

CAPÍTULO 11

EFFECTO DE BIOCIDAS Y TOLERANCIA A LA EXPOSICIÓN AL AIRE

MIRIAM E. MAROÑAS¹ Y CRISTINA DAMBORENEA²

INTRODUCCIÓN

Los problemas provocados por la introducción no intencional en la Cuenca del Plata del mejillón dorado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), impactan tanto en el ambiente natural como en el humano. En este último, el mejillón dorado produce severos daños en infraestructura de plantas industriales, potabilizadoras y generadoras de energía que toman agua de los ríos para su funcionamiento, provocando *macrofouling* en el agua dulce de América del Sur (Darrigran, 1997; Darrigran & Ezcurra de Drago, 2000). En América del Norte, la almeja asiática, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) y, en especial, el mitilido comúnmente conocido como mejillón cebra, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), ocasionan serios problemas en las industrias. Dada la amplia distribución de éste último mejillón y los serios perjuicios económicos que causa, existen numerosos estudios acerca de sus respuestas ecofisiológicas ante la exposición a sustancias químicas potencialmente utilizables como agentes de control y sobre la tolerancia de esta especie a la exposición al aire por tiempo prolongado. En perjuicio de las industrias sudamericanas, los conocimientos con respecto al mejillón dorado son escasos, a pesar del alto impacto ya provocado por esta especie.

En este capítulo presentaremos una síntesis de las experiencias llevadas a cabo por varios autores, tanto del ámbito local como internacional, sobre el efecto de diversos biocidas y sobre la tolerancia de *L. fortunei* a la exposición al aire. Estas experiencias constituyen un elemento fundamental para establecer metodologías sustentables de prevención y control del mejillón dorado en los sistemas de agua industriales.

BIOCIDAS

Por definición, un biocida es un causante de muerte. Este término es aplicado a los productos químicos utilizados para matar organismos vivos, tanto los que interfieren o amenazan la salud como los que afectan a las actividades humanas. Sin embargo, en general, no se consideran como biocidas a los antibióticos usados en medicina. Algunos biocidas son selectivos, es decir, son más potentes contra un número pequeño de especies que contra otras. Por el contrario, otros son tóxicos indiscriminados. El "biocida ideal" es una sustancia alta-

¹ Instituto de Limnología "Dr. R. Ringuelet", CC 712 (1900) La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Calle 122 y 61 (1900) La Plata. Argentina. miriam@ilpla.edu.ar

² Grupo de Investigación en Moluscos Invasores/Plaga (GIMIP). División Zoología Invertebrados. Facultad Ciencias Naturales y Museo. Paseo del Bosque. (1900) La Plata. Argentina. cdambor@fcnym.unlp.edu.ar

mente tóxica para un tipo particular de organismo o grupo de organismos y que no tiene efectos perjudiciales para el resto de los componentes biológicos del sistema. Además, este "compuesto ideal" no reacciona con los elementos abióticos del ambiente y se disocia en formas no tóxicas. Como se sabe, este "biocida ideal" aún no se ha logrado, pero ante la necesidad de ser utilizado en la prevención del asentamiento y/o en el control efectivo del *biofouling* en sistemas de aguas, las investigaciones se han orientado en el sentido de minimizar los impactos ambientales.

Son numerosos los químicos empleados como biocidas. De acuerdo con su mecanismo de acción se diferencian en oxidantes y no oxidantes. Entre los primeros se destaca el cloro como sustancia utilizada universalmente, y también pueden mencionarse el ozono, el peróxido de hidrógeno y el permanganato de potasio, entre otros. Varias sustancias químicas no oxidantes se han desarrollado como agentes de control sobre bacterias o algas y su uso se ha extendido a moluscos (molusquicidas).

Cloro

El cloro ha sido aplicado ampliamente en los tratamientos de potabilización del agua para el consumo humano desde principios del siglo XX. En épocas recientes, la cloración con hipoclorito de sodio comenzó a utilizarse en forma muy extendida en los sistemas de agua como método para el control del *biofouling*.

De todos los desinfectantes es el más intensamente estudiado en relación con su química, toxicidad y ecotoxicidad. Por ello, al estar tecnológicamente bien probado y porque su costo económico es aceptable, es utilizado universalmente en las industrias. Sin embargo, está muy lejos de poseer las características del "biocida ideal".

La acción del cloro como agente de control del *biofouling* se realiza a través de su efecto tóxico oxidante directo sobre los organismos, por inhibición del asentamiento y del crecimiento de los estadios larvales, o por debilitar los mecanismos por los cuales los individuos permanecen sujetos al sustrato (Claudi & Mackie, 1994).

Se dispone de compuestos para la cloración a partir de varios productos químicos. Los más frecuentemente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaOCl) y el cloro gaseoso (Cl₂). Muchos factores, tales como el pH, el contenido de nitrógeno orgánico e inorgánico y la temperatura, afectan el poder oxidante del cloro. Conjuntamente, se deben considerar las propiedades emergentes de cada población, como por ejemplo su estructura de edad o de tallas, su densidad, su biomasa, ya que diferentes poblaciones tendrán respuestas desiguales ante concentraciones semejantes del oxidante. Por estas razones es necesario ensayar su efectividad teniendo en cuenta las condiciones reinantes en las instalaciones a tratar.

Se conocen numerosas investigaciones acerca del efecto del cloro en otros bivalvos invasores como los ya nombrados *D. polymorpha* y *C. fluminea*. En *L. fortunei*, los primeros estudios para determinar la eficacia del cloro como agente para su control fueron los realizados por Morton y otros (1976). Estos autores trabajaron con ejemplares adultos provenientes del embalse de Plover Cove de Hong Kong, utilizando grupos de organismos sin especificar su talla. Más recientemente, Cataldo y otros (2003) realizaron varios ensayos con individuos de esta especie colectados en las costas del Río de la Plata, en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina).

Morton y otros (1976) utilizaron agrupamientos con aproximadamente 30 individuos que fueron colocados en tanques con agua proveniente del ambiente natural (el embalse), manteniéndola en circulación. Los mejillones dorados fueron alimentados durante todo el tiempo que duró la experiencia. Realizaron ensayos con tres tratamientos diferentes en los que se aplicó cloro en: (a) bajas concentraciones (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 y 1,2 mg/l) adicionando hipoclorito de sodio cada cuatro horas para mantener la concentración constante; (b) altas concentraciones (200; 300 y 400 mg/l) sin cloro adicional y, por último (c), altas concentraciones (200; 300 y 400 mg/l) por un período de cuatro días y, a continuación, los animales permanecieron expuestos a bajas concentraciones (1 mg/l), adicionando hipoclorito de sodio cada cuatro horas. Los tratamientos realizados tuvieron diferente duración temporal y siempre se mantuvieron grupos de control con agua procedente del embalse.

Los ensayos realizados por Cataldo y otros (2003) fueron llevados a cabo con 6 concentraciones de cloro diferentes (1, 5, 10, 25, 50 y 100 mg/l) a temperaturas de 15, 20 y 25°C. La concentración de cloro fue mantenida en forma constante por adición de hipoclorito de sodio una vez por día. Los organismos utilizados tenían entre 15-25 mm de longitud máxima valvar y se encontraban fijados a las superficies de ensayo. En este estudio no se les proporcionó alimento durante el desarrollo de las experiencias. Estos autores mantuvieron grupos de control y todas las rutinas fueron llevadas a cabo por triplicado. Cada 24 horas removieron los individuos muertos que se identificaron por la ausencia de respuesta ante estímulos mecánicos.

