

Clearance rate of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. II. Response to uncorrelated seston variables (quantity, quality, and chlorophyll content)

Tasa de aclaramiento del mejillón *Mytilus galloprovincialis*. II. Respuesta a variables no correlacionadas del seston (cantidad, calidad y contenido 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) response of *Mytilus galloprovincialis* was determined over 32 experiments in which the trophic conditions of its natural habitat, the Galician rías (Spain), were reproduced. Experimental diets were prepared by mixing pulverized sediment, Tahitian *Isochrysis* aff. *galbana*, and pulverized *Spartina* sp., avoiding multicollinearity among the seston variables used to characterize the diets: total particulate matter (TPM), quality (f = particulate organic matter (POM)/TPM), and chlorophyll content. This approach allowed us to identify the seston variables that have the most important effect on CR, as well as develop a mathematical model of CR response to the environmental trophic characteristics, without worrying about the statistical problems associated with multicollinearity among explanatory variables. Each of the three seston variables had a significant effect on CR response. Maximum CR was observed at a seston concentration of 1.2 mg L⁻¹. The CR was inversely correlated with the fraction of low digestible organic matter ($f_{\text{det}} = \text{POM}_{\text{Spartina sp.}}/\text{TPM}$), and was relatively consistent when poorly digestible diets ($f_{\text{det}} > 0.4$) were excluded from the analyses. This relative stability suggested that CR was regulated by a physiological feedback such as the fraction of poorly digestible organic matter.

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

RESUMEN. Se realizaron 32 experimentos en los que se determinó la tasa de aclaramiento (TA) en *Mytilus galloprovincialis* ante una matriz de dietas que simulaba el rango de condiciones tróficas de su hábitat natural, las rías gallegas (España). Las dietas experimentales se prepararon empleando sedimento pulverizado, *Isochrysis* aff. *galbana* (variedad tahitiana) y *Spartina* sp. pulverizada, que permitieron la preparación de las dietas evitando la colinealidad entre las variables del seston empleadas para su caracterización: material particulado total (MPT), calidad (f = materia orgánica particulada (MOP)/MPT) y contenido de clorofila. Esta aproximación permitió determinar las variables del seston que afectan en mayor medida a la TA y establecer su patrón de respuesta en función de las características tróficas del medio evitando problemas estadísticos asociados con la multicolinealidad de las variables explicativas. Los resultados pusieron de manifiesto que las tres variables explicativas ejercieron un efecto significativo en la regulación de TA. Los valores máximos de aclaramiento se observaron con una concentración de seston en torno a 1.2 mg L⁻¹. Se observó una reducción de la TA relacionada con el incremento de la proporción de materia orgánica de baja digestibilidad ($f_{\text{det}} = \text{MOP}_{\text{Spartina sp.}}/\text{MPT}$); sin embargo, la TA se mostró relativamente estable cuando las dietas de baja digestibilidad ($f_{\text{det}} > 0.4$) se excluyeron de los análisis. La estabilidad relativa de TA permite sugerir que esta variable está determinada por una retroalimentación fisiológica, que en el caso particular de este experimento estuvo determinada por el contenido de materia orgánica de baja digestibilidad de la dieta.

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

INTRODUCTION

Ecological system models are powerful decision-making tools because they simulate organization, function, and change of the ecosystem. A crucial aspect of mussel cultivation model development is the parametrization of energy uptake under different trophic conditions. Energy uptake does not depend exclusively on filtration and retention rates of food particles in the gills, when estimated using the clearance rate (CR). At high seston concentration, pre-ingestive selection and pseudofaeces production constitute mechanisms that regulate food ingestion (Bayne *et al.* 1993, Ward and Shumway 2004); however, under low seston conditions,

INTRODUCCIÓN

Los modelos de sistemas ecológicos representan herramientas poderosas en la toma de decisiones ya que simulan la organización, la función y los cambios del ecosistema. Un aspecto importante en el desarrollo de modelos para el cultivo de mejillones es la parametrización de la captación de energía en diferentes condiciones tróficas. La captación de energía no depende exclusivamente de las tasas de filtración y retención de partículas de alimento en las branquias, estimada mediante la tasa de aclaramiento (TA). Bajo altas concentraciones de seston, la selección preingestiva y la producción de pseudoheces son mecanismos que regulan

such as those occurring in the Galician rías (total particulate matter $< 3 \text{ mg L}^{-1}$) where phytoplankton constitutes the highest proportion of seston (Figueiras *et al.* 2002), selective processes may have minor importance. Hence, in these systems the uptake of energy would essentially depend on the CR.

The regulation of CR in *Mytilus* sp. exposed to different diet characteristics has been widely studied under controlled laboratory conditions and *in situ* (see review by Bayne *et al.* 1993). In laboratory studies, predefined ranges of environmental variables allow the determination of mathematical equations that describe the physiological response. Despite being a very productive research field, the effect of different seston variables on CR is not yet conclusive, either because of methodological or experimental shortcomings. The most important shortcoming when examining CR response to different seston variables using multiple regression is the failure to address multicollinearity. Multicollinearity occurs when some of the explanatory variables are highly correlated, causing an important negative impact on the quality and stability of the regression model. When multicollinearity occurs, the conclusions of the regression model regarding the significant effect of the correlated variables on the response variable are likely to be spurious (Neter and Wasserman 1974) because the effect of one explanatory variable cannot be distinguished from that of the correlated one. The simplest way to detect multicollinearity is to perform correlation analyses between pairs of explanatory variables. If two explanatory variables are highly correlated, only one should be used to explain variation in the response variable, since one conveys essentially all the information in the other. Despite the importance of accounting for multicollinearity when determining statistical significance, the relationships between explanatory variables have not usually been considered in the experimental design. After a thorough review of the literature, we consider that the present study is the first to do so.

In the present analysis, the CR of *Mytilus galloprovincialis* was studied under a range of diets simulating the trophic conditions of its natural habitat (the Galician rías). The experimental diets were prepared by mixing pulverized sediment, *Isochrysis galbana*, and an organic matrix composed of pulverized *Spartina* sp. The use of these components allowed an *a priori* design of diets in order to avoid correlation between the variables that characterize the diet: total particulate matter (TPM), quality (f = particulate organic matter (POM)/TPM), and chlorophyll content (Chl a). Each of these variables plays an important role in mussel performance (Freites *et al.* 2003) and they are commonly used in ecophysiological models (see table 1). This approach allowed (1) the identification of seston variables that exert the most important influence on CR, and (2) the mathematical description of the CR response depending on trophic characteristics.

la ingestión de alimento (Bayne *et al.* 1993, Ward y Shumway 2004); sin embargo, a bajas concentraciones de seston, como sucede en las rías de Galicia (materia particulada total $< 3 \text{ mg L}^{-1}$) donde el fitoplancton constituye la mayor proporción de seston (Figueiras *et al.* 2002), los procesos selectivos podrían ser de menor importancia, por lo que en estos sistemas la captación de energía dependería esencialmente de la TA.

La regulación de TA en *Mytilus* sp. expuesto a diferentes dietas ha sido estudiada ampliamente tanto bajo condiciones controladas de laboratorio como *in situ* (ver revisión por Bayne *et al.* 1993). En los estudios de laboratorio, intervalos predefinidos de variables ambientales permiten la determinación de ecuaciones matemáticas que describen la respuesta fisiológica. A pesar de ser un área de investigación muy productiva, la información sobre el efecto de diferentes variables del seston sobre la TA aún no es concluyente debido a deficiencias ya sea metodológicas o experimentales. La deficiencia más importante en los estudios que han utilizado la regresión múltiple para analizar la respuesta de TA a diferentes variables del seston es que éstos no consideran la multicolinealidad que ocurre cuando algunas de las variables explicativas están muy correlacionadas entre sí, provocando un impacto muy negativo sobre la calidad y la estabilidad del modelo de regresión. Cuando se presenta la multicolinealidad, las conclusiones del modelo de regresión en cuanto al efecto significativo de las variables correlacionadas en la variable de respuesta pueden ser espurias (Neter y Wasserman 1974) ya que no se puede distinguir entre el efecto de una variable explicativa y el efecto de la variable correlacionada. La manera más simple de detectar la multicolinealidad es realizar análisis de correlación entre pares de variables explicativas; si dos de estas variables están altamente correlacionadas, sólo una debería de usarse para explicar la variación en la variable de respuesta, ya que en esencia una transmite toda la información de la otra. A pesar de la importancia de considerar la multicolinealidad al determinar la significancia estadística, generalmente no se toman en cuenta las relaciones entre las variables explicativas en el diseño experimental. Después de una revisión exhaustiva de la literatura, consideramos que el presente trabajo es el primero en hacerlo.

