



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Adaptación del biomarcador LMS (lysosomal membrane stability) en Chamelea gallina

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Evaluación y Seguimiento Ambiental de Ecosistemas Marinos y Costeros

AUTOR/A: Zúñiga Sola, Esther

Tutor/a: Falco Giaccaglia, Silvia Laura

Cotutor/a externo: MARTINEZ GOMEZ, CONCEPCION

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandía

## Adaptación del biomarcador LMS (lysosomal membrane stability) en *Chamelea gallina*

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Evaluación y Seguimiento Ambiental de Ecosistemas Marinos y Costeros

AUTORA: Zúñiga Sola, Esther

Tutora: Falco Giaccaglia, Silvia Laura

Cotutora externa: Martínez Gómez, Concepción

Curso académico: 2022/23

## Resumen

Los bivalvos presentan una gran importancia económica en el mar Mediterráneo, siendo *Chamelea gallina* una de las especies objetivo. El declive de sus poblaciones en las últimas décadas presenta una vía de estudio para recuperar y mantener la especie y su explotación.

El uso de biomarcadores está ampliamente recomendado por programas de seguimiento de la contaminación en el medio marino (i.e. OSPAR, UNEP). El biomarcador general de citotoxicidad basado en la Estabilidad de Membrana Lisosomal (EML) ha sido extensamente utilizado en mejillones (*Mytilus galloprovincialis*, *M. edulis*).

En este TFM se pretende establecer el rango de respuestas basales del biomarcador EML en una especie bentónica como *C. gallina* en función de salinidad (27-28 PSU, 32-33 PSU y 37-38 PSU —la propia del mar Mediterráneo) y temperatura (12°C, simulando el invierno; 20°C, primavera-otoño; y 28°C, verano). Se evalúan también los niveles de estrés de los organismos ensayados y se tiene en cuenta el índice de condición comparando los valores obtenidos con valores de referencia (correspondientes a ensayos practicados inmediatamente tras los muestreos).

Se observan diferencias significativas tanto en la estabilidad de la membrana lisosomal como en el índice de condición en función del ciclo reproductivo de *C. gallina*.

**Palabras clave:** Rojo Neutro; *C. gallina*; bioindicador; estrés; salinidad; temperatura

## Abstract

Bivalves are of great economic importance in the Mediterranean Sea, with *Chamelea gallina* being one of the target species. The decline of their populations in recent decades presents an avenue of study to recover and maintain the species and its exploitation.

The use of biomarkers is widely recommended by marine pollution monitoring programmes (i.e. OSPAR, UNEP). The general biomarker of cytotoxicity based on Lysosomal Membrane Stability (LMS) has been extensively used in mussels (*Mytilus galloprovincialis*, *M. edulis*).

In this TFM we aim to establish the range of basal responses of the LMS biomarker in a benthic species such as *C. gallina* as a function of salinity (27-28 PSU, 32-33 PSU and 37-38 PSU - that of the Mediterranean Sea) and temperature (12°C, simulating winter; 20°C, spring-autumn; and 28°C, summer). The stress levels of the tested organisms are also assessed, and the condition index is considered by comparing the values obtained with reference values (corresponding to tests carried out immediately after sampling).

Significant differences in both lysosomal membrane stability and condition index are observed as a function of the reproductive cycle of *C. gallina*.

**Key words:** Neutral red; *C. gallina*; bio-indicator; stress; salinity; temperature



# ÍNDICE

1	Introducción .....	7
1.1	Ecología de la especie .....	7
1.1.1	Sistema inmunitario.....	8
1.2	Situación de las poblaciones de <i>C. gallina</i> .....	9
1.3	Biomarcadores y bioindicadores .....	10
1.3.1	Rojo neutro y la estabilidad de la membrana lisosomal.....	11
1.3.2	Índice de condición .....	12
2	Objetivos .....	14
3	Materiales y Métodos .....	15
3.1	Muestreo de <i>C. gallina</i> .....	15
3.2	Diseño experimental, mantenimiento y aclimatación de los individuos en el laboratorio .....	17
3.3	Alimentación de los organismos en el laboratorio .....	19
3.4	Análisis de la estabilidad de la membrana lisosomal .....	21
3.4.1	Equipos.....	21
3.4.2	Reactivos .....	22
3.4.3	Procedimiento.....	22
3.4.4	Análisis.....	26
3.4.5	Interpretación de los resultados.....	28
3.5	Análisis del índice de condición.....	29
3.6	Análisis estadístico de los datos .....	33
4	Resultados y discusión .....	35
4.1	Resultados de la estabilidad de la membrana lisosomal.....	38
4.1.1	Análisis unifactorial .....	40
4.1.2	Análisis multifactorial .....	44
4.2	Resultados del índice de condición .....	46
5	Conclusiones .....	48
6	Bibliografía .....	49
	Anexos.....	55
	Anexo 1 .....	55
	Anexo 2 .....	56
	Anexo 3 .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ejemplares de <i>C. gallina</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Representación del ciclo ovárico de <i>C. gallina</i> en la costa de levante. Fuente: Adaptado de [15]. .....	8
<b>Figura 3.</b> Imagen tomada al microscopio de dos hemocitos granulares de la especie <i>C. gallina</i> . Los pequeños gránulos intracelulares se corresponden con lisosomas teñidos con Rojo Neutro. 9	
<b>Figura 4.</b> Mapa del punto de muestreo entre las playas de Daimús y Guardamar de la Safor (Comunidad Valenciana).....	15
<b>Figura 5.</b> Muestreo de <i>C. gallina</i> en Venecia (C. Valenciana) con buzos.....	15
<b>Figura 6.</b> Separación y selección de los individuos de <i>C. gallina</i> para la experimentación en función de su talla .....	16
<b>Figura 7.</b> Recogida de agua, muestreo y selección de individuos de <i>C. gallina</i> para la experimentación en función de su talla en la playa de Daimús.....	16
<b>Figura 8.</b> Recogida de agua de mar para llenar los acuarios .....	17
<b>Figura 9.</b> Esquema del diseño experimental.....	18
<b>Figura 10.</b> Imagen del montaje experimental de los acuarios, separados por pares en función de las salinidades.....	19
<b>Figura 11.</b> Botellas con el cultivo de microalgas <i>Isochrysis galbana</i> con el que alimentar a <i>C. gallina</i> .....	20
<b>Figura 12.</b> Imagen del recuento de <i>Isochrysis galbana</i> en el cultivo. Remarcado en rojo en cuadro de 0,2x0,2mm que debe tenerse en cuenta. ....	21
<b>Figura 13.</b> (a) Cámara de incubación. (b) Microscopio binocular Olympus CX21FS1 .....	22
<b>Figura 14.</b> Materiales necesarios para el ensayo de rojo neutro.....	23
<b>Figura 15.</b> Interior de la cámara de incubación cargada con los portaobjetos y agua con hielo para mantener las muestras a una temperatura baja y una humedad adecuada.....	23
<b>Figura 16.</b> Representación del lugar idóneo para la extracción de hemolinfa en <i>C. gallina</i> . ....	24
<b>Figura 17.</b> Pasos a seguir para la extracción de la hemolinfa en <i>C. gallina</i> .....	24
<b>Figura 18.</b> Imagen en la que se muestra dónde insertar la jeringa para la extracción de hemolinfa en <i>C. gallina</i> . ....	24
<b>Figura 19.</b> (a) Vertido de la hemolinfa extraída a un tubo Eppendorf. (b) Aspecto que debe tener una buena extracción de hemolinfa.....	25
<b>Figura 20.</b> Colocación de la muestra de hemolinfa extraída sobre el portaobjetos correspondiente dentro de la cámara de incubación. ....	25
<b>Figura 21.</b> (a) Se escurre el exceso de agua sobre el portaobjetos pasados los 30 minutos de incubación. (b) Adición de la solución de trabajo de rojo neutro sobre el portaobjetos. ....	25
<b>Figura 22.</b> Densidad celular en un campo de visión a aumento x200 (a) y x400 (b y c) .....	26
<b>Figura 23.</b> Límites (minutos) establecidos de tiempos de retención de Rojo Neutro para valorar el estrés celular en <i>C. gallina</i> utilizando el biomarcador de la estabilidad de la membrana lisosomal. ....	29
<b>Figura 24.</b> Grados de estrés celular en función del tiempo de retención del rojo neutro en muestras poblacionales de <i>C. gallina</i> (media $\pm$ SE). Rojo: muy severo. Naranja: severo. Amarillo: moderado. Verde claro: ligero. Verde: sin estrés. ....	29
<b>Figura 25.</b> Báscula utilizada para el análisis del IC. ....	30
<b>Figura 26.</b> Organismos abiertos y escurriendo sobre un papel absorbente .....	30
<b>Figura 27.</b> Balanza durante el pesaje de los organismos escurridos .....	31
<b>Figura 28.</b> Crisoles rotulados y pesados.....	31
<b>Figura 29.</b> Extracción del tejido blando y colocación en los crisoles .....	31
<b>Figura 30.</b> Valvas preparadas para ser introducidas en la estufa.....	32
<b>Figura 31.</b> Crisoles con las muestras de tejido blando seco en el desecador .....	32
<b>Figura 32.</b> Pesaje de las valvas tras salir de la estufa.....	33

<b>Figura 33.</b> Talla media (mm) de los organismos estudiados en cada tratamiento (representado con el error estándar).....	38
<b>Figura 34.</b> Resultados del TRRN (min) para cada tratamiento (representado con la media y el error estándar) .....	39
<b>Figura 35.</b> Resultados de EML (%) para cada tratamiento (representado con la media y los errores estándar) .....	40
<b>Figura 36.</b> Resultados de IC (%) para cada tratamiento (representado con la media y el error estándar). IC para 12°C ajustado al rango de tallas 13-16 mm. IC para 20°C y 28°C ajustado al rango de tallas de 17 a 20 mm.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fórmulas para el cálculo del índice de condición encontradas en la bibliografía [42].	13
<b>Tabla 2.</b> Resumen del diseño del experimento.....	18
<b>Tabla 3.</b> Volumen celular, peso seco y contenido bruto en lípidos de algunas especies de algas flageladas para la alimentación de bivalvos [63]. .....	20
<b>Tabla 4.</b> Estado patológico de las células y puntuación asignada descrita en Martínez-Gómez et al., 2015 [51]. .....	27
<b>Tabla 5.</b> Factor de ponderación en función del tiempo .....	27
<b>Tabla 6.</b> Estadios de degradación de los hemocitos .....	27
<b>Tabla 7.</b> Valores de BAC y EAC para TRRN descritos en Martínez-Gómez et al., 2015 [51].	28
<b>Tabla 8.</b> Estadísticos descriptivos (medias y errores estándar) de las condiciones de exposición y de la estabilidad de la membrana Lisosomal (EML) en cada tratamiento. Los valores de EML están expresados como tiempo de retención del Rojo Neutro (TRRN, en minutos) y como %EML . OD= Oxígeno disuelto .....	36
<b>Tabla 9.</b> Estadísticos descriptivos (medias y errores estándar) de las condiciones de exposición y resultados del índice de condición en forma de medias y errores estándar. OD= Oxígeno disuelto; IC =Índice de Condición ajustado para tallas de 17 20 mm.....	37
<b>Tabla 10.</b> Resumen de las diferencias significativas encontradas en la EML en hemocitos de C. gallina entre tratamientos de salinidad por temperatura constante.....	41
<b>Tabla 11.</b> Resumen de las diferencias significativas encontradas en la EML en hemocitos de C. gallina entre tratamientos de temperatura por salinidad constante.....	43
<b>Tabla 12.</b> Matriz de cargas de para los factores tras la rotación Varimax para el TRRN .....	45
<b>Tabla 13.</b> Calidad del análisis factorial en función del valor del índice KMO propuesto por Sharma, 1996 [65]. .....	45
<b>Tabla 14.</b> Matriz de cargas de para los factores tras la rotación Varimax para el %EML .....	45
<b>Tabla 15.</b> Resultados del análisis de nitrógeno de amonio y de nitrito en $\mu\text{M}$ en los acuarios según la temperatura de estudio.....	55
<b>Tabla 16.</b> Reactivos junto a sus respectivas cantidades para la preparación de 2L de nitrato, fosfato, silicato y tris .....	56
<b>Tabla 17.</b> Reactivo y cantidades para la preparación de la solución de metales traza .....	56
<b>Tabla 18.</b> Cantidades de cada reactivo para la preparación de 10, 2 y 1 litro de medio de cultivo para Isochrysis galbana .....	56

# 1 Introducción

## 1.1 Ecología de la especie

*Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) es un molusco bivalvo pelecípodo, que pertenece a la familia Veneridae. Comúnmente se le conoce por su nombre común, chirla (figura 1).



Figura 1. Ejemplares de *C. gallina*

Se caracteriza por habitar fondos de arena fina [1-3] cercanos a la costa a profundidades de entre unos pocos centímetros hasta los 15-20 metros [1,3-7], que le proporcionan protección y refugio. Es una especie muy extendida en el mar Mediterráneo, el mar Negro y el mar Adriático [4, 5], aunque también en algunas zonas del Atlántico (en la costa portuguesa del Algarve, desde Noruega a Marruecos) [2, 3, 8].

