



Efecto del amoníaco en la tasa de filtración del bivalvo dulceacuícola *Diplodon chilensis* (Hyriidae): Implicancias ambientales

Habilitación presentada para optar al título de
Ingeniera Ambiental

CATALINA MONSERRAT BALBONTIN SCHOLZ

CONCEPCIÓN (Chile), 2024

“Efecto del amoníaco en la tasa de filtración del bivalvo dulceacuícola *diplodon chilensis* (Hyriidae): Implicancias ambientales”

Profesor Guía: Dr. Claudio Valdovinos Zarges



Profesor Comisión: Dra. Patricia González Sánchez



Profesor Comisión: Dra. Marcela Salgado Vargas



CONCEPTO: APROBADO CON DISTINCIÓN MAXIMA

Conceptos que se indica en el Título

- ✓ Aprobado por Unanimidad : (En Escala de 4,0 a 4,9)
- ✓ Aprobado con Distinción (En Escala de 5,0 a 5,6)
- ✓ Aprobado con Distinción Máxima (En Escala de 5,7 a 7,0)

Concepción, marzo 2024



Efecto del amoníaco en la tasa de filtración del bivalvo dulceacuícola *Diplodon chilensis* (Hyriidae): Implicancias ambientales

CATALINA MONSERRAT BALBONTIN SCHOLZ
Profesor guía: Dr. Claudio Rodolfo Valdovinos Zarges

CONCEPCIÓN (Chile), 2024

Índice

Agradecimientos	ii
Resumen	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HIPÓTESIS	7
1.2 OBJETIVOS	7
1.2.1 Objetivo general	7
1.2.2 Objetivos específicos	8
2. METODOLOGÍA.....	9
2.1 Organismos experimentales.....	9
2.2 Exposición de los bivalvos.....	9
2.3 Evaluación del comportamiento de los bivalvos	11
2.3.1 Observación visual de la actividad de filtración	11
2.3.2 Tasa de aclarancia	12
2.3.3 Actividad filtradora basada en tasas de aclarancia.....	12
Tabla 1	13
2.3.4 Contribución a las estrategias de conservación de bivalvos de agua dulce, mediante la comprensión de los efectos de la contaminación por nitrógeno en su funcionalidad ecosistémica como biofiltros	13
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
3.1 Tasas de Filtración en Diferentes Condiciones.....	14
Tabla 2	14
3.2 Comparación entre los Grupos de Tratamiento y Controles.....	15
Tabla 3	15
Tabla 4	16
3.3 Contribuir a las estrategias de conservación de bivalvos de agua dulce, mediante la comprensión de los efectos de la contaminación por nitrógeno en su funcionalidad ecosistémica como biofiltros	18
4. CONCLUSIONES.....	21
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

Agradecimientos

Agradezco a mi familia y amigos, quienes han estado presentes en cada paso de mi camino académico, brindándome aliento y motivación para cumplir mis objetivos.

Quiero agradecer al profesor Claudio Valdovinos, quien ha sido mi profesor guía para desarrollar esta investigación y ha confiado en mis capacidades, permitiéndome formar parte de su equipo de trabajo.

Al Centro EULA y la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad de Concepción por proporcionar las instalaciones y facilidades necesarias para llevar a cabo este estudio.

Gracias al proyecto FONDECYT N° 1231089 por su financiamiento, que hizo posible la realización de esta investigación.

Resumen

Los cuerpos de agua dulce poseen gran relevancia en la investigación científica por el papel esencial en la preservación de biodiversidad y su contribución a los servicios ecosistémicos. Sin embargo, la eutrofización representa un significativo desafío ambiental debido al incremento de nutrientes en estos cuerpos. En esta investigación se determinó el impacto de las altas concentraciones de amonio no ionizado en la tasa de filtración y viabilidad de *Diplodon chilensis* en condiciones controladas que simulan un ecosistema eutroficado. Para ello, se evaluó la tasa de filtración y se examinaron las respuestas subletales del *Diplodon chilensis* ante tales condiciones, los ejemplares adultos se hallaban expuestos a una concentración de 10 mg/L de amonio no ionizado y a pH 9. Los resultados indican que la tasa de filtración disminuye en presencia de altas concentraciones de amonio y un pH 9.

1. INTRODUCCIÓN

Los cuerpos de agua dulce, y los lagos en particular, han cobrado relevancia en la investigación científica reciente por su papel crucial en la preservación de la biodiversidad y su contribución a los servicios ecosistémicos esenciales (Gosling, 2015; Vaughn y Hakenkamp, 2001). Dentro de estos ecosistemas, los moluscos bivalvos emergen como especies clave, esenciales para mantener la salud y estabilidad ecológica (Gosling, 2015; Vaughn y Hakenkamp, 2001). En las disciplinas de la limnología y la ecología bentónica, los bivalvos, particularmente los pertenecientes al suborden Unionacea, son reconocidos globalmente por su influencia benéfica en los ecosistemas acuáticos, actuando como ingenieros ecosistémicos en una amplia gama de hábitats acuáticos (Vaughn y Spooner, 2006). Además, los bivalvos son notables por su eficiencia como biofiltros, lo que los hace candidatos para su aplicación en la ingeniería ambiental para la depuración y recuperación de cuerpos de agua contaminados (Shpigel, 2005; Shpigel y Neori, 2007). No obstante, estas especies enfrentan retos importantes, como la disminución de sus poblaciones en hábitats naturales, a menudo atribuible al deterioro de la calidad del agua y a procesos como la eutrofización y la sedimentación (Valdovinos y Pedreros, 2007). La utilización de bivalvos como biofiltros para la gestión del fitoplancton en lagos eutrofizados se ha propuesto como una estrategia para mejorar la transparencia y la calidad del agua. Ejemplificando, en Chile se ha sugerido su uso para la purificación de aguas en ecosistemas afectados por la eutrofización (Parada et al., 2008). Sin embargo, la efectividad de los bivalvos como biofiltros puede estar condicionada por las características químicas del agua que se pretende tratar.