En el presente análisis se estudió la TA del mejillón *Mytilus galloprovincialis* bajo un espectro de dietas que simulaba las condiciones tróficas de su hábitat natural (las rías gallegas). Las dietas experimentales se prepararon mezclando sedimento pulverizado, *Isochrysis galbana* y una matriz orgánica compuesta de *Spartina* sp. pulverizada. El uso de estos componentes permitió diseñar las dietas *a priori* para evitar la correlación entre las siguientes variables que caracterizan la dieta: material particulado total (MPT), calidad (f = material orgánico particulado (MOP)/MPT) y contenido de clorofila (Chl a). Cada una de estas variables

Table 1. Environmental variables (particulate organic matter, POM; particulate volume, VOL; total particulate matter, TPM; seston quality in terms of organic content, $f = \text{POM/TPM}$; chlorophyll content, Chla) that explain variation in clearance rate (CR) in different species of bivalve molluscs.

Tabla 1. Variables ambientales (materia orgánica particulada, POM; volumen particulado, VOL; material particulado total, TPM; calidad del seston en términos de contenido orgánico, $f = \text{POM/TPM}$; contenido de clorofila, Chla) que explican la variación de la tasa de aclaramiento (CR) en diferentes especies de moluscos bivalvos.

Independent variable	Explained CR variance	Species	Reference
TPM	53%	<i>Mytilus edulis</i>	Hawkins <i>et al.</i> (1996)
Chla, TPM	53%	<i>Perna canaliculus</i>	Hawkins <i>et al.</i> (1999)
Chla, VOL	58%	<i>Chlamys farreri</i>	Hawkins <i>et al.</i> (2001)
Chla	83%	<i>Perna canaliculus</i>	James <i>et al.</i> (2001)
TPM, POM	82%	<i>Mulinia edulis</i>	Velasco and Navarro (2002)
TPM, POM	83%	<i>Mytilus chilensis</i>	Velasco and Navarro (2002)
f	40%	<i>Aulacomya maoriana</i>	Gardner (2002)
f	43%	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Gardner (2002)
POM	44%	<i>Perna canaliculus</i>	Gardner (2002)
TPM	92%	<i>Mulinia edulis (in situ)</i>	Velasco and Navarro (2005)
TPM	47%	<i>Mulinia edulis</i> (laboratory)	Velasco and Navarro (2005)
TPM	85%	<i>Mytilus chilensis (in situ)</i>	Velasco and Navarro (2005)
TPM	71%	<i>Mytilus chilensis</i> (laboratory)	Velasco and Navarro (2005)
Chla	82%	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Filgueira <i>et al.</i> (2009)
TPM, Chla, f	85%	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Filgueira <i>et al.</i> (present study)

MATERIAL AND METHODS

Collection and acclimation of experimental mussels

Mytilus galloprovincialis (Lamarck 1819) were collected from a cultivation raft in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). Individuals 59 ± 2.5 mm in length were selected and epibionts were removed. The mussels were maintained following the same procedure described by Filgueira *et al.* (2009).

Experimental diets

The diets were prepared by mixing pulverized sediment, Tahitian *Isochrysis* aff. *galbana*, and previously-lyophilized pulverized *Spartina* sp. in variable proportions (table 2). *Isochrysis galbana* was cultivated in 50-L tanks under controlled conditions, the sediment was collected from the seafloor below the rafts, and *Spartina* was collected along the coast by cutting the stem of living plants. The detritus of the last two compounds was dried, pulverized, and sieved using a 50- μm nylon mesh. The seawater in the holding tank was filtered using a cartridge filtration system (CUNO Super Micro-Wynd 10, 5, and 1 μm ; CUNO Betapure 0.5 μm) with an effective pore space of 0.5 μm , followed by UV treatment. At the beginning of the experiment the diets were prepared by mixing the different components in a tank. This tank was strongly aerated in order to maintain homogeneity and avoid particle sedimentation.

juega un papel importante en el desarrollo de los mejillones (Freites *et al.* 2003) y son empleadas frecuentemente en modelos ecofisiológicos (ver tabla 1). Este enfoque permitió (1) la identificación de las variables del seston que afectan la TA en mayor medida y (2) una descripción matemática de la respuesta de TA según las características tróficas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección y aclimatación de mejillones

Se recolectaron ejemplares de *M. galloprovincialis* (Lamarck 1819) de una batea de cultivo en la Ría de Arousa (Galicia, NO de España), y se seleccionaron individuos de 59 ± 2.5 mm de longitud a los que se retiraron los epibiontes. Los mejillones se mantuvieron según el procedimiento descrito por Filgueira *et al.* (2009).

Diets experimentales

Las dietas se prepararon mezclando proporciones variables de sedimento pulverizado, *Isochrysis* aff. *galbana* (variedad tahitiana) y *Spartina* sp. pulverizada y previamente liofilizada (tabla 2). *I. galbana* se cultivó en tanques de 50 L en condiciones controladas, el sedimento se recolectó del lecho marino debajo de las bateas, y *Spartina* se recolectó a lo largo de la costa cortando el tallo de plantas vivas. El detritus de los dos últimos componentes se secó, pulverizó y

Table 2. Composition (Phyto., *Isochrysis galbana*; Sed., sediment; Det., *Spartina* sp.) and characteristics of the experimental diets: total particulate matter (TPM), particulate organic matter (POM), seston quality in terms of organic content ($f = \text{POM/TPM}$), and chlorophyll content (Chla). The density of microalgal cells can be calculated following the equivalence $1 \mu\text{g L}^{-1} \approx 2500 \text{ cells mL}^{-1}$.

Tabla 2. Composición (Phyto., *Isochrysis galbana*; Sed., sedimento; Det., *Spartina* sp.) y características de las dietas experimentales: material particulado total (TPM), materia orgánica particulada (POM), calidad del seston en términos de contenido orgánico ($f = \text{POM/TPM}$), y contenido de clorofila (Chla). La densidad de las células de microalgas puede calcularse con la siguiente equivalencia: $1 \mu\text{g L}^{-1} \approx 2500 \text{ cél mL}^{-1}$.

Composition	TPM (mg L ⁻¹)	POM (mg L ⁻¹)	f	Chla (μg L ⁻¹)
Phyto./Sed.	1.28 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.30 ± 0.007	0.20 ± 0.072
Phyto./Sed.	1.57 ± 0.08	0.44 ± 0.02	0.28 ± 0.004	0.34 ± 0.013
Phyto./Sed./Det.	1.34 ± 0.08	0.95 ± 0.04	0.71 ± 0.004	0.48 ± 0.013
Phyto./Sed./Det.	1.49 ± 0.10	1.05 ± 0.04	0.70 ± 0.002	0.58 ± 0.010
Phyto./Sed./Det.	1.57 ± 0.04	1.07 ± 0.01	0.68 ± 0.007	0.61 ± 0.067
Phyto./Sed./Det.	1.62 ± 0.03	1.05 ± 0.07	0.64 ± 0.003	0.66 ± 0.017
Phyto./Sed.	1.35 ± 0.07	0.48 ± 0.03	0.36 ± 0.006	0.71 ± 0.041
Phyto./Sed.	1.13 ± 0.04	0.45 ± 0.03	0.40 ± 0.009	0.88 ± 0.036
Phyto./Sed./Det.	0.39 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.54 ± 0.002	1.14 ± 0.059
Phyto./Sed./Det.	0.95 ± 0.10	0.49 ± 0.02	0.52 ± 0.003	1.17 ± 0.044
Phyto./Sed.	1.07 ± 0.04	0.46 ± 0.02	0.43 ± 0.009	1.76 ± 0.084
Phyto./Sed.	1.11 ± 0.11	0.42 ± 0.02	0.37 ± 0.002	1.93 ± 0.087
Phyto./Sed./Det.	1.15 ± 0.02	0.54 ± 0.01	0.47 ± 0.001	1.94 ± 0.084
Phyto./Sed.	1.75 ± 0.16	0.52 ± 0.01	0.29 ± 0.005	2.00 ± 8.024
Phyto./Sed.	1.23 ± 0.06	0.49 ± 0.01	0.40 ± 0.006	2.73 ± 0.130
Phyto./Sed.	0.90 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.52 ± 0.003	2.74 ± 0.094
Phyto./Sed.	1.33 ± 0.08	0.49 ± 0.01	0.37 ± 0.001	2.82 ± 0.124
Phyto./Sed./Det.	1.09 ± 0.13	0.60 ± 0.08	0.55 ± 0.003	3.10 ± 0.044
Phyto./Sed./Det.	1.06 ± 0.10	0.65 ± 0.04	0.61 ± 0.002	3.37 ± 0.067
Phyto./Sed.	1.23 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.49 ± 0.001	3.38 ± 0.144
Phyto./Sed.	0.60 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.60 ± 0.002	4.00 ± 0.067
Phyto./Sed.	1.11 ± 0.11	0.42 ± 0.02	0.37 ± 0.002	4.19 ± 0.146
Phyto./Sed./Det.	1.07 ± 0.08	0.54 ± 0.03	0.50 ± 0.008	4.27 ± 0.131
Phyto./Sed./Det.	0.92 ± 0.04	0.51 ± 0.01	0.56 ± 0.001	5.22 ± 0.018
Phyto./Sed.	0.76 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.62 ± 0.002	5.40 ± 0.112
Phyto./Sed.	1.09 ± 0.10	0.77 ± 0.01	0.70 ± 0.005	5.47 ± 0.185
Phyto./Sed.	1.26 ± 0.02	0.59 ± 0.01	0.47 ± 0.006	5.49 ± 0.099
Phyto./Sed./Det.	0.90 ± 0.07	0.54 ± 0.03	0.59 ± 0.002	5.74 ± 0.127
Phyto./Sed.	1.20 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.71 ± 0.005	5.88 ± 0.182
Phyto./Sed.	1.24 ± 0.12	0.57 ± 0.02	0.46 ± 0.003	5.96 ± 0.167
Phyto./Sed.	0.79 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.62 ± 0.003	6.37 ± 0.032
Phyto./Sed.	1.43 ± 0.08	0.72 ± 0.02	0.50 ± 0.002	8.78 ± 0.194