Morton y otros (1976) encontraron que con bajas concentraciones el cloro no produce mortalidad inmediata sino que, recién transcurridos 24 días, con una concentración de 0,2 mg/l, pudo registrarse un 37% de mortalidad, considerando que la mortalidad en el grupo control había sido de un 11%. En la Tabla 1 se consignan la dosis letal cincuenta (LD₅₀) que estimaron para las distintas concentraciones utilizadas. En este trabajo, los autores no especifican a qué temperatura se realizaron los ensayos, aunque puede deducirse por la información aportada en los gráficos que la misma estuvo en el rango 19,8 – 21,8 °C. Morton y otros (1976)

concluyen que, con dosis entre 200-400 mg/l, el 50 % de los especímenes muere a los 6 días, pero si luego se aplican bajas dosis de cloro para mantener concentraciones de 1 mg/l, se asegurará la mortalidad de la población restante en 11 días. Hay que señalar que con concentraciones entre 200-400 mg/l de cloro se produce un marcado incremento en la alcalinidad, llegando el pH a valores próximos a 10. Morton y otros (1976) destacan que este factor podría contribuir en la mortalidad del mejillón dorado. Los resultados obtenidos por Montalto y Marchese (2003) para *L. fortunei* con respecto al pH confirman que valores de 10 producen una alta mortalidad. Estos últimos autores trabajaron con organismos divididos en tres grupos de tamaño según su longitud máxima valvar: los juveniles hasta 6mm; adultos de 6 hasta 15 mm; y adultos con una talla mayor a 15 y hasta 27 mm. La temperatura de la experiencia tuvo un promedio de 21 ± 1 °C. El tiempo al que ocurrió la muerte estuvo relacionado con el tamaño de la valva, ya que los individuos más grandes mostraron mayor tolerancia que los más pequeños. De todas formas, a las 72 horas de iniciada la experiencia, la mortalidad era cercana al 100% para todas las tallas que formaron parte de los ensayos.

En la Tabla 1 también se sintetizan los valores estimados por Cataldo y otros (2003) de LD₅₀ bajo las tres temperaturas de las experiencias y para distintas concentraciones de cloro. Estos autores observan que a 15 °C con dosis de hasta 100 mg/l se necesitan entre dos y cuatro semanas para provocar el 100% de mortalidad, mientras que con dosis de 5 a 100 mg/l y 20 °C esta mortalidad se alcanza a las cuatro semanas. En cambio, con temperaturas de 25 °C, el tiempo requerido para alcanzar el 100% de mortalidad disminuye notablemente; con 100 mg/l de cloro sólo hacen falta 11 días, mientras que con 1 – 5 mg/l son necesarios 17 días para obtener dicha mortalidad.

Cataldo y otros (2003) presentan resultados en parte coincidentes con el trabajo previo de Morton y otros (1976) y de otros realizados para *Dreissena polymorpha* (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad con distintas dosis de cloro y para diferentes temperaturas obtenidos para *Limnoperna fortunei* y *Dreissena polymorpha* en diferentes experiencias.

	Días	Dosis mg/l	Temperaturas °C	Mortalidad %	Longitud valvar mm	
<i>L. fortunei</i>	5-6	200		50		Morton y otros (1976).
	6	300 - 400		50		
	14 -15	1,0 – 1,2		50		
	31	0,1		50		
<i>L. fortunei</i>	25	93,2	15	50	15 - 25	Cataldo y otros (2003).
	30	51,7	15	50		
	35	27,2	15	50		
	40	14,0	15	50		
	45	2,1	15	50		
	20	3,3	20	50		
	25	1,2	20	50		
	10	5,5	25	50		
<i>D. polymorpha</i>	4	8,0	12	50	2 -10	Martin y otros (1993).
	6	5,0	12	50		
	29	5,0	12	100		
	10	2,5	12	50		
	22	2,5	12	100		
	15	1,0	12	50		
<i>D. polymorpha</i>	25	1,0	20 - 22	100	0,75-2	Van Benschoten. En: Van Benschoten y otros (1993).
<i>D. polymorpha</i>	28	1,0	8 -12	70	>2 -5	Lewis. En: Van Benschoten y otros (1993).

Los estudios realizados demuestran que tratamientos breves con cloro no son efectivos para controlar la totalidad de la población a tratar. Por investigaciones efectuadas en otros bivalvos (de Kock & Bowmer, 1993) se ha observado que esto se debe fundamentalmente a que los organismos detectan el tóxico y, como respuesta ante la sustancia extraña, cierran las valvas impidiendo el ingreso del agente oxidante. Solamente con

temperaturas superiores a 25°C y concentraciones mayores a los 25 mg/l el cloro afectaría significativamente la tasa de supervivencia de los bivalvos dentro de los primeros dos o tres días de exposición. Se supone que esto se debe a que en animales poiquilotermos expuestos a mayores temperaturas se produce un incremento de la tasa metabólica y, en consecuencia, hay una aceleración en la incorporación del agente oxidante incrementado el potencial tóxico del mismo.

Molusquicidas

A pesar de que los compuestos no oxidantes utilizados como biocidas resultan onerosos, poseen algunas ventajas con respecto al cloro. Estas sustancias son relativamente inertes en relación con los materiales constitutivos de los sistemas de agua de las industrias y, hasta el presente, no se ha detectado que reaccionen con elementos del medio, produciendo compuestos cancerígenos o deletéreos tal como ocurre con los oxidantes. Además, para el control de moluscos, son efectivos en bajas concentraciones, se inactivan rápidamente y son de sencillo manipuleo para su aplicación.

Polímero de amonio cuaternario. En los Estados Unidos se ha usado un compuesto catiónico líquido de amonio policuaternario (BULAB 6002®) para el control de algas en piletas de natación. Este compuesto es un ión de n polímeros de cadena abierta con átomos de nitrógeno cargados positivamente en la columna de su cadena polimérica. También es utilizado como microbicida en sistemas de agua comerciales e industriales, y empleado como molusquicida en la prevención y control del *biofouling*, especialmente el causado por *Dreissena polymorpha* (Martin y otros, 1993; McMahan y otros, 1993). El BULAB 6002® se enlaza con las superficies cargadas negativamente, incluyendo los microorganismos y las membranas de los moluscos. Estos últimos no son capaces de detectar a la sustancia activa como un agente nocivo y, por lo tanto, no cierran sus valvas al ser expuestos al molusquicida que provoca rápidamente la muerte.