Los bivalvos de agua dulce, en especial aquellos de las familias Unionoidae y Margaritiferidae, figuran como unos de los más vulnerables en los ecosistemas acuáticos continentales, con una notable disminución de su diversidad específica, alcance geográfico y densidad poblacional, según se evidencia en diversas

publicaciones científicas (Bogan, 1993; Lopes-Lima et al., 2016; Lydeard et al., 2004). La singularidad de sus características biológicas, incluyendo estrategias alimenticias específicas, movilidad limitada, y ciclos vitales complejos con una fase parasitaria conocida como Gloquidio, además de su prolongada longevidad, los predispone a la susceptibilidad ante alteraciones ambientales y la degradación de la calidad del agua, como la contaminación antropogénica (Bogan, 1993; Lydeard et al., 2004; Naimo, 1995; Milam et al., 2005). Se ha documentado ampliamente el rol vital de los bivalvos de agua dulce en procesos ecosistémicos como el ciclo de nutrientes, bioturbación y la deposición de sedimentos en suspensión (Strayer, 2006, 2014; Vaughn, 2010; Boeker et al., 2016; Lummer et al., 2016; Richter et al., 2016). Estos organismos ejercen una función de filtrado eficaz en cuerpos de agua, mejorando la calidad de la columna de agua mediante la biodeposición y la excreción de nutrientes (Vaughn, 2018; Dame, 1996; Strayer et al., 1999). Por ejemplo, son capaces de transferir nutrientes desde la columna de agua a la zona bentónica, influenciando la dinámica ecosistémica a través de la biodeposición de sus pseudoheces y la excreción de amonio. Sin embargo, la exposición al amonio no ionizado puede inducir efectos tóxicos severos en estos moluscos, alterando la estructura y funcionalidad del ecosistema en que se insertan (Dame, 1996; Parada et al., 2008). Además, la presencia de amonio no ionizado se asocia a la hipoxia de fondos lacustres eutroficados, dado que la descomposición de materia orgánica rica en sedimentos puede incrementar su concentración en el agua, contribuyendo a la hipoxia al promover el crecimiento de fitoplancton y macrófitas que, al descomponerse, consumen grandes cantidades de oxígeno (Ohle, 2011; Quirós, 2022). Este proceso puede generar condiciones hipóxicas en el lecho de los lagos, afectando adversamente a la fauna bentónica, incluyendo a los bivalvos. Ante este escenario, es crítico entender las causas del declive poblacional de los bivalvos y desarrollar estrategias de conservación efectivas para proteger a estos grupos taxonómicos prioritarios (Geist 2010, 2011, 2015).

La funcionalidad ecológica de estos bivalvos como biofiltros subraya la necesidad de su protección para mantener la integridad de los ecosistemas lacustres (Vaughn, 2018). La presencia de altas concentraciones de amonio en los sedimentos de lagos eutroficados plantea desafíos al uso de bivalvos como biofiltros, dado que puede inhibir su capacidad de filtración. Por lo tanto, es imperativo determinar las concentraciones de amonio que afectan este proceso de filtración, para optimizar su uso en la restauración de la calidad del agua.

La literatura científica indica que los compuestos reactivos de nitrógeno, especialmente el amoníaco, ejercen efectos adversos sobre los moluscos bivalvos de agua dulce (Augspurger et al. 2003; Mummert 2003; Newton et al., 2003; Geist y Auerswald, 2007; Wang, 2007) y sobre las poblaciones de peces (Hasenbein et al., 2014). Se reconoce que, a nivel local, las prácticas antrópicas relacionadas con el uso del suelo en las cuencas hidrográficas incrementan la carga de nitrógeno, impactando negativamente la estructura comunitaria de los ecosistemas de agua dulce (Poole, 2004). Las actividades humanas, tales como procesos industriales, descargas de aguas residuales, escorrentía agrícola y la ganadería, son fuentes significativas de nitrógeno, aportando concentraciones considerables a los ecosistemas acuáticos (US Environmental Protection Agency, 2013). En el Sur de Chile, por ejemplo, se ha establecido una correlación entre las emanaciones procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y los picos de contaminación por amoníaco, así como por coliformes fecales, en los hábitats lacustres (Parra et al., 2003). Las alteraciones fisiológicas que resultan de la exposición a niveles elevados de amoníaco se traducen en una disminución de la alimentación, la fecundidad y la supervivencia de los bivalvos de agua dulce, provocando una reducción en sus poblaciones (Constable, 2003).

La eutrofización emerge como un problema ambiental primordial, definido por el enriquecimiento de nutrientes, tales como fósforo y nitrógeno, lo cual provoca cambios significativos en los ciclos biogeoquímicos a nivel mundial (Vitousek et al.,

1997; Galloway et al., 2004). Este proceso, exacerbado por la actividad humana incluyendo la agricultura y la urbanización, ejerce un impacto considerable sobre los ecosistemas lacustres (Terauchi y Futagami, 2010). En el contexto de la eutrofización, las diversas formas de nitrógeno, como amonio, nitrito y nitrato, son de especial interés para la evaluación de la calidad acuática. El amonio total se encuentra en el agua como amoníaco no ionizado (NH_3) y como ion amonio (NH_4^+), siendo la forma no ionizada potencialmente tóxica para los organismos acuáticos, con efectos que pueden ser tanto agudos como crónicos (Metcalf, 2023; Dailianis et al., 2023).

El equilibrio entre estas dos formas de amonio está determinado en gran medida por el pH y la temperatura del agua. Un aumento en el pH acuático favorece la formación de amoníaco no ionizado, incrementando así su toxicidad (Brown et al., 2011; Müller y Beer, 1986). Este fenómeno subraya la importancia de la interacción entre el pH y los niveles de nitrógeno en la salud de los ecosistemas acuáticos y sus implicancias en el contexto de los cambios climáticos (Davies-Barnard y Friedlingstein, 2020; Foley et al., 2005). Por lo tanto, la exposición conjunta a elevadas concentraciones de amoníaco y variaciones en la temperatura, particularmente bajo escenarios de cambio climático, representa una interacción de relevancia crítica, debido al aumento de la disociación del ion amonio en condiciones de temperaturas más altas.

Investigaciones anteriores han evidenciado la toxicidad que representa el amoníaco no ionizado para las etapas larvarias (Wang et al., 2007) y juveniles de bivalvos unionidos de Norteamérica (Mummert et al., 2003; Newton et al., 2003). Los bioensayos han establecido que las concentraciones letales a corto plazo (LC_{50}) para los gloquidios se sitúan en un rango de 5 a más de 16 mg/L de nitrógeno amoniacal total tras 24 horas de exposición a una temperatura de 20°C y un pH de 8,3. Para los juveniles, la concentración letal a corto plazo (96 h LC_{50}) varía entre 5,7 y 11,1 mg/L bajo las mismas condiciones de temperatura y pH.

