$; PCC $\text{Chla vs POM} = 0.983$, $P < 0.001$; PCC $\text{TPM vs POM} = 0.871$, $P < 0.001$. Due to the high correlation between chlorophyll

alimento obligó a la terminación prematura, a las 7 horas, de los experimentos que contenían las dietas de 45.68 y 104.88 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. Las características de las dietas se determinaron 3 veces a lo largo del experimento.

Estandarización de TA

En todos los casos TA se estandarizó a una longitud del mejillón de 60 mm con la siguiente fórmula:

$$\text{TA}_{\text{std}} = \text{TA}_{\text{exp}} \times (L_{\text{std}}/L_{\text{exp}})^b$$

donde TA_{std} es la tasa de aclaramiento estandarizada, TA_{exp} la tasa de aclaramiento experimental, L_{std} la longitud de estandarización, L_{exp} la longitud del individuo experimental y b el exponente que relaciona la TA con la longitud. Se utilizó un valor de 1.72 como exponente de estandarización de TA respecto a la longitud (Filgueira *et al.* 2008).

Análisis estadístico

Se buscó la correlación entre las características de las dietas mediante el coeficiente de correlación de Pearson. El efecto del tiempo en la respuesta de TA se evaluó por medio de una regresión lineal. El efecto de las características de las dietas sobre TA se analizó con modelos no lineales que se formularon usando el algoritmo de Levenberg-Marquardt y cuadrados mínimos como función de pérdida. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete de cómputo SPSS 11.5 (SPSS Inc. Chicago).

Resultados

Dietas experimentales

Las características de las dietas experimentales (tabla 1) mostraron una correlación estadística significativa, con coeficientes de correlación de Pearson (CCP) para $\text{Chla-TPM} = 0.771$, $P < 0.001$; CCP $\text{Chla-MOP} = 0.983$, $P < 0.001$; y CCP $\text{MPT-MOP} = 0.871$, $P < 0.001$. Debido a la fuerte correlación entre Chla y MOP los resultados podrían ser explicados por cualquiera de estas variables. Sin embargo, dado que el contenido de clorofila da una buena idea de la calidad del alimento y que la clorofila explicó mejor la varianza de TA que la de MOP (ver más abajo), los resultados fueron descritos en términos de contenido de clorofila.

Cambios en TA en función del tiempo de experimentación

En la figura 2 se muestran los cambios en TA con las diferentes dietas a lo largo del experimento. El análisis de regresión lineal correspondiente a cada dieta mostró pendientes negativas estadísticamente significativas para las dietas con menos de 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, a excepción de la dieta con 1.95 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (tabla 2), lo que implica que la reducción observada de TA (fig. 2a) es significativa. Para las dietas con entre 2.08 y

content and POM, the results could be explained by any of these variables; however, given that chlorophyll content is a good proxy for high quality food and the variance in CR explained by chlorophyll was higher than that by POM (see below), the results were described in terms of chlorophyll content.

Changes in CR with experimental time

The changes in CR throughout the experiment for the different diets is shown in figure 2. The linear regression analysis for each diet showed negative and statistically significant slopes in diets containing less than 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, with the exception of 1.95 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (table 2), which implies that the observed CR reduction (fig. 2a) is significant. For diets containing between 2.08 and 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, the slopes of the linear regression analyses were not statistically different from zero (table 2), indicating that CR was constant throughout the experiment (fig. 2b). Finally, the regression analyses for diets containing more than 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ showed negative and statistically significant slopes (table 2), highlighting an important reduction in CR (fig. 2c).

Effect of diet on CR

The CR response was affected in different ways by the experimental time depending on the chlorophyll content of the

Table 2. Linear regression of the clearance rate throughout the experiment for each diet (slope of the regression, explained variance of the regression (r^2), and P value of the ANOVA test).

Tabla 2. Regresión lineal de la tasa de aclaramiento a lo largo del experimento para cada dieta (pendiente (slope), varianza explicada (r^2) y valor de P del ANOVA).

Diet ($\mu\text{g Chla L}^{-1}$)	Slope	r^2	P
0.28	-0.291	0.29	<0.01
0.30	-0.316	0.69	<0.001
0.62	-0.334	0.42	<0.001
0.75	-0.323	0.43	<0.001
1.38	-0.187	0.17	<0.001
1.95	-0.106	0.09	0.082
2.00	-0.250	0.31	<0.001
2.08	-0.049	0.02	0.358
8.03	-0.091	0.10	0.167
9.14	0.032	0.02	0.354
9.82	-0.040	0.03	0.443
15.08	-0.011	0.01	0.795
26.91	-0.096	0.09	0.195
45.68	-0.203	0.34	<0.01
54.26	-0.290	0.51	<0.001
104.88	-0.109	0.27	<0.01

26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, las pendientes de los análisis de regresión lineal no difirieron estadísticamente de 0 (tabla 2), lo que indica que TA fue constante a lo largo del experimento (fig. 2b). Finalmente, los análisis de regresión lineal de las dietas con más de 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ mostraron pendientes negativas estadísticamente significativas (tabla 2) resaltando una importante reducción de TA (fig. 2c).

Efecto de la dieta en TA

La respuesta de TA se vio afectada de diferente manera por el tiempo de experimentación dependiendo del contenido de