Darrigran y otros (2001) realizaron una primera aproximación al estudio del efecto de este tipo de molusquicidas sobre las larvas del mejillón dorado. Para el desarrollo de las experiencias recolectaron el material con una red de fitoplancton en la ribera del Río de la Plata (Ensenada, Provincia de Buenos Aires). Una vez en el laboratorio tomaron alícuotas que fueron observadas bajo lupa y, con una micropipeta, extrajeron las larvas veliger umbonadas (237,5 - 287,5 micras) de *Limnoperna fortunei* que se utilizaron de forma inmediata en las experiencias. Las concentraciones ensayadas fueron de 1, 2, 4, 8 y 16 ppm de la sustancia activa del BULAB 6002®. Las soluciones fueron preparadas con agua corriente de red domiciliar estacionada. En cápsulas de Petri colocaron entre 9 a 10 larvas y, como controles, prepararon blancos con 10 larvas en el agua utilizada como diluyente. Realizaron toda la experiencia por duplicado y a temperatura ambiente de 18 °C ± 2. El ensayo fue controlado a las 24 horas, contando (bajo microscopio estereoscópico) la cantidad de larvas sin ningún tipo de movilidad (consideradas como muertas) y las que presentaban algún signo de actividad (consideradas como vivas). En la Figura 1 puede observarse el resultado de la experiencia. Los resultados fueron tratados con el programa de análisis Probit de la EPA para el cálculo de concentración letal cincuenta (LC₅₀) de test de toxicidad de distintas sustancias. La LC₅₀ de la réplica 1 resultó ser 9,6 ppm, y la de la réplica 2 fue de 4,65 ppm. Los autores comprobaron, mediante la prueba de Chi cuadrado, que la diferencia entre los valores esperados y los observados no eran significativas.

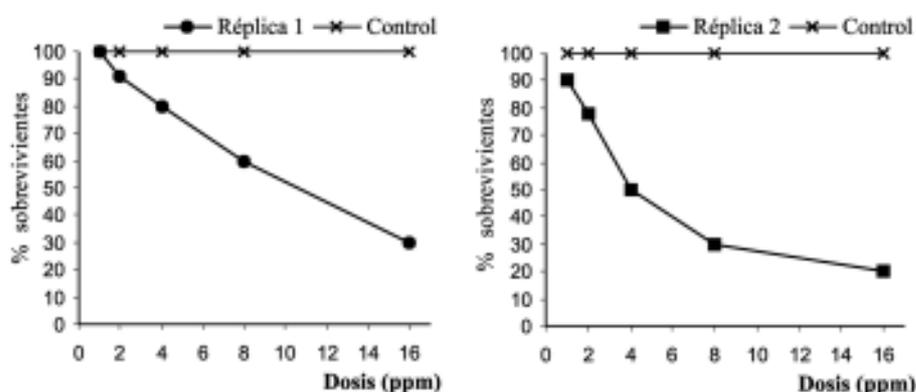


Figura 1. Porcentaje de larvas veliger umbonadas de *Limnoperna fortunei* sobrevivientes, a las 24 horas de iniciados los ensayos, en distintas concentraciones de BULAB 6002® y en grupos utilizados como control. Modificada de Darrigran y otros (2001).

Cabe destacar que Darrigran y otros (Ms) señalan que, a las 24 horas de iniciada la experiencia, se comprobó que en las cápsulas destinadas para controles, además de hallarse sólo individuos vivos, las larvas podían calificarse como nadadoras activas. En las restantes cápsulas, cualquiera fuera la concentración de la sustancia

tóxica, las larvas que permanecían vivas (certificado por el movimiento ciliar interno) debían ser calificadas como inactivas, ya que permanecían depositadas en el fondo de la cápsula. Lo experimentado por los grupos control permite determinar que los cambios de comportamiento o la muerte de las larvas fueron inducidos por el BULAB 6002®, y que las larvas de esta especie son muy sensibles a este tóxico, ya que a la menor concentración de sustancia activa utilizada se las encontró inactivas dentro de las 24 horas de iniciado el ensayo. Sería recomendable la experimentación con concentraciones menores a 1 ppm con el fin de evaluar la mínima concentración necesaria para lograr la inactividad larval.

El BULAB 6002® puede también ser utilizado para la limpieza de los sistemas cuando en éstos se han desarrollado asentamientos importantes de organismos adultos. De esta forma, utilizando concentraciones, tiempos y un sistema de recirculación adecuado, se logra matar y desprender a la población asentada. Darrigran y Damborenea (2001) realizaron ensayos con esta sustancia en diferentes concentraciones y para distintas tallas de *L. fortunei*. Los ejemplares adultos utilizados provenían del estuario Río de la Plata (Berisso, Buenos Aires, Argentina) los cuales fueron previamente aclimatados a las condiciones de laboratorio. Los ensayos de toxicidad se realizaron de forma estática, con renovación del medio cada 24 horas, a una temperatura de 24 ± 1 °C. Los animales seleccionados por talla fueron dispuestos en potes, colocados en acuarios con agua del ambiente y agua corriente (2:1) para lograr fijación a la superficie ofrecida. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para el control de las experiencias se utilizaron testigos tratados bajo las mismas condiciones. Las soluciones finales se realizaron a partir de una solución inicial de BULAB 6002® con un 60% de sustancia activa. Se efectuaron un total de seis ensayos a tres concentraciones diferentes (8, 12 y 20 ppm de sustancia activa) (Tabla 2).

La mortalidad de *L. fortunei* se monitoreó cada 24 horas, observándose, bajo microscopio estereoscópico, la actividad de los mejillones colocados en agua del ambiente y su respuesta ante estímulos sobre el manto. Las experiencias realizadas se extendieron por un lapso de 168 horas.

Tabla 2. Tallas promedios de *Limnoperna fortunei* y concentración de BULAB 6002® en cada uno de los ensayos realizados por Darrigran y Damborenea (2001).

Ensayo	Concentración del tóxico (ppm)	Longitud valvar (mm) media (rango)	n
1	8	10,80 (6 a 14)	416
2	8	19,97 (18 a 29)	377
3	12	12,45 (4,5 a 16)	659
4	12	20,17 (18 a 27)	625
5	20	7,30 (2.5 a 12)	325
6	20	22,76 (18 a 33)	305

Los resultados de Darrigran y Damborenea (2001) indican que a las 168 horas, con concentraciones de 8 ppm (ensayos 1 y 2) y de 12 ppm (ensayos 3 y 4) de BULAB 6002®, no se alcanzó el 100% de mortalidad de los adultos de *L. fortunei* (Figura 2). Para concentraciones de 8 ppm se registró una mortalidad de 78,88 % (ensayo 1) y de 75,00 % (ensayo 2), y con 12 ppm la mortalidad fue de 88,83% (ensayo 3) y de 82,14% (ensayo 4). Sin embargo, con 20 ppm, la mortalidad del 100 % se alcanzó a las 120 y 144 horas para los ensayos 5 y 6, respectivamente.

Los adultos de *L. fortunei*, al igual que sus estadios larvales, son sensibles a este tóxico. En Estados Unidos se desarrollaron ensayos semejantes (Martin y otros, 1993), con esta misma sustancia, para *Dreissena polymorpha* (mejillón cebra). En éstos, los individuos de 2 a 8 mm de longitud valvar expuestos a 8 ppm presentan una mortalidad del 100 % a las 144 horas. Según los resultados de Darrigran y Damborenea (2001), en el caso de *L. fortunei* la mortalidad no es mayor al 80% con concentraciones semejantes del compuesto y luego de 168 horas de experiencias. Este hecho indica que los adultos de *L. fortunei* son más resistentes a este biocida que los del mejillón cebra.