Se alimenta por filtración mediante sifones [3-5, 9, 10] lo que les permite acumular sustancias tóxicas como metales pesados en la alimentación. Esto puede afectar negativamente a su sistema inmunológico [11]. Esta especie utiliza su pie en forma de hacha para excavar y enterrarse en la arena o el fango. Tienen una vida sésil, acostumbrada a enterrarse en el sustrato [8].

El crecimiento de esta especie es lento [4] y depende en gran parte de factores ambientales como la temperatura [1, 12]. El crecimiento de la concha se ve inhibido o ralentizado por debajo de los 10°C y por encima de los 27°C [12]. Los individuos requieren de al menos un año para alcanzar los 14-18 mm y, con ello, la madurez sexual [1, 4]. Logran la talla mínima comercial legal en España en el mar Mediterráneo de 25 mm a los dos años de vida aproximadamente [4, 13]. Es extraño encontrar individuos de más de 3 años pese a que tienen ciclos de vida de unos 4 años [3] y que la talla máxima registrada para la especie es de 50 mm [5].

Debido a sus cortos ciclos de vida se exige éxito en el desove y reclutamiento a fin de perpetuar la especie. Un mal reclutamiento puede comprometer el mantenimiento de la población por los próximos dos años. Tanto el reclutamiento como el desove están condicionados por la variabilidad climática [3], la disponibilidad de alimento [14], además de otros factores como la disponibilidad de oxígeno [4]. En la figura 2 se muestra una representación del ciclo ovárico de la chirla en la costa del levante, dividida por etapas según los meses del año [15].

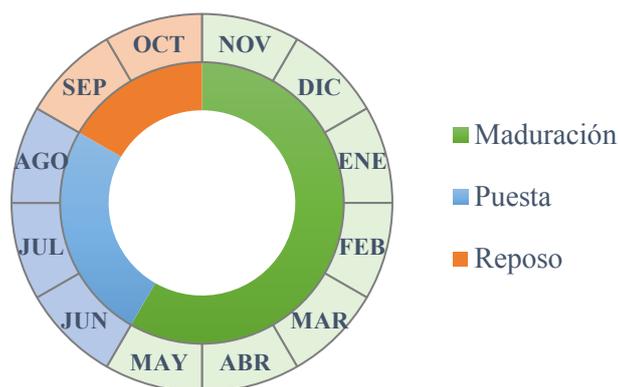


Figura 2. Representación del ciclo ovárico de *C. gallina* en la costa de levante. Fuente: Adaptado de [15].

Este ciclo está abierto a pequeñas variaciones interanuales. También se ha llegado a plantear un periodo de desove más extenso que se extendería de abril a agosto, con un máximo en junio [8]. Estudios realizados en el mar Adriático indican que ciclo reproductivo de *C. gallina* abarca los meses de marzo a septiembre [1], aunque en el área del Golfo de Cádiz algunos autores han detectado los primeros desoves en febrero, extendiéndose hasta agosto [16, 17].

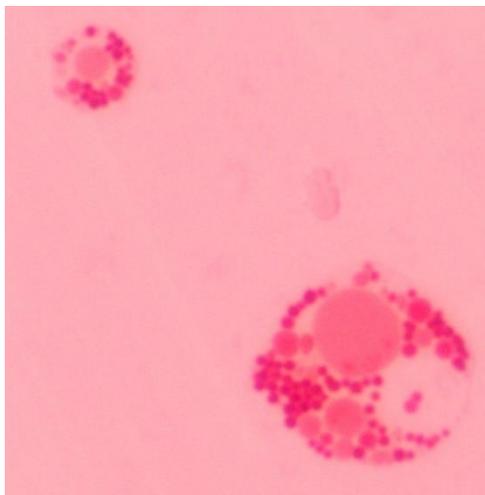
### 1.1.1 Sistema inmunitario

En los bivalvos, el estrés debido a acumulación de metales pesados o variaciones en los parámetros ambientales deriva en el deterioro o alteración de sus funciones fisiológicas, bioquímicas y ecológicas [18]. Esto repercute de forma directa en sus patrones de comportamiento entre los que destacan su crecimiento, su ciclo reproductivo, el sistema endocrino y, más comúnmente, el sistema inmunitario [4, 11], siendo el más sensible de los mencionados. Este sistema, encargado de reconocer y eliminar organismos, en su mayoría, patógenos [4], se ve inhibido o alterado, haciendo a los organismos más vulnerables [19].

El sistema inmune en los bivalvos es innato y consiste en respuestas inflamatorias no específicas mediadas por células (hemocitos) o sus productos (mecanismos humorales) [11, 19], existiendo una estrecha vinculación entre ellos, y siendo estas respuestas las principales responsables de la detección de cuerpos extraños y su fagocitosis, actuando como mecanismos de defensa contra parásitos y patógenos [4, 9, 20]. Además, también participan en la reparación de las valvas, la digestión intracelular, la excreción y la cicatrización de heridas [21]. Los bivalvos tienen un sistema circulatorio semiabierto, y los hemocitos están presentes en la hemolinfa, pero también son capaces de salir de la circulación y migrar a otros tejidos del animal donde pueden agregarse para restringir la infección o alguna lesión tisular.

En la década de los 70 diversos investigadores trataron de clasificar a los distintos tipos de hemocitos encontrados en bivalvos en función de su morfología y del papel que desempeñan en el organismo [21]. Gran parte de estos estudios han empleado ostras y mejillones para tal distinción. No obstante, pocos estudios han estudiado especies de la clase Veneridae [9]. Está demostrada la existencia de dos tipos de hemocitos en bivalvos: granulocitos y hialinocitos [21]. No todas las especies de bivalvos cuentan con la presencia de estos dos hemocitos. Sin embargo, *C. gallina* cuenta con ambos [9]. Ambas células cuentan con enzimas digestivas y actividad fagocítica. La diferencia radica en la cantidad de gránulos en el citoplasma, siendo abundantes en granulocitos y escasos o inexistentes en hialinocitos [9, 21]. Los lisosomas son gránulos intracelulares provistos de membrana que se derivan del aparato de Golgi y se encuentran en todas

las células del organismo, y son extremadamente abundantes en los hemocitos granulares (Figura 3). La matriz interna de los lisosomas tiene un pH ácido que permite que las enzimas digestivas que contienen (hidrolasas) sean funcionales. Están implicados en varios procesos celulares, pero fundamentalmente se encargan de reciclar restos celulares de desecho y destruir virus y bacterias invasoras [22]. Si la célula es dañada y no puede ser reparada, los lisosomas participan en el proceso de autodestrucción conocido como muerte celular programada o apoptosis [23].



**Figura 3.** Imagen tomada al microscopio de dos hemocitos granulares de la especie *C. gallina*. Los pequeños gránulos intracelulares se corresponden con lisosomas teñidos con Rojo Neutro.

Dado que la respuesta inmune se rige por la funcionalidad y actividad de los hemocitos, un análisis de estas células puede proporcionar una estima del bienestar del organismo [19, 20].

## 1.2 Situación de las poblaciones de *C. gallina*

Los bivalvos suponen un 14% de la producción de alimento en ecosistemas marinos a nivel mundial [3]. Su pesca tiene gran importancia económica en el mar Mediterráneo [2, 5, 7, 9, 24] llegando a facturar hasta 21.000 millones de euros anuales. Dentro de Veneridae, las almejas son las especies más valoradas debido a que son una fuente de nutrientes y a la relativa facilidad en su recolección. De este modo, las almejas se convierten en unas de las especies más explotadas a nivel europeo, con un 28.87% de la producción total de bivalvos [3].

La especie objetivo de almeja en la UE es *C. gallina* [3, 6, 7, 24] y, durante décadas, especialmente entre 1970 y 1980, la especie se ha sometido a una intensa presión pesquera llegando a desembarcar hasta 100.000 t/año en la costa del mar Adriático [1, 4, 5, 9, 24, 25].

La recolección de esta especie se realiza mediante pequeñas embarcaciones —que suponen el 64% de la flota pesquera en el mar Mediterráneo [3]— equipadas con dragas hidráulicas [4, 6, 19]. En el mar Mediterráneo se requieren profundidades de entre 2 a 12 metros para la captura [2] mientras que en el mar Adriático van de 3 a 15 m de profundidad [1].

El paso de los años ha ido reflejando un declive en las poblaciones de chirla. Inicialmente se consideró que la mala o nula gestión en la pesca de esta especie —dado que las pequeñas pesquerías no registraban datos de capturas correctamente [3]— había llegado a agotar los stocks naturales [2, 25]. Por esto mismo, se impusieron una serie de restricciones, como el establecimiento de la talla mínima comercial permitida de 25 mm [Reglamento del Consejo (CE) No. 1967/2006, 2006 de la Comunidad Europea (CE)]. En la costa italiana se produjo una recuperación parcial de las poblaciones en torno al año 2007, pero pronto se observó un nuevo agotamiento en 2009 [24].

Durante este tiempo, se observó el impacto que otro tipo de factores produce en *C. gallina*, más allá de la presión pesquera. Los veranos de 1991, 1993, 1996, 1998 y 2000 fueron periodos críticos para las poblaciones debido a condiciones anóxicas que derivaron en una alta mortalidad. Estos eventos pueden deberse a numerosas causas como la entrada masiva de nutrientes (provenientes de blooms de algas, por ejemplo), de la propia estratificación de la columna de agua o de cambios en las tasas de intercambio en la masa de agua [4, 9]. Lejos de ser casos aislados, los eventos anóxicos han aumentado en el tiempo en los últimos 50 años.

Con esto, se decretó que la escasa recuperación de las poblaciones de *C. gallina* (pese al control pesquero ofrecido) se debe a una combinación de factores actuando de forma simultánea [3]. Además, se ha llegado a determinar que los factores ambientales son los causantes más comunes de mortalidad en bivalvos [7].

Este hecho tiene especialmente importancia teniendo en cuenta las evidencias del cambio climático en la actualidad [26]. El aumento de emisiones de CO<sub>2</sub> conduce a la acidificación de los océanos; el incremento de la temperatura del agua marina que deriva en eventos más frecuentes de anoxia dificultando la disolución del oxígeno; los cambios en la salinidad de las aguas por entrada masiva de agua dulce tras grandes inundaciones o vertidos; etc. [27]. Por su parte, las sustancias antropogénicas presentes en las aguas como p.e. fármacos (presentes en cremas solares,) [20] suponen un factor de estrés añadido a los bivalvos, junto a las afecciones con patógenos y a la presencia de compuestos contaminantes como metales pesados [2, 3, 5, 7, 8, 18, 20].

Dadas las peculiaridades del nicho ecológico de *C. gallina*, resulta imposible su producción acuícola. Así, su extracción proviene directamente de stocks naturales. De este modo, la peligrosidad para la perpetuidad de la especie es alta [28] y es necesario establecer acciones para su protección y facilitar su proliferación.

### 1.3 Biomarcadores y bioindicadores

Debido al proceso de cambio climático que se está produciendo en nuestro planeta y a la propia contaminación de origen antropogénico, es necesario estudiar y detectar los impactos que estos producen sobre las especies a fin de lograr una mejor gestión ambiental para el mantenimiento de las poblaciones y ecosistemas. En ecotoxicología se denominan especies bioindicadoras a aquellas en las que su fisiología y características estructurales (ecología trófica, distribución espacial, abundancia, etc.) pueden ser utilizadas para valorar la calidad del medio en el que viven, ya que integran parte de la información ambiental que los rodea, modificando respuestas biológicas cuantificables al variar las condiciones ambientales [29]. Es decir, son organismos suficientemente sensibles que reaccionan a los cambios ambientales. Las especies bioindicadoras se utilizan ampliamente desde 1970 como herramientas biológicas para valorar la calidad de los hábitats, con un enfoque especial a los afectados por la actividad antropogénica [30]. Desde principios de la década de 1990, en estas especies bioindicadoras se empezaron a desarrollar herramientas basadas en pruebas fisiológicas, bioquímicas, genéticas, etc. para establecer señales de alerta temprana de potenciales efectos deletéreos a mayores niveles de organización biológica, comúnmente conocidas como "biomarcadores" [29, 31–33]. Los biomarcadores son herramientas auxiliares en toxicología ambiental para evaluar la "salud" de los organismos [34]. De este modo, es posible conocer los efectos nocivos y en algunos casos, el daño patológico que pueden generar los factores estresantes sobre los organismos, y establecer programas de seguimiento para valorar si las medidas de gestión adoptadas para combatirlos resultan eficaces [18].