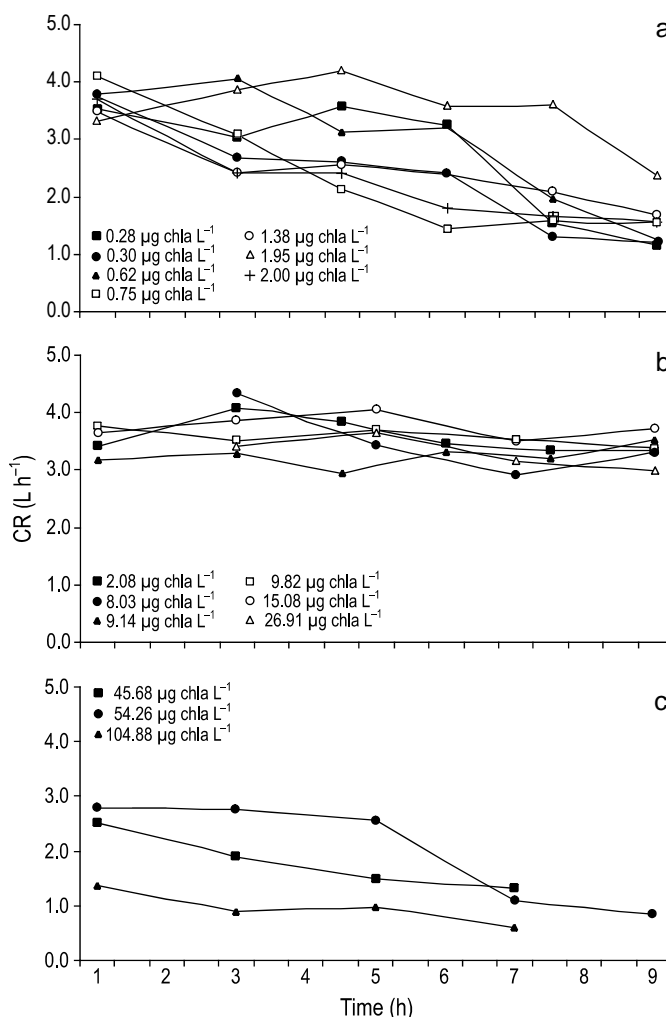


Figure 2. Clearance rate (CR, L h^{-1}) response throughout the experiment for different diets in terms of chlorophyll content: (a) less than 2.08 $\mu\text{g L}^{-1}$, (b) between 2.08 and 26.91 $\mu\text{g L}^{-1}$, and (c) more than 26.91 $\mu\text{g L}^{-1}$. Average values of seven individuals are shown. The standard deviation is not shown to clarify the visualization of the chart.

Figura 2. Respuesta de la tasa de aclaramiento (CR, L h^{-1}) a lo largo de experimentos con dietas distintas en términos de contenido de clorofila: (a) con menos de 2.08 $\mu\text{g L}^{-1}$, (b) con entre 2.08 y 26.91 $\mu\text{g L}^{-1}$, y (c) con más de 26.91 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se muestran los promedios para siete individuos. Por claridad visual de la gráfica no se muestra la desviación estándar.

diet: diets containing between 2.08 and 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ showed a constant CR throughout the experiment, while those containing less than 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ and more than 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ showed a significant decrease in CR. This highlighted the crucial importance of studying the CR response depending on chlorophyll content at different moments during the experiment. In order to address the effect of time on CR response depending on chlorophyll content, the results were divided into three different time intervals: first period (0–3 h), intermediate period (4–6 h), and last period (>6 h).

During the first period, a negative linear relationship was observed between CR and chlorophyll content (simple linear regression, fig. 3a). The variance in CR explained by chlorophyll content was 72%. Regarding POM, the same response was observed though the explained variance was lower (61%). No statistically significant relationship was observed between CR and TPM.

During the intermediate period, the relationship between CR and chlorophyll content was described by non-linear regression (James *et al.* 2001; fig. 3b) with maximum CR at 2.08–26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. Chlorophyll content explained 77% of the variance in CR. POM showed the same response but only explained 69% of the variance. As in the first period, no statistically significant relationship was observed between CR and TPM.

In the last period, the relationship between CR and chlorophyll content was described by non-linear regression (modified logistic model, Murado *et al.* 2002; fig. 3c). The relationship showed an inhibitory behaviour, whereby CR increased with chlorophyll content until a maximum was reached at intermediate chlorophyll content (2.08–26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$), followed by a gradual decrease. The variance explained by chlorophyll content increased to 82%. The same pattern was observed for POM, though this variable explained only 57% of the variance. Again, no statistically significant relationship was observed between CR and TPM.

The relationship between CR and chlorophyll and/or POM over the three periods (fig. 3) showed a gradual response throughout the experiment. The trend was mainly defined by the decrease of CR with experimental time in diets containing less than 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ and more than 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. These regression analyses summarize the results described previously for each diet (fig. 2, table 2).

Discussion

Effect of the experimental time on the relationship between CR and chlorophyll content

The decrease in CR with experimental time in diets containing less than 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (fig. 2a) and more than 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (fig. 2c) highlights the importance of the time in the CR response. This response pattern has been observed for *Mytilus edulis* in other studies (summarized in table 3);

clorofila de cada dieta; esto es, los tratamientos con dietas que contenían entre 2.08 y 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ mostraron una TA constante a lo largo del experimento, mientras que los que contenían menos de 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ o más de 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ mostraron una TA significativamente reducida. Esto resaltó la gran importancia de estudiar la respuesta de TA en función del contenido de clorofila en diferentes momentos del experimento. Con el fin de observar este efecto temporal en la respuesta de TA en función del contenido de clorofila, los resultados se dividieron en tres etapas del tiempo de