Measurements of the dietary characteristics (TPM, POM, and Chla) were taken in triplicate for each diet following the procedure described by Filgueira *et al.* (2009). The characteristics (Chla, TPM, and f) of the 32 diets (table 2) covered the typical range observed in Galician rías. The trophic conditions of the Galician rías and those used in this study are shown in table 3. The ría TPM, POM, and f values are similar to those tested in this study, although TPM can reach higher

tamizó con una malla de nilón de 50 μm de luz. El agua de mar en el tanque de almacenamiento fue filtrada a través de un sistema de cartucho (CUNO Super Micro-Wynd de 10, 5 y 1 μm; CUNO Betapure de 0.5 μm), con un tamaño de poro efectivo de 0.5 μm, y tratada con luz UV. Al inicio del experimento las dietas se prepararon mezclando los diferentes componentes en un tanque con aireación intensa para mantener la homogeneidad y evitar la sedimentación de partículas.

Table 3. Observed trophic conditions of the Galician rías and the experimental conditions analyzed in this study: total particulate matter (TPM), particulate organic matter (POM), seston quality in terms of organic content ($f = \text{POM}/\text{TPM}$), and chlorophyll content (Chla). From PROVIGO (1996), Babarro *et al.* (2000), and own unpublished data.

Tabla 3. Condiciones tróficas observadas en las rías gallegas y las condiciones experimentales analizadas en este estudio: materia particulada total (TPM), materia orgánica particulada (POM), calidad del seston en términos de su contenido orgánico ($f = \text{POM}/\text{TPM}$) y contenido de clorofila (Chla). De PROVIGO (1996), Babarro *et al.* (2000) y datos propios no publicados.

		TPM (mg L ⁻¹)	POM (mg L ⁻¹)	f	Chla (µg L ⁻¹)
Ría	Maximum	2.56	1.00	0.63	34.2
	Minimum	0.49	0.28	0.27	0.1
	Average	1.05	0.48	0.48	4.6
Present study	Maximum	1.75	1.08	0.71	8.8
	Minimum	0.39	0.21	0.28	0.2

values during sporadic storm events. The studied range of chlorophyll covered 89.4% of the values observed over a 9-yr study (833 samples, PROVIGO 1996). The present study did not account for the exceptionally high chlorophyll concentrations during phytoplankton blooms.

Clearance rate measurement and standardization

For each diet, ten individual chambers with mussels and one control chamber without mussels were used to determine the CR. Different mussels were exposed to each treatment. The CR was estimated with the flow-through chamber method following the methodology described by Filgueira *et al.* (2006). The experiments were run over 4 h, and CR measurements were performed after 2, 3, and 4 h. Mussels that spawned during the experiments were removed from the analyses.

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

$$\text{CR}_{\text{std}} = \text{CR}_{\text{exp}} \times (L_{\text{std}} \times L_{\text{exp}}^{-1})^b \quad (1)$$

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

Protocol for selecting the best regression model: CR vs TPM, f , Chla

TPM, f , Chla, their linear combination, quadratic terms, and first order interaction terms were all considered as potential independent variables in the regression model that best explained variation in the mussel CR. Estimation and selection of the regression model was performed using the following protocol. First, the variance explained by each independent variable and all possible combinations of independent variables were calculated using multiple regression (Best Subsets Procedure of Statistica 6.0). Second, the

Las mediciones de MPT, MOP y Chla se tomaron por triplicado para cada dieta siguiendo el procedimiento descrito por Filgueira *et al.* (2009). Las características (Chla, MPT y f) de las 32 dietas (tabla 2) cubrieron el intervalo típico observado en las rías gallegas. Las condiciones tróficas de estas rías y las usadas en este estudio se muestran en la tabla 3. Los valores de MPT, MOP y f de las rías son similares a los aquí analizados, aunque MPT puede ser mayor durante tormentas esporádicas. El intervalo de clorofila analizado cubrió 89.4% de los valores observados durante un estudio de nueve años (833 muestras, PROVIGO 1996). En el presente trabajo no se consideraron las concentraciones de clorofila excepcionalmente altas que ocurren durante los florecimientos fitoplanctónicos.

Medición y estandarización de la tasa de aclaramiento

Para estimar TA, para cada dieta se usaron diez cámaras individuales con mejillones y una cámara control sin ellos. En cada tratamiento se usaron diferentes mejillones. La TA se estimó con el método de cámara de flujo continuo siguiendo la metodología descrita por Filgueira *et al.* (2006). Los experimentos se realizaron durante 4 h, realizando las mediciones de TA después de 2, 3 y 4 h. Los mejillones que desovaron durante los experimentos fueron descartados de los análisis.

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

$$\text{TA}_{\text{std}} = \text{TA}_{\text{exp}} \times (L_{\text{std}} \times L_{\text{exp}}^{-1})^b \quad (1)$$

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

Protocolo para seleccionar el mejor modelo de regresión: TA vs MPT, f , Chla

Se consideraron MPT, f , Chla, su combinación lineal, términos cuadráticos y términos de interacción de primer

regression models that (1) explained high variance and (2) had statistically significant parameters when non-linear estimation was applied (least-squares procedure and Levenberg-Marquardt method, Statistica 6.0) were selected as potential best models. Lastly, Akaike's information criterion (AIC; Motulsky and Christopoulos 2004) was used to select the most suitable regression model between the potential models selected in the second step. This approach was used to calculate a comparison coefficient (AIC) for each regression by considering the number of cases, parameters, and the square sum of regression residuals.

RESULTS

Experimental diets

The characteristics of the 32 experimental diets are shown in table 2. The Pearson correlation coefficient (r) did not show a statistically significant correlation between these variables ($r_{\text{Chla} \times \text{TPM}} = -0.288$, $P = 0.110$; $r_{\text{Chla} \times f} = 0.252$, $P = 0.163$; $r_{\text{TPM} \times f} = -0.235$, $P = 0.196$). In addition, the variation inflation factors showed values near to one ($\text{VIF}_{\text{Chla}} = 1.13$, $\text{VIF}_{\text{TPM}} = 1.12$, $\text{VIF}_f = 1.10$), which indicated that the multicollinearity was negligible.

Regression models: CR vs TPM, f , Chla

The non-linear regression model that best explained the experimental results included the linear terms of f , TPM, and Chla, as well as the quadratic term of TPM and the interaction between f and Chla. The response surface can be described by the following equation:

$$\text{CR} = -7.15 \pm 0.80 f - 0.61 \pm 0.15 \text{ Chla} + 8.12 \pm 1.29 \text{ TPM} - 3.48 \pm 0.58 \text{ TPM}^2 + 1.35 \pm 0.27 f \text{ Chla} + 2.45 \pm 0.84 \quad (2)$$

$$r^2 = 0.85, P < 0.001, n = 32$$

The same statistical protocol was applied to pairwise analyses between TPM and Chla, TPM and f , and Chla and f . These analyses are particular cases of the previous one, but they provide new perspectives concerning the role of the independent variables and allow three-dimensional visualization of the regression models.

The response of CR as a function of the seston organic content or quality (f) and TPM is shown in figure 1. The non-linear regression model that best explained the results is described by the following equation:

$$\text{CR} = 17.68 \pm 2.63 \text{ TPM} - 5.27 \pm 0.72 \text{ TPM}^2 - 11.04 \pm 2.82 \text{ TPM} f + 10.8 \pm 3.82 f - 8.47 \pm 2.57 \quad (3)$$

$$r^2 = 0.78, P < 0.001, n = 32$$

orden como variables independientes potenciales en el modelo de regresión que mejor explicó la variación de TA. La estimación y selección del modelo de regresión se realizó siguiendo el siguiente protocolo. Primero se calculó la varianza explicada por cada variable independiente y todas las posibles combinaciones de las variables independientes mediante regresión múltiple (Best Subsets Procedure en Statistica 6.0). Después se seleccionaron como mejores modelos potenciales aquellos modelos de regresión que (1) explicaban gran parte de la varianza y (2) presentaban parámetros estadísticamente significativos al aplicar una estimación no lineal (procedimiento de mínimos cuadrados y método de Levenberg-Marquardt en Statistica 6.0). Por último, se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC; Motulsky y Christopoulos 2004) para seleccionar el modelo de regresión más adecuado de entre los modelos potenciales seleccionados. Se utilizó este enfoque para calcular un coeficiente de comparación (AIC) para cada regresión considerando el número de casos, los parámetros y la suma de cuadrados de los residuales de regresión.