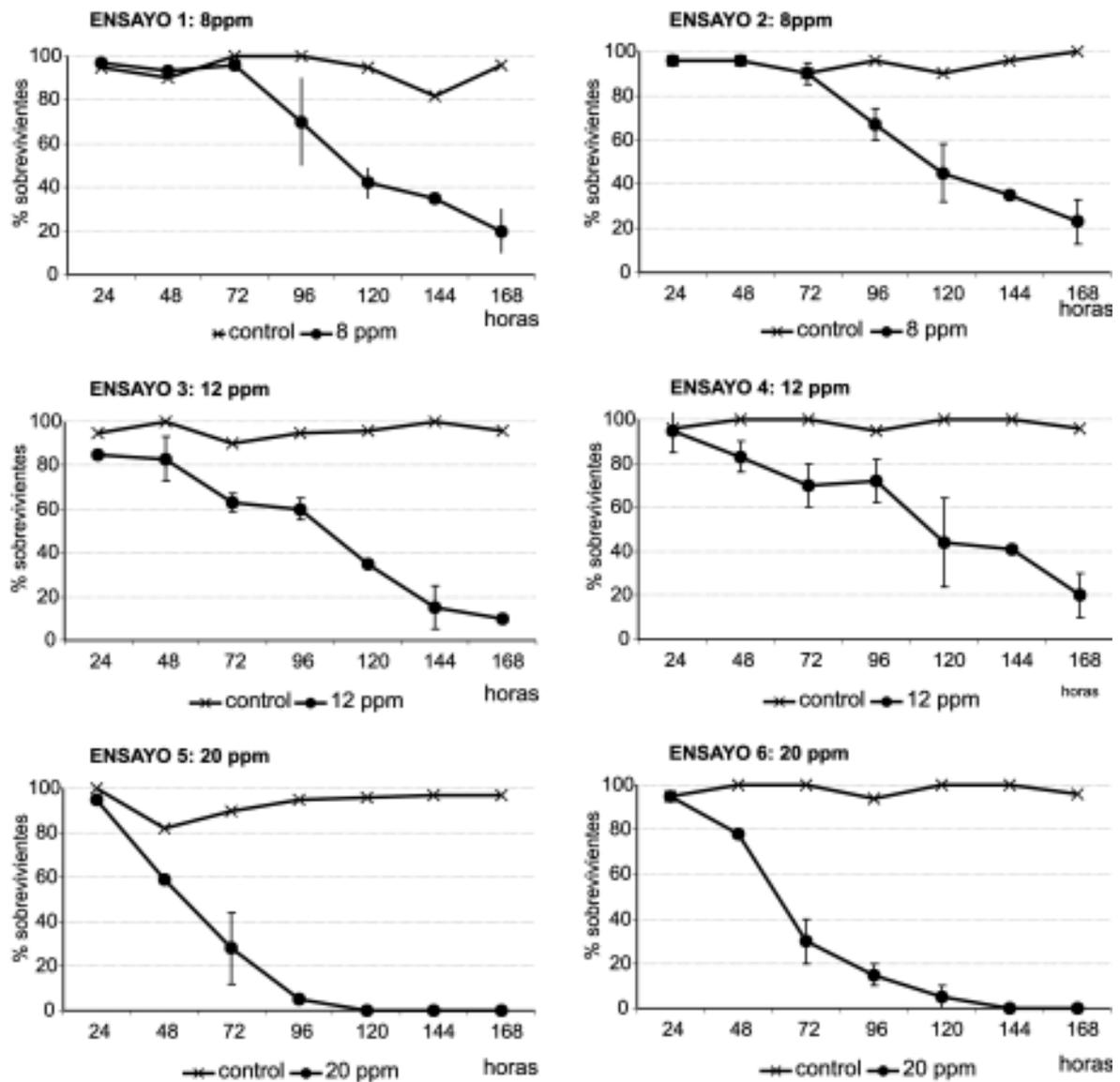


Figura 2. Porcentaje de adultos de *Limnoperna fortunei* sobrevivientes a lo largo del tiempo a distintas concentraciones de BULAB 6002® y en grupos utilizados como control. Modificada de Darrigran y Damborenea (2001).

Cabe destacar que este biocida es un tóxico no selectivo que, al ser volcado al ambiente causa un impacto indeseado acorde con la concentración utilizada. Para ensayar la aplicación de *shocks* de esta sustancia en concentraciones adecuadas para la limpieza del sistema de agua con abundantes asentamientos, estos deben realizarse en circuitos cerrados, donde el tóxico no sea vertido al ambiente cuando finaliza el proceso, excepto que sea previamente desactivado.

Otros molusquicidas ensayados. Cataldo y otros (2003) estudiaron en laboratorio el efecto de otros tres molusquicidas líquidos sobre el mejillón dorado. Los compuestos utilizados fueron:

- a. Molusquicida 1. Un compuesto de amonio cuaternario, con un 50 % de sustancia activa, que es un surfactante catiónico de la familia de los *n* alquil dimetilbencil cloruro de amonio.
- b. Molusquicida 2. Un compuesto orgánico conteniendo una solución de un álcali de amonio policuaternario (didecil dimetil cloruro de amonio) con un 50% de sustancia activa.
- c. Molusquicida 3. Un compuesto orgánico, el 2, 5' dicloro 4' nitrosalicilanilida.

Los primeros dos molusquicidas fueron ensayados ampliamente para ser utilizados como agentes de control del mejillón cebrado en América del Norte, y el tercero es usado en países tropicales para el control de caracoles de agua dulce vectores de la esquistosomiasis.

Cataldo y otros (2003) realizaron los ensayos con organismos de entre 15 – 25 mm de longitud máxima valvar, recolectados en las costas del Río de la Plata (Quilmes, Buenos Aires, Argentina). Las pruebas de toxicidad fueron llevadas a cabo por triplicado a temperaturas de 15, 20 y 25°C. Los molusquicidas fueron diluidos con agua corriente de clorinada y mantuvieron grupos de control. Ni éstos individuos ni los usados en los ensayos fueron alimentados durante las pruebas. El tiempo de exposición de los organismos a la acción del tóxico fue de 48 horas; cada 24 horas comprobaron la cantidad de individuos vivos y muertos de los distintos ensayos. Los dos compuestos de amonio cuaternario (molusquicidas 1 y 2) fueron probados con concentraciones de 1; 2,5; 5; 10; 20 y 30 mg/l y, para el denominado molusquicida 3, las concentraciones fueron de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 y 8 mg/l. Para el molusquicida 2, a 25 °C; además, ensayaron concentraciones de 0,5 y 0,75 mg/l necesarias para el cálculo de la dosis letal 50% (LC₅₀). Ya que de acuerdo con las especificaciones técnicas los molusquicidas presentan una acción residual una vez concluida la exposición, los organismos que permanecieron vivos fueron transferidos a aguas libres de tóxico y su respuesta monitoreada durante varios días.