Dentro del medio marino, las diferentes Convenciones Regionales, como por ejemplo la Convención de Barcelona (para el mar Mediterráneo) o la Convención de Oslo-París (OSPAR;

del Atlántico Noreste) han desarrollado sus propios programas de seguimiento de la contaminación marina (MED POL en el Mediterráneo y CEMP en el Atlántico Noreste). En estos programas de seguimiento se recomienda el uso de biomarcadores en especies bioindicadoras de los ecosistemas marinos y costeros [30, 35, 36] ya que contribuyen a la evaluación de si se mantiene o si se está alcanzando el Buen Estado Ambiental en las Demarcaciones Marinas, tal y como indica la Directiva Marco de la Estrategia Marina de la UE (2008/56/CE) [11] y el Plan de Acción para el Mediterráneo (MAP) [37].

En este ámbito, los moluscos bivalvos son uno de los grupos de bioindicadores más utilizados en estos programas para evaluar la calidad de las aguas costeras, siendo los mejillones los más utilizados, seguidos de las ostras. [38, 39] Esto se debe a su amplia distribución geográfica, su naturaleza trófica (organismos filtradores), ecológica (sésiles) y fisiológica (con baja capacidad para detoxificar compuestos xenobióticos y gran capacidad para bioacumular en sus tejidos los contaminantes más persistentes), lo que les permite acumular significativamente sustancias presentes en pequeñas cantidades en la columna de agua [40].

En el presente Trabajo de Fin de Máster se utiliza como bioindicador al bivalvo *C. gallina*. Se trata de una especie que juega un papel importante en los ecosistemas puesto que, pese a su vida sésil, es capaz de impactar directamente en el ciclo de nutrientes modificando de este modo las redes de alimentación de su entorno [8]. Es sensible a cambios ambientales en la zona submareal en la que habita [8] y, dado que se alimenta por filtración gracias a un par de sifones, es capaz de acumular en sus tejidos sustancias tóxicas como metales pesados [2, 8, 25, 30].

Los bivalvos, *C. gallina* en este caso, están expuestos a condiciones ambientales cambiantes por la propia naturaleza del hábitat en el que se encuentran [11]. Fluctuaciones en la temperatura del agua, la disponibilidad de oxígeno o la salinidad, además del propio ciclo biológico de la especie, suponen factores de confusión a la hora de interpretar las respuestas de biomarcadores en relación a la contaminación química ambiental [18, 30, 41]. Por ello, es necesario un profundo conocimiento de la influencia de estos factores ambientales y biológicos en la especie bioindicadora antes utilizar la respuesta de biomarcadores para valorar la calidad química ambiental [42, 43] Por otro lado, el uso de una batería de biomarcadores que cubren diferentes modos de acción, p.e. citotoxicidad, neurotoxicidad, genotoxicidad, inmunotoxicidad, etc. permite valorar de una forma más robusta los efectos sobre la salud del organismo y el estado de la calidad ambiental del entorno en el que habitan [44].

### 1.3.1 Rojo neutro y la estabilidad de la membrana lisosomal

Uno de los biomarcadores más utilizados y recomendados en los programas de seguimiento de la contaminación marina es la estabilidad de la membrana lisosomal (Lysosomal membrane stability, LMS, en inglés) [45–48]. La estabilidad de la membrana lisosomal (EML) es un biomarcador muy sensible de la viabilidad celular [10] y puede proporcionarla información sobre el tiempo y/o la concentración máxima de exposición a un contaminante/grupo de contaminantes al que se puede someter a un organismo antes de mostrar signos de estrés celular y citotoxicidad [45].

En el caso del programa MED POL, el análisis de este biomarcador en mejillones es de obligado cumplimiento [49]. Para el análisis de este biomarcador se pueden utilizar diferentes técnicas, dependiendo del tipo celular en el que se evalúe [50, 51]. En el caso de los mejillones y otros invertebrados, el estudio de la estabilidad de la membrana lisosomal puede estudiarse en hemocitos granulares, ya que como se explicó anteriormente, son células ricas en lisosomas. Para ello se utiliza el ensayo de retención del rojo neutro (Neutral Red Retention, NRR, en inglés).

Una de las ventajas de la aplicación del ensayo NRR es que no se trata de una prueba destructiva, ya que se utiliza una muestra de hemolinfa para realizar el test. Es decir, tras una cuidada recolección de organismos y extracción de hemolinfa, los individuos pueden regresar a su hábitat [51]. El ensayo NRR permite valorar la citotoxicidad celular *in vivo*, utilizando cultivos monocapa primarios de las células diana, y es una técnica muy utilizada por sus aplicaciones, no sólo en el ámbito ambiental, sino también biomédico [10]. Se emplea para monitorizar alteraciones presentes en la membrana lisosomal causadas por factores de estrés [45, 52] incluidos los contaminantes ambientales [10, 52, 53].

La técnica consiste en determinar el tiempo de retención del rojo neutro dentro de los lisosomas de los hemocitos granulares [52, 53]. El rojo neutro es un colorante capaz de atravesar la membrana celular de los hemocitos por difusión pasiva debido a su débil carga catiónica [10], [51]. Una vez dentro de la célula, queda atrapado dentro de los lisosomas por protonización y secuestrado por la matriz lisosomal, acumulándose en estos orgánulos. El grado de retención del colorante está en función del pH del interior del lisosoma, así como de la eficiencia de su bomba de protones asociada a la membrana [54]. El ensayo NRR permite obtener información acerca de la tasa de fusión de lisosomas primarios con auto/heterofagosomas, pero también el aumento de la autofagia, así como la fuga de los contenidos lisosomales en el citosol como consecuencia de pérdida de la impermeabilidad de su membrana, posiblemente por deterioro de la bomba de protones [51].

Las células sanas son capaces de captar más rojo neutro que las dañadas y de retenerlo dentro de los lisosomas durante mayor tiempo, lo que permite obtener información sobre el grado de estrés celular al que ha estado sometido el organismo previo al análisis [51]. En el ensayo NRR, la retención del colorante y su evolución dentro de los lisosomas se observa al microscopio durante pequeños intervalos de tiempo (1-2 minutos) y de manera intermitente (cada 30 minutos) durante 3 horas [10]. En caso de que la membrana lisosomal se vea afectada (mostrando la afección celular), se podrá apreciar la difusión o fuga del rojo neutro al citoplasma [51, 52]. También es posible visualizar otras anomalías en los lisosomas, tales como el agrandamiento y la fusión lisosomal [51].

El ensayo NRR debe finalizar a las 3 horas con el fin de no proporcionar resultados falseados por la propia toxicidad del Rojo Neutro, siendo importante utilizar la concentración adecuada en el ensayo. Además, el colorante rojo neutro es fotosensible, por lo que las muestras celulares han de mantenerse en oscuridad el máximo tiempo posible y deben recibir el mismo tiempo de exposición a la luz bajo el microscopio. La intensidad de la luz en el microscopio debe mantenerse tan baja como sea posible para maximizar la comparación de los resultados entre muestras [51].

El biomarcador EML proporciona resultados sobre posibles daños en la funcionalidad de la membrana lisosomal y se expresa, cuando se utiliza el ensayo NRR como el tiempo máximo (en minutos) al que las células permanecieron sin alteración, es decir, sin difundir el colorante al citoplasma o sin presentar anomalías estructurales significativas. [29].

Hasta donde se sabe, no hay información documentada previa sobre el uso de este biomarcador (EML) en la especie *C. gallina*.

### 1.3.2 Índice de condición

Los biomarcadores necesitan, en algunos casos, de otro tipo de ensayos que evalúen los efectos biológicos para facilitar una correcta interpretación de los resultados obtenidos con biomarcadores [42]. En este caso, es posible obtener información complementaria sobre el estado de los bivalvos mediante la estimación de su índice de condición (IC). Este índice representa la cantidad de tejido blando relativo producido por un organismo con respecto al peso total del

organismo [5, 55, 56]. Permite obtener información acerca del estado nutricional y fisiológico de los bivalvos [5, 56] y proporcionar datos sobre su valor nutritivo, comercial y ecológico [55].

Los resultados del IC pueden verse afectados por cambios en los propios ciclos biológicos de los organismos, por almacenamiento y/o uso de las reservas energéticas, la maduración y liberación de gametos, disponibilidad de alimento y/o oxígeno, además de otros factores ambientales [57].

En este sentido, sería necesario discriminar por sexo los individuos a la hora de realizar los análisis de índice de condición puesto que el desarrollo de las gónadas y el crecimiento de tejido somático es distinto en machos y hembras [56, 58]. No obstante, dado que *C. gallina* no presenta dimorfismo sexual evidente a simple vista, en este trabajo no se ha realizado tal distinción, estando el análisis histológico gonadal fuera de los objetivos del presente TFM.

En la bibliografía se han descrito varias funciones para calcular el índice de condición en bivalvos, como los que se muestran en la tabla 1. El peso de las valvas puede suponer problemas en alguna especie de bivalvos donde la diferencia entre la biomasa de las valvas y el tejido blando es grande (p.e. con Ostras). En el presente estudio se ha utilizado el IC<sub>1</sub>.

**Tabla 1.** Fórmulas para el cálculo del índice de condición encontradas en la bibliografía [42].

<b>IC<sub>1</sub></b>	$IC_1 = \frac{\text{Peso tejido blando seco (g)}}{\text{Longitud de las valvas (cm)}} \cdot 100$
<b>IC<sub>2</sub></b>	$IC_2 = \frac{\text{Peso tejido blando seco (g)}}{\text{Peso valvas (g)}} \cdot 100$
<b>IC<sub>3</sub></b>	$IC_3 = \frac{\text{Peso tejido blando seco (g)}}{\text{Peso total (g)} - \text{Peso valvas (g)}} \cdot 100$
<b>IC<sub>4</sub></b>	$IC_4 = \frac{\text{Peso tejido blando húmedo (g)}}{\text{Peso total (g)}} \cdot 100$
<b>IC<sub>5</sub></b>	$IC_5 = \frac{\text{Peso tejido blando húmedo (g)}}{\text{Peso total (g)} - \text{Peso valvas (g)}} \cdot 100$
<b>IC<sub>6</sub></b>	$IC_6 = \frac{\text{Peso tejido blando seco (g)}}{\text{Peso tejido blando húmedo (g)}} \cdot 100$
<b>IC<sub>7</sub></b>	$IC_7 = \frac{\text{Peso tejido blando húmedo (g)}}{\text{Peso valvas (g)}} \cdot 100$

## 2 Objetivos

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Máster es el estudio de la respuesta basal del biomarcador EML en hemocitos granulares de *C. gallina* bajo distintas condiciones ambientales de temperatura y salinidad, utilizando la técnica de retención de rojo neutro (NRR). En este estudio se parte de la hipótesis de que diferentes condiciones ambientales de temperatura y salinidad podrían afectar a la estabilidad de la membrana lisosomal de los hemocitos en la almeja *C. gallina*.

A fin de lograr el objetivo general se han planteado los objetivos específicos que se detallan a continuación:

- **Obj. s1.** Valorar la EML en hemocitos de *C. gallina* aclimatada a tres temperaturas diferentes: 12°C, 20°C y 28°C y tres salinidades diferentes 27-28 PSU, 32-33 PSU y 37-38 PSU.
- **Obj. s2.** Determinar de las condiciones óptimas de salinidad y temperatura para la especie *C. gallina* en función del biomarcador EML.
- **Obj. s3.** Plantear el posible escenario al que se conduce la especie *C. gallina* en medios marinos debido al calentamiento global.
- **Obj. s4.** Aportar variables de apoyo (i.e. índice de condición, tamaño) de los organismos para facilitar la interpretación de los biomarcadores.

### 3 Materiales y Métodos

En este apartado se especifican los materiales utilizados para la realización de los ensayos, así como los muestreos, procedimientos y métodos experimentales y materiales empleados a lo largo de este Trabajo de Fin de Máster.

#### 3.1 Muestreo de *C. gallina*

A fin de llevar a cabo los ensayos se muestrearon individuos de poblaciones naturales al sur del puerto de Gandía, entre Daimús y Guardamar de la Safor (Valencia). En la figura 4 (*Fotograma vol 2023 CC BY 4.0 © Instituto Cartográfico Valenciano, Generalitat*) se indica el punto de muestreo en el mapa.



Figura 4. Mapa del punto de muestreo entre las playas de Daimús y Guardamar de la Safor (Comunidad Valenciana)

Dada la propia ecología de la especie, la recogida de individuos se realizó mediante rastrillos con redes de 0,5 cm. Fue necesario acceder a los puntos de muestreo con un barco dada la profundidad existente (de 4 a 7 metros).



Figura 5. Muestreo de *C. gallina* en Venecia (C. Valenciana) con buzos.

Se realizaron 3 muestreos (28 de marzo, 3 de mayo y 28 de junio de 2023). En cada uno de ellos se recogieron unos 175 individuos de *C. gallina* (25 individuos para cada uno de los seis acuarios además de 25 individuos para el cálculo del índice de condición de referencia). Para minimizar los efectos de la edad en la respuesta del biomarcador [42] y facilitar la extracción de la hemolinfa se seleccionan los individuos de tamaño comprendido entre 15 y 26 mm (los cuales ya habían alcanzado la madurez sexual en la mayoría de los casos). Los individuos que no alcanzaban dicha talla fueron devueltos al punto de muestreo.