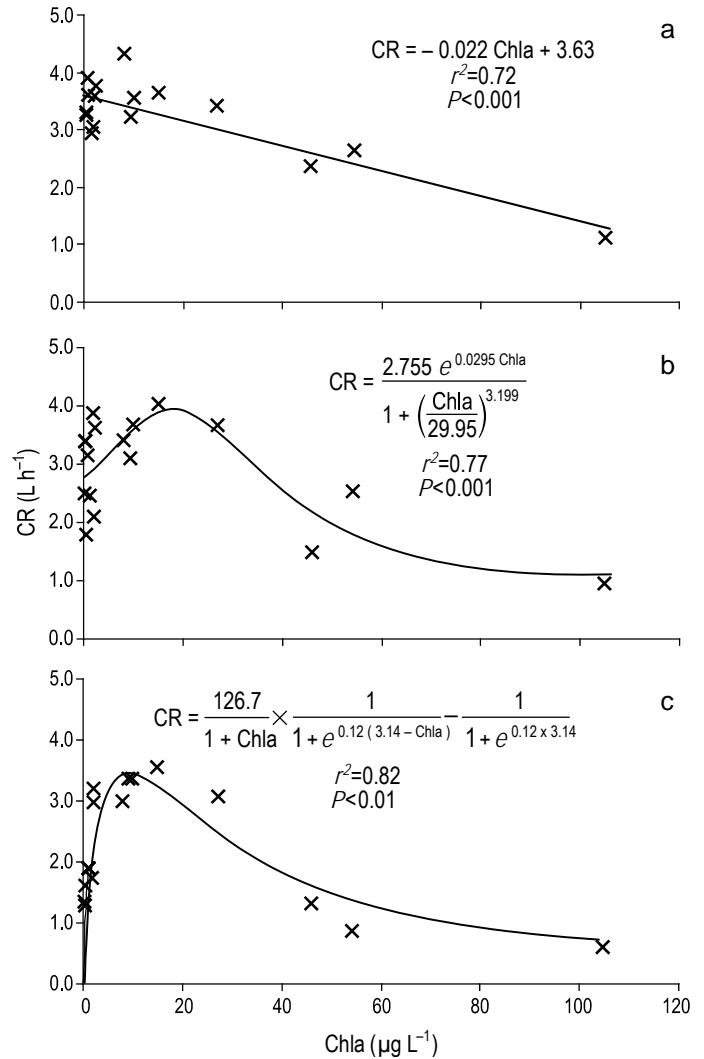


Figure 3. Averaged clearance rate (CR, L h^{-1}) values of seven individuals exposed to diets containing different chlorophyll contents (Chla , $\mu\text{g L}^{-1}$). Over the first period of the experiment (a, 0–3 h) data fit to a simple linear regression, whereas over the intermediate (b, 4–6 h) and last (c, >6 h) periods of the experiment data fit to non-linear regressions.

Figura 3. Promedio de la tasa de aclaramiento (CR, L h^{-1}) de siete individuos sometidos a dietas distintas en términos de contenido de clorofila (Chla , $\mu\text{g L}^{-1}$). En la etapa inicial de experimentación (a, 0–3 h) los datos se ajustan a una regresión lineal simple, mientras que en las etapas intermedia (b, 4–6 h) y final (c, >6 h) éstos se ajustan a sendas regresiones no lineales.

Table 3. Clearance rate (CR) response (reduction or constant) in *Mytilus edulis* depending on diet and exposure time.Tabla 3. Respuesta de la tasa de aclaramiento (CR) en *Mytilus edulis* (reducción o constante) dependiendo de la dieta y el tiempo de exposición.

CR behaviour	Diet	Time	Reference
Reduction	Low food concentration	3–5 h	Thompson and Bayne (1972)
Reduction	<1500 <i>Phaeodactylum tricorutum</i> cells mL ⁻¹	15–20 min	Riisgård and Randløv (1981)
Reduction	Seawater 2189 particles mL ⁻¹	130 min	Newell <i>et al.</i> (2001)
Constant	1500–30000 <i>Phaeodactylum tricorutum</i> cells mL ⁻¹	16 h	Riisgård and Randløv (1981)
Constant	2000–6000 <i>Rhodomonas baltica</i> cells mL ⁻¹	6 h	Riisgård (1991)
Constant	4000–6000 <i>Rhodomonas</i> sp. cells mL ⁻¹	9–14 d	Clausen and Riisgård (1996)
Constant	Seawater + microalgae 7556 particles mL ⁻¹	130 min	Newell <i>et al.</i> (2001)
Reduction	30000 <i>Phaeodactylum tricorutum</i> cells mL ⁻¹	2 h	Riisgård and Randløv (1981)
Reduction	15000 <i>Rhodomonas baltica</i> cells mL ⁻¹	2 h	Riisgård (1991)
Reduction	13000 <i>Rhodomonas</i> sp. cells mL ⁻¹ + sediment 4.8 mg L ⁻¹	9–14 d	Clausen and Riisgård (1996)
Reduction	38900 particles mL ⁻¹ <i>Phaeocystis</i> cf. <i>globosa</i>	23 h	Smaal and Twisk (1997)

however, the results of these surveys cannot be directly compared in terms of chlorophyll content due to its high dependency on the microalgal culture conditions. In general, these studies show a significant reduction in CR for extreme concentrations of food below and above the optimum range, within which reduction is not observed. Contrary to these results, Arifin and Bendell-Young (1997) observed a constant CR that was independent of the experimental time in *M. trossulus* exposed to the following dietary matrix: 5, 20, and 150 × 10³ *Thalassiosira pseudonana* cells mL⁻¹, and 0, 5, 20, and 50 mg L⁻¹ sediment. The authors noted an exception with the 5 × 10³ cells mL⁻¹ and 5 mg L⁻¹ diet, in which a significant reduction in CR with experimental time was observed.

A differential response of CR with time, depending on chlorophyll content, was observed in the relationships between CR and chlorophyll content. The different statistical regressions confirm that experimental time exerts a significant effect on CR, which is mainly manifested in the reduction of CR at low chlorophyll contents. Our results indicate that the CR observed at the end of the experiment, during the last period, corresponds to an inhibitory behaviour, with an incremental increase in CR with chlorophyll content until an optimum CR is reached at intermediate chlorophyll content. This is subsequently followed by a gradual decrease in CR. The relationship in this period can be segregated depending on the chlorophyll content in which an abrupt behavioural change is observed between 2.08 and 26.91 µg Chl *a* L⁻¹, resulting in three different response curves (fig. 4a):

- Exponential increase of CR in diets containing less than 2.08 µg Chl *a* L⁻¹.
- Constant CR in diets containing between 2.08 and 26.91 µg Chl *a* L⁻¹.
- Potential reduction of CR in diets containing more than 26.91 µg Chl *a* L⁻¹.

experimentación: la “inicial” de 0 a 3 h, la “intermedia” de 4 a 6 h y la “final”, después de 6 h.

Durante la etapa inicial se observó una relación lineal negativa entre TA y contenido de clorofila (regresión lineal simple, fig. 3a), en la que este último explicó 72% de la varianza de TA. Se observó la misma respuesta en términos de MOP, aunque esta variable explicó un porcentaje menor de varianza (61%). No se observó ninguna relación estadísticamente significativa entre TA y MPT.

Durante la etapa intermedia la relación entre TA y contenido de clorofila se caracterizó por ser no lineal (James *et al.* 2001) (fig. 3b), con TA máxima a concentraciones entre 2.08 y 26.91 µg Chl *a* L⁻¹. El contenido de clorofila explicó 77% de la varianza de TA, y aunque MOP mostró el mismo tipo de respuesta sólo explicó 69% de la varianza. Como en la primera etapa, no se observó ninguna relación estadísticamente significativa entre TA y MPT.