Según los resultados presentados por Cataldo y otros (2003) para 15 °C, el molusquicida 1 no provocó una mortalidad de 100% en ninguna de las concentraciones ensayadas, aunque se realizaron observaciones hasta diez días post exposición. Para las otras dos temperaturas, a partir de 2,5 mg/l de concentración, después del tercer día post exposición, la mortalidad alcanzó valores de entre un 80–100%; y, con concentraciones mayores, se llegó a un 100% de mortalidad en menor tiempo. El molusquicida 2 fue efectivo, al provocar una mortalidad del 100%, bajo todas las temperaturas, cuando los moluscos estuvieron expuestos a altas concentraciones de sustancia activa. Con 25 °C su efectividad fue también alta para bajas concentraciones. El molusquicida 3 fue el más eficaz a la más baja temperatura, teniendo un efecto notable sobre todo en el primer día de exposición. A la mayor de las temperaturas, y en concentraciones superiores a 0,5 mg/l, fue muy efectivo; a las 72 horas de iniciada la experiencia había matado a la totalidad de los organismos. En la Figura 3 se presentan los resultados de la LC₅₀ obtenidos por los autores.

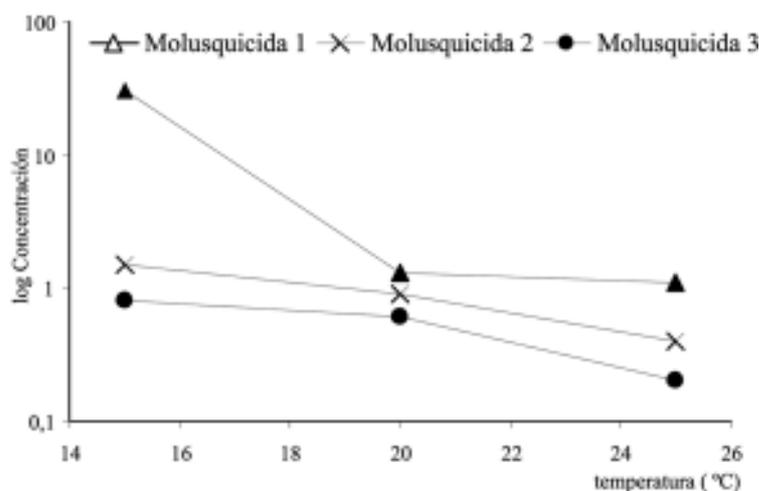


Figura 3. Dosis letal 50 de 48 horas de exposición a las tres temperaturas de las experiencias y para los tres molusquicidas ensayados. Datos tomados de Cataldo y otros (2003).

Como se desprende de la gráfica anterior, la dosis depende no sólo del efecto del molusquicida como agente tóxico para esta especie, sino también de la temperatura bajo la cuál está actuando. En este análisis se aplica el mismo razonamiento expuesto para el accionar del cloro. Con temperaturas mayores se produce un incremento de la tasa metabólica de los organismos y, por lo tanto, se acelera la incorporación del molusquicida, lo que produce un incremento de su potencial toxicidad. Las medidas de control sobre esta especie deben tomar en cuenta este hecho y, si es posible la aplicación de un molusquicida, realizarla en la época de mayores temperaturas para intensificar su efecto.

TOLERANCIA A LA EXPOSICIÓN AL AIRE

La tolerancia a la exposición al aire y la capacidad de fijarse fuertemente a sustratos por su bisco son características propias de los mitílidos, gracias a las cuales han podido aprovechar la alta disponibilidad de recursos

existentes en los sistemas intermareales. Estas propiedades también han favorecido la propagación antropocórica por vía terrestre de una cuenca a otra de los bivalvos de agua dulce epifaunales (Griffiths y otros, 1991; Ricciardi y otros, 1994; Mansur y otros, 1999).

Iwasaki (1997) fue quién realizó los primeros ensayos en laboratorio sobre la resistencia de *L. fortunei* a la exposición al aire. Los individuos utilizados en las experiencias provenían de recolecciones realizadas en el río Uji (Japón Central). Una vez en el laboratorio fueron aclimatados durante dos días, en los que se les proporcionó abundante alimento (*Chlorella* sp. y *Euglena* sp.). Sus experiencias consistieron en exponer al aire atmosférico a individuos aislados, con una longitud máxima valvar entre los 4 y 34 mm, en condiciones del ambiente con una temperatura que osciló entre los 26 – 30 °C y con un rango de humedad relativa de 72 – 81%. Cada 24 horas, Iwasaki verificó el número de individuos muertos a los que se les midió la longitud máxima valvar. Según este autor, para los pequeños mejillones (<10 mm), la supervivencia media fue de 3,2 días, cayendo abruptamente hacia el día 4 de la experiencia; para el día 5 todos habían muerto. La supervivencia media se acrecentó con el incremento en longitud de la valva (Figura 4); sin embargo, para el día 10 de iniciado el experimento, se registró el 100% de mortalidad. Lamentablemente, su diseño experimental no incluyó grupos testigos o controles, por lo que no pudo establecer si la única causa de mortalidad fue la exposición al aire. En sus conclusiones, Iwasaki sugiere que en condiciones de campo se incrementaría la supervivencia de los individuos, ya que es conocido el hecho de que la disposición en capas o la agregación de organismos mejora las condiciones de vida para los mejillones individuales, a través de incrementar la humedad y producir un descenso de la temperatura hacia las capas inferiores o hacia el centro del agregado.

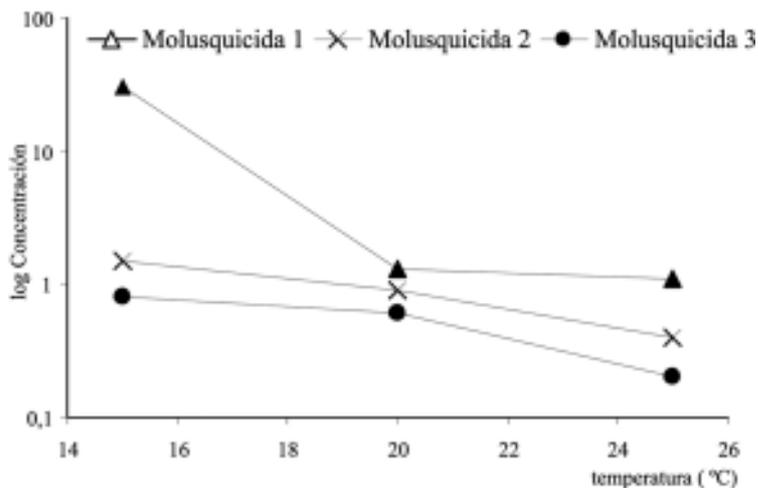


Figura 4. Supervivencia media en días de los individuos de *L. fortunei* de distintas clases de tallas expuestos al aire. Modificado de Iwasaki (1997).