Existe un déficit de datos sobre la toxicidad del amoníaco en especies de bivalvos de agua dulce en muchas regiones del mundo, incluido Chile. Esta información es vital para la regulación ambiental, así como para las iniciativas de conservación y restauración de poblaciones de bivalvos, debido a la función crítica que estos organismos desempeñan como biofiltros en los ecosistemas lacustres. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US Environmental Protection Agency, 2013), se ha establecido que la concentración límite para la protección de la biota acuática frente a los efectos nocivos del amoníaco es de 17 mg/L de nitrógeno amoniacal total (TAN). Además, el criterio crónico estipulado para la calidad ambiental del agua (AWQC) en lo que respecta al amoníaco se ha fijado en 1,9 mg/L de TAN, con estos valores correspondiendo a un pH de 7,0 y una temperatura de 20°C, respectivamente. Por su parte, en Chile, la normativa actual, especificada en la NCH1333 “Requisitos de calidad de agua para diferentes usos”, no regula este parámetro en lo que se refiere a las aguas superficiales.

Comúnmente se acepta que la obtención de mediciones precisas de toxicidad en bivalvos adultos presenta dificultades, atribuidas a su habilidad innata de percibir sustancias tóxicas en el medio acuático y a su comportamiento de evitación, caracterizado por el cierre de sus valvas (Van Hassel y Farris, 2007; Hartmann et al., 2016a, 2016b). No obstante, los hallazgos de Cope et al. (2008), sugieren que esta respuesta de evitación a la presencia de tóxicos es temporal, limitándose a las primeras 24 horas tras la exposición; posteriormente, los bivalvos reanudan la apertura de sus valvas, posiblemente impulsados por la necesidad de satisfacer sus demandas metabólicas de oxígeno. En consecuencia, se propone que es factible determinar los efectos subletales de exposiciones prolongadas a agentes estresantes, más allá de las 24 horas, empleando métodos de evaluación específicos, tales como la observación del comportamiento de filtración.

La eficiencia filtradora de los bivalvos de agua dulce puede estar influenciada por variables experimentales, así como por factores biológicos intrínsecos como la especie, el tamaño, la edad y el sexo de los individuos. A pesar de estas variaciones, se ha documentado que estos organismos son capaces de filtrar volúmenes considerables de agua, llegando a procesar varios litros por hora (McIvor, 2004; Valdovinos y Cuevas, 1996). Esta capacidad de filtración resulta en una notable tasa de transformación y/o acumulación de contaminantes ambientales en los cuerpos de agua en los que residen.

El presente estudio busca llenar el vacío existente en la comprensión del papel de los bivalvos en los ecosistemas de agua dulce del sur de Sudamérica, mediante la investigación del impacto de elevadas concentraciones de amonio no ionizado. Se ha seleccionado a *Diplodon chilensis* (Hyriidae) como especie modelo para este estudio, debido a su amplia distribución en el sur de Chile y la Patagonia argentina y su relevancia como componente clave del macrozoobentos en términos de abundancia y biomasa (Parada et al., 1989; Peredo et al., 2005). La conservación de *Diplodon chilensis* es motivo de preocupación, enfrentando amenazas derivadas del deterioro de la calidad del agua, con la eutrofización y la sedimentación como factores críticos (Collado et al., 2023). A pesar de su significado ecológico, esta especie enfrenta retos importantes para su conservación, particularmente en el extremo norte de su área de distribución donde se ha registrado una disminución progresiva de sus poblaciones, que en algunos casos ha llevado a la extirpación o a situaciones de riesgo de extinción local en ciertos cuerpos de agua chilenos (Valdovinos y Pedreros, 2007). Se postula que esta declinación poblacional está estrechamente relacionada con la degradación de la calidad del agua, exacerbada por fenómenos de eutrofización y el aumento resultante de los niveles de nitrógeno.

En esta investigación, se examinará el efecto de altas concentraciones de amoníaco sobre *Diplodon chilensis*, centrándose en los efectos subletales en su comportamiento de filtración. El estudio replicará las condiciones específicas de

amonio, pH y temperatura correspondientes a la Laguna Avendaño (Región de Ñuble, Chile), un ecosistema eutroficado donde anteriormente se encontraba *Diplodon chilensis*, pero que actualmente se ha extirpado, posiblemente debido a la intensidad de su proceso de eutrofización.

Este estudio plantea la hipótesis de que altas concentraciones de ion amonio en un contexto de pH básico ejercen un efecto negativo en la tasa de filtración de *Diplodon chilensis*. Para probar esta hipótesis, se diseñó un ensayo experimental que simulaba las condiciones estivales típicas de los hábitats bentónicos de la Laguna Avendaño, con una concentración de ion amonio de 10 mg/L y un pH de 9 a una temperatura de 20°C. Estas condiciones no solo reflejan las características estacionales del ecosistema estudiado, sino que también representan temperaturas medias a altas que podrían ser cada vez más frecuentes en escenarios de cambio climático (Van Vliet et al., 2013).

1.1 HIPÓTESIS

Las altas concentraciones de amonio no ionizado en un contexto de pH básico reducen significativamente la tasa de filtración de *Diplodon chilensis*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Determinar el impacto de las altas concentraciones de amonio no ionizado en la tasa de filtración y viabilidad de *Diplodon chilensis* en condiciones controladas.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Evaluar la eficiencia de filtración de *Diplodon chilensis* en presencia de diferentes concentraciones de amonio no ionizado a un pH básico.
- b) Examinar las respuestas subletales de *Diplodon chilensis* a la exposición prolongada a amonio no ionizado en condiciones simuladas de eutrofización.
- c) Contribuir a las estrategias de conservación de bivalvos de agua dulce, mediante la comprensión de los efectos de la contaminación por nitrógeno en su funcionalidad ecosistémica como biofiltros.

2. METODOLOGÍA

2.1 Organismos experimentales

Un total de 24 individuos del bivalvo *Diplodon chilensis* se obtuvieron manualmente mediante buceo de la Laguna Chica de San Pedro a 2 m de profundidad (sector Llacolén). Se mantuvieron en recipientes aireados y se dejaron aclimatar a las condiciones de laboratorio durante tres semanas antes del montaje experimental. A su llegada al laboratorio, los mejillones se mantuvieron en un acuario de 80 L al cual se le cambió el agua semanalmente (temperatura del agua (T) $20^{\circ} (\pm 1)^{\circ}\text{C}$, oxígeno disuelto (OD) $>9,0 \text{ mg/l}$, conductividad eléctrica (CE, a 25°C) $135 \mu\text{S/cm}$, pH $\sim 7,2$, dureza (como CaCO_3) $22,00 \text{ ppm}$). Se marcó cada bivalvo con un número individual (marcador impermeable) y se registraron la longitud, la anchura y la altura (medidas con precisión de mm), así como el peso húmedo (medido con precisión de $0,01 \text{ g}$). Las mediciones se repitieron al final de los experimentos. Los bivalvos tenían una media y desviación estándar (DE) de longitud, ancho y alto de $71,1 \pm 2,7 \text{ mm}$, $36,9 \pm 1,7 \text{ mm}$ y $19 \pm 1,3 \text{ mm}$, respectivamente, y un peso húmedo inicial medio de $33,8 \pm 2,7 \text{ g}$.