**Figura 6.** Separación y selección de los individuos de *C. gallina* para la experimentación en función de su talla



**Figura 7.** Recogida de agua, muestreo y selección de individuos de *C. gallina* para la experimentación en función de su talla en la playa de Daimús.

Durante la recolección se recogió agua de mar de la zona de muestreo para ser utilizada posteriormente en los experimentos de aclimatación, con el fin de reducir el estrés al que están sometidos los individuos al inicio de la experimentación. Se anotaron los datos de temperatura y salinidad de esa agua a fin de iniciar una aclimatación más eficiente. Tras el muestreo, los individuos fueron transportados al laboratorio de la UPV e introducidos inmediatamente en

acuarios con agua de mar del sitio de muestreo, previamente filtrada (50  $\mu\text{m}$ ) para eliminar la mayor parte del plancton presente.



**Figura 8.** Recogida de agua de mar para llenar los acuarios

### 3.2 Diseño experimental, mantenimiento y aclimatación de los individuos en el laboratorio

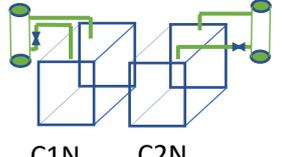
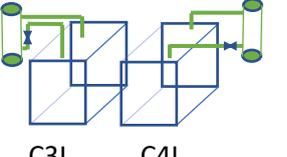
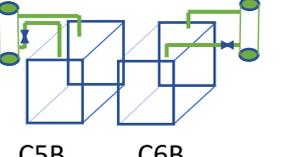
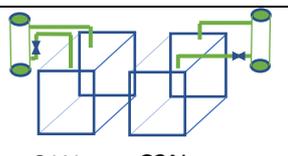
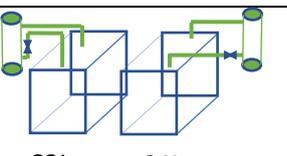
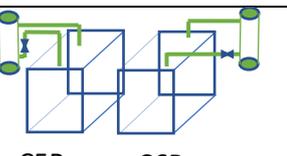
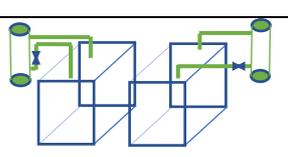
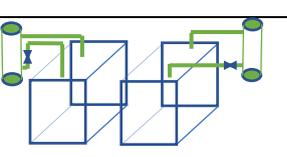
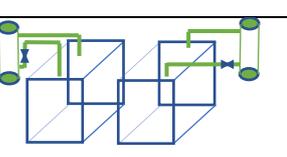
El experimento se plantea en función de las características propias de salinidad y temperatura del mar Mediterráneo y de resultados obtenidos en estudios previos con la especie *C. gallina* encontrados en la bibliografía.

En el mar Mediterráneo, la temperatura del agua en invierno ronda los 10°C a 15°C, mientras que en verano oscila entre los 21°C y los 30°C. En cuanto a su salinidad, es uno de los mares con salinidad más alta, alcanzando los 36 PSU a 38 PSU [59, 60]. En experimentos realizados con *C. gallina* se ha trabajado bajo condiciones de salinidad de 28 PSU 34 PSU y 40 PSU [7].

En este estudio se establecieron nueve tratamientos diferentes en función de las condiciones de temperatura y salinidad del agua, tal como se muestran en la Tabla 2. Cada tratamiento incluyó dos factores fijos (temperatura y salinidad) y se realizó por duplicado. El tamaño muestral de la unidad experimental (acuario de 20L) fue de 20 a 25 individuos. Los organismos fueron expuestos durante 21 días a cada tratamiento. Previo a esto, se precisaron de unos 5-10 días de aclimatación donde, a partir de las condiciones de salinidad y temperatura del agua recogida en el muestreo, los organismos se adaptaron a los valores deseados para el estudio. Durante el periodo de aclimatación, se aumentó o disminuyó 2°C o 2 PSU diariamente hasta alcanzar los valores experimentales [7, 22].

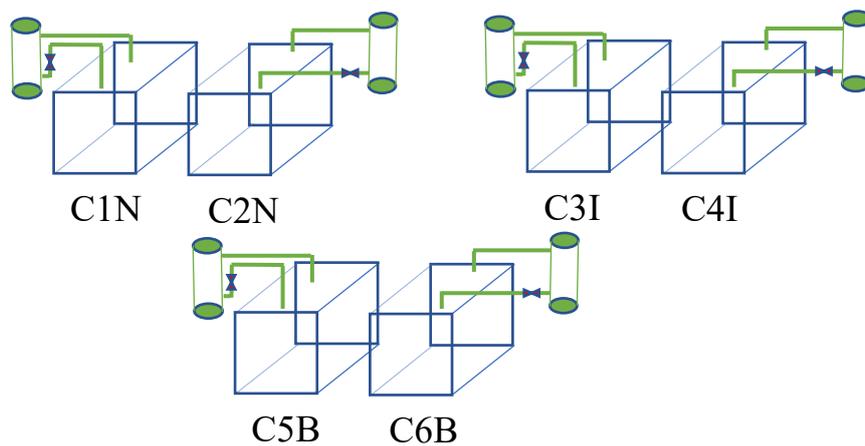
Las temperaturas elegidas fueron 12°C, lo que simularía una época invernal; 20°C, haciendo referencia a la primavera o al otoño; y 28°C correspondiente a la época estival. En cuanto a las salinidades, se escogieron 37-38 PSU la correspondiente al Mediterráneo; 33-32 PSU como un valor intermedio; y 27-28 PSU, valor de salinidad al que la tasa de supervivencia es del 100% para *C. gallina* [7], [22]. Para cada condición de temperatura, por tanto, se tuvieron 6 acuarios divididos por pares en función de la salinidad. De modo que dos acuarios contaban con un rango de salinidad de 37-38 PSU, denominadas CN (salinidad “normal”, la perteneciente al Mediterráneo); dos acuarios estuvieron a 32-33 PSU, llamadas CI (salinidad “intermedia”); y las dos últimos a 27-28 PSU, designadas como CB (salinidad “baja”).

**Tabla 2.** Resumen del diseño del experimento

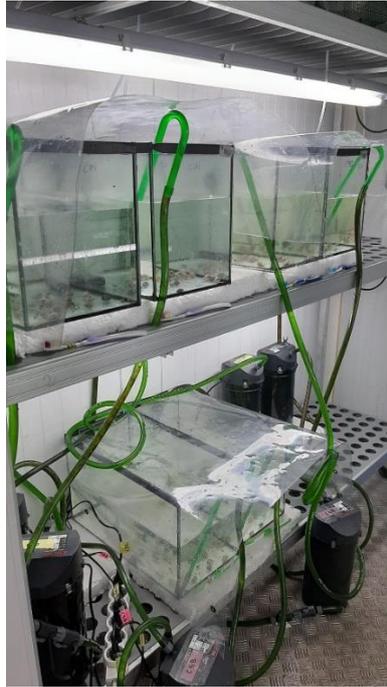
<b>CÁMARA TERMOSTATIZADA</b>			
<b>TEMPERATURA</b>	<b>SALINIDAD</b>		
	37-38 PSU	33-32 PSU	27-28 PSU
12°C Abril-Mayo	 C1N C2N	 C3I C4I	 C5B C6B
20°C Mayo-Junio	 C1N C2N	 C3I C4I	 C5B C6B
28°C Junio-Julio	 C1N C2N	 C3I C4I	 C5B C6B

Los acuarios se ubicaron dentro de unas cámaras termostáticas a fin de mantener la temperatura constante durante la realización de los experimentos (12°C, 20°C o 28°C) en función del ensayo que se realice. Dentro de las cámaras termostáticas se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Cada acuario fue provisto de aireación constante y un filtro para recircular el agua y mantenerla limpia.

En la figura 9 se muestra un esquema del diseño experimental y en la figura 10 una fotografía tomada del montaje dentro de una de las cámaras termostáticas.



**Figura 9.** Esquema del diseño experimental.



**Figura 10.** Imagen del montaje experimental de los acuarios, separados por pares en función de las salinidades

De forma diaria, se registraron datos del oxígeno disuelto (OD), de la salinidad y de la temperatura en cada acuario. Las sondas utilizadas para dichas mediciones fueron la Sonda óptica proODO YSI para las medidas de temperatura y OD; y la Sonda WTW 3320 para la medida de la salinidad. Cuando fue necesario y debido a procesos de evaporación, se reajustó la salinidad del agua en los acuarios. El reajuste de la salinidad siempre se realizó añadiendo agua destilada para evitar introducir factores de estrés añadidos a la experimentación.

Ocasionalmente (mínimo una vez para cada temperatura de estudio), se realizó un análisis del nivel de amonio ( $N_{NH_4^+}$ ) y nitrito ( $N_{NO_2^-}$ ) presentes en los acuarios para comprobar que la calidad del agua era la óptima. Se utilizaron los métodos propuestos por Aminot y Chaussepied, 1983, y adaptados por Baumgarten et al., 2010 [61, 62] (Anexo 1).

Durante los ensayos, los organismos fueron alimentados con microalgas. Durante la alimentación, los filtros permanecieron cerrados entre 4 y 8 horas para permitir una correcta alimentación a los individuos.

### 3.3 Alimentación de los organismos en el laboratorio

La especie de microalga escogida para la alimentación de *C. gallina* durante la experimentación fue *Isochrysis galbana*.

Dado que los individuos del estudio eran reproductores (según indica su talla), la ración necesaria fue del 2% al 4% del peso seco del tejido blando de los organismos en peso seco de algas. Por esto se siguió el procedimiento para el cálculo de índice de condición de *C. gallina* recogido en el primer muestreo para calcular la ración diaria necesaria por adulto (ecuación 1).

$$\frac{g \text{ de ración}}{\text{día} \cdot \text{adulto}} = \frac{3 \cdot \text{peso seco medio de la carne (g)}}{100} \quad (1)$$

Se proporcionó el 50% de la ración diaria al 3% —es decir, el 1,5%— como alimento por cada adulto de *C. gallina*. La densidad celular necesaria se calculó de acuerdo con la ecuación 2

sabiendo que 1 millón de células de *Isochrysis galbana* tiene un peso seco de unos 0,023 mg (Tabla 3, [63]).

$$\frac{\text{Ración (1,5\%)}}{\text{día}} (\text{millones de células}) = \frac{0,015 \cdot \text{peso seco tejido blando (mg)}}{0,023} \quad (2)$$

**Tabla 3.** Volumen celular, peso seco y contenido bruto en lípidos de algunas especies de algas flageladas para la alimentación de bivalvos [63].

Especie	Volumen celular medio ( $\mu\text{m}^3$ )	Peso seco ( $\mu\text{g } 10^{-6}$ células)	Lípidos (%)
<i>Tetraselmis suecica</i>	300	200	6
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	170	85	21
<i>Isochrysis galbana</i>	40-50	19-24	20-24
<i>Isochrysis</i> (T-ISO)			
<i>Pavlova lutherii</i>			

El crecimiento y proliferación de estas microalgas se consiguió añadiendo medio de cultivo a botellas con cepas activas de *I. galbana* ya existentes cada vez que se extraía un volumen para alimentar a *C. gallina*. El medio de cultivo se preparó a partir de agua de mar (filtrada y esterilizada mediante autoclave) y nutrientes (nitrato, fosfato, silicato y TRIS según se muestra en el anexo 2). Dado que se trabajó con acuarios a tres salinidades al mismo tiempo, se prepararon tres medios de cultivo, cada uno con una salinidad (CN, CI, CB). Para no contaminar los cultivos con zooplancton u otro tipo de contaminantes que puedan comprometer la vida de las microalgas, se trabajó en condiciones de esterilidad, utilizando mecheros Bunsen y pipetas esterilizadas

Los cultivos se mantuvieron en botellas con aireación en el laboratorio a temperatura ambiente (figura 11). Las botellas estuvieron expuestas a luz artificial durante las 24 horas del día para fomentar la proliferación de las microalgas.



**Figura 11.** Botellas con el cultivo de microalgas *Isochrysis galbana* con el que alimentar a *C. gallina*.

A la hora de la alimentación de *C. gallina* se hicieron recuentos en el microscopio a fin de estimar la densidad de algas existente y proporcionar la ración de alimento necesaria. Para la estima de la densidad algal se utilizan cámaras de recuento celular tipo Bürker con doble cámara (volumen total de la cámara es de  $0,1 \text{ mm}^3$  al colocar un cubreobjetos). Se añadió una gota de formol a la muestra de cultivo de microalgas para evitar su movimiento durante el recuento y, con ayuda de una pipeta, se cargaron las dos cámaras.



**Figura 12.** Imagen del recuento de *Isochrysis galbana* en el cultivo. Remarcado en rojo en cuadro de 0,2x0,2mm que debe tenerse en cuenta.

Debido al tamaño de *Isochrysis galbana* es suficiente con hacer recuento en 10 cuadrículas aleatorias de 0,2x0,2mm (figura 12). En este caso, se realizaron recuentos en 10 cuadrículas de cada una de las dos cámaras y se utilizó la media de los valores para la estimación de la ración diaria.