RESULTADOS

Dietas experimentales

En la tabla 2 se muestran las características de las 32 dietas experimentales. El coeficiente de correlación de Pearson (r) no presentó una correlación estadísticamente significativa entre las variables ($r_{\text{Chla} \times \text{MPT}} = -0.288$, $P = 0.110$; $r_{\text{Chla} \times f} = 0.252$, $P = 0.163$; $r_{\text{MPT} \times f} = -0.235$, $P = 0.196$). Además, los factores de inflación de la varianza mostraron valores cercanos a uno ($\text{VIF}_{\text{Chla}} = 1.13$, $\text{VIF}_{\text{MPT}} = 1.12$, $\text{VIF}_f = 1.10$), lo que indica que la multicolinealidad fue insignificante.

Modelos de regresión: TA vs MPT, f , Chla

El modelo de regresión no lineal que mejor explicó los resultados experimentales incluyó los términos lineales de f , MPT y Chla, así como el término cuadrático de MPT y la interacción entre f y Chla. La superficie de respuesta se puede describir con la siguiente ecuación:

$$\text{CR} = -7.15 \pm 0.80 f - 0.61 \pm 0.15 \text{ Chla} + 8.12 \pm 1.29 \text{ TPM} - 3.48 \pm 0.58 \text{ TPM}^2 + 1.35 \pm 0.27 f \text{ Chla} + 2.45 \pm 0.84 \quad (2)$$

$$r^2 = 0.85, P < 0.001, n = 32$$

Se aplicó el mismo protocolo estadístico a los análisis de pares entre MPT y Chla, MPT y f , y Chla y f , los cuales son casos particulares del anterior, pero aportan nuevas pistas en cuanto al papel de las variables independientes y permiten una visualización tridimensional de los modelos de regresión.

En la figura 1 se muestra la respuesta de TA en función del contenido orgánico o calidad del seston (f) y MPT. El

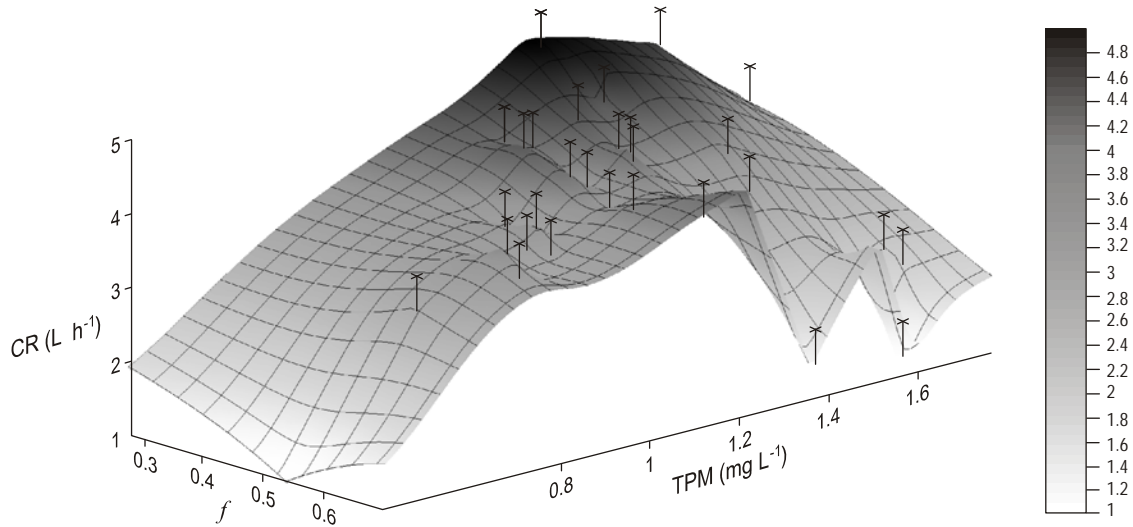


Figure 1. Average clearance rate (CR) vs total particulate matter (TPM) and seston quality in terms of organic content (f) of the diet. Each point is the average of 10 individuals and the CR was measured three times in each individual in a 4-h period.

Figura 1. Tasa de aclaramiento (CR) media vs material particulado total (TPM) y calidad del seston en términos de contenido orgánico (f) de la dieta. Cada punto es el promedio de 10 individuos y la tasa se midió tres veces en cada individuo en un periodo de 4 h.

As in equation 2, the quadratic term indicated an optimum TPM that maximizes the CR; however, the interaction term (TPM \times f) implied that the optimum value depended on f . The relationship between optimum TPM and f that maximizes the CR was calculated by applying differential calculus:

$$\text{TPM}_{\text{opt}} = 1.68 \pm 0.34 - 1.05 \pm 0.30 f \quad (4)$$

The variation of CR as a function of both TPM and Chla is shown in figure 2. The non-linear regression that best explained the results depended exclusively on TPM. The response surface can be described by the following equation:

$$\text{CR} = 9.97 \pm 2.45 \text{ TPM} - 4.34 \pm 1.08 \text{ TPM}^2 - 1.78 \pm 1.36 \quad (5)$$

$$r^2 = 0.36, P < 0.001, n = 32$$

According to this equation, maximum CR values were observed with $1.15 \pm 0.40 \text{ mg TPM L}^{-1}$.

The variation of CR as a function of Chla and f is shown in figure 3. The non-linear regression that best explained the results is described by the following equation:

$$\text{CR} = -7.63 \pm 1.22 f - 0.56 \pm 0.23 \text{ Chla} + 1.33 \pm 0.41 f \text{ Chla} + 7.01 \pm 0.64 \quad (6)$$

$$r^2 = 0.62, P < 0.001, n = 32$$

The CR decreased sharply with increasing f value when Chla was low (fig. 3). This is evidence that a chlorophyll threshold level may exist that determines mussel behaviour. For *M. edulis* this threshold has been established between 0.5

modelo de regresión no lineal que mejor explicó los resultados se describe con la ecuación:

$$\text{CR} = 17.68 \pm 2.63 \text{ TPM} - 5.27 \pm 0.72 \text{ TPM}^2 - 11.04 \pm 2.82 \text{ TPM} \cdot f + 10.8 \pm 3.82 f - 8.47 \pm 2.57 \quad (3)$$

$$r^2 = 0.78, P < 0.001, n = 32$$

Al igual que en la ecuación 2, el término cuadrático indicó un MPT óptimo que maximiza TA; sin embargo, el término de interacción (MPT \times f) sugirió que el valor óptimo depende de f . La relación entre el MPT óptimo y f que maximiza TA se estimó mediante cálculo diferencial:

$$\text{TPM}_{\text{opt}} = 1.68 \pm 0.34 - 1.05 \pm 0.30 f \quad (4)$$

En la figura 2 se muestra la variación de TA en función tanto de MPT como de Chla. La regresión no lineal que mejor explicó los resultados dependió exclusivamente de MPT. La superficie de respuesta puede describirse con la siguiente ecuación:

$$\text{CR} = 9.97 \pm 2.45 \text{ TPM} - 4.34 \pm 1.08 \text{ TPM}^2 - 1.78 \pm 1.36 \quad (5)$$

$$r^2 = 0.36, P < 0.001, n = 32$$

De acuerdo con esta ecuación, los valores máximos de TA se obtuvieron con $1.15 \pm 0.40 \text{ mg MPT L}^{-1}$.