En la etapa final, la relación entre TA y contenido de clorofila también se caracterizó por ser no lineal (modelo logístico modificado; Murado *et al.* 2002) (fig. 3c). La relación mostró un comportamiento inhibitorio en el que TA se incrementó con la clorofila hasta alcanzar un máximo a un nivel intermedio de 2.08–26.91 µg Chl *a* L⁻¹, seguido por una disminución gradual. La varianza explicada por el contenido de clorofila aumentó a 82%. Este mismo patrón se observó para MOP, aunque esta variable sólo explicó 57% de la varianza. De nuevo, no se observó ninguna relación estadísticamente significativa entre TA y MPT.

A lo largo de las tres etapas de la experimentación la relación entre TA y el contenido de clorofila y/o MOP (fig. 3) mostró una respuesta gradual en el tiempo. La tendencia se vio principalmente definida por una disminución de TA con el tiempo de experimentación en las dietas con menos de 2.08 y más de 26.91 µg Chl *a* L⁻¹. Estos análisis de regresión sintetizan los resultados antes descritos para cada dieta (fig. 2, tabla 2).

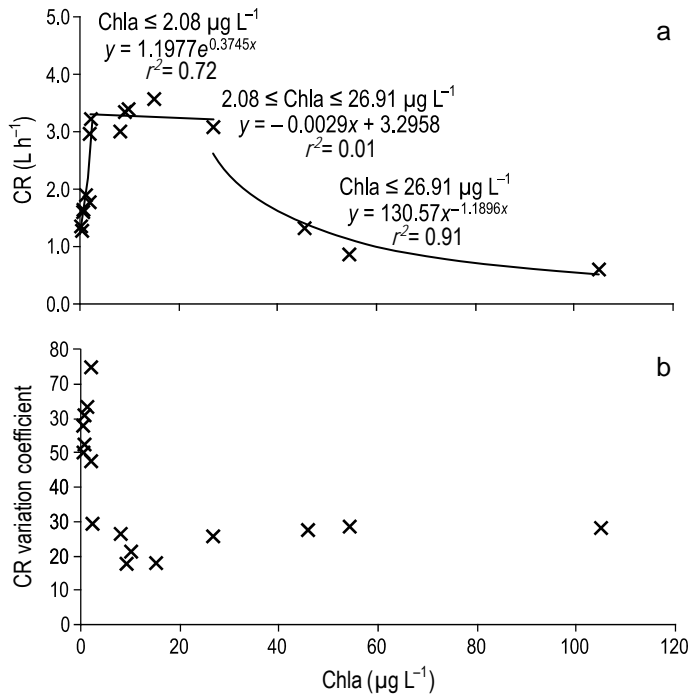


Figure 4. (a) Averaged clearance rate (CR, L h⁻¹) values of seven individuals during the last period of the experiment for each diet in terms of chlorophyll content (Chla, µg L⁻¹). The continuous lines represent the regressions for each chlorophyll range. (b) Pearson's variation coefficient of CR during the last period of the experiment for each diet expressed in terms of chlorophyll content (Chla, µg L⁻¹).

Figura 4. (a) Promedio de la tasa de aclaramiento (CR, L h⁻¹) de siete individuos en la etapa final de experimentación para cada dieta distinta en términos de contenido de clorofila (Chla, µg L⁻¹); las líneas representan las regresiones para cada rango de clorofila. (b) Coeficiente de variación de Pearson de la tasa de aclaramiento (CR) durante la etapa final de experimentación para cada dieta en términos de contenido de clorofila (Chla, µg L⁻¹).

The same behavioural pattern was observed using POM as the independent variable instead of chlorophyll content, although the variance explained by the regression model was lower than for the chlorophyll fit. An exponential increase in CR was observed in diets containing less than approximately 0.4 mg POM L⁻¹, a constant phase in diets containing between 0.4 and 1.7 mg POM L⁻¹, and a potential reduction of CR in diets with more than approximately 1.7 mg POM L⁻¹. This response pattern is theoretically explained in terms of TPM by Winter (1978), who stated that from a low threshold concentration upwards, filtration rate increases rapidly and is then kept constant up to a food concentration at which a maximum amount of food is ingested. As soon as this maximum ingestion rate is reached, the filtration rate decreases continuously in such a way that the amount of food ingested is kept constant. This explanation concurs with Widdows *et al.* (1979), who observed that above the pseudofaeces production threshold, the balance between CR and pseudofaeces production provided a constant ingestion rate in *M. edulis*. This pattern is similar to

Discusión

Efecto del tiempo de experimentación en la relación entre TA y Chla

La disminución de TA con el tiempo de experimentación en los tratamientos con dietas con menos de 2.08 µg Chla L⁻¹ (fig. 2a) y más de 26.91 µg Chla L⁻¹ (fig. 2c) resalta la importancia de la variable tiempo en la respuesta de TA. Este mismo patrón de respuesta ha sido observado previamente en *M. edulis* en estudios cuya síntesis se presenta en la tabla 3. Sin embargo, los resultados de dichos estudios no pueden compararse directamente en términos de contenido de clorofila debido a su gran dependencia de las condiciones de cultivo de las microalgas. En general estos estudios muestran una reducción significativa de TA ante concentraciones extremas de alimento por debajo y por encima de un intervalo óptimo, dentro del cual no se observa reducción alguna. Por lo contrario, Arifin y Bendell-Young (1997) observaron una TA constante independiente del tiempo de experimentación en *M. trossulus* expuesto a las siguientes combinaciones de dietas: 5, 20 y 150 × 10³ cél *Thalassiosira pseudonana* mL⁻¹, con 0, 5, 20 y 50 mg L⁻¹ de sedimento. Estos autores notaron una excepción con la dieta que contenía 5 × 10³ cél mL⁻¹ y 5 mg L⁻¹ de sedimento, con la que se observó una significativa reducción de TA con el tiempo de experimentación.