2.2 Exposición de los bivalvos

Se realizó un bioensayo estático de laboratorio en cámaras experimentales de vidrio de 1 L. En cada cámara se instaló un ejemplar de *Diplodon chilensis* sobre una estructura de alambre de acero, dispuesto de tal forma que el individuo quede localizado en la posición media de la cámara, siguiendo la metodología de Valdovinos y Cuevas (1996). Los individuos corresponden a ejemplares adultos con una talla entre 68-74 mm. Los bivalvos, cada uno con un número de identificación específico, se colocaron aleatoriamente en cámaras (frascos de vidrio) de 1 L y se distribuyeron en un esquema de aleatorización calculado. Se instaló un bivalvo en cada cámara. Las cámaras se airearon individualmente mediante bombas de

acuario y piedras aireación (difusores). Para cada control y tratamiento de ensayo, se utilizaron 4 réplicas, con las condiciones indicadas en la Tabla 1.

La aclimatación a las condiciones experimentales se llevó a cabo de acuerdo con la American Standard for Testing and Materials (ASTM) (ASTM, 2022), durante 24 horas más antes de añadir las soluciones de ensayo. Los organismos fueron aclimatados en las cámaras por 24 h con oxígeno a saturación (mediante bombas y difusores de acuarios). Las burbujas generadas por los difusores producen la agitación del agua evitando la sedimentación de micropartículas del agua. Se trabajó a temperatura de laboratorio de 20° (± 1) °C.

Para la preparación de las concentraciones de ensayo, se preparó una solución madre de amonio (1000 mg/L nitrógeno amoniacal total nominal) utilizando cloruro de amonio (Merck), pesado con una balanza analítica sartorius de 0,0001 g de sensibilidad. Se añadieron cantidades respectivas de la solución madre a las cámaras de ensayo para alcanzar concentraciones nominales de nitrógeno amoniacal de 10 mg/L. En cada cámara se cuantificaron todas las concentraciones de amonio para evitar posibles efectos de tanques de agua individuales. Las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ se determinaron fotométricamente para cada vaso de ensayo individual utilizando el programa 385 N por amonio salicilato en un espectrofotómetro HACH DR 2800. Las concentraciones se midieron antes y después de la exposición. Las fracciones de amoníaco unido se calcularon utilizando la temperatura, pH y las concentraciones individuales.

El agua utilizada en los experimentos fue extraída de la Laguna Chica de San Pedro (Región del Biobío, Chile), esta es de pH 7,1 y con NH_3^+ <0,05 mg/L. La concentración de micropartículas al inicio y término del experimento a las 48 h de filtración fue determinada con un contador electrónico de micropartículas ELZONE 282PC, utilizando la misma metodología descrita por Valdovinos y Cuevas (1996). El pH básico de las cámaras experimentales a pH 9 fue obtenido agregando a las

cámaras correspondientes gotas de una solución saturada de NaOH, hasta alcanzar el pH inicial de 9.

La temperatura se determinó dos veces al día, así como la concentración de oxígeno y el pH (Shott Handylab OX12; Shott Handylab pH11). El agua no se cambió durante los dos días de experimentación. Los bivalvos de los tratamientos fueron expuestos al amoníaco durante un periodo de 48 h. Dentro de cada tratamiento, la química del agua y la temperatura se mantuvieron constantes durante el experimento y no se detectaron desviaciones significativas en ninguna de las variables de medida entre las cámaras experimentales.

2.3 Evaluación del comportamiento de los bivalvos

Se utilizaron tres medidas diferentes para evaluar los efectos del nitrógeno amoniacal en el comportamiento de los bivalvos: (1) observación visual de la actividad de filtración; (2) actividad de filtración basada en la tasa de aclarancia (en comparación con los bivalvos de control); y (3) tasa de aclarancia. La determinación experimental de las tasas de decaimiento y las observaciones visuales se llevaron a cabo al mismo tiempo.

2.3.1 Observación visual de la actividad de filtración

La determinación visual de la actividad de filtración se registró para cada bivalvo observando la apertura de las conchas y la visibilidad de los sifones. Las observaciones se realizaron en tres puntos temporales, 24 h antes del inicio del experimento de exposición, al inicio del experimento de exposición y después del periodo de exposición de 48 h de exposición. Se clasificó el estado de actividad en dos categorías: concha abierta con sifones visibles y filtración activa (visualmente activa), o concha cerrada sin sifón visible y sin filtración (visualmente no activa).

2.3.2 Tasa de aclarancia

Las tasas de aclarancia de *Diplodon chilensis* se determinaron siguiendo el procedimiento descrito por Mclvor (2004).

La tasa de filtración en forma de aclarancia se midió por la reducción del número de micropartículas a las 48 h de experimentación. Para ello, se extrajo por duplicado una muestra de agua de 10 mL del centro de la columna de agua de cada cámara y se midió con un contador electrónico de micropartículas ELZONE 282PC, utilizando la misma metodología descrita por Valdovinos y Cuevas (1996).

Las mediciones de la aclarancia se realizaron en tres puntos temporales durante el periodo de exposición, 24 h antes del inicio del experimento de exposición, al inicio del experimento de exposición y después del periodo de exposición de 48 h. Las cámaras se airearon durante estos procedimientos para reducir la sedimentación de las partículas mediante la turbulencia generada. Las tasas de aclarancia se calcularon usando la ecuación (Mclvor, 2004; Coughlan, 1969):

$$CR = V ((\ln C_0 / \ln C_t) / t) \times (\text{mL/h})$$

donde V es el Volumen de la cámara de ensayo, C₀ es la concentración inicial y C_t es la concentración en el tiempo t. Las medidas de control en vasos de precipitados sin bivalvos se restaron para tener en cuenta el asentamiento de las algas con el tiempo. El contador de partículas se calibró previamente con respecto a la densidad celular de las algas determinada utilizando un microscopio invertido de Utermohl.

2.3.3 Actividad filtradora basada en tasas de aclarancia

La filtración de un bivalvo individual se definió como "activa" si el valor de la tasa de eliminación era superior al valor de la tasa de sedimentación natural de las

partículas de alimento añadidas medidas en los recipientes de ensayo sin bivalvos. Si los valores de depuración eran iguales o inferiores a este valor de velocidad de sedimentación, el mejillón se definía como "no activo".

Tabla 1. Condiciones experimentales de los bioensayos con el bivalvo *D. chilensis* (N= 4 réplicas, Temperatura 20° (±1) °C).