Darrigran y otros (2004) también examinaron, en condiciones de laboratorio, la respuesta de *L. fortunei* a la exposición al aire bajo diferentes condiciones de humedad relativa, evaluando la mortalidad en función del tiempo. Los ejemplares utilizados fueron recolectados en las costas del estuario del Río de la Plata (Ensenada, Buenos Aires, Argentina). Previo a las experiencias, durante 48 horas, los mejillones fueron aclimatados en el laboratorio, en acuarios con agua de red domiciliaria estacionada, con aireación permanente y alimentados con algas (*Scenedesmus* sp.) cultivadas en el laboratorio. El diseño del experimento consistió en separar agregados de individuos a los que denominaron "rosetas", distribuidas en forma equidistante en bandejas plásticas. En una primera etapa expusieron dos lotes de rosetas al aire atmosférico (S1 y S2) y mantuvieron otro como control (C1). En la siguiente experiencia expusieron dos lotes de rosetas al aire atmosférico (S3 y S4) mientras que otros dos fueron mantenidos cubiertos con un lienzo humedecido a saturación cada 24 horas (H1 y H2). Aquí también utilizaron un grupo de rosetas como control (C2). Ambas etapas fueron realizadas en una habitación cerrada sin incidencia del sol, a una temperatura media de 25 °C ± 0,5 y con una humedad relativa ambiente que osciló entre un mínimo de 49% y un máximo de 63%. Los controles fueron mantenidos con agua de red domiciliaria estacionada con aireación y sin provisión de alimento. Diariamente extrajeron una roseta de cada una de las unidades experimentales, separaron a los individuos, y luego los sumergieron en agua corrien-

te estacionada con aireación. Después de 18 horas determinaron y contaron los ejemplares que permanecían vivos y los muertos, y a todos les midieron la longitud máxima valvar. Con la información obtenida calcularon el porcentaje de individuos sobrevivientes en cada tratamiento y muestreo. También, en todos los casos, realizaron el ajuste al modelo normal acumulado de los porcentajes de individuos muertos en función del tiempo, utilizando la técnica de mínimos cuadrados, y calcularon la cantidad de horas necesarias para que el 50 % y el 100 % de los individuos murieran. Además, clasificaron a los individuos de cada roseta en tres categorías de longitud valvar <10; 10-20 y >20 mm, y analizaron la mortalidad en función de la talla (Figura 5).

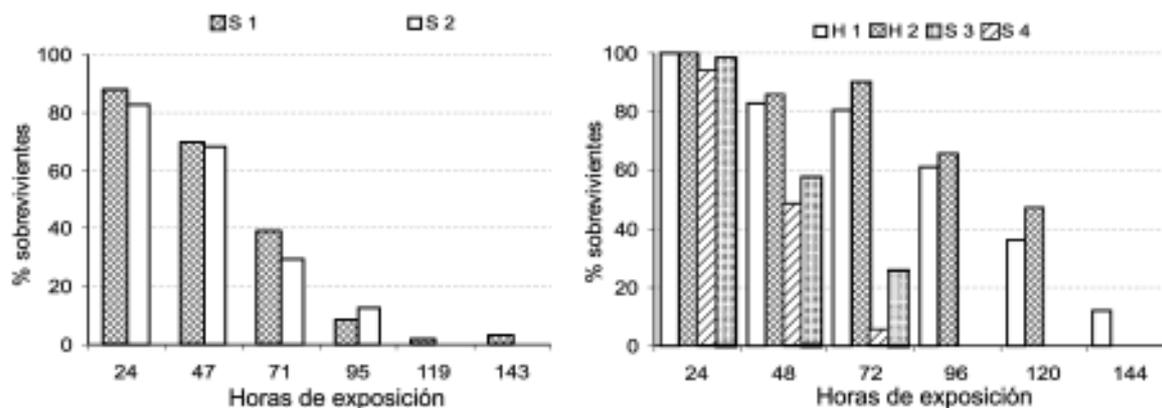


Figura 5. Porcentaje de individuos sobrevivientes según las horas de exposición para las dos experiencias realizadas. S 1 a S 4: exposición permanente al aire atmosférico, H 1 y H 2: húmedecido a saturación cada 24 horas. Datos de Darrigran, Maroñas y Colautti.

Es notable el incremento de la supervivencia de *L. fortunei* a mayor humedad relativa (Figura 5). En los casos de exposición permanente los individuos no sobrevivieron más de 120 horas, con excepción de la experiencia S2 donde aproximadamente un 3% permaneció vivo por más tiempo, mientras que los húmedecidos diariamente sobrevivieron hasta 168 horas. Observando la Tabla 3 se puede deducir que, con una exposición permanente al aire atmosférico, se requiere menos del 50% del tiempo de los expuestos a saturación para que muera el 50% de los individuos.

Tabla 3. Cantidad de horas necesarias para que los individuos permanentemente expuestos al aire (S1 a S4) o húmedecidos diariamente a saturación (H1 y H2) alcancen el 50% y 100% de mortalidad.

Ensayo	Mortalidad 50% (horas)	Mortalidad 100% (horas)
S 1	57	119
S 2	61	168
S 3	47,44	96
S 4	54,82	96
H 1	103,91	168
H 2	110,02	144

Los resultados obtenidos al evaluar la mortalidad en el tiempo, por categorías de tamaño, demostraron que los componentes más jóvenes de las poblaciones son menos resistentes a períodos prolongados de exposición permanente al aire atmosférico (Figura 6), alcanzando el 100% de mortalidad un día antes que los mayores de 20 mm.