En la figura 3 se muestra la variación de TA en función de Chla y f . La regresión no lineal que mejor explicó los resultados se describe con la siguiente ecuación:

$$\text{CR} = -7.63 \pm 1.22 f - 0.56 \pm 0.23 \text{ Chla} + 1.33 \pm 0.41 f \text{ Chla} + 7.01 \pm 0.64 \quad (6)$$

$$r^2 = 0.62, P < 0.001, n = 32$$

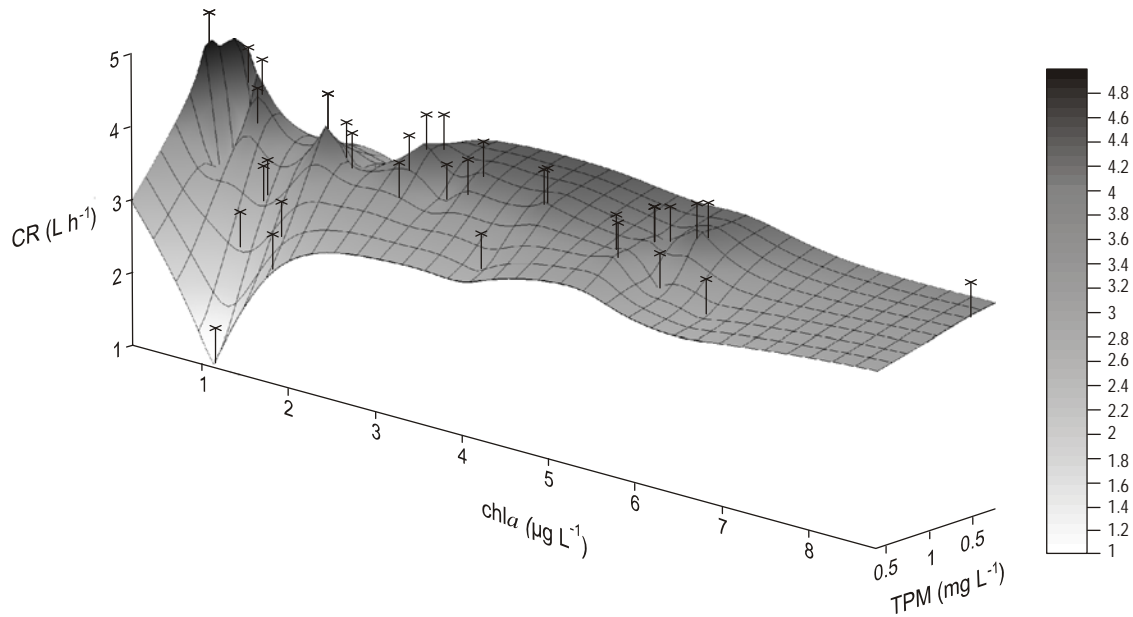


Figure 2. Average clearance rate (CR) vs total particulate matter (TPM) and chlorophyll content (Chla) of the diet. Each point is the average of 10 individuals and the CR was measured three times in each individual in a 4-h period.

Figura 2. Tasa de aclaramiento (CR) media vs material particulado total (TPM) y contenido de clorofila (Chla) de la dieta. Cada punto es el promedio de 10 individuos y la tasa se midió tres veces en cada individuo en un periodo de 4 h.

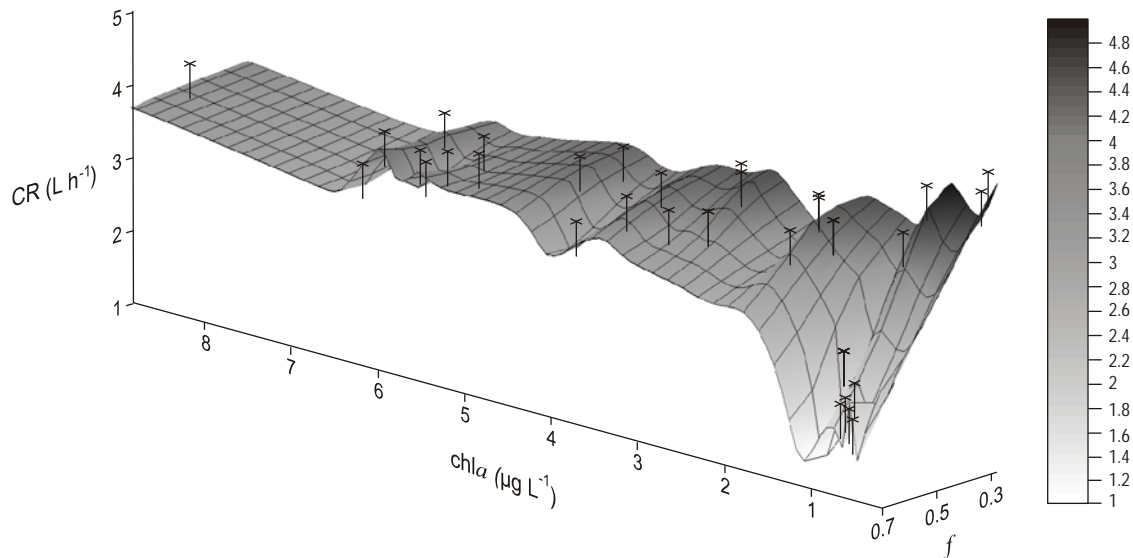


Figure 3. Average clearance rate vs seston quality in terms of organic content (f) and chlorophyll content (Chla) of the diet. Each point is the average of 10 individuals and the CR was measured three times in each individual in a 4-h period.

Figura 3. Tasa de aclaramiento (CR) media vs calidad del seston en términos de contenido orgánico (f) y contenido de clorofila (Chla) de la dieta. Cada punto es el promedio de 10 individuos y la tasa se midió tres veces en cada individuo en un periodo de 4 h.

and $1.0 \mu\text{g Chla L}^{-1}$ (Dolmer 2000, Pascoe *et al.* 2009). According to the results of our experiment, for *M. galloprovincialis* this threshold could be established between 1.18 and $1.75 \mu\text{g Chla L}^{-1}$.

This threshold suggested the possibility of segregating the diets into two groups depending on Chla. The segregation showed a change in the best regression explaining CR when TPM, f , and Chla were considered simultaneously (eq. 2).

La TA decreció marcadamente al incrementarse el valor de f cuando Chla era baja (fig. 3). Esto evidencia la posible existencia de un umbral de clorofila que determina el comportamiento de los mejillones. Para *M. edulis* se ha establecido este umbral entre 0.5 y $1.0 \mu\text{g Chla L}^{-1}$ (Dolmer 2000, Pascoe *et al.* 2009). De acuerdo con los resultados del presente trabajo, para *M. galloprovincialis* este umbral podría establecerse entre 1.18 y $1.75 \mu\text{g Chla L}^{-1}$.

For diets with Chla above the threshold, the best regression depended exclusively on TPM. The response surface is described by the equation:

$$CR = 5.13 \pm 1.10 \text{ TPM} - 2.04 \pm 0.47 \text{ TPM}^2 + 0.76 \pm 0.63 \quad (7)$$

$$r^2 = 0.56, P < 0.001, n = 22$$

The quadratic relationship between CR and TPM showed that an optimum TPM of $1.26 \pm 0.40 \text{ mg L}^{-1}$ reported maximum CR values.

For diets with Chla below the threshold, the best regression explaining variation in CR was simpler than the regression that included all diets simultaneously (eq. 2). In fact, the chlorophyll terms were not significant in the new regression:

$$CR = 7.51 \pm 3.05 \text{ TPM} - 3.01 \pm 1.46 \text{ TPM}^2 - 6.86 \pm 1.27 f + 2.26 \pm 1.73 \quad (8)$$

$$r^2 = 0.89, P < 0.001, n = 10$$

The quadratic relationship between CR and TPM revealed an optimum TPM of $1.26 \pm 0.59 \text{ mg L}^{-1}$ that maximized CR.

The pairwise analyses identified a sharp change in the CR response depending on Chla that is supported by previous studies (Dolmer 2000, Pascoe *et al.* 2009). The segregation of the experimental diets depending on the chlorophyll threshold ($1.18\text{--}1.75 \mu\text{g Chla L}^{-1}$) improved the regression models, increasing the explained variance. First, diets with Chla above the threshold caused a consistent CR response ($3.2\text{--}4.3 \text{ L h}^{-1}$), which could be explained in terms of TPM (eq. 7), showing maximum CR values at $1.26 \text{ mg TPM L}^{-1}$. Second, diets with Chla below the threshold caused very different responses of CR (ranging from 1.0 to 5.0 L h^{-1}). This could be explained in terms of TPM and the quality (organic content) of the diet, showing an inverse relationship between CR and f and maximum CR values at $1.25 \text{ mg TPM L}^{-1}$ (eq. 8). Therefore, although Chla is not explicitly in the regression models, it is involved in CR regulation as an important threshold variable.

DISCUSSION

Despite the prolific literature regarding CR response in mussels, the effect of different seston variables on its regulation is not yet conclusive. One of the most important shortcomings in this research field is related to the failure to address multicollinearity. The conclusions of experiments in which multicollinearity occurs are ambiguous and the effects of the explanatory variables on CR response are likely spurious. In the present paper the main methodological goal was to design a set of diets in order to avoid multicollinearity between the explanatory variables considered (TPM, f , and Chla). The analysis showed that these variables were not correlated and the variation inflation factors highlighted that

Este umbral sugirió la posibilidad de segregar las dietas en dos grupos según la Chla. Tal segregación mostró un cambio en la regresión que mejor explicaba TA cuando MPT, f y Chla fueron considerados simultáneamente (ec. 2). Para las dietas con Chla por encima del umbral, la mejor regresión dependió sólo de MPT. La superficie de respuesta está dada por:

$$CR = 5.13 \pm 1.10 \text{ TPM} - 2.04 \pm 0.47 \text{ TPM}^2 + 0.76 \pm 0.63 \quad (7)$$

$$r^2 = 0.56, P < 0.001, n = 22$$

La relación cuadrática entre TA y MPT mostró que los valores máximos de TA se obtuvieron con un MPT óptimo de $1.26 \pm 0.40 \text{ mg L}^{-1}$.