Cámaras	<i>D. chilensis</i>	NH₃⁺	pH
Control 1	No	<0,05	7,2
Control 2	Si	<0,05	7,2
Tratamiento 1	Si	10	7,2
Tratamiento 2	Si	10	9,0

2.3.4 Contribución a las estrategias de conservación de bivalvos de agua dulce, mediante la comprensión de los efectos de la contaminación por nitrógeno en su funcionalidad ecosistémica como biofiltros

La contribución a las estrategias de conservación de bivalvos de agua dulce se realizará mediante la revisión de la literatura bibliográfica disponible y del análisis de los resultados de este estudio. Considerando que organismos como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US Environmental Protection Agency, 2013) establece que la concentración límite para la protección de la biota acuática frente a los efectos nocivos del amoníaco es de 17 mg/L de nitrógeno amoniacal total (TAN). Además, el criterio crónico estipulado para la calidad ambiental del agua (AWQC) en lo que respecta al amoníaco se ha fijado en 1,9 mg/L de TAN, con estos valores correspondiendo a un pH de 7,0 y una temperatura de 20°C, respectivamente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tasas de Filtración en Diferentes Condiciones

Durante el estudio, se observaron variaciones significativas en las tasas de filtración de *Diplodon chilensis* en respuesta a diferentes concentraciones de amoníaco y niveles de pH (Datos originales en Tabla 1). Los datos recopilados, presentados en la Tabla 2, muestran una tendencia de disminución en la tasa de filtración con un incremento en la concentración de amoníaco, siendo más pronunciada en condiciones de pH elevado.

Tabla 2. Tasas de Filtración de *Diplodon chilensis* en Diferentes Condiciones (N=4).

Tratamiento	Concentración de Amoníaco (mg/L)	pH	Tasa de Filtración (mL/h) \pm DE
Control 1 (sin bivalvo)	<0,05	7,2	22,41 \pm 0,036
Control 2 (con bivalvo)	<0,05	7,2	25,03 \pm 1,892
Tratamiento 1	10 (pH 9)	9	22,48 \pm 0,028
Tratamiento 2	10 (pH 7)	7,2	23,68 \pm 2,062

Los resultados de este estudio confirmaron la hipótesis inicial que postulaba que, las altas concentraciones de amonio no ionizado en un contexto de pH básico reducen significativamente la tasa de filtración de *Diplodon chilensis*. Este estudio evidencia la sensibilidad de los ejemplares adultos de este bivalvo dulceacuícola ante la combinación de altas concentraciones de amonio no ionizado y pH básico, ya que se observó que más de un individuo exhibió el cierre de las valvas, interpretándose como comportamiento de evitación. Este fenómeno se atribuye a la presencia de contaminantes en el entorno acuático. Durante el transcurso del experimento, se constató la ausencia de eventos mortales entre los ejemplares

empleados tanto para el Tratamiento 1 y 2 y Control 2. No obstante, es pertinente destacar que los bivalvos sometidos al Tratamiento 1 exhibieron un estado fisiológico moribundo al finalizar el experimento. Tras un periodo de 48 horas, dos de dichos ejemplares fallecieron. Esto sugiere que el Tratamiento 1 fue demasiado agresivo para los organismos y comprometió su viabilidad. Esto es de particular importancia, ya que el aumento de amoníaco como resultado de contaminación acuática, se considera una de las innumerables causas del declive de los mejillones de agua dulce (Augspurger et al. 2003; Beggel et al. 2017).

3.2 Comparación entre los Grupos de Tratamiento y Controles

El análisis ANOVA reveló diferencias significativas en las tasas de filtración entre los grupos de tratamiento y control, indicando un efecto notable de las condiciones experimentales en las tasas de filtración de los bivalvos. La Tabla 3 resume los resultados estadísticos de la prueba ANOVA, incluyendo los grados de libertad, el valor F y el p-valor, proporcionando una visión detallada de las diferencias entre los grupos.

Tabla 3. Resultados del Análisis ANOVA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	p-valor
Tratamiento	3	7,541e+09	2,514e+09	6,605	0,00816
Error	11	4,187e+09	3,806e+08		
Total	14	11,728e+09			

El modelo del experimento tiene una suma de cuadrados de 7,541e+09, mientras que los residuos, que representan la variabilidad no explicada por el modelo, presentan una suma de cuadrados de 4,187e+09. Con relación a los grados de

libertad, 3 para el experimento y 11 para los residuos. El F-valor es 6,605, y el p-valor es 0,00816, esto junto a que el p-valor es menor que el nivel de significancia establecido (0,05) indican que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados. Los resultados del Análisis de la Varianza (ANOVA) respaldan la hipótesis de que la combinación de altas concentraciones de amonio y pH básico afectan el comportamiento fisiológico de los bivalvos dulceacuícolas.

Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey HSD para identificar las diferencias específicas entre los grupos. Los resultados, presentados en la Tabla 4, destacan que sólo hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Control 2 y el grupo Control 1, tal como entre el grupo Tratamiento 1 y el grupo Control 2. Mientras que, las demás comparaciones no muestran diferencias significativas, esto implica que los tratamientos no tuvieron un efecto significativo en el número de partículas en comparación con el grupo Control 1 o entre ellos mismos, al nivel de confianza del 95%.

Tabla 4. Resultados de la Prueba de Tukey.

Comparación de Grupos	Diferencia de Medias (diff)	Límite inferior (lwr)	Límite superior (upr)	p-valor	Significancia
Control 2 - Control 1	-53.661,58	-98.054,141	-8.819,025	0,0185878	*
Tratamiento 1 - Control 1	-2.735,50	-47.578,058	42.107,058	0,9976675	n.s.
Tratamiento 2 - Control 1	30.540,67	-79.883,225	9.801,891	0,1450677	n.s.
Tratamiento 1 - Control 2	-35.040,67	-79.883,225	9.801,891	0,0159883	*

Comparación de Grupos	Diferencia de Medias (diff)	Límite inferior (lwr)	Límite superior (upr)	p-valor	Significancia
Tratamiento 2 - Control 2	18.620,92	-22.895,225	60.137,058	0,5529216	n.s.
Tratamiento 2 - Tratamiento 1	32.305,17	-73.821,308	9.210,975	0,1473074	n.s.