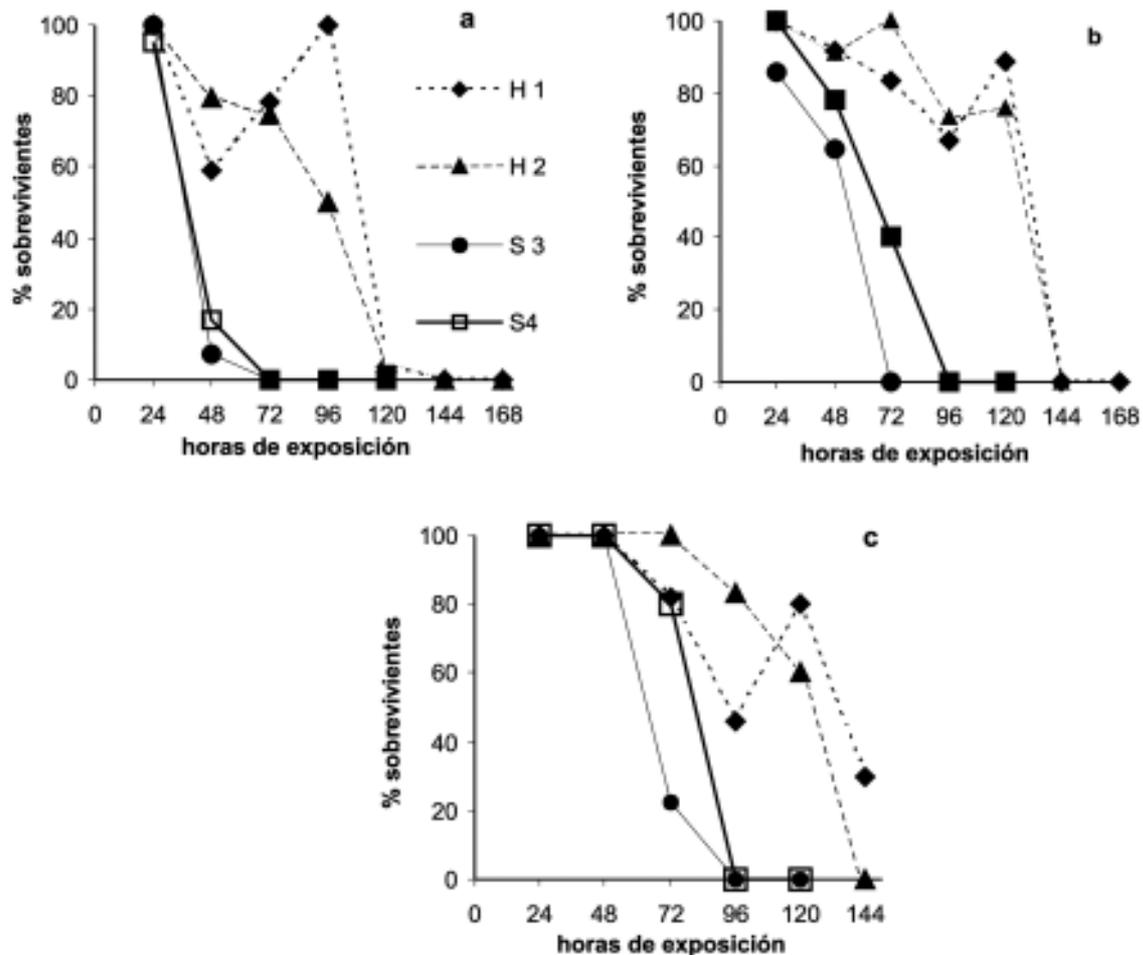


Figura 6. Porcentaje de sobrevivientes, por clase de tamaño de la segunda experiencia, de acuerdo con exposición permanente al aire (S3 y S4) o humedecido a saturación cada 24 horas (H1 y H2). **a:** longitud máxima valvar inferior a 10 mm, **b:** longitud máxima entre 10 y 20 mm, **c:** longitud máxima entre mayor a 20 mm. Datos inéditos de Darrigran, Maroñas y Colautti.

Darrigran y otros (2004) concluyen que la exposición al aire como herramienta de control resulta más eficiente en el caso de individuos menores a 10 mm de longitud valvar. En instalaciones industriales densamente colonizadas por *L. fortunei* la eliminación periódica del agua, por lapsos menores a seis días, no sería suficiente como mecanismo de control. Para ser efectivo, este método debería estar acompañado de procedimientos que reduzcan la humedad relativa del ambiente. De esta forma sería posible generar un *stress* capaz de producir una mortalidad del 100% de los individuos, en intervalos de tiempo menores. Asimismo, la complejidad del ambiente humano a tratar determina que esta metodología no pueda implementarse en todos los sectores de los sistemas. No obstante, este tratamiento representa una herramienta más, que debe complementarse con otras para diseñar estrategias de control que propicien el tratamiento integral de cada ambiente.

A partir de los resultados obtenidos, Darrigran y otros (2004) concluyen que es necesario tomar medidas sanitarias en relación con el transporte por vía terrestre de elementos que han tenido contacto con ambientes acuáticos invadidos por el mejillón dorado. Bajo condiciones atmosféricas semejantes a las de fin de primavera con respecto a la temperatura en un clima templado, pero con una humedad relativa inferior a la promedio para esta latitud, la especie demostró la capacidad de resistir hasta seis días de exposición al aire. Esto determina que pueda ser transportada hacia otros ambientes o cuencas, adheridas por sus bisos a embarcaciones, redes y equipos de pesca, entre otros, expandiendo no sólo su distribución geográfica sino, también, los perjuicios ambientales y económicos que esta dispersión involucra. Esta hipótesis, sustentada a partir de los estudios de la forma de dispersión de *Dreissena polymorpha* en el Hemisferio Norte (Nalepa & Schloesser, 1993), representa una vía alternativa para explicar la rápida dispersión del mejillón dorado, a contracorriente, en América del Sur (Darrigran, 2000; Darrigran & Ezcurra de Drago, 2000; Darrigran y otros, 2000). Este hecho, que provoca su amplia distribución actual, favorece y potencia su dispersión futura.

Montalto y Ezcurra de Drago (2003) evaluaron el tiempo de tolerancia a la desecación, tanto en el laboratorio, donde simularon un sistema de tuberías, como con experiencias en el campo. Los ejemplares que utilizaron se recolectaron en los ríos Santa Fe, Salado del Norte y en el Paraná Inferior a la altura de la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). En el laboratorio fueron mantenidos en acuarios que contenían agua de río aireada y alimentados con cultivos de algas (*Selenastrum capricornutum*). Los individuos que utilizaron en las experiencias fueron clasificados en tres clases a partir de su longitud máxima valvar: los juveniles (< 6 mm), adultos medios (> 6 – 15 mm) y los adultos mayores (> 15 – 27 mm). Los autores agruparon 20 individuos por experiencia e hicieron entre 3 a 5 réplicas, siempre llevando un grupo como control. En el microambiente control midieron el pH, la temperatura, el tenor de oxígeno, la temperatura ambiente y el porcentaje de humedad relativa. Todas las experiencias fueron controladas cada 12 horas, y se realizaron registros de individuos vivos y muertos. Conjuntamente, controlaron el tiempo de recuperación de los organismos ya que, después de cada experiencia, tanto para las de laboratorio como para las de campo, agregaron agua en el vaso de experimentación y controlaron el tiempo que tardaron los primeros organismos en mostrar signos de recuperación. Las unidades experimentales y el control usados fuera del laboratorio se colocaron en un dispositivo especialmente diseñado y fijado al suelo; para protegerlas de posibles depredadores se utilizó una tela metálica y, para la lluvia, una tela plástica. Estos autores también realizaron un análisis de los cambios en el nivel del agua del río Paraná para examinar los efectos de los períodos de aguas bajas sobre las poblaciones de *L. fortunei*.

Al igual que en las experiencias realizadas por otros autores, sus resultados mostraron que existe una tendencia a que los mejillones dorados más grandes toleren mejor la desecación que los más pequeños (Tabla 4). Cabe destacar que los grupos controles mostraron un 100% de supervivencia para todas las tallas.

Tabla 4. Cantidad de horas necesarias para que los individuos de distintas clases de tallas alcancen el 100% de mortalidad y rango de condiciones ambientales a los que estuvieron expuestos. Modificado de Montalto & Ezcurra de Drago, 2003.

	Mortalidad del 100%	
	Laboratorio	Campo
Juveniles	72	72
Adulto medio	192	96
Adulto mayor	276	108
	Condiciones ambientales	
Temperatura (°C)	9,1 – 16,5	15,3 – 16,6
Humedad Relativa (%)	63,4 – 78,4	65 – 93

El tiempo mínimo para la recuperación de los especímenes clasificados como juveniles fue el mismo, tanto para los que se mantuvieron en el laboratorio como para los sometidos a condiciones de campo (entre 10 y 15 minutos). Los individuos clasificados como adultos medios y mayores que fueron mantenidos en condiciones de laboratorio se recuperaron más rápidamente que los expuestos a la intemperie.