Para las dietas con Chla por debajo del umbral, la regresión que mejor explicó la variación de TA fue más simple que la regresión que incluyó todas las dietas simultáneamente (ec. 2). De hecho, los términos de clorofila no fueron significativos en la nueva regresión:

$$CR = 7.51 \pm 3.05 \text{ TPM} - 3.01 \pm 1.46 \text{ TPM}^2 - 6.86 \pm 1.27 f + 2.26 \pm 1.73 \quad (8)$$

$$r^2 = 0.89, P < 0.001, n = 10$$

La relación cuadrática entre TA y MPT mostró un MPT óptimo de $1.26 \pm 0.59 \text{ mg L}^{-1}$ que maximizó la TA.

El análisis de pares identificó un cambio fuerte en la respuesta de TA, dependiente de Chla, lo cual ha sido corroborado en otros estudios (Dolmer 2000, Pascoe *et al.* 2009). La segregación de las dietas experimentales según el umbral de clorofila ($1.18\text{--}1.75 \mu\text{g Chla L}^{-1}$) mejoró el ajuste de los modelos de regresión incrementando la varianza explicada. Primero, las dietas con Chla por encima del umbral provocaron una respuesta consistente de TA ($3.2\text{--}4.3 \text{ L h}^{-1}$), lo que podría explicarse en términos de MPT (ec. 7), con valores máximos de TA a $1.26 \text{ mg MPT L}^{-1}$. Segundo, las dietas con Chla por debajo del umbral provocaron respuestas muy diferentes en TA (de 1.0 a 5.0 L h^{-1}), lo que podría explicarse en términos de MPT y la calidad de la dieta, con una relación inversa entre TA y f , y valores máximos de TA a $1.25 \text{ mg MPT L}^{-1}$ (ec. 8). Por tanto, aunque Chla no esté explícita en los modelos de regresión, si está involucrada en la regulación de TA como una variable umbral importante.

DISCUSIÓN

A pesar de la cuantiosa literatura alusiva a la respuesta de TA en los mejillones, la información sobre el efecto de diferentes variables del seston en su regulación aún no es concluyente. Una falla importante en investigaciones previas ha sido no considerar la multicolinealidad. Las conclusiones de los experimentos que presentan multicolinealidad son ambiguos y los efectos de las variables explicativas en la

the multicollinearity was negligible. After a thorough literature review we consider that this is the first study to take multicollinearity into account in the experimental design, strengthening the conclusions of the experiments.

Several studies have established that bivalves regulate their CR to optimize energy uptake (Bayne *et al.* 1993, Velasco and Navarro 2002). In the present analysis, this physiological response was examined using functional relationships between CR and different environmental variables. The quadratic relationship observed between CR and TPM (eqs. 7, 8) indicates that maximum CR values occur at seston concentrations of 1.25 mg L^{-1} . Kiørboe *et al.* (1981) observed a similar pattern in *M. edulis*, although a comparison of TPM concentrations associated with maximum CR values is precluded by different dietary composition and characterization methods. Other studies have reported a wide spectrum of relationships between CR and TPM in *M. edulis*, including inverse relationships (Kiørboe *et al.* 1980, Clausen and Riisgård 1996) and direct relationships (Newell and Shumway 1993, Hawkins *et al.* 1996). The disagreement among studies may be related to seston concentration or correlation between the explanatory variables.

Our results suggest that Chla could be considered a threshold variable that changes the CR response depending on whether the concentration in a diet is above or below the threshold. Diets containing $>1.18\text{--}1.75 \mu\text{g Chla L}^{-1}$ cause a consistent CR response that depends exclusively on TPM (eq. 7). Below this threshold, a very different CR response is observed (ranging from 1.0 to 5.0 L h^{-1}), which can be explained by the TPM and the organic content quality of the diet (eq. 8). The change in CR in response to diets containing low Chla has been observed in other studies. Several authors have reported a complete cessation of filtration activity in *M. edulis* at $0.5\text{--}1 \mu\text{g Chla L}^{-1}$ (see review by Dolmer 2000). Hawkins *et al.* (1999) and James *et al.* (2001), using *Perna canaliculus*, and Hawkins *et al.* (2001), using *Chlamys farreri*, observed a reduction in filtration activity, although without total cessation. Pascoe *et al.* (2009) observed a reduction in both CR and the number of feeding animals for *M. edulis*, a reduction that was also observed recently by Strohmeier *et al.* (2009) for *M. edulis* and *Pecten maximus*. Filgueira *et al.* (2009) performed a 9-h experiment and observed a constant and high CR in *M. galloprovincialis* during the first 3 h. These results differ from the present study in which mussels that were fed diets containing high organic content responded with a significant reduction in CR (eq. 8) at the beginning of the experiment. An inverse relationship between CR and f has been reported for *M. edulis* (Bayne *et al.* 1993) and *M. chilensis* (Velasco and Navarro 2002), although with higher seston content diets. In some cases, the increase in CR in response to low organic content diets has been accompanied by particle selection in the labial palps and, consequently, an increase in organic ingestion efficiency (Bayne *et al.* 1993, Hawkins *et al.* 1996); however, pseudo-faeces production was not observed in this experiment.

respuesta de TA muy probablemente son espurios. Aquí el principal objetivo metodológico fue diseñar un conjunto de dietas para evitar la multicolinealidad entre las variables explicativas consideradas (MPT, f y Chla). El análisis mostró que estas variables no estuvieron correlacionadas y los factores de inflación de la varianza indicaron que la multicolinealidad era insignificante. Después de una extensa revisión de la literatura, creemos que este estudio es el primero en considerar la multicolinealidad en el diseño experimental, fortaleciendo así las conclusiones.

Varios estudios han establecido que los bivalvos regulan su TA para optimizar la asimilación de energía (Bayne *et al.* 1993, Velasco y Navarro 2002). En el presente trabajo se analizó esta respuesta fisiológica mediante relaciones funcionales entre TA y diferentes variables ambientales. La relación cuadrática observada entre TA y MPT (ecs. 7, 8) indica que los valores máximos de TA se presentan a concentraciones de seston de 1.25 mg L^{-1} . Kiørboe *et al.* (1981) observaron un patrón similar en *M. edulis*, aunque no es posible hacer una comparación de las concentraciones de MPT asociadas con los valores máximos de TA ya que la composición dietética y los métodos de caracterización empleados fueron diferentes. Otros estudios han encontrado un amplio espectro de relaciones entre TA y MPT en *M. edulis*, incluyendo relaciones inversas (Kiørboe *et al.* 1980, Clausen y Riisgård 1996) y directas (Newell y Shumway 1993, Hawkins *et al.* 1996). La disparidad entre estudios puede estar relacionada con la concentración de seston o la correlación entre las variables explicativas.

Nuestros resultados sugieren que Chla podría considerarse una variable umbral que cambia la respuesta de TA dependiendo de si la concentración en la dieta está por encima o por debajo del umbral. Las dietas con Chla $>1.18\text{--}1.75 \mu\text{g L}^{-1}$ provocan una respuesta consistente de TA que depende exclusivamente de MPT (ec. 7). Por debajo de este umbral se observa una respuesta de TA muy diferente (variando de 1.0 a 5.0 L h^{-1}) que podría ser explicada por MPT y la calidad en contenido orgánico de la dieta (ec. 8). En otros estudios se ha notado la respuesta de TA a dietas con baja Chla. Varios autores observaron una reducción total de la actividad de filtración en *M. edulis* a $0.5\text{--}1 \mu\text{g Chla L}^{-1}$ (ver revisión de Dolmer 2000). Hawkins *et al.* (1999) y James *et al.* (2001), trabajando con *Perna canaliculus*, y Hawkins *et al.* (2001), con *Chlamys farreri*, observaron una reducción en la actividad de filtración, pero sin cesarla. Pascoe *et al.* (2009) observaron en *M. edulis* una reducción tanto en TA como en el número de animales alimentándose, reducción que también fue observada recientemente por Strohmeier *et al.* (2009) en *M. edulis* y *Pecten maximus*. Filgueira *et al.* (2009), en un experimento de 9 h, observaron una TA constante y alta en *M. galloprovincialis* durante las primeras 3 h. Estos resultados difieren del presente trabajo en que aquí los mejillones que fueron alimentados con dietas con alto contenido orgánico presentaron una reducción significativa de TA (ec. 8) al principio del experimento. Se ha

The inverse relationship between diet organic content quality and CR has been interpreted as a physiological response to maintain a constant organic ingestion rate during periods of low total seston concentration (Bayne *et al.* 1987). In this case, CR response to diets below the 1.18–1.75 $\mu\text{g L}^{-1}$ chlorophyll threshold does not allow the animals to reach a constant organic ingestion rate (eq. 8), so the amount of ingested organic matter does not seem to be involved in CR regulation. On the other hand, Willows (1992) developed a theoretical model that assumes that CR is regulated by the capacity of the digestive system. Therefore, the balance between gut passage time and ingestion rate could be a key regulator of CR. Based on Willows' model, Fernández-Reiriz *et al.* (2007) suggested that in ecosystems with low seston concentration, such as the Galician rías (POM < 3 mg L^{-1}), mussel stomach volume is below maximum capacity, thus stimulating consistently high CR values; however, their results, as well as those presented here, do not support the assumptions of Willows' model since low CR values were observed in mussels fed low seston concentration diets, suggesting that the stomach capacity does not exclusively determine the CR.