En las relaciones entre TA y el contenido de clorofila se observó una respuesta diferencial de TA en el tiempo, que dependió de la clorofila. Las diferentes regresiones estadísticas confirman que el tiempo de experimentación ejerce un efecto significativo en TA, que se manifiesta principalmente en su reducción a bajos niveles de clorofila. Los resultados aquí presentados indican que la TA observada en la etapa final del experimento corresponde a un comportamiento de tipo inhibitorio, con un incremento creciente en TA conforme aumenta el contenido de clorofila, hasta llegar a una TA óptima a un nivel intermedio de clorofila. Esto es inmediatamente seguido de un descenso gradual en TA. La relación entre ambas variables en esta etapa es diferente dependiendo del contenido de clorofila, ya que se observa un cambio abrupto en el comportamiento entre 2.08 y 26.91 µg Chla L⁻¹, que a su vez resulta en tres diferentes curvas de respuesta (fig. 4a):

- Aumento exponencial de TA con dietas con un contenido menor a 2.08 µg Chla L⁻¹.
- TA constante con dietas con un contenido entre 2.08 y 26.91 µg Chla L⁻¹.
- Reducción potencial de TA con dietas con un contenido mayor a 26.91 µg Chla L⁻¹.

Al usar la MOP como variable independiente en lugar del contenido de clorofila se observó el mismo patrón de comportamiento, no obstante la varianza explicada por el modelo de regresión fue menor que para el ajuste con la clorofila. Se observó un aumento exponencial en TA con las dietas con

that observed by James *et al.* (2001) and Hawkins *et al.* (1999) for *Perna canaliculus*, by Hawkins *et al.* (2001) for *Chlamys farreri*, and recently by Pascoe *et al.* (2009) and Strohmeier *et al.* (2009) for *M. edulis*. The differential CR response with dietary composition illustrates a highly flexible CR response. At low food concentrations, CR regulation could be conditioned by the imbalance between energetic yield and cost of the feeding process (Widdows and Hawkins 1989), whereas at high food concentration, the CR could be regulated to maintain a constant ingestion rate (Winter 1973, 1978; Widdows *et al.* 1979; James *et al.* 2001). Accordingly, Hawkins *et al.* (2001) suggested that gut volume could be a morphological limitation that exerts control over this response. Within this context, Willows (1992) developed a theoretical model that assumes that the gut is always full and, therefore, the balance between ingestion rate and gut residence time would determine the CR regulation mechanism.

Lower trigger level

Thompson and Bayne (1972) observed an absence of any filtration activity before the addition of food in *M. edulis*, followed by a rapid increase in CR after food addition. This suggests the existence of a threshold, below which the filtration activity is inactivated. Winter (1978) and Newell *et al.* (2001) also suggested the existence of this threshold. The lower trigger level of *M. edulis* has been established for diets containing 0.5–1.0 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (see review by Dolmer 2000, Pascoe *et al.* 2009). The results of the present study do not show a total cessation of CR for any experimental diet (fig. 2); however, a significant decrease in CR with experimental time (table 2) was observed when the mussels were given diets containing less than 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (fig. 2a). The Pearson variation coefficient for CR during the last period of the experiment was significantly higher in these treatments (fig. 4b), showing high variability between individuals. This is caused by an “all or nothing” response; that is, some individuals filter at maximum capacity while others sharply reduce their filtration activity. These results are in very good agreement with Pascoe *et al.* (2009) who observed that the number of feeding animals was lower at low concentration diets. Their study also highlighted a greater standard deviation at low concentration diets. This dichotomic response suggests an on/off switch instead of a progressive control mechanism, as indicated by Bernard (1983).

Given the definition of a lower trigger level and the absence of filtration cessation in all individuals under the same diet, the results of the present survey do not allow a strict quantification of the lower trigger level. Nevertheless, under the experimental conditions described, a sharp reduction of CR may occur in some *M. galloprovincialis* individuals fed diets containing less than 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. This chlorophyll concentration could be the lower threshold, below which the energetic cost of feeding is not compensated by the energetic yield of the food ingested (Widdows and Hawkins 1989). The CR reduction under prolonged exposure to meagre diets could be

menos de aproximadamente 0.4 mg MOP L^{-1} , la fase constante con dietas con entre 0.4 y 1.7 mg MOP L^{-1} , y la potencial reducción de TA con dietas con más de 1.7 mg MOP L^{-1} . Este patrón de respuesta ha sido explicado teóricamente en términos de MPT por Winter (1978), quien afirma que por encima del umbral de baja concentración, la tasa de filtración se incrementa rápidamente y después se mantiene constante hasta llegar a una concentración de alimento a la cual se alcanza la ingesta alimenticia máxima. Tan pronto como se logra esta máxima tasa de ingestión, la tasa de filtración disminuye de manera continua para que la ingesta alimenticia permanezca constante. Esta explicación es congruente con lo observado por Widdows *et al.* (1979) en el sentido de que por encima del umbral de producción de pseudoheces, el equilibrio entre TA y la producción de pseudoheces proporciona a *M. edulis* una tasa de ingestión constante. Este patrón es similar al observado por James *et al.* (2001) y Hawkins *et al.* (1999) en *Perna canaliculus*, por Hawkins *et al.* (2001) en *Chlamys farreri*, y recientemente por Pascoe *et al.* (2009) y Strohmeier *et al.* (2009) en *M. edulis*. La respuesta diferencial de TA con la composición de la dieta demuestra su gran flexibilidad de respuesta. A bajas concentraciones de alimento, la regulación de TA puede estar condicionada por el desequilibrio entre el costo y el rendimiento energético del proceso alimenticio (Widdows y Hawkins 1989). Por otra parte, a altas concentraciones de alimento la TA podría estar siendo regulada para mantener una tasa de ingestión constante (Winter 1973, 1978; Widdows *et al.* 1979; James *et al.* 2001). Consistentemente, Hawkins *et al.* (2001) sugieren que el volumen del tracto digestivo podría ser una limitante morfológica que controle esta respuesta. En este contexto, Willows (1992) desarrolló un modelo teórico que supone un tracto digestivo siempre lleno, y por lo tanto sería el equilibrio entre tasa de ingestión y tiempo de residencia en el tracto digestivo el mecanismo que regularía la TA.