Para el cálculo de la densidad de algas en el cultivo se siguió la ecuación 3.

$$\text{Densidad de algas (cél/ml)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células en 10 cuadrículas}}{0,004 \text{ mm}^3 \cdot 10 \text{ cuadrículas}} \quad (3)$$

A la hora de tomar un volumen del cultivo de *I. galbana* para alimentar a *C. gallina* se tuvo la precaución de invertir las botellas con delicadeza tras cubrirlas con Parafilm con el fin de resuspender las células que pudieran haber sedimentado.

### 3.4 Análisis de la estabilidad de la membrana lisosomal

Los análisis de la EML fueron realizados utilizando el Ensayo del Rojo Neutro y siguiendo la metodología descrita en Martínez-Gómez et al., (2015) [51] para hemocitos de mejillones. A través de este ensayo se determinan dos parámetros: el tiempo de retención del rojo neutro, (expresado en minutos) y el % de EML.

#### 3.4.1 Equipos

Los equipos utilizados son cámaras de incubación de portaobjetos opacas (protegidas de la luz) y microscopio binocular modelo Olympus CX21FS1 con objetivos x20 y x40 (figura 13).



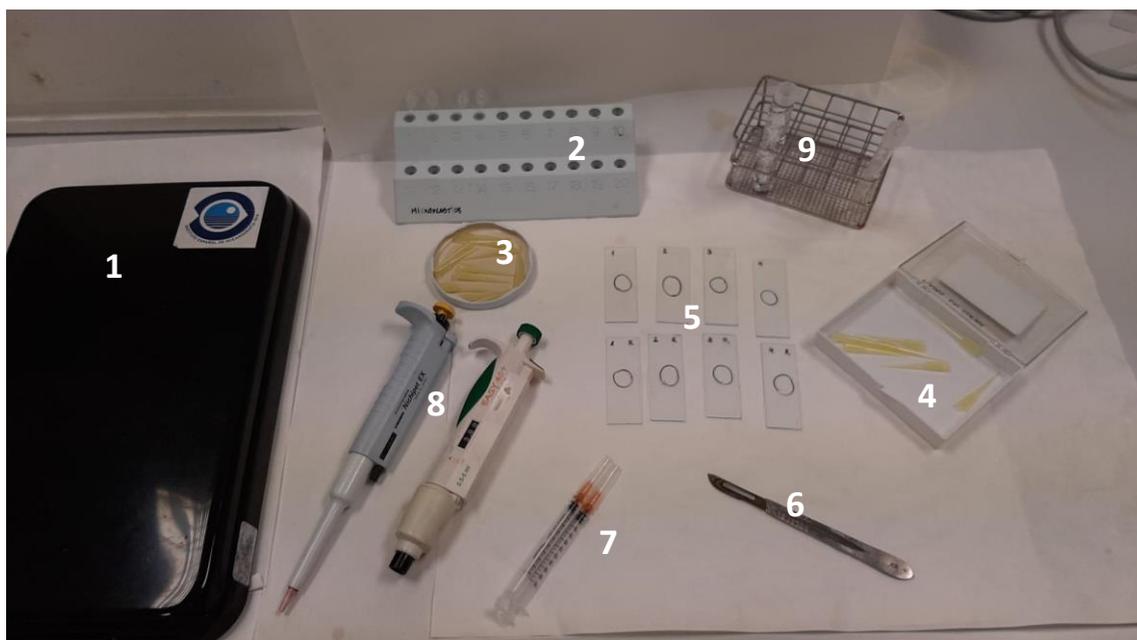
Figura 13. (a) Cámara de incubación. (b) Microscopio binocular Olympus CX21FS1

### 3.4.2 Reactivos

- Agua de mar filtrada: filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Se trata del propio agua de los acuarios.
- Rojo neutro (RN) (CAS: 553-24-2; Labkem)
- Solución madre de rojo neutro de 100mM: disolver 28,8 mg de RN en 1mL de DMSO. Se puede almacenar en la nevera durante 2-3 semanas, de modo que una solución madre es utilizada para cada uno de los ensayos de salinidad a diferentes temperaturas.
- Solución de trabajo de rojo neutro: se diluyen 10 $\mu\text{l}$  de disolución madre en 5ml de agua de mar filtrada. Es necesario preparar una nueva para cada ensayo porque precipita a las 4 horas. Se prepara una solución de trabajo por cada salinidad estudiada.
- Reactivo de silicona para vidrio y otras superficies (Sigmacote® de Sigma-Aldrich®): Se usó para minimizar la adhesión de proteínas y células a la superficie de los microtubos y retrasar la coagulación de la hemolinfa.

### 3.4.3 Procedimiento

Es necesaria una preparación de los materiales previa a la extracción de la hemolinfa para evitar incluir factores de estrés añadido a los individuos al exponerlos durante largo tiempo a las condiciones ambientales del laboratorio. En la figura 14 se muestran los materiales a emplear.



**Figura 14.** Materiales necesarios para el ensayo de rojo neutro.

- 1.- Cámara de incubación de portaobjetos: donde se incuban las muestras en oscuridad y con humedad (figura 15).
- 2.- Tubos Eppendorf de 1mL recubiertos con Sigmacote durante 30 minutos.
- 3.- Puntas de pipeta con la punta ligeramente cortada.
- 4.- Puntas de pipeta con la punta sin cortar.
- 5.- Portaobjetos previamente rotulados indicando el número de muestra y un círculo en el reverso para facilitar la localización de la muestra bajo el microscopio
- 6.- Bisturí para separar las valvas de *C. gallina* y permitir la extracción de hemolinfa.
- 7.- Agujas hipodérmicas de 1 mL cargadas con 0,1 mL de agua de mar filtrada del acuario correspondiente. Agujas de calibre 25G.
- 8.- Pipetas automáticas de 10 a 100  $\mu$ L y de 0,5 a 5 mL para la preparación de reactivos y muestras.
- 9.- Tubos para la preparación de la solución de trabajo de rojo neutro.



**Figura 15.** Interior de la cámara de incubación cargada con los portaobjetos y agua con hielo para mantener las muestras a una temperatura baja y una humedad adecuada

Como se indicó en la introducción, la realización del ensayo de Rojo Neutro se realiza *in vivo*, en cultivos monocapa de hemocitos primarios utilizando portaobjetos. El primer paso, una vez todo el material está preparado, es realizar la extracción de la hemolinfa. Para ello, con ayuda de un bisturí se separan las valvas del individuo por la zona central. Es importante dejar escurrir el agua intervalvar antes de extraer la hemolinfa. Con ayuda de una jeringa hipodérmica cargada con 0,1mL de agua de mar filtrada del acuario en la que ha residido el organismo en cuestión se extraen 0,1mL de hemolinfa del músculo aductor (figura 18). Es necesario mantener la proporción hemolinfa: agua de mar filtrada al 50:50 para evitar el aglutinamiento de células. En la figura 16 se muestra dónde resulta más sencillo extraer la hemolinfa en *C. gallina*. También es posible extraer hemolinfa del músculo aductor del lado contrario, pero la visibilidad se reduce.



**Figura 16.** Representación del lugar idóneo para la extracción de hemolinfa en *C. gallina*.

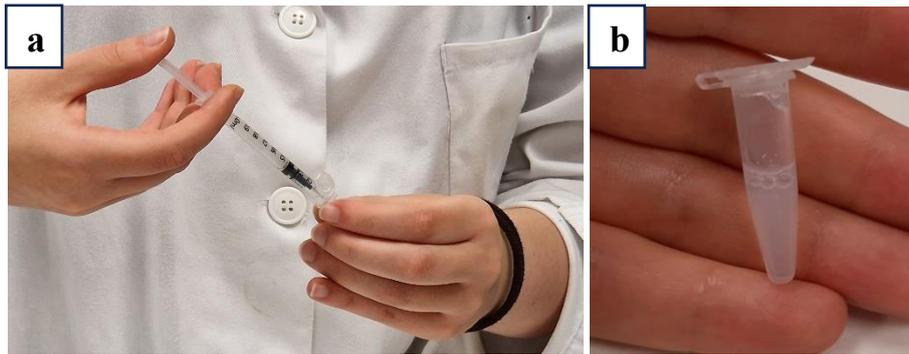


**Figura 17.** Pasos a seguir para la extracción de la hemolinfa en *C. gallina*



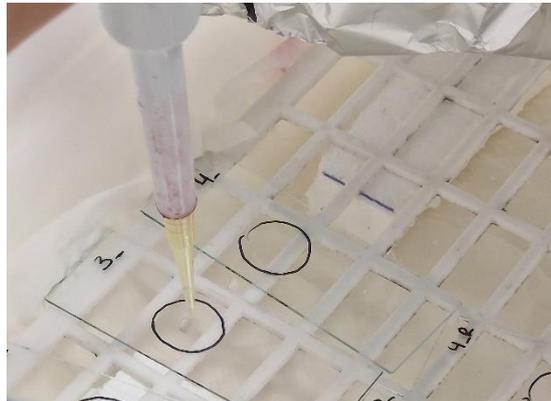
**Figura 18.** Imagen en la que se muestra dónde insertar la jeringa para la extracción de hemolinfa en *C. gallina*.

Una vez extraída la hemolinfa, el contenido es vertido a un microtubo Eppendorf (figura 19a), siendo el color de la muestra agua de mar algo turbio-blanquecina como se muestra en la figura 19b.



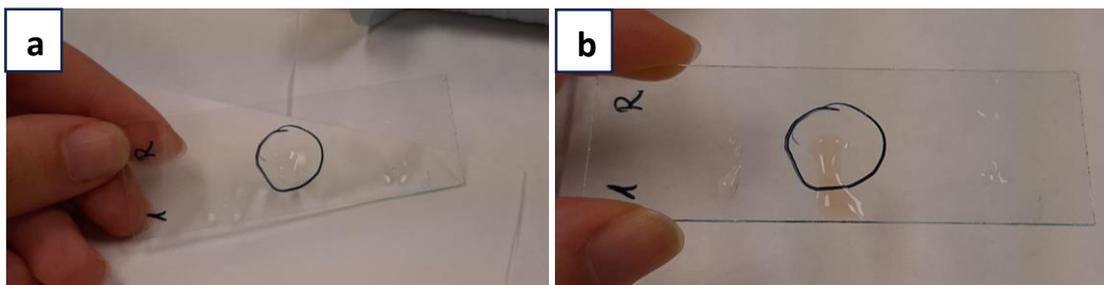
**Figura 19.** (a) Vertido de la hemolinfa extraída a un tubo Eppendorf. (b) Aspecto que debe tener una buena extracción de hemolinfa

A continuación, se pipetea 20  $\mu\text{L}$  del contenido en el Eppendorf —previamente invertido a fin de homogenizar la muestra y permitir la correcta mezcla de hemolinfa y agua de mar filtrada— a uno de los portaobjetos (figura 20). Es necesario utilizar puntas de pipeta ligeramente cortadas para disminuir la presión sobre las células al transferirlas al portaobjetos. Los portaobjetos deben encontrarse en la cámara de incubación. De cada muestra se preparan dos portaobjetos (de modo que haya una réplica).



**Figura 20.** Colocación de la muestra de hemolinfa extraída sobre el portaobjetos correspondiente dentro de la cámara de incubación.

Los portaobjetos se mantienen frescos ( $< 20^{\circ}\text{C}$ ) a causa del hielo y en completa oscuridad (dentro de la cámara de incubación) durante 30 minutos, con el fin de que los hemocitos granulares sedimenten y se fijen al vidrio. Pasado ese tiempo, se elimina el exceso de agua en suspensión del portaobjetos, inclinándolo ligeramente y dejando que el líquido escurra por un lado (figura 21a). A continuación, se depositan 40  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de RN sobre los hemocitos (figura 21b). Es importante hacerlo rápido para que no se seque la muestra en el portaobjetos. El momento de adición de la solución de RN es considerado el tiempo cero del ensayo. Se deja incubar 15 minutos dentro de la cámara de incubación para que el colorante rojo neutro penetre en los lisosomas de los hemocitos.



**Figura 21.** (a) Se escurre el exceso de agua sobre el portaobjetos pasados los 30 minutos de incubación. (b) Adición de la solución de trabajo de rojo neutro sobre el portaobjetos.

Pasados los 15 minutos se escurre el exceso de colorante del mismo modo que anteriormente y se coloca un cubreobjetos para su análisis al microscopio.

#### 3.4.4 Análisis

El análisis se realiza observando las muestras al microscopio de forma sistemática a los 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos desde la adición del rojo neutro.

Dado que el rojo neutro es un colorante sensible a la luz, la exposición a la misma debe ser la menor posible. De este modo, la iluminación del microscopio debe ajustarse lo más baja posible y la muestra debe permanecer el tiempo estrictamente necesario fuera de la cámara de incubación (< 3 min).

A cada uno de estos tiempos se anota la existencia o no de anomalías estructurales y funcionales observadas en los lisosomas con el fin de poder calcular posteriormente el tiempo de Retención del Rojo Neutro y el % de estabilidad de la membrana lisosomal.