One of the variables that may be important for CR regulation is the digestibility of the dietary components. Hawkins *et al.* (1999) suggested that CR regulation in mussels could be related to the content of phytoplanktonic organic matter in their food, which reflects the greater digestibility of chlorophyll-rich organics. Based on this hypothesis, the organic content (f) was segregated into three fractions, reflecting the different compounds that were used to prepare the diets: f_{micro} (POM_{microalgae}/TPM), f_{sed} (POM_{sediment}/TPM), and f_{det} (POM_{detritus}/TPM). These three f components together with TPM and Chla were considered explanatory variables and the same protocol described in the material and methods section was applied to select the best regression, which highlighted that CR depends exclusively on f_{det} :

$$\text{CR} = -1.05 \pm 0.41 f_{\text{det}} - 3.67 \pm 1.24 f_{\text{det}}^2 + 4 \pm 0.36 \quad (9)$$

$$r^2 = 0.60, P < 0.001, n = 32$$

This equation implies that maximum CR values occur in the absence of *Spartina* sp., and a significant decrease in CR occurs when the organic matter from *Spartina* sp. increases relative to the seston concentration. This response could reflect the low digestibility of *Spartina* sp. compared with the other main source of organic matter, *I. galbana*. Although it has been demonstrated that filter-feeding organisms can assimilate plant organic material, the presence of low digestibility components (cellulose and lignin) makes the process difficult (Duggins and Eckman 1997). This reduced digestibility could be related to polyphenolic compounds (Tugwell and Branch 1992), which have been shown to have a significant negative impact on the CR of *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* (Levinton *et al.* 2002). Therefore, the

encontrado una relación inversa entre TA y f para *M. edulis* (Bayne *et al.* 1993) y *M. chilensis* (Velasco y Navarro 2002), aunque con dietas con mayor contenido de seston. En algunos casos el incremento de TA en respuesta a dietas con bajo contenido orgánico ha ido acompañado por la selección de partículas en los palpos labiales y, consecuentemente, la eficiencia en la ingestión de materia orgánica se ha incrementado (Bayne *et al.* 1993, Hawkins *et al.* 1996). Sin embargo, en este experimento no se observó la producción de pseudoheces.

La relación inversa entre la calidad en contenido orgánico de la dieta y la TA se ha interpretado como una respuesta fisiológica para mantener una tasa constante de ingestión orgánica durante periodos de baja concentración de seston total (Bayne *et al.* 1987). En este caso, la respuesta de TA a las dietas por debajo del umbral de clorofila de 1.18–1.75 $\mu\text{g L}^{-1}$ no permite que los animales alcancen una tasa constante de ingestión orgánica (ec. 8), por lo que la cantidad de materia orgánica ingerida no parece estar involucrada en la regulación de TA. Por otro lado, Willows (1992) desarrolló un modelo teórico que supone que la TA es regulada por la capacidad del sistema digestivo. Por tanto, el balance entre el tiempo de residencia en el intestino y la tasa de ingestión podría ser un regulador clave de la TA. Con base en el modelo de Willows, Fernández-Reiriz *et al.* (2007) sugirieron que en ecosistemas con baja concentración de seston como las rías gallegas (MOP < 3 mg L^{-1}), el volumen estomacal de los mejillones se mantiene por debajo de su capacidad máxima, estimulando valores consistentemente altos de TA; sin embargo, sus resultados y los aquí presentados no sustentan las suposiciones del modelo de Willows ya que se observaron valores bajos de TA en mejillones cuyas dietas contenían bajas concentraciones de seston, lo que indica que TA no está determinada exclusivamente por la capacidad estomacal.

Una de las variables que podría ser importante en la regulación de TA es la digestibilidad de los componentes alimenticios. Según Hawkins *et al.* (1999), la regulación de TA en los mejillones podría estar relacionada con el contenido de materia orgánica fitoplanctónica en su dieta, lo que indica mayor digestibilidad de la materia orgánica rica en clorofila. Con base en esta hipótesis, se separó el contenido orgánico (f) en tres fracciones que reflejaran los diferentes componentes usados para preparar las dietas: f_{micro} (MOP_{microalgas}/MPT), f_{sed} (MOP_{sedimento}/MPT) y f_{det} (MOP_{detritus}/MPT). Estos tres componentes de f junto con MPT y Chla fueron considerados variables explicativas y se aplicó el mismo protocolo descrito en la sección de material y métodos para seleccionar la mejor regresión, mostrando que TA depende exclusivamente de f_{det} :

$$\text{CR} = -1.05 \pm 0.41 f_{\text{det}} - 3.67 \pm 1.24 f_{\text{det}}^2 + 4 \pm 0.36 \quad (9)$$

$$r^2 = 0.60, P < 0.001, n = 32$$

Esta ecuación sugiere que los valores máximos de TA se presentan en ausencia de *Spartina* sp., y que TA se reduce

reduction in CR observed in this study when mussels were fed diets of high quality in terms of organic content (f) and low Chla (below the 1.18–1.75 $\mu\text{g L}^{-1}$ threshold) could be due to the low digestibility of the principal component of these diets, that is, *Spartina* sp. Ward *et al.* (1998) observed that *C. gigas* had significantly lower CR for *Spartina alterniflora* particles than for *Rhodomonas lens* cells when they were offered in mixed diets. These authors suggested that the differences were probably caused by lower retention efficiency of *S. alterniflora* particles rather than by differences in the digestibility of each source. Other studies, however, have reported similar CR values for *Spartina* and other components of the diet in homorhabdic bivalves (*M. trossulus*, Ward *et al.* 1998; *Dreissena polymorpha*, Bastviken *et al.* 1998) like *M. galloprovincialis*. Ward *et al.* (1998) observed that *M. trossulus* was able to selectively reject *S. alterniflora* detritus over *R. lens*. In this process, CR regulation was not involved and selection was carried out in the labial palps, with the consequent formation of pseudo-faeces. The mussels showed an absence of pseudo-faeces production with our experimental diets, indicating that selective processes are not important to the energetic balance under experimental conditions representative of the Galician rías.

The diet-dependent CR reduction of *M. galloprovincialis* observed in this experiment could be interpreted as a physiological regulation process (Hawkins *et al.* 1996, Levinton *et al.* 2002, Pascoe *et al.* 2009). According to the segregation of the organic content into three fractions according to origin (pulverized sediment, *I. galbana*, and *Spartina* sp.), it can be suggested that the reduction in CR when mussels are fed high organic content diets with Chla below the threshold (1.18–1.75 $\mu\text{g L}^{-1}$) may be caused by a high percentage of low digestibility organic matter (f_{det} , eq. 9). Accordingly, when diets with $f_{\text{det}} > 0.4$ are excluded, a constant CR of $3.9 \pm 0.42 \text{ L h}^{-1}$ (Pearson coefficient of variation = 10.7%) is observed. This value is similar to that reported by Filgueira *et al.* (2009) with a similar experimental time and diets and the same chlorophyll range, yet composed exclusively of *I. galbana* and pulverized sediment. This average value is also similar to that observed in field experiments conducted by Navarro *et al.* (1991), Iglesias *et al.* (1996), Babarro *et al.* (2000), and Petersen *et al.* (2008) for *M. galloprovincialis* in Galician rías.