Umbral de activación

Thompson y Bayne (1972) observaron la ausencia de actividad filtradora antes de suministrar el alimento a *M. edulis*, seguida de un súbito incremento en la TA tras la adición del mismo. Esto sugiere la existencia de un umbral por debajo del cual se inactiva la filtración. Winter (1978) y Newell *et al.* (2001) también sugieren la existencia de este umbral. El umbral de activación de *M. edulis* ha sido establecido para dietas que contienen de 0.5 a 1.0 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (ver revisión de Dolmer 2000, Pascoe *et al.* 2009). Los resultados del presente estudio no muestran una reducción total de TA con ninguna de las dietas experimentales (fig. 2); sin embargo se observó su disminución significativa con el tiempo de experimentación (tabla 2) cuando se suministró a los mejillones dietas con menos de 2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (fig. 2a). En estos tratamientos, el coeficiente de variación de Pearson para TA fue significativamente mayor durante el período final de experimentación (fig. 4b), mostrando una gran variabilidad entre individuos. Este fenómeno es causado por una respuesta de tipo “todo o nada”;

interpreted as a physiological response designed to reduce water transport through the gills and mantle cavity and, therefore, reduce respiration and metabolic rate (Jørgensen *et al.* 1988). The residual CR observed in some individuals could be interpreted as a partial opening of the valves that allows a reduction of the metabolic rate, avoiding anaerobic metabolism (Widdows *et al.* 1979).

Saturation reduction

A decrease in CR in mussels given high-chlorophyll diets has been observed in several studies. Riisgård (1991) and Clausen and Riisgård (1996) established that CR in *M. edulis* is reduced when given a diet containing more than ~19 and 16.25 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, respectively. Recently, Pascoe *et al.* (2009) established this threshold at ~6 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. In the case of *Perna canaliculus*, Hawkins *et al.* (1999) observed a threshold at $1.11 \pm 0.42 \mu\text{g Chla L}^{-1}$, whereas James *et al.* (2001) reported a level of 0.45 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. Hawkins *et al.* (2001) observed maximum CR in *Chlamys farreri* fed 5 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ and a decrease at higher chlorophyll concentrations.

The results of the present study confirm that, under the experimental conditions described, diets containing more than 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ cause the CR of *M. galloprovincialis* to decrease. The reduction in CR is observed throughout the experiments (fig. 3a). The low Pearson variation coefficient observed in these treatments for the relationship between CR and chlorophyll during the last period of the experiment (fig. 4b) suggests that CR is homogeneous for all individuals; that is, the “all or nothing” response is not observed at high chlorophyll concentrations. This homogeneous behaviour and the continuous decrease in CR with chlorophyll (potential regression, fig. 4a) could suggest that the saturation reduction is controlled by a progressive threshold instead of an on/off switch.

The reduction in CR at high food concentrations has been widely studied though there is no general consensus explaining this behaviour (Widdows *et al.* 1979; Kiørboe *et al.* 1980; Riisgård 1991; Newell and Shumway 1993; Clausen and Riisgård 1996; Smaal and Twisk 1997; Hawkins *et al.* 1999, 2001; James *et al.* 2001; Velasco and Navarro 2002). The results of the present study show a statistically significant relationship between CR and chlorophyll content, suggesting that CR is regulated by the food concentration, which means that it is not a simple response to exposure to adverse conditions. This behaviour could be interpreted as a physiological adjustment to optimize energy uptake (Winter 1978, Bayne *et al.* 1993, Velasco and Navarro 2002), a process in which the selection and rejection in ctenidial and labial palps could also be involved (Shumway *et al.* 1985, Bayne *et al.* 1993, Ward and Shumway 2004).

In summary, the CR values reported in the present study are in good agreement with those observed under natural conditions for *M. galloprovincialis* (Navarro *et al.* 1991, Iglesias *et al.* 1996, Babarro *et al.* 2000). Considering the change

es decir, que algunos individuos filtran a su máxima capacidad mientras otros reducen abruptamente su actividad filtradora. Nuestros resultados concuerdan con los de Pascoe *et al.* (2009), quienes observaron que el número de animales que se alimentaban era menor cuando se suministraban dietas de baja concentración. De la misma manera, su estudio resalta una mayor desviación estándar en la respuesta con dietas de baja concentración. Esta respuesta dicotómica sugiere la existencia de un mecanismo de tipo encendido/apagado en lugar de uno de control progresivo, como lo indica Bernard (1983).

Dada la definición del “umbral de activación” y la ausencia de un cese de la filtración generalizado en todos los individuos con la misma dieta, los resultados del presente estudio no permitieron una cuantificación estricta de dicho umbral; sin embargo, en las condiciones experimentales descritas se podría dar una abrupta reducción en la TA de algunos individuos de *M. galloprovincialis* ante un contenido de clorofila <2.08 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. Esta concentración de clorofila podría representar el umbral de activación debajo del cual el costo energético de alimentarse no es compensado por el aporte de energía del alimento ingerido (Widdows y Hawkins 1989). La reducción de TA tras la exposición prolongada a dietas pobres podría ser interpretada como una respuesta fisiológica desarrollada para reducir el transporte de agua a través de las branquias y la cavidad paleal, y así disminuir la respiración y la tasa metabólica (Jørgensen *et al.* 1988). La TA residual observada en algunos individuos podría ser interpretada como una apertura parcial de las valvas que permite disminuir la tasa metabólica y evitar la activación de la fase anaerobia del metabolismo (Widdows *et al.* 1979).

Umbral de saturación

En diversos estudios se ha observado una disminución de TA en mejillones alimentados con dietas ricas en clorofila. Riisgård (1991) y Clausen y Riisgård (1996) establecieron que la TA de *M. edulis* disminuye cuando su dieta contiene más de ~19 y 16.25 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, respectivamente. Recientemente Pascoe *et al.* (2009) establecieron este umbral a ~6 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. En el caso de *Perna canaliculus*, Hawkins *et al.* (1999) observaron un umbral a $1.11 \pm 0.42 \mu\text{g Chla L}^{-1}$, mientras que James *et al.* (2001) reportaron uno a 0.45 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$. Hawkins *et al.* (2001) observaron una TA máxima en *Chlamys farreri* alimentada con 5 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$, que disminuyó con concentraciones de clorofila mayores.