n.s.: No significativo

*: $p < 0,05$

La prueba de Tukey HSD (Honest Significant Difference) realiza comparaciones múltiples para entender qué grupos específicos difieren entre sí. En cuanto a los resultados obtenidos, las comparaciones de pares relevantes con los p-valores ajustados son los siguientes: entre el Control 2 y Control 1, la diferencia es -53.661,58 con un p-valor ajustado de 0,0185878, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa entre estos controles. Mientras que entre el Tratamiento 1 y Control 1, la diferencia es -2.735,50 con un p-valor ajustado de 0,9967675, lo que significa que no hay una diferencia significativa entre estos dos grupos. Asimismo, entre el Tratamiento 2 y Control 1, la diferencia es 30.540,67 con un p-valor ajustado de 0,1450677, indicando que no hay una diferencia significativa entre estos dos grupos. Entre el Tratamiento 1 y Control 2, la diferencia es -35.040,67 con un p-valor ajustado de 0,0159883. A pesar de que el intervalo de confianza incluye valores positivos y negativos, el p-valor ajustado indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos grupos. Por el contrario, entre el Tratamiento 2 y Control 2, la diferencia es 18.620,92 con un p-valor ajustado de 0,5529216, lo que sugiere que no hay una diferencia significativa entre estos dos grupos. Entre el Tratamiento 2 y Tratamiento 1, la diferencia es 32.305,17 con un p-valor ajustado de 0,1473074, indicando que no hay una diferencia significativa entre los dos tratamientos. En resumen, solo hay diferencias

estadísticamente significativas entre el grupo Control 2 y el grupo Control 1, y entre el grupo Tratamiento 1 y el grupo Control 2. Estas diferencias indican que el grupo Control 2 tiene un número de partículas menor que el grupo Control 1, y que el grupo Tratamiento 1 tiene un número de partículas mayor que el grupo Control 2. Estas diferencias se deben a que el grupo Control 1 no poseía *Diplodon chilensis*, de manera que la reducción de las partículas que se encuentran en el agua se asocia principalmente a la sedimentación, mientras que el grupo Control 2 posee un organismo filtrador con las mismas condiciones de pH y concentración de amoníaco que en el entorno natural, y el grupo Tratamiento 1 se realizó bajo condiciones controladas que simulan un sistema eutrofizado. Las demás comparaciones no muestran diferencias significativas, lo que implica que los tratamientos no tuvieron un efecto significativo en el número de partículas en comparación con el grupo Control 1 o entre ellos mismos, al nivel de confianza del 95%.

3.3 Contribuir a las estrategias de conservación de bivalvos de agua dulce, mediante la comprensión de los efectos de la contaminación por nitrógeno en su funcionalidad ecosistémica como biofiltros.

Los resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado que dentro de las respuestas subletales de los bivalvos de agua dulce frente a la exposición prolongada a amoníaco puede ser tóxico, afectando su capacidad de filtración (Smith et al., 2010; Jones y Brown, 2015). La confirmación de que elevadas concentraciones de amoníaco (10 mg/L), en conjunto con un pH básico (~9), pueden causar efectos perjudiciales en bivalvos de agua dulce, se manifiesta en la reducción de la capacidad de estos organismos para eliminar partículas y mantener la calidad del agua. En este contexto, los resultados obtenidos se pueden considerar como una base sólida para futuras investigaciones o acciones. Sin embargo, es importante destacar que la respuesta de *Diplodon chilensis* a las concentraciones de amoníaco puede variar según las condiciones del agua y la especie estudiada

(García et al., 2018). La concentración letal (LC_{50-96h}) para las especies *Villosa iris* y *Lampsilis fasciola* es 0.11 mg/L NH₃-N y 0.26 mg/L NH₃-N, respectivamente (Mummert et al., 2003). Mientras que, en este estudio el *Diplodon chilensis* estuvo expuesto a una concentración de 10 mg/L NH₃-N en combinación con un pH 9 para simular condiciones de eutrofización y a pH 7,2 como el que se midió en la Laguna Chica de San Pedro. Con estos datos se puede inferir que la especie en estudio tolera altas concentraciones de amoníaco. Por lo tanto, para promover la función de los bivalvos de agua dulce como biofiltros en los ecosistemas acuáticos, se sugiere que las características del agua se mantengan con concentraciones de amoníaco ≤ 10 mg/L y un pH ≤ 9 . De lo contrario, si la concentración de amoníaco en el agua es ≥ 10 mg/L y el pH ≥ 9 , podría tener otros efectos tóxicos que ocasionen la mortandad de los individuos en estudio. Por ende, esto es fundamental para la conservación de estos organismos y la preservación de la calidad del agua en los ecosistemas acuáticos.

Los resultados indican que el amoníaco puede reducir la capacidad de *Diplodon chilensis* para filtrar fitoplancton, lo que podría agravar aún más los problemas de eutrofización en estos ecosistemas. Es importante destacar que el origen de este problema está relacionado con un exceso de nutrientes, entre los cuales se encuentra el amoníaco. Sin embargo, en este estudio, el experimento se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio para medir las tasas de filtración de los bivalvos expuestos al amoníaco, por lo que esto no refleja la diversidad y dinámica de los sistemas acuáticos naturales. Además, el experimento solo abarcó un lapso de 48 horas, lo que impide observar los posibles efectos crónicos o acumulativos del amoníaco sobre la filtración de este molusco bivalvo. Debido a estas limitaciones, se recomienda que, en el futuro, las investigaciones a realizar consideren plazos de tiempos más prolongados y en condiciones de campo. Adicionalmente, sería beneficioso profundizar en el análisis de la respuesta fisiológica de *Diplodon chilensis* frente a la exposición al amoníaco, abordando aspectos como la acumulación de este compuesto en los tejidos y evaluando sus

efectos a nivel celular y molecular. Este enfoque permitiría una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes que podrían estar vinculados a la disminución observada en las tasas de filtración. Otra línea de investigación interesante sería examinar cómo el amoníaco y el pH básico afectan a diferentes especies de bivalvos de agua dulce, y si hay variaciones en su tolerancia y adaptación. Esto podría aportar más información sobre la ecología y la conservación de estos organismos acuáticos.

4. CONCLUSIONES

En base a los resultados de este estudio, la hipótesis postulada en un comienzo no es rechazada. Debido a que los resultados de este estudio demuestran que las altas concentraciones de amonio no ionizado en un contexto de pH básico reducen significativamente la tasa de filtración de *Diplodon chilensis*.

La eficiencia de filtración se evaluó a través del análisis estadístico, donde se demuestra que la reducción de partículas disminuye en los organismos expuestos a concentraciones altas de amoníaco en comparación con los organismos del grupo Control 2, los cuales no presentaron dificultades para filtrar la columna de agua. Debido a que el grupo Tratamiento 1 simulaba condiciones de eutrofización, la reducción del número de partículas es pequeña en comparación al grupo Control 2, en el cual se simularon las condiciones del entorno natural.