##### 3.4.4.1 Tiempo de retención del rojo neutro

El tiempo de retención del rojo neutro (TRRN) corresponde al tiempo de observación inmediatamente anterior al que se observan, por primera vez, anomalías o pérdidas de color en los lisosomas en más del 50% de los granulocitos observados. Si los granulocitos son capaces de retener el colorante dentro de sus lisosomas sin que éstos sufran deformaciones, se consideran saludables.

En caso de que más del 50% de las células se encuentre sin deformaciones, se le asignará el signo positivo (+). Si, por el contrario, más del 50% presenta alteraciones, se le asignará el signo negativo (-).

Como se comentó anteriormente, el ensayo NRR acaba a los 180 minutos porque a ese tiempo la mayoría de los organismos saludables responde a la toxicidad propia del colorante rojo neutro, y consecuentemente los resultados a partir de este tiempo de observación no reflejan el estrés real de las células.

El número de células observables en un campo de visión usando un aumento x400 puede ser muy variable, rondando 20-50 células. Para efectuar este análisis es necesario observar entre 100 o 400 células. En la figura 22 se muestra la densidad celular en aumento x200 (a) y x400 (b y c) a modo de ejemplo.

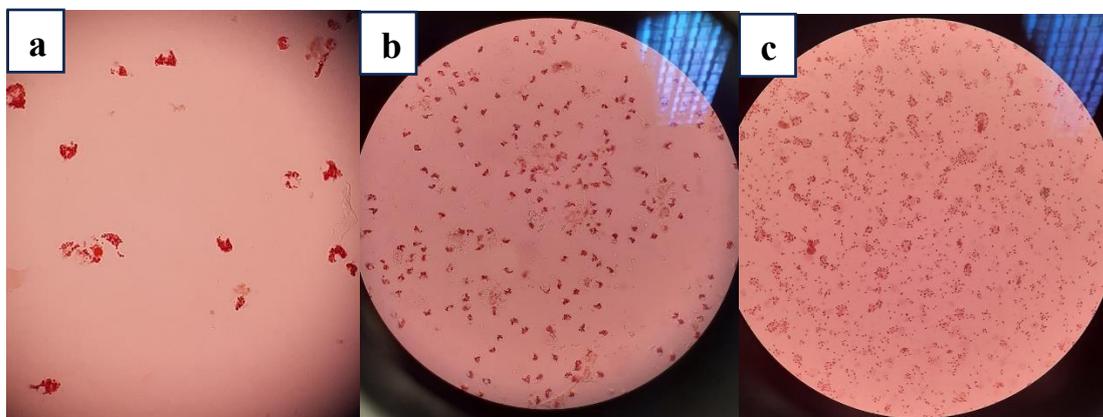


Figura 22. Densidad celular en un campo de visión a aumento x200 (a) y x400 (b y c)

### 3.4.4.2 Porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal

A cada tiempo de observación desde el tiempo 15 minutos hasta los 120 minutos, se asigna un valor (de 0 a 5) en función de la apariencia estructural predominante en más del 50% de las células de la muestra.

En la tabla 4 se muestran los estados descritos en Martínez-Gómez et al., 2015 [51], en orden creciente en función de la severidad del cambio estructural y/o funcional del lisosoma.

**Tabla 4.** Estado patológico de las células y puntuación asignada descrita en Martínez-Gómez et al., 2015 [51].

PATOLOGÍA	PUNTUACIÓN
Sin efecto	0
Agrandamiento de los lisosomas	1
Difusión del colorante de los lisosomas al citoplasma	2
Agrandamiento de los lisosomas y difusión del colorante al citoplasma	3
Agrandamiento de los lisosomas, difusión del colorante al citoplasma y pérdida de color en algunos lisosomas	4
Células redondeadas o fragmentadas donde no se distinguen los lisosomas	5

La puntuación ponderada de la estabilidad de la membrana lisosomal se calcula multiplicando la puntuación asignada según la tabla anterior por un factor de ponderación que depende del tiempo de observación durante el ensayo al que se observe (tabla 5).

**Tabla 5.** Factor de ponderación en función del tiempo

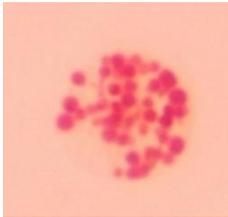
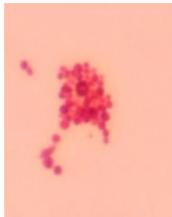
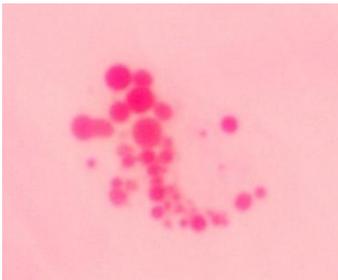
Tiempo (min)	15	30	60	90	120
Factor de ponderación	1	2	3	4	5

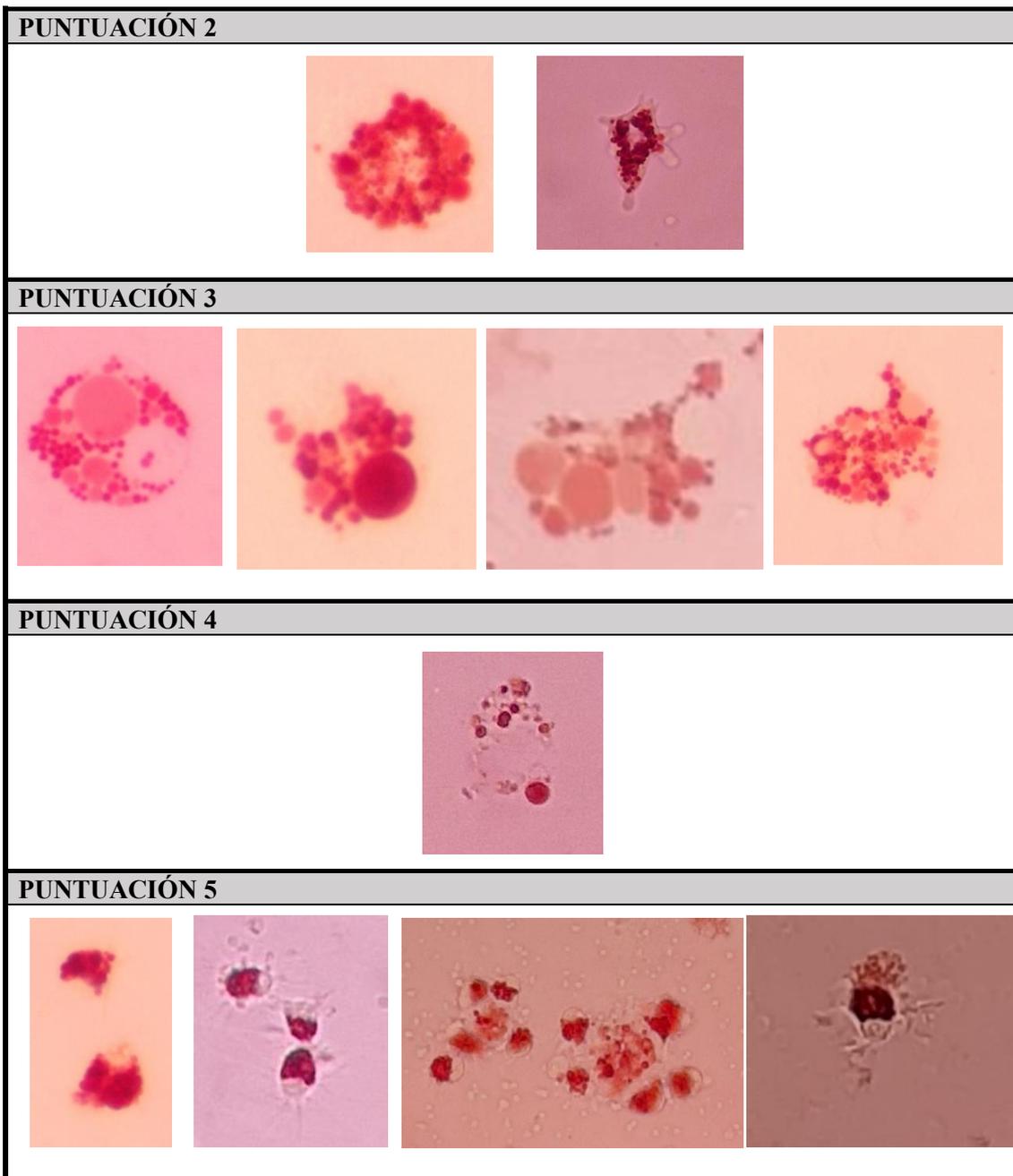
En este caso, la puntuación ponderada se trunca a los 120 minutos de ensayo. La puntuación final de la estabilidad de la membrana lisosomal se calcula según la ecuación 4.

$$\%LMS = \frac{1 - \text{sumatoria ponderada}}{75} \cdot 100 \quad (4)$$

En la tabla 6 se muestran algunos ejemplos de los distintos estados patológicos.

**Tabla 6.** Estadios de degradación de los granulocitos

PUNTUACIÓN 0	
	
PUNTUACIÓN 1	
	



### 3.4.5 Interpretación de los resultados

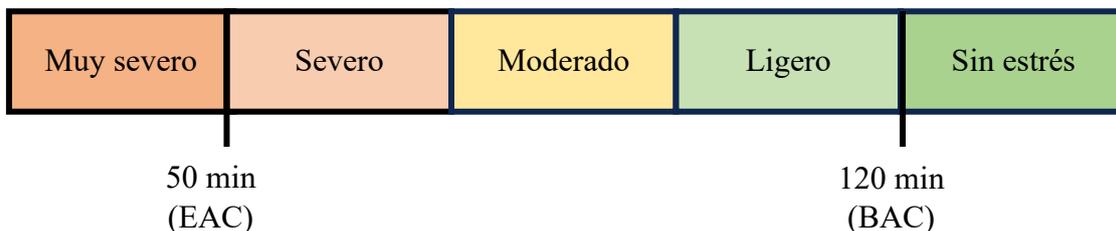
La valoración de los resultados obtenidos para el tiempo de retención del rojo neutro (TRRN) se realizó utilizando los criterios de valoración establecidos para este biomarcador y validado para las especies del género *Mytilus sp.* [64]: Criterio de Valoración Basal (BAC en inglés) = 120 minutos y Criterio de Valoración Ambiental (EAC) = 50 minutos [51] (tabla 7).

Valores de TRRN por debajo del EAC implican un estrés celular severo en el organismo, con muy altas posibilidades de presentar patologías. Por el contrario, valores iguales o por encima del BAC implican una ausencia de estrés celular.

**Tabla 7.** Valores de BAC y EAC para TRRN descritos en Martínez-Gómez et al., 2015 [51].

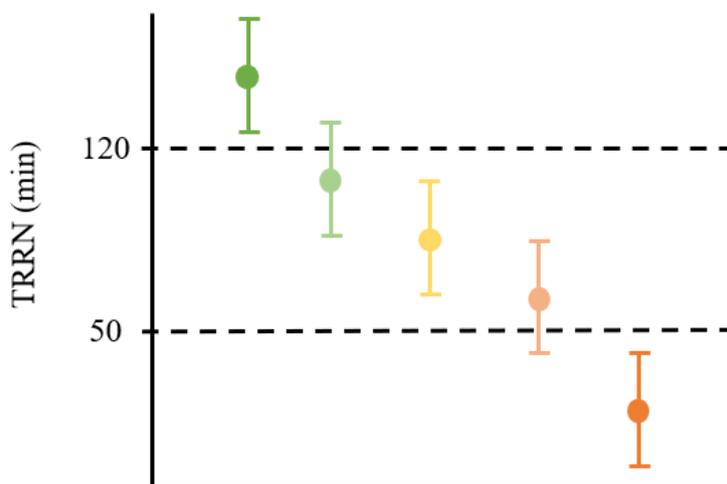
	BAC (minutos)	EAC (minutos)
TRRN	120	50

En el presente estudio, se decidió asignar cinco categorías de estrés celular, manteniendo los BAC y EACs establecidos para mejillón, tal y como se muestra en la figura 23, y atendiendo a los valores límite de los errores estándar (SE en inglés) de la media poblacional.



**Figura 23.** Límites (minutos) establecidos de tiempos de retención de Rojo Neutro para valorar el estrés celular en *C. gallina* utilizando el biomarcador de la estabilidad de la membrana lisosomal.

Al analizar los datos de una muestra poblacional, se consideró que existía estrés severo para los organismos si el límite inferior del SE error estándar de la media cruzaba el valor límite establecido como EAC (50 minutos); estrés moderado si ambos límites (superior e inferior) del SE de la media se encontraban dentro del rango de valores entre el BAC y el EAC (de 50 a 120 minutos); y estrés ligero si el límite superior del SE de la media era superior al BAC. Se valoró como estrés muy severo para los organismos cuando el límite superior del SE de la media fue inferior al valor del EAC. Por último, se consideró que los organismos no estaban sometidos a ningún estrés celular (ausencia de estrés) cuando el límite inferior del SE de la media se encontraba por encima del valor del BAC (figura 24).