In conclusion, the CR response of *M. galloprovincialis* under experimental conditions representative of the Galician rías could be related only to the amount of low digestibility particles in the diet (eq. 9). The presence of *Spartina* sp. causes a significant reduction in CR, while the response is relatively consistent when diets with $f_{\text{det}} > 0.4$ are excluded from the analyses (Pearson coefficient of variation = 10.7%). The consistent CR values could suggest that the 1.18–1.75 $\mu\text{g L}^{-1}$ chlorophyll threshold is a statistical artifact caused by the diets with $f_{\text{det}} > 0.4$. This may explain that reported by Fernández-Reiriz *et al.* (2007), who stated that

significativamente cuando la materia orgánica de *Spartina* sp. aumenta en relación con la concentración de seston. Esta respuesta podría reflejar la baja digestibilidad de *Spartina* sp. en comparación con la otra fuente principal de materia orgánica, *I. galbana*. Aunque se ha demostrado que los organismos filtradores pueden asimilar materia orgánica vegetal, la presencia de componentes de baja digestibilidad (celulosa y lignina) dificulta este proceso (Duggins y Eckman 1997). Esta reducida digestibilidad podría estar relacionada con compuestos polifenólicos (Tugwell y Branch 1992), los cuales han mostrado tener un impacto negativo significativo en la TA de *Crassostrea gigas* y *Mytilus trossulus* (Levinton *et al.* 2002). Por tanto, la reducción en TA observada en este estudio al exponer los mejillones fueron a dietas con alta calidad en contenido orgánico (f) y baja Chla (debajo del umbral de 1.18–1.75 $\mu\text{g L}^{-1}$) podría deberse a la baja digestibilidad del componente principal de estas dietas, *Spartina* sp. Ward *et al.* (1998) observaron que *C. gigas* alimentado con dietas mixtas presentó una TA significativamente menor con partículas de *Spartina alterniflora* que con células de *Rhodomonas lens*, y sugirieron que las diferencias probablemente se debían a la menor eficiencia de retención de las partículas de *S. alterniflora* más que a diferencias en la digestibilidad de cada fuente. No obstante, otros estudios han observado valores similares para *Spartina* y otros componentes dietéticos en bivalvos homorhabdicos (*M. trossulus*, Ward *et al.* 1998; *Dreissena polymorpha*, Bastviken *et al.* 1998) como *M. galloprovincialis*. Según Ward *et al.* (1998), *M. trossulus* tiene la capacidad de rechazar selectivamente el detritus de *S. alterniflora* sobre el de *R. lens*. En este proceso no se presentó regulación de TA y la selección se realizó en los palpos labiales, con la consecuente formación de pseudo-heces. Con las dietas experimentales usadas en el presente estudio los mejillones no produjeron pseudoheces, lo que indica la poca importancia de los procesos de selección en el balance energético en condiciones experimentales representativas de las rías gallegas.

La reducción de TA observada aquí para *M. galloprovincialis* dependiendo de su dieta podría interpretarse como un proceso de regulación fisiológica (Hawkins *et al.* 1996, Levinton *et al.* 2002, Pascoe *et al.* 2009). Tras la segregación del contenido orgánico en tres fracciones según su origen (sedimento pulverizado, *I. galbana* y *Spartina* sp.), se puede sugerir que la reducción de TA al alimentar los mejillones con dietas de alto contenido orgánico con Chla debajo del umbral (1.18–1.75 $\mu\text{g L}^{-1}$) es producto de un alto porcentaje de materia orgánica de baja digestibilidad (f_{det} , ec. 9). Así, al excluir las dietas con $f_{\text{det}} > 0.4$ se observa una TA constante de $3.9 \pm 0.42 \text{ L h}^{-1}$ (coeficiente de variación de Pearson = 10.7%). Este valor es similar al encontrado por Filgueira *et al.* (2009) con tiempo y dietas experimentales similares y el mismo intervalo de clorofila, pero usando exclusivamente *I. galbana* y sedimento pulverizado. Este promedio también es similar a lo encontrado en los

CR regulation is not due to seston availability or chlorophyll levels, but rather illustrates a physiological feedback, which is not dependent on the capacity of the digestive system. In the present study, this feedback could be caused by a high percentage of poorly digestible organic matter in the diet. Further research is necessary to test this hypothesis, including the study of digestive balance and absorption efficiency.

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

- 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.
- Bastviken DTE, Caraco NF, Cole JJ. 1998. Experimental measurements of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) impacts on phytoplankton community composition. *Freshwat. Biol.* 39: 375–386.
- Bayne BL, Hawkins AJS, Navarro E. 1987. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L (Bivalvia: Mollusca) in mixture of silt and algal cells at low concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 111: 1–22.
- 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.
- 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.
- Duggins DO, Eckman JE. 1997. Is kelp detritus a good food for suspension feeders? Effects of kelp species, age and secondary metabolites. *Mar. Biol.* 128: 489–495.
- Fernández-Reiriz MJ, Duarte P, Labarta U. 2007. Modelos de comportamiento alimentario en el mejillón de las rías de Galicia. In: Figueras A (ed.), *Biología y Cultivo del Mejillón (Mytilus galloprovincialis) en Galicia*. Biblioteca de Ciencias (CSIC), Madrid, pp. 197–223.
- Figueiras FG, Labarta U, Fernández-Reiriz MJ. 2002. Coastal upwelling, primary production and mussel growth in the Rías Baixas of Galicia. *Hydrobiologia* 484: 121–131.
- 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.
- experimentos de campo realizados por Navarro *et al.* (1991), Iglesias *et al.* (1996), Babarro *et al.* (2000) y Petersen *et al.* (2008) con *M. galloprovincialis* en las rías de Galicia.
- En conclusión, la respuesta de TA en *M. galloprovincialis* en condiciones experimentales representativas de las rías gallegas está relacionada sólo con la cantidad de partículas de baja digestibilidad en la dieta (ec. 9). La presencia de *Spartina* sp. causa una reducción significativa de la TA, mientras que la respuesta es relativamente consistente cuando se excluyen las dietas con $f_{det} > 0.4$ de los análisis (coeficiente de variación de Pearson = 10.7%). Los valores consistentes de TA sugieren que el umbral de clorofila de 1.18–1.75 $\mu\text{g L}^{-1}$ es un artificio estadístico causado por las dietas con $f_{det} > 0.4$. Esto podría explicar lo observado por Fernández-Reiriz *et al.* (2007) en el sentido de que la regulación de TA no se debe a la disponibilidad de seston o a los niveles de clorofila, sino más bien demuestra una retroalimentación fisiológica que no depende de la capacidad del sistema digestivo. En el presente trabajo, esta retroalimentación podría atribuirse a un alto contenido de materia orgánica de baja digestibilidad en la dieta; sin embargo, se requieren ulteriores investigaciones para probar esta hipótesis, incluyendo estudios del balance digestivo y la eficiencia de absorción.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por PROINSA (proyecto CSIC 2004448), la Xunta de Galicia (PGDIT03RMA13E) y la UE (MABENE EVK3-2001-00144). El primer autor fue apoyado por CSIC-Xunta de Galicia y Caixanova con una beca para entrenamiento científico. Se agradece a L Nieto, B González y R Salgueiro (CSIC-España) su asistencia técnica en el laboratorio.

Traducido al español por Christine Harris.

- Filgueira R, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U. 2009. Clearance rate of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. I. Response to extreme chlorophyll ranges. *Cienc. Mar.* 35: 405–417.
- 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.
- Gardner JPA. 2002. Effects of seston variability on the clearance rate and absorption efficiency of the mussels *Aulacomya maoriana*, *Mytilus galloprovincialis* and *Perna canaliculus* from New Zealand. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268: 83–101.
- 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, Rickman 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* L): 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. *NZ J. Mar. Freshwat. Res.* 35: 73–86.
- 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.
- Kjørboe T, Møhlenberg F, Nøhr O. 1981. Effect of suspended bottom material on growth and energetics in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 61: 283–288.
- Levinton JS, Ward JE, Shumway SE. 2002. Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* to chemical composition of fresh and aged kelp detritus. *Mar. Biol.* 141: 367–376.
- Motulsky H, Christopoulos A. 2004. *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*. Oxford Univ. Press, Oxford, 351 pp.
- Navarro E, Iglesias JIP, Pérez-Camacho A, Labarta U, Beiras R. 1991. The physiological energetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis* L) from different cultivation rafts in the Ría de Arosa (Galicia, NW Spain). *Aquaculture* 94: 197–212.
- Neter J, Wasserman W. 1974. *Applied Linear Statistical Models*. Richard D Irwin, Homewood, Illinois, 842 pp.
- 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.
- 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.
- Petersen JK, Nielsen TG, van Duren L, Maar M. 2008. Depletion of plankton in a raft culture of *Mytilus galloprovincialis* in Ría de Vigo, NW Spain. I. Phytoplankton. *Aquat. Biol.* 4: 113–125.
- PROVIGO. 1996. Nueve Años de Muestreo Hidrográfico en la Ría de Vigo (Enero 1987–Enero 1996). Fundación PROVIGO, Vigo, 47 pp.
- 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.
- Tugwell S, Branch GM. 1992. Effects of herbivore gut surfactants on kelp polyphenol defenses. *Ecology* 73: 205–215.
- 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.
- Velasco LA, Navarro JM. 2005. Feeding physiology of two bivalves under laboratory and field conditions in response to variable food concentrations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 291: 115–124.
- 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.
- Ward JE, Levinton JS, Shumway SE, T Cucci. 1998. Particle sorting in bivalves: *In vivo* determination of the pallial organs of selection. *Mar. Biol.* 131: 283–292.
- Willows RI. 1992. Optimal digestive investment: A model for filter feeders experiencing variable diets. *Limnol. Oceanogr.* 37: 829–847.

Recibido en septiembre de 2009;
aceptado en noviembre de 2009.