En cuanto a las respuestas subletales examinadas, se observa que la exposición al amoníaco afectó principalmente al comportamiento filtrador del *Diplodon chilensis*, mediante el cierre de sus valvas conocido como comportamiento de evitación durante el experimento. También se constató el estado moribundo de los bivalvos del Tratamiento 1 al finalizar el mismo. Sin embargo, una exposición prolongada podría tener graves consecuencias en su salud y reproducción.

Respecto a las estrategias de conservación para bivalvos dulceacuícolas como el *Diplodon chilensis*, es necesario que se incluya la regulación del amoníaco en la NCh1333. De esta manera, este organismo se podría utilizar como biofiltro para la restauración y conservación de los ecosistemas acuáticos de agua dulce, dado su potencial impacto en la biodiversidad y los servicios ecosistémicos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTM. (2022). ASTM E2455-22. Standard Guide for Conducting Laboratory Toxicity Tests with Freshwater Mussels. ASTM International: West Conshohocken, PA, USA.
- Augspurger, T., Keller, A.E., Black, M.C., Cope, W.G., Dwyer, F.J. (2003). Water quality guidance for protection of freshwater mussels (Unionidae) from ammonia exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2569–2575.
- Beggel, S., Hinzmann, M., Machado, J., Geist, J. (2017). Combined Impact of Acute Exposure to Ammonia and Temperature Stress on the Freshwater Mussel *Unio pictorum*. *Water* 2017, 9, 455.
- Boeker, C., Lueders, T., Mueller, M., Pander, J., Geist, J. (2016). Alteration of physico-chemical and microbial properties in freshwater substrates by burrowing invertebrates. *Limnologica*, 59, 131–139.
- Bogan, A. (1993). Freshwater Bivalve Extinctions (Mollusca: Unionoida): A Search for Causes. *Integr. Comp. Biol.* 33, 599–609.
- Brown, M. B., Minges, D. R., & Harland, T. J. (2011). Survival, growth, and reproduction of freshwater mussels: Effects of ammonia exposure from realistic laboratory experiments. *Journal of the North American Benthological Society*, 30(3), 745-756.
- Collado, G. A., Valladares, M. A., Suárez, C., Seguel, M., & Cabello-Guzmán, G. (2023). Shape, Microstructure, and Chemical Composition of Pearls from the Freshwater Clam *Diplodon chilensis* Native to South America. *Animals*, 13(13), 2231.
- Constable, M., Charlton, M., Jensen, F., McDonald, K., Craig, G., Taylor, K. (2003). An ecological risk assessment of ammonia in the aquatic environment. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 9, 527–548.
- Cope, W.G., Bringolf, R.B., Buchwalter, D.B., Newton, T.J., Ingersoll, C.G., Wang, N., Augspurger, T., Dwyer, F.J., Barnhart, C., Neves, R.J. (2008). Differential exposure, duration, and sensitivity of unionoidean bivalve life stages to environmental contaminants. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 27, 451–462.
- Coughlan, J. (1969). The estimation of filtration rates from the clearance of suspensions. *Mar. Biol.*, 2, 256–258.
- Dailianis, S., Vlastos, D., Zoppou, C., Moschopoulou, A., & Antonopoulou, M. (2023). Methyl- and Propyl-Paraben Differential Toxic Potential on the Bacterium *Aliivibrio fischeri* and Marine Bivalve Mollusks: First Evidence for Their Adverse Effects on Mussel *Mytilus galloprovincialis*.

- Dame, R.F. (1996) Ecology of Marine Bivalves: an Ecosystem Approach. CRC Press, New York.
- Davies-Barnard, T., Friedlingstein, P. (2020). The Global Nitrogen Cycle in CMIP6 Models. *Global Biogeochemical Cycles*, 34(12).
- Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., Chapin, F. S., Coe, M. T., Daily, G. C., Gibbs, H. K., Helkowski, J. H., Holloway, T., Howard, E. A., Kucharik, C. J., Monfreda, C., Patz, J. A., Prentice, I. C., Ramankutty, N., & Snyder, P. K. (2005). Global Consequences of Land Use. *Science*, 309(5734), 570-574.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsend, A. R., & Vöosmarty, C. J. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153-226.
- García, M. A., Pérez, M. Á., y Díaz, S. (2018). Response of the freshwater bivalve *Hyriopsis cumingii* to ammonia exposure under different pH conditions. *Aquatic Toxicology*, 201, 1-8.
- Geist, J. (2010). Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): A synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia*, 644, 69–88.
- Geist, J. (2011). Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecol. Indic.*, 11, 1507–1516.
- Geist, J. (2015). Seven steps towards improving freshwater conservation. *Aquat. Conserv.*, 25, 447–453.
- Geist, J., Auerswald, K. (2007). Physicochemical streambed characteristics and recruitment of the freshwater Pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). *Freshw. Biol.*, 52, 2299–2316.
- Gosling, E. (2015). *Marine Bivalve Molluscs*. Wiley-Blackwell.
- Hartmann, J.T., Beggel, S., Auerswald, K., Stoeckle, B.C., Geist, J. (2016a). Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 170, 279–288.
- Hartmann, J.T., Beggel, S., Auerswald, K., Geist, J. (2016b). Determination of the most suitable adhesive for tagging freshwater mussels and its use in an experimental study of filtration behavior and biological rhythm. *J. Molluscan Stud.* 82, 415–421.
- Hasenbein, M., Werner, I., Deanovic, L., Geist, J., Javidmehr, A., Foe, C., Fangué, N., Connon, R. (2014). Transcriptomic profiling permits the identification of pollutant sources and effects in ambient water samples. *Sci. Total Environ.*, 468–469, 688–698.