**Figura 24.** Grados de estrés celular en función del tiempo de retención del rojo neutro en muestras poblacionales de *C. gallina* (media  $\pm$  SE). Rojo: muy severo. Naranja: severo. Amarillo: moderado. Verde claro: ligero. Verde: sin estrés.

### 3.5 Análisis del índice de condición

Se realizaron análisis del índice de condición (IC) de los organismos a tiempo 21 días para cada tratamiento. Los organismos empleados en estos análisis fueron obtenidos de los mismos acuarios y de forma simultánea que los organismos utilizados para los ensayos de estabilidad de la membrana lisosomal, por lo que las condiciones fisicoquímicas se mantuvieron para cada tratamiento. Fue necesario realizar el análisis del IC a organismos distintos debido a que los bivalvos utilizados para la estabilidad de la membrana lisosomal fueron empleados para posteriores análisis toxicológicos (que no conciernen a este Trabajo de Fin de Máster).

Por otro lado, se realizaron también análisis del IC a organismos a tiempo 0 (inmediatamente tras los muestreos) a 20°C y 28°C. Es así puesto que tras los tratamientos realizados a 12°C se encontró la necesidad de comparar los resultados con un valor inicial de referencia. De este modo, sería posible comparar la evolución de los organismos durante el tiempo de experimentación de 21 días.

Para el análisis del IC se siguió el sencillo protocolo que se muestra a continuación y el material a emplear fue, principalmente, una báscula de precisión ( $\pm 0,0001$  g) (figura 25).



**Figura 25.** Báscula utilizada para el análisis del IC.

En primer lugar, se escogieron entre 6 y 20 individuos al azar (en función del número de organismos disponibles) y se tomaron medidas de talla de cada uno de ellos. A continuación, se abrieron por la parte central con ayuda de un bisturí. Se dejaron escurrir con las valvas abiertas sobre un papel absorbente para eliminar toda el agua intervalvar durante 15 minutos (figura 26).



**Figura 26.** Organismos abiertos y escurriendo sobre un papel absorbente

Trascurrido ese tiempo, se pesaron los organismos uno a uno en la balanza de precisión (figura 27).



**Figura 27.** Balanza durante el pesaje de los organismos escurridos

A continuación, se extrajo todo el tejido blando del organismo y se colocó sobre un crisol (figura 29) previamente numerado y pesado (figura 28). Se pesó el crisol con la muestra húmeda y se anotó el resultado.



**Figura 28.** Crisoles rotulados y pesados.



**Figura 29.** Extracción del tejido blando y colocación en los crisoles

A continuación, se introdujeron los crisoles con la muestra de tejido blando húmeda, por un lado, y las valvas vacías, por otro (figura 30), en una estufa a 100°C durante 24 horas para eliminar la humedad. Una vez realizado este proceso, se pesaron las valvas (figura 32) y se mantuvieron los crisoles con la muestra de tejido blanco seco durante 30 minutos en un desecador (figura 31) antes de ser pesados.



**Figura 30.** Valvas preparadas para ser introducidas en la estufa



**Figura 31.** Crisoles con las muestras de tejido blando seco en el desecador



Figura 32. Pesaje de las valvas tras salir de la estufa

De este modo, se recogieron todos los datos posibles para emplear cualquiera de los índices de condición expuestos en la tabla 1. En este TFM, el índice de condición empleado en los ensayos fue el IC<sub>1</sub>.

### 3.6 Análisis estadístico de los datos

Los resultados obtenidos en los análisis anteriormente descritos se procesaron con el programa STATGRAPHICS Centurion XVIII.

Se utilizaron análisis paramétricos o no paramétricos dependiendo de la naturaleza de los datos. A fin de realizar análisis de la varianza (ANOVA) para investigar la posible existencia de diferencias significativas entre tratamientos fue necesario comprobar previamente si los datos cumplían las condiciones de normalidad y homocedasticidad.

Con el fin de aproximar los datos a una distribución normal, éstos fueron transformados con carácter previo al análisis estadístico de los datos. Dado que en el caso de la estabilidad de membrana lisosomal y del índice de condición los datos son valores porcentuales, se realizó una transformación, tal y como se expone en la ecuación 5 (donde X es, o bien el %EML, o bien el %IC):

$$\text{Arcsen} \left( \sqrt{X/100} \right) \quad (5)$$

En cuanto a los datos de TRRN, los datos se transformaron siguiendo la ecuación 6:

$$\log (TRRN + 1) \quad (6)$$

Si tras la transformación de los datos éstos no alcanzaban las condiciones de normalidad y/o homocedasticidad se procedió a trabajar con los datos en bruto, sin la transformación, utilizando test no paramétricos.

La normalidad se determinó mediante el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada de los datos. Si estos permanecen dentro del rango -2 a 2 implica que siguen una distribución normal.

Para comprobar la existencia de homocedasticidad se aplicó el test de Levene. Este test se basa en la hipótesis nula que indica que las desviaciones estándar de las muestras a comparar son

iguales. Esto quiere decir con un nivel de confianza del 95% que, si el p-valor es mayor o igual a 0,05, no hay diferencias significativas estadísticamente hablando entre las desviaciones estándar.

Cuando fue posible utilizar ANOVAs, si el valor obtenido en la prueba-F era menor que 0,05, los grupos comparados presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí. Para determinar qué grupos son los que se comportan de distinta manera, se usó la prueba de múltiples rangos basada en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer.

Cuando fue necesario utilizar test no paramétricos se aplicó el test de Kruskal-Wallis. Si el p-valor obtenido en esta prueba es superior al 0,05, con un 95% de probabilidad los grupos estudiados se comportan estadísticamente iguales. Para determinar que grupos son diferentes entre sí, se aplicó el test de Bonferroni.

A la hora de realizar análisis multifactorial, se usaron métodos paramétricos como el ensayo de componentes principales (PCA) o no paramétricos como el análisis factorial para así eliminar información redundante recogida en las variables de estudio.

## 4 Resultados y discusión

En la tabla 8 se resumen las condiciones de operación en cada tratamiento y los resultados de la EML obtenidos a través del ensayo de rojo neutro en cada uno de los tratamientos (valores medios junto a su error estándar).

Hay que tener en cuenta algunos detalles frente a los datos presentados en la tabla 8. Tal y como se ha mencionado con anterioridad, el efecto de las variables ambientales es importante y las interacciones entre dos o más de ellas puede provocar cambios en otras variables. Es el ejemplo claro de la temperatura y la salinidad. Al actuar juntas afectan a la solubilidad del oxígeno. En la tabla se aprecia que, conforme aumenta la temperatura, la disponibilidad de OD se reduce (de 9 a 7 mg/L). Este hecho no resulta importante en este ensayo puesto que, al incluir aireadores en los acuarios, la saturación de oxígeno siempre estuvo por encima del 100%. No obstante, habría resultado interesante realizar el estudio sin aireadores para comprobar mejor estos efectos. En cualquier caso, pese a tener aireadores ya se aprecian los efectos que se han provocado en la solubilidad del oxígeno, lo que indica que los cambios observados en ausencia de aireación habrían sido más agudos.

Cabe destacar también la talla de los individuos. En el primer muestreo (12°C) la talla de los organismos recogidos fue considerablemente menor que en el resto de los muestreos. Dado que *C. gallina* es un organismo poiquilotermo (carece de mecanismos internos reguladores de la temperatura corporal —por lo que esta varía en función de la temperatura ambiental) hace pensar que puede influir de alguna forma en los resultados obtenidos (pues hay diferencias de hasta 7 mm en las tallas de los organismos estudiados a 12°C y los estudiados a 20°C y 28°C).

Se puede comprobar que la tasa de mortalidad de los individuos durante el periodo de exposición no ha resultado ser relevante (< 20%). Tan solo murieron dos de los organismos como evento anecdótico.

En la tabla 9 se resumen las condiciones de operación en cada tratamiento y los resultados del análisis del índice de condición (IC<sub>1</sub>), representando los valores medios junto a su error estándar.

Se debe tener en cuenta que los organismos empleados para el cálculo del IC no fueron los mismos organismos empleados para los ensayos de EML. Debido a que el IC varía de forma marcada en función de la talla de los organismos y que se utilizaron los organismos de mayor tamaño para realizar la extracción de hemolinfa en los experimentos se trabajó, siempre que fue posible, con un IC ajustado a un rango de tallas de 17 a 20 mm. Por tanto, las tallas y el tamaño muestral (n) difieren de los mostrados en la tabla 8. No obstante, dichos organismos sí se tuvieron incubando en los mismos acuarios y de forma simultánea para los ensayos a temperatura 20°C y 28°C, por lo que las variables ambientales coinciden con las presentadas en la tabla 8. Los organismos del IC de referencia a tiempo 0 no fueron incubados en ningún acuario y se presentan los datos de las variables ambientales, salinidad y temperatura del agua de mar registrada en el momento del muestreo.

**Tabla 8.** Estadísticos descriptivos (medias y errores estándar) de las condiciones de exposición y de la estabilidad de la membrana Lisosomal (EML) en cada tratamiento. Los valores de EML están expresados como tiempo de retención del Rojo Neutro (TRRN, en minutos) y como %EML . OD= Oxígeno disuelto

Tratamiento		n	Talla mm	Temperatura °C	Salinidad PSU	OD mg/L	TRRN min	EML %	Mortalidad %
Temperatura	Salinidad (PSU)								
12°C	37-38	16	16,86 ± 0,62	12,17 ± 0,05	38,12 ± 0,05	9,09 ± 0,02	68,4 ± 14,0	52,2 ± 6,0	0,00
	32-33	16	17,82 ± 0,74	12,00 ± 0,03	32,56 ± 0,14	9,12 ± 0,01	116,3 ± 14,0	72,2 ± 5,4	0,00
	27-28	16	18,22 ± 0,70	12,30 ± 0,03	27,09 ± 0,06	9,06 ± 0,01	55,3 ± 9,5	53,3 ± 4,1	0,00
20°C	37-38	16	25,44 ± 0,49	20,34 ± 0,05	37,63 ± 0,06	7,72 ± 0,02	133,1 ± 12,0	71,3 ± 4,9	0,00
	32-33	16	24,13 ± 0,89	19,95 ± 0,04	32,70 ± 0,04	7,64 ± 0,04	60,9 ± 12,9	49,2 ± 5,1	0,00
	27-28	16	23,42 ± 0,52	20,11 ± 0,05	27,35 ± 0,03	7,79 ± 0,01	131,3 ± 16,6	59,8 ± 6,1	4,00
28°C	37-38	16	23,33 ± 0,30	26,98 ± 0,11	37,71 ± 0,10	6,93 ± 0,01	82,5 ± 15,1	61,2 ± 3,6	0,00
	32-33	16	23,60 ± 0,37	26,94 ± 0,09	32,73 ± 0,09	6,91 ± 0,01	65,6 ± 10,2	53,1 ± 5,0	0,00
	27-28	16	24,43 ± 0,35	27,13 ± 0,10	27,59 ± 0,05	6,91 ± 0,01	68,4 ± 11,7	50,8 ± 4,6	0,00

**Tabla 9.** Estadísticos descriptivos (medias y errores estándar) de las condiciones de exposición y resultados del índice de condición en forma de medias y errores estándar. OD= Oxígeno disuelto; IC =Índice de Condición ajustado para tallas de 17 20 mm.

Tratamiento		n	Talla mm	Temperatura °C	Salinidad PSU	OD mg/L	IC %	Mortalidad %
Temperatura	Salinidad							
12°C	37-38 PSU	20	14,10 ± 0,11	12,17 ± 0,05	38,12 ± 0,05	9,09 ± 0,02	2,10 ± 0,08*	0,00
12°C	32-33 PSU	21	13,95 ± 0,13	12,00 ± 0,03	32,56 ± 0,14	9,12 ± 0,01	1,88 ± 0,07*	0,00
12°C	27-28 PSU	12	14,45 ± 0,24	12,30 ± 0,03	27,09 ± 0,06	9,06 ± 0,01	2,10 ± 0,16*	0,00
Referencia		10	17,93 ± 0,23	19,5	36,8	—	2,78 ± 0,10	—
20°C	37-38 PSU	10	18,86 ± 0,25	20,34 ± 0,05	37,63 ± 0,06	7,72 ± 0,02	3,24 ± 0,32	0,00
20°C	32-33 PSU	9	19,03 ± 0,29	19,95 ± 0,04	32,70 ± 0,04	7,64 ± 0,04	2,89 ± 0,24	0,00
20°C	27-28 PSU	11	18,91 ± 0,35	20,11 ± 0,05	27,35 ± 0,03	7,79 ± 0,01	2,52 ± 0,16	4,00
Referencia		16	17,85 ± 0,18	23,5	37,1	—	2,61 ± 0,08	—
28°C	37-38 PSU	13	18,93 ± 0,29	26,98 ± 0,11	37,71 ± 0,10	6,93 ± 0,01	2,18 ± 0,15	0,00
28°C	32-33 PSU	13	19,01 ± 0,22	26,94 ± 0,09	32,73 ± 0,09	6,91 ± 0,01	2,07 ± 0,09	0,00
28°C	27-28 PSU	6	18,33 ± 0,23	27,13 ± 0,10	27,59 ± 0,05	6,91 ± 0,01	2,02 ± 0,26	0,00

\*El IC ajustado en el tratamiento a 12°C es para el rango de tallas de 13 a 16 mm. El resto de IC corresponden al rango de tallas de 17 a 20mm.