Los resultados del presente estudio confirman que, en las condiciones experimentales descritas, las dietas con más de 26.91 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ causan una disminución de la TA en *M. galloprovincialis*. Esta reducción se observó en todos los experimentos (fig. 3a). El bajo coeficiente de variación de Pearson para la relación entre TA y contenido de clorofila observado en estos tratamientos durante la etapa final de experimentación (fig. 4b) sugiere una TA homogénea para todos los individuos; es decir, que a altas concentraciones de clorofila no se observa la respuesta de tipo “todo o nada”. Este comportamiento

observed for CR throughout the experiment, the results suggest that time exerts a significant effect on CR, which is mainly manifested in the reduction of CR at extreme chlorophyll contents. This reduction is stronger in low than in high chlorophyll content diets. Although the lower trigger level cannot be strictly quantified, prolonged exposure to diets containing less than $2.08 \mu\text{g Chl}a \text{ L}^{-1}$, or approximately $0.4 \text{ mg POM L}^{-1}$, given the high correlation between chlorophyll and organic content, caused a sharp change in the CR of some individuals. This response is controlled by an on/off switch: individuals that filter at maximum capacity and others at reduced CR. From this chlorophyll threshold upwards, the mussels filter at maximum capacity until the saturation reduction threshold is reached. This progressive threshold begins at about $26.91 \mu\text{g Chl}a \text{ L}^{-1}$, or approximately $1.7 \text{ mg POM L}^{-1}$. The behavioural pattern of CR during the last period of the experiment is in agreement with other studies (Hawkins *et al.* 1999, 2001; James *et al.* 2001; Pascoe *et al.* 2009) and theoretical arguments (Winter 1978), whereby the CR of *M. galloprovincialis* shows a highly flexible behaviour depending on the characteristics of the diet.

Acknowledgements

This study was supported by PROINSA (project CSIC 2004448), Xunta de Galicia (PGDIT03RMA13E), and EU (MABENE EVK3-2001-00144). The first author was supported by a research personnel training grant from CSIC-Xunta de Galicia and Caixanova. We thank L Nieto, B González, and R Salgueiro (CSIC, Spain) for technical laboratory assistance.

References

- Arifin Z, Bendell-Young LI. 1997. Feeding response and carbon assimilation by the blue mussel *Mytilus trossulus* exposed to environmentally relevant seston matrices. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 160: 241–253.
- Babarro JMF, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U. 2000. Feeding behaviour of seed mussel *Mytilus galloprovincialis*: Environmental parameters and seed origin. *J. Shellfish Res.* 19: 195–201.
- Bayne BL. 1998. The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: An introduction to the Plymouth “TROPHEE” workshop. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 219: 1–19.
- Bayne BL. 2001. Reply to comment by Riisgård HU. *Ophelia* 54: 211.
- Bayne BL, Iglesias JIP, Hawkins AJS, Navarro E, Héral M, Deslous-Paoli JM. 1993. Feeding behaviour of the mussel *Mytilus edulis*: Responses to variations in quantity and organic content of the seston. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 73: 813–829.
- Bernard FR. 1983. Physiology and mariculture of some northeastern Pacific bivalve molluscs. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* No. 63, 24 pp.
- Clausen IB, Riisgård HU. 1996. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: No evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141: 37–45.
- Dolmer P. 2000. Feeding activity of mussels *Mytilus edulis* related to near-bed currents and phytoplankton biomass. *J. Sea Res.* 44: 221–231.
- homogéneo y la disminución continua de TA con la clorofila (regresión potencial; fig. 4a) podrían estar sugiriendo que la disminución de TA por saturación es más bien controlada por un umbral progresivo que por un mecanismo de tipo “encendido/apagado”.
- La reducción de TA a altas concentraciones de alimento ha sido estudiada ampliamente; no obstante aún no existe un consenso general para explicar este comportamiento (Widdows *et al.* 1979; Kiørboe *et al.* 1980; Riisgård 1991; Newell y Shumway 1993; Clausen y Riisgård 1996; Smaal y Twisk 1997; Hawkins *et al.* 1999, 2001; James *et al.* 2001; Velasco y Navarro 2002). Los resultados del presente estudio muestran una relación estadísticamente significativa entre TA y contenido de clorofila, sugiriendo que TA es regulada por la concentración de alimento, lo que a su vez significa que ésta no es una simple respuesta a la exposición a condiciones adversas. Este comportamiento podría ser explicado como un ajuste fisiológico para la optimización energética (Winter 1978, Bayne *et al.* 1993, Velasco y Navarro 2002), un proceso en el que también podrían estar involucrados la selección y el rechazo de alimento a nivel del ctenidio y los palpos labiales (Shumway *et al.* 1985, Bayne *et al.* 1993, Ward y Shumway 2004).
- En conclusión, los valores de TA reportados en el presente trabajo concuerdan con los observados en *Mytilus galloprovincialis* en condiciones naturales (Navarro *et al.* 1991, Iglesias *et al.* 1996, Babarro *et al.* 2000). Considerando el cambio de TA a lo largo del experimento, nuestros resultados sugieren que el tiempo tiene un efecto significativo en TA que se manifiesta en su reducción ante contenidos extremos de clorofila. Esta reducción es mayor con dietas de bajo contenido de clorofila que con dietas ricas en clorofila. A pesar de que el umbral de activación no ha podido ser estrictamente definido, la exposición prolongada a dietas con menos de $2.08 \mu\text{g Chl}a \text{ L}^{-1}$, o aproximadamente $0.4 \text{ mg MOP L}^{-1}$, dada la fuerte correlación entre los contenidos de clorofila y materia orgánica, causaron el cambio abrupto de la TA en algunos individuos. Esta respuesta es controlada por un mecanismo de tipo “encendido/apagado”: individuos que filtran a su máxima capacidad mientras que otros lo hacen a TAs reducidas. A partir de este umbral de clorofila hacia arriba, los mejillones filtran a su máxima capacidad hasta llegar al umbral de saturación, un umbral progresivo que se inicia a alrededor de $26.91 \mu\text{g Chl}a \text{ L}^{-1}$, o aproximadamente $1.7 \text{ mg MOP L}^{-1}$. El patrón de comportamiento de TA durante la etapa final de nuestro experimento concuerda con los patrones identificados en otros estudios (Hawkins *et al.* 1999, 2001; James *et al.* 2001; Pascoe *et al.* 2009) y con la teoría (Winter 1978), en el sentido de que la TA de *M. galloprovincialis* muestra un comportamiento sumamente flexible dependiendo de las características de su dieta.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el contrato-proyecto PROINSA código CSIC 2004448, por los proyectos Xunta de Galicia PGDIT03RMA13E y UE MABENE EVK3-2001-