Como se puede observar en la Tabla 4, el mejillón dorado toleró mejor la desecación en condiciones de laboratorio. Montalto y Ezcurra de Drago (2003) concluyeron que este hecho estaría asociado con la menor variación en la temperatura y la humedad relativa reinantes en las condiciones de laboratorio. En el exterior, al existir una mayor variación en ambos factores, se produciría un mayor *stress*. Las experiencias fueron realizadas en otoño/invierno, por lo que los autores concluyeron que el tiempo de tolerancia a la desecación en el campo durante la primavera/verano, con temperatura más alta y con mayor número de horas de sol, debería reducirse.

La interpretación de los resultados obtenidos por Montalto y Ezcurra de Drago (2003) en el campo es de sumo interés en lo concerniente a las poblaciones del mejillón dorado que colonizan la zona del sistema río Paraná. En la llanura de inundación de este río las poblaciones de *L. fortunei* están sujetas a pulsos de agua. Durante el período de aguas altas esta especie puede colonizar la zona de transición agua – tierra, mientras que durante la fase de aguas bajas los individuos están sujetos a condiciones de desecación. Los resultados que obtuvieron en el campo les permiten asumir que, con un período extenso de aguas bajas, la población de *L. fortunei* podría decrecer naturalmente con un tiempo de exposición de al menos 96 horas.

Iwasaki (1997) encontró que los individuos de *L. fortunei* mayores a 20 mm sobrevivían hasta 10 días, mientras que los registros máximos de supervivencia de Darrigran y otros (2004) no superaron los 7 días, no obstante haber usado rosetas. A pesar de que en ambos estudios hubo coincidencia en la temperatura, la diferencia en la supervivencia se debería a que las experiencias de los últimos autores se hicieron en una atmósfera más desecante: 49-63 % de humedad relativa ambiente contra 72-81% utilizada en los ensayos de Iwasaki (1997). Los resultados obtenidos por Montalto y Ezcurra de Drago (2003), en relación con los ensayos realizados en el laboratorio, son coincidentes con las observaciones ya mencionadas, y confirman que la supervivencia del mejillón dorado está ligada a la temperatura. De todos los ensayos, estos últimos fueron los que se realizaron a las más bajas temperaturas y son los que presentaron la mayor supervivencia.

Las experiencias realizadas por Darrigran y otros (2004), en las que se aumentó periódicamente la humedad hasta el punto de saturación (H1 y H2), incrementaron notablemente la supervivencia en función del tiempo, comparados con la exposición permanente al aire. Esta respuesta tendría relación con la capacidad de la especie para vivir en zonas de intermarea, donde la inmersión y exposición son parte del ciclo de vida diario.

REFERENCIAS

- CATALDO, D., D. BOLTOVSKOY & M. POSE. 2003. Toxicity of chlorine and three nonoxidizing molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. *Journal Awwa* 95: 66-76.
- CLAUDI, R. & G. L. MACKIE. 1994. *Practical manual for zebra mussel monitoring and control*. Lewis Publishers, Boca Ratón, 227 pp.
- DARRIGRAN, G. A. 1997. Invasores en la cuenca del Plata. *Ciencia Hoy* 7(38): 17-22.
- DARRIGRAN, G. 2000. Invasive Freshwater Bivalves of the Neotropical Region. *Dreissena* 11(2): 7-13.
- DARRIGRAN, G. & M. C. DAMBORENEA. 2001. Concentraciones letales de un biocida para adultos del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Mytilidae). *ACTAS Seminario Internacional sobre Gestión Ambiental e Hidroelectricidad*: 25-32. Salto Grande. Argentina.
- DARRIGRAN, G. & I. EZCURRA DE DRAGO. 2000. Invasion of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in America. *Nautilus* 2: 69-74.
- DARRIGRAN, G., P. PENCHASZADEH & C. DAMBORENEA. 2000. An invasion tale: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) in the Neotropics. R. Claudi (ed.) *Proceeding 10th International Aquatic Nuisance Species and Zebra-Mussels Conference*. Toronto. Canadá: 219-224.
- DARRIGRAN, G. A., M. E. MAROÑAS & D. C. COLAUTTI. 2001. Primeras estimaciones de concentraciones letales de un biocida para el molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Mytilidae). *ACTAS Seminario Internacional sobre Gestión Ambiental e Hidroelectricidad*: 131-134.
- DARRIGRAN, G. A.; M. E. MAROÑAS & D. C. COLAUTTI. 2004. Air exposure as a control mechanism for the golden mussel, *Limnoperna fortunei*, (Bivalvia: Mytilidae). *J. Freshwater Ecology* 19(3): 461-464.
- DARRIGRAN, G. A., D. C. COLAUTTI & M. E. MAROÑAS (Manuscrito). Acute toxicity test in larval stage of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) under experimental conditions.
- DE KOCK, W. C. & C. T. BOWMER. 1993. Bioaccumulation, biological effects and food chain transfers of contaminants in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). In: Nalepa T. F. & D. W. Schoesser (Eds.). *Zebra mussels. Biology, impacts, and control*. Lewis Publications.
- GRIFFITHS, R.W., D. W. SCHLOESSER; J. H. LEACH & W.P. KOVALAK. 1991. Distribution and dispersal of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in the Great Lakes region. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:1381-1388.
- IWASAKI, K. 1997. Climbing behaviour and tolerance to aerial exposure of freshwater mussel, *Limnoperna fortunei*. *Venus* 56 (1): 15-25.
- MANSUR, M. C. D., L. M. Z RICHINITTI & C. P. DOS SANTOS. 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na Bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, Porto Alegre 7 (2):147-149.

- MARTIN, I. D., G. L. MACKIE & M. A. BAKER. 1993. Acute toxicity test and pulsed-dose delayed mortality at 12 and 22 °C in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 389-398.
- McMAHON, R. F., B. N. SHIPMAN & D. P. LONG. 1993. Laboratory efficacies of nonoxidizing molluscicides on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the asian clam (*Corbicula fluminea*). In: Nalepa T. F. & D. W. Schoesser (Eds.). *Zebra mussels. Biology, impacts, and control*, pp. 575 – 598. Lewis Publications.
- MONTALTO, L. & I. EZCURRA DE DRAGO. 2003. Tolerance to desiccation of an invasive mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae), under experimental conditions. *Hydrobiologia* 498: 161-167.
- MONTALTO, L. & M. MARCHESE. 2003. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) tolerance to temperature and pH in experimental conditions. *Neotropica* 49: 26-34.
- MORTON, B. S., C. S. AU & W. W. LAM. 1976. Control of *Limnoperna fortunei*. *Jour. Inst. Water Eng. & Sci.* 30: 147-156
- NALEPA, T. & W. SCHLOESSER. 1993. *Zebra mussels: biology, impacts, and control*. Lewis Publisher, Boca Raton, 508 pp.
- RICCIARDI, A.; R. SERROUYA & F. G. WHORISKEY. 1994. Aerial exposure tolerance of zebra and quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae): implications for overland dispersal. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 470-477.
- VAN BENSCHOTEN, J. E., J. N. JENSEN, D. LEWIS & T. J. BRADY. 1993. Chemical oxidants for controlling zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a synthesis of recent laboratory and field studies. In: Nalepa T. F. & D. W. Schoesser (Eds.). *Zebra mussels. Biology, impacts, and control*, pp. 599 – 620. Lewis Publications.