## 4.1 Resultados de la estabilidad de la membrana lisosomal

### a. Efecto de la talla de los organismos

Previo al propio análisis de los resultados de la estabilidad de la membrana lisosomal se comprobó la posible influencia de la talla (edad) de los organismos estudiados para ofrecer una interpretación adecuada. En la figura 33 se muestran los valores medios de las tallas en función de los tratamientos ensayados (salinidad y temperatura), junto a sus errores estándar.

Se puede apreciar cómo los organismos expuestos a temperaturas de 20°C y 28°C cuentan con tallas medias mayores que los organismos expuestos a 12°C, para cualquier tratamiento de salinidad. No obstante, por cada grupo de temperatura las tallas medias son similares entre salinidades. Por lo tanto, los resultados de estabilidad de la membrana lisosomal entre tratamientos a diferentes salinidades, pero a la misma temperatura no se encuentran influidos por el tamaño (edad) de los organismos.

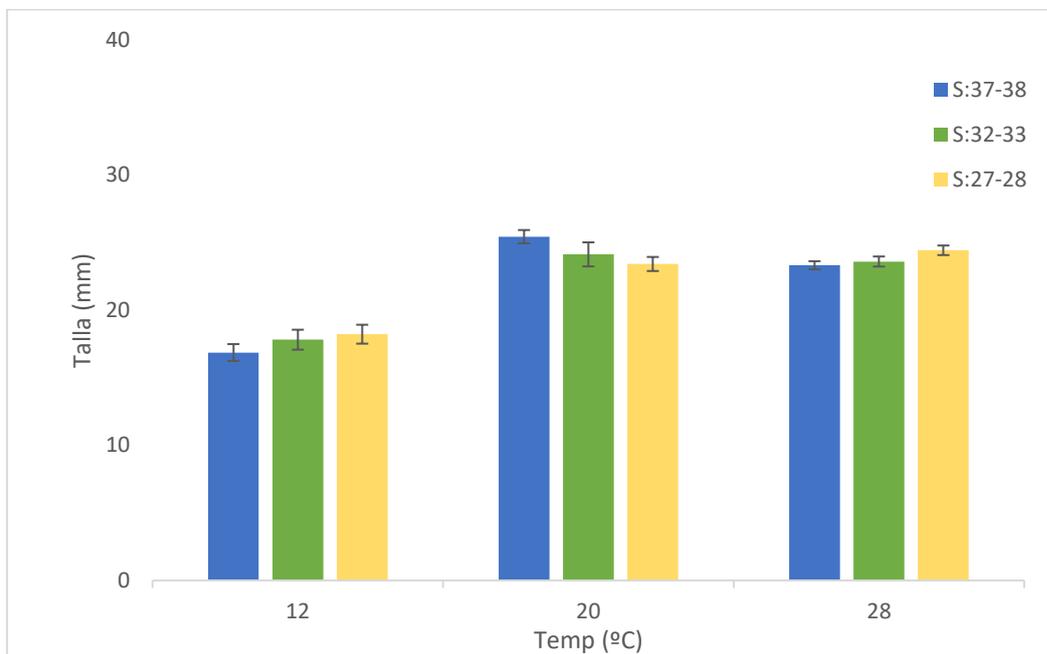


Figura 33. Talla media (mm) de los organismos estudiados en cada tratamiento (representado con el error estándar)

### b. Efecto de la temperatura y la salinidad en la EML

En general, cabe decir que los resultados de la EML expresados como porcentaje y como TRRN fueron similares y mostraron el mismo patrón de respuesta frente a los diferentes tratamientos, validando el uso de ambos indicadores.

Se puede comprobar que la EML en los tratamientos a 37-38 PSU de salinidad y 32-33 PSU de salinidad a temperaturas 12°C y 20°C muestra respuestas inversas (figura 34 y 35). Es decir, mientras que a los 12°C la EML se ve favorecida en condiciones de salinidades intermedias, a los 20°C la EML resulta favorecida a la mayor salinidad. Por otro lado, la EML presenta el rango menos variable entre grupos de temperatura cuando la salinidad se mantiene a 27-28 PSU, recogiéndose en todos los casos entre el 40 y el 70 por ciento en la estabilidad de la membrana lisosomal. Actualmente no existen criterios de valoración definidos para interpretar los resultados

de la EML expresada como porcentaje. Por lo tanto, la valoración del grado de estrés celular se ha realizado atendiendo a los resultados de EML expresados como TRRN (Figura 34).

Ninguno de los tratamientos causó un nivel de estrés celular muy severo (ambos errores estándar por debajo de los 50 minutos) en los organismos.

Resulta importante destacar que dentro de los tratamientos de 20°C, dos de los grupos de salinidad (37-38 PSU y 27-28 PSU) presentan los menores niveles de estrés de entre los tratamientos ensayados. Por su parte, el grupo 32-33 PSU de salinidad cuenta con niveles de estrés severo, cercano a valores obtenidos para tratamientos a temperaturas de 12°C.

Los tratamientos a 12°C y 28°C se muestran más afectados, reuniendo niveles de estrés mayores que para 20°C. Pese a ello, es posible apreciar diferencias entre ambos grupos de temperatura. Mientras que para los tratamientos a 28°C los niveles de estrés parecen ser más homogéneos (manteniéndose entre los 60 y los 95 min de TRRN) entre salinidades, los tratamientos a 12°C y 20°C resultan más heterogéneos.

A nivel de tratamientos por salinidades, no se observa un patrón claro de respuesta de la EML: Los organismos expuestos a condiciones de salinidad 27-28 PSU alcanzaron niveles de estrés celular severo a 12°C, sin estrés a 20°C y moderado a 28°C; los expuestos a salinidades 32-33 PSU mostraron niveles de estrés celular ligero a 12°C, severo a 20°C y moderado a 28°C; los organismos expuestos a salinidades 37-38 PSU resultaron con niveles de estrés variado en función del tratamiento térmico. A 12°C y 28°C el estrés fue moderado, mientras que a 20°C fue ligero.

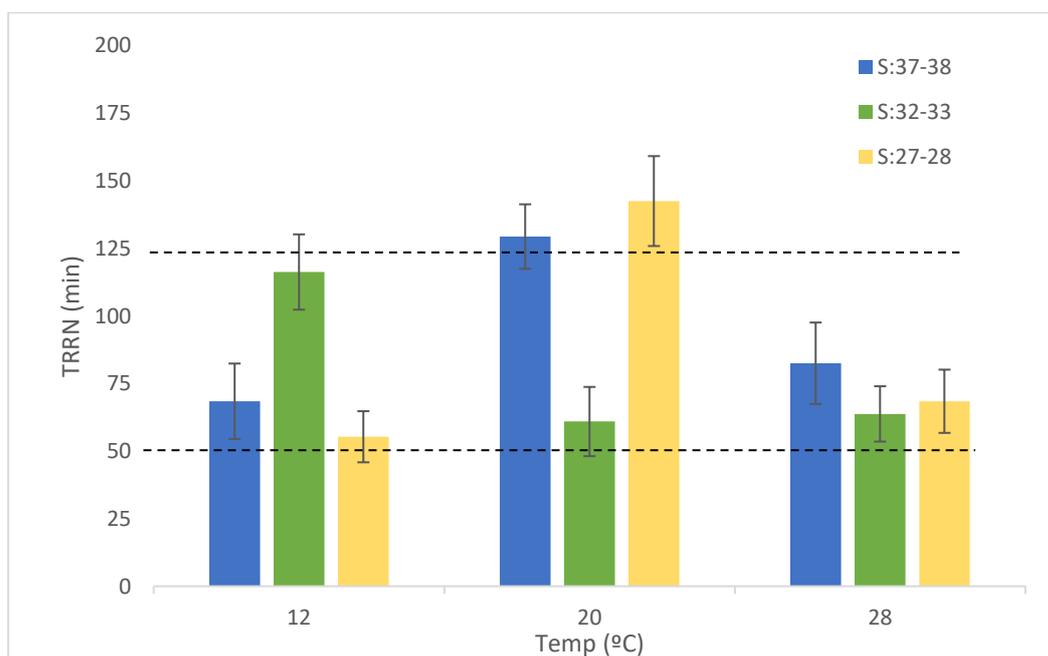


Figura 34. Resultados del TRRN (min) para cada tratamiento (representado con la media y el error estándar)

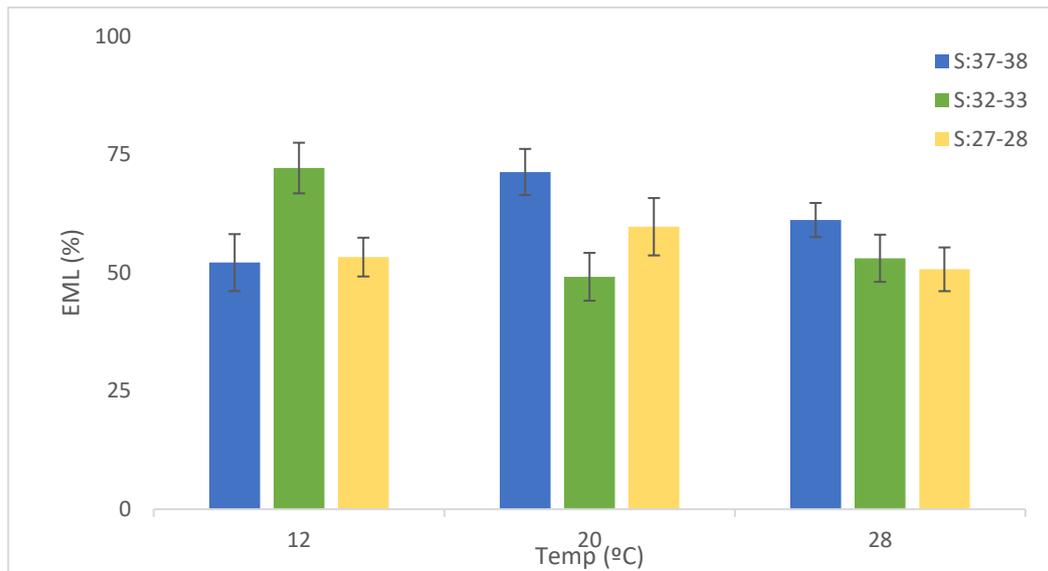


Figura 35. Resultados de EML (%) para cada tratamiento (representado con la media y los errores estándar)

#### 4.1.1 Análisis unifactorial

##### Tratamientos a 12°C

- Los datos referentes a la talla de los organismos estudiados cumplieron la normalidad y la homocedasticidad (p-valor de la prueba de Levene es  $0,5927 > 0,05$ ). Al aplicar el test ANOVA (p-valor de la prueba F  $0,3682 > 0,05$ ) se comprobó la no existencia de diferencias significativas de talla para los distintos grupos de salinidad. Esto implica que las posibles diferencias encontradas en la estabilidad de la membrana lisosomal no deben atribuirse a la talla (edad) de los organismos estudiados. (Tabla 10)
- Para investigar la EML, expresada como TRRN, se trabajó con los datos sin transformar al cumplir éstos la condición de normalidad. Sin embargo, al no haber homocedasticidad de las varianzas (test de Levene; p-valor =  $0,0421 < 0,05$ ) se aplicó el test de Kruskal-Wallis donde se comprobó la existencia de diferencias significativas para grupos de salinidad (p-valor =  $0,0109893 < 0,05$ ). Con el test de Bonferroni se observó que el nivel de estrés para el grupo de salinidad 27-28 PSU difirió significativamente del grupo de salinidad 32-33 PSU, mostrando la salinidad intermedia los menores niveles de estrés celular (ligero). (Tabla 10)
- La EML también resultó significativamente diferente entre grupos de salinidad (test de Levene, p-valor =  $0,0903 > 0,05$ ; ANOVA, p-valor =  $0,0114 < 0,05$ ). Se encontró que la EML en los tratamientos a las salinidades 37-38 PSU y 27-28 PSU era estadísticamente similares, y significativamente más alta en el tratamiento con salinidad de 32-33 PSU, (p-valor  $< 0,05$ ; test de múltiples rangos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer) (Tabla 10).

##### Tratamientos a 20°C

- La talla de los organismos estudiados no presentó diferencias significativas entre los diferentes grupos de salinidad. Se trató de un grupo homogéneo, por lo que las diferencias encontradas en la EML no se atribuyeron a la talla. (Los datos cumplieron la normalidad, pero no la homocedasticidad —p-valor de la prueba de Levene es  $0,0164 < 0,05$ —. P-valor del test de Kruskal-Wallis,  $