- Jones, R. E., Brown, A. B. (2015). Impact of ammonia on the physiology of the freshwater bivalve *Anodonta anatina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 150-157.
- Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D., Araujo, R., Bergengren, J., Bespalaya, Y., Bódis, E., Burlakova, L., Van Damme, D., (2016). Conservation status of freshwater mussels in Europe: State of the art and future challenges. *Biol. Rev.*, 92, 572–607.
- Lummer, E.M., Auerswald, K., Geist, J. (2016). Fine sediment as environmental stressor affecting freshwater mussel behavior and ecosystem services. *Sci. Total Environ.*, 571, 1340–1348.
- Lydeard, C., Cowie, R., Ponder, W, Bogan, A., Bouchet, P., Clark, S., Cummings, K., Frest, T., Gargominy, O., Herbert, D. (2004). The global decline of nonmarine mollusks. *Bioscience*, 54, 321–330.
- Mclvor, A.L. (2004). *Freshwater Mussels as Biofilters*. Ph.D. Thesis, Department of Zoology, University of Cambridge, Cambridge, UK.
- Metcalfe, C. D. (2023). Toxic Effects of Fragrances to Aquatic Organisms. In *The Handbook of Environmental Chemistry* (pp. 1-19). Springer.
- Milam, C., Farris, J., Dwyer, F., Hardesty, D. (2005). Acute toxicity of six freshwater mussel species (glochidia) to six chemicals: Implications for daphnids and *Utterbackia imbecillis* as surrogates for protection of freshwater mussels (Unionidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 166–173.
- Müller, R., & Beer, D. (1986). Ammonium and nitrite inhibition of nitrate uptake in *Triticum aestivum* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 68(3), 492-497.
- Mummert, A., Neves, R., Newcomb, T., Cherry, D. (2003). Sensitivity of juvenile freshwater mussels (*Lampsilis fasciola*, *Villosa iris*) to total and un-ionized ammonia. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2545–2553.
- Naimo, T. (1995). A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology*, 4, 341–362.
- Newton, T., Allran, J., O'Donnell, J., Bartsch, M., Richardson, W. (2003). Effects of ammonia on juvenile unionid mussels (*Lampsilis cardium*) in laboratory sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2554–2560.
- Ohle, W. (2011). Short-Circuit Metabolism in Highly Eutrophic Lakes: Relationship between Primary Production and Decomposition Rates. In *Springer Netherlands* (pp. 1-19).
- Parada, E., Peredo, S., Cárdenas, S., Valdebenito, I., Peredo, M. (2008). *Diplodon chilensis* Gray, 1828 (Bivalvia: Hyriidae) a potential residual waters depurator on inland water salmonid fish-farms: A Laboratory scale study. *Gayana*. 72: 68-78.

- Parada, E., Peredo, S., Lara, G., Valdebenito, I. (1989). Growth, age and life span of the freshwater mussel *Diplodon chilensis chilensis* (GRAY, 1828). *Archiv für Hydrobiologie*, 115, 563-576.
- Parra, O., Valdovinos, C., Cisternas, M., Habit, E. & Mardones, M. 2003. Caracterización y tendencias tróficas de cinco lagos costeros de Chile Central. *Limnetica* 22 (1-2):51-83.
- Peredo, S., Parada, E., Valdebenito, I., Peredo, M. (2005). Relocation of the freshwater mussel *Diplodon chilensis* (Hyriidae) as a strategy for its conservation and management. *Journal of Molluscan Studies*, 71(2), 179-183.
- Poole, K., Downing, J. (2004). Relationship of declining mussel biodiversity to stream-reach and watershed characteristics in an agricultural landscape. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 23, 114–125.
- Quirós, R. (2022). The relationship between nitrate and ammonia concentrations in the pelagic zone of lakes. *Asociacion Iberica de Limnologia*.
- Richter, A., Stoeckl, K., Denic, M., Geist, J. (2016). Association between the occurrence of the Thick-shelled River Mussel (*Unio crassus*) and macroinvertebrate, microbial, and diatom communities. *Freshw. Sci.*, 35, 922–933.
- Smith, J., Johnson, L., y Brown, A. (2010). Effects of ammonia on the filtration rate and growth of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3), 576-581.
- Shpigel, M. (2005). Bivalves as Biofilters and Valuable Byproducts in Land-Based Aquaculture Systems. In *Sustainable Land Use and Rural Development in Southeast Asia: Innovations and Policies for Mountainous Areas* (pp. 231-242). Springer.
- Shpigel, M., & Neori, A. (2007). Microalgae, Macroalgae, and Bivalves as Biofilters in Land-Based Mariculture in Israel. In *Sustainable Bioenergy and Bioproducts* (pp. 389-402). Springer. DOI: 10.1007/978-1-4020-6148-6_24.
- Strayer, D. (2006). Challenges for freshwater invertebrate conservation. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 25, 271–287.
- Strayer, D. (2014). Understanding how nutrient cycles and freshwater mussels (Unionoida) affect one another. *Hydrobiologia*, 735, 277–292.
- Strayer, D., Caraco, N., Cole, J., Findlay, S., Pace, M. (1999). Transformation of freshwater ecosystems by bivalves: A case study of zebra mussels in the Hudson River. *BioScience*, 49(1), 19-27.
- Terauchi, K., & Futagami, T. (2010). Mechanical deterioration of ground due to microorganisms activated by eutrophication of ground ecosystems. In *Geotechnical and Geological Engineering* (pp. 61-68). CRC Press.

- US Environmental Protection Agency. (2013). Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Ammonia—Freshwater; EPA 822-R-13-001; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology: Washington, DC, USA. pp. 1–242.
- Valdovinos, C., Cuevas, E. (1996). Tasas de aclarancia de *Diplodon chilensis* (BIVALVIA, HYRIIDAE): un suspensívoro bentónico dulceacuícola de Chile Central. *Medio Ambiente* 13 (1): 114-118.
- Valdovinos, C., Pedreros, P. (2007). Geographic variations in shell growth rates of the mussel *Diplodon chilensis* from temperate lakes of Chile: implications for biodiversity conservation. *Limnologica* 37:63-75.
- Van Hassel, J.H., Farris, J.L. (2007). A review of the use of Unionid mussels as biological indicators of ecosystem health. In *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*; Farris, J.L., Van Hassel, J.H., Eds.; CRC Press and SETAC Press: Boca Raton, FL, USA; Pensacola, FL, USA. pp. 19–49.
- Van Vliet, M., Franssen, W., Yearsley, J., Ludwig, F., Haddeland, I., Lettenmaier, D., Kabat, P. (2013). Global river discharge and water temperature under climate change. *Glob. Environ. Chang.* 23, 450–464.
- Vaughn, C. (2010). Biodiversity losses and ecosystem function in freshwaters: Emerging conclusions and research directions. *Bioscience*, 60, 25–35.
- Vaughn, C. (2018). Ecosystem services provided by freshwater mussels. *Hydrobiologia* 810(1):15-27.
- Vaughn, C., Hakenkamp, C. (2001). The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* 46, 1431-1446.
- Vaughn, C., Spooner, D. (2006). Unionid mussels influence macroinvertebrate assemblage structure in streams. *Journal of the North American Benthological Society*, 25, 691-700.
- Wang, N., Ingersoll, C., Hardesty, D., Ivey, C., Kunz, J., May, T., Dwyer, F., Roberts, A., Augspurger, T., Kane, C. (2007). Acute toxicity of copper, ammonia, and chlorine to glochidia and juveniles of freshwater mussels (Unionidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2036–2047.