- Filgueira R, Labarta U, Fernández-Reiriz MJ. 2006. Flow-through chamber method for clearance rate measurements in bivalves. Design and validation of individual chambers and mesocosm. *Limnol. Oceanogr. Methods* 4: 284–292.
- Filgueira R, Labarta U, Fernández-Reiriz MJ. 2008. Effect of condition index on allometric relationships of clearance rate in *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43: 391–398.
- Freites L, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U. 2003. Biochemical composition and energy content of the mussel *Mytilus galloprovincialis* of subtidal and rocky shore origin: Influence of environmental variables and source of mussel seed. *Cienc. Mar.* 29: 603–619.
- Hawkins AJS, Smith RFM, Bayne BL, Héral M. 1996. Novel observations underlying the fast growth of suspension-feeding shellfish in turbid environments: *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131: 179–190.
- Hawkins AJS, James MR, Hickman RW, Hatton S, Weatherhead M. 1999. Modelling of suspension feeding and growth in the green-lipped mussel *Perna canaliculus* exposed to natural and experimental variations of seston availability in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 191: 217–232.
- Hawkins AJS, Fang JG, Pascoe PL, Zhang JH, Zhang XL, Zhu MY. 2001. Modelling short-term responsive adjustments in particle clearance rate among bivalve suspension-feeders: Separate unimodal effects of seston volume and composition in the scallop *Chlamys farreri*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262: 61–73.
- Iglesias JIP, Pérez-Camacho A, Navarro E, Labarta U, Beiras R, Hawkins AJS, Widdows J. 1996. Microgeographic variability in feeding, absorption and condition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.): A transplant experiment. *J. Shellfish Res.* 15: 673–680.
- James MR, Weatherhead MA, Ross AH. 2001. Size-specific clearance, excretion, and respiration rates, and phytoplankton selectivity for the mussel *Perna canaliculus* at low levels of natural food. *N.Z. J. Mar. Freshwat. Res.* 35: 73–86.
- Jeffrey SW, Welschmeyer NA. 1997. Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. In: Jeffrey SW, Montura RFC, Wright SW (eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. UNESCO, Paris, pp. 597–615.
- Jørgensen CB. 1996. Bivalve filter feeding revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142: 287–302.
- Jørgensen CB, Larsen PS, Møhlenberg F, Riisgård HU. 1988. The bivalve pump. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 34: 69–77.
- Kjørboe T, Møhlenberg F, Nøhr O. 1980. Feeding, particle selection and carbon absorption in *Mytilus edulis* in different mixtures of algae and resuspended bottom material. *Ophelia* 19: 193–205.
- Murado MA, González MP, Vázquez JA. 2002. Dose-response relationships: An overview, a generative model and its application to the verification of descriptive models. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 439–455.
- Navarro E, Iglesias JIP, Pérez-Camacho A, Labarta U, Beiras R. 1991. The physiological energetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) from different cultivation rafts in the Ría de Arosa (Galicia, NW Spain). *Aquaculture* 94: 197–212.
- Newell CR, Shumway SE. 1993. Grazing of natural particulates by bivalve molluscs: Spatial and temporal perspective. In: Dame RD (ed.), *Bivalve Filter Feeders in Estuarine and Coastal Ecosystem Processes*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 85–148.
- Newell CR, Wildish DJ, MacDonald BA. 2001. The effects of velocity and seston concentration on the exhalant siphon area, valve gape and filtration rate of the mussel *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262: 91–111.
00144. R Filgueira fue apoyado por CSIC-Xunta de Galicia y Caixanova con una beca para entrenamiento científico. Agradecemos a L Nieto, B González y R Salgueiro (CSIC-España) su asistencia técnica en el laboratorio.
- Traducido al español por Manuel Gardea Ojeda.
-
- Pascoe PL, Parry HE, Hawkins AJS. 2009. Observations on the measurement and interpretation of clearance rate variations in suspension-feeding bivalve shellfish. *Aquat. Biol.* doi: 10.3354/ab00123.
- Riisgård HU. 1991. Filtration rate and growth in the blue mussel, *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758: Dependence on algal concentration. *J. Shellfish Res.* 10: 29–35.
- Riisgård HU. 2001a. Physiological regulation versus autonomous filtration in filter-feeding bivalves: Starting points for progress. *Ophelia* 54: 193–209.
- Riisgård HU. 2001b. On measurement of filtration rates in bivalves – the stony road to reliable data: Review and interpretation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211: 275–291.
- Riisgård HU, Randløv A. 1981. Energy budgets, growth and filtration rates in *Mytilus edulis* at different algal concentration. *Mar. Biol.* 61: 227–234.
- Shumway SE, Cucci TL, Yentsch CM. 1985. Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 91: 77–92.
- Smaal AC, Twisk F. 1997. Filtration and absorption of *Phaeocystis* cf. *globosa* by the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 209: 33–46.
- Strohmeier T, Strand Ø, Cranford P. 2009. Clearance rates of the great scallop (*Pecten maximus*) and blue mussel (*Mytilus edulis*) at low natural seston concentrations. *Mar. Biol.* 156: 1781–1795.
- Thompson R, Bayne BL. 1972. Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9: 111–124.
- Velasco LA, Navarro JM. 2002. Feeding physiology of infaunal (*Mulinia edulis*) and epifaunal (*Mytilus chilensis*) bivalves under a wide range of concentrations and qualities of seston. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 240: 143–155.
- Ward JE, Shumway SE. 2004. Separating the grain from the chaff: Particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300: 83–130.
- Widdows J, Hawkins AJS. 1989. Partitioning of rate of heat dissipation by *Mytilus edulis* into maintenance, feeding and growth components. *Physiol. Zool.* 62: 764–784.
- Widdows J, Fieth P, Worrall CM. 1979. Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 50: 195–207.
- Willows RI. 1992. Optimal digestive investment: A model for filter feeders experiencing variable diets. *Limnol. Oceanogr.* 37: 829–847.
- Winter JE. 1973. The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuous automatic recording apparatus. *Mar. Biol.* 22: 317–328.
- Winter JE. 1978. A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* 13: 1–33.

Recibido en abril de 2008;
aceptado en noviembre de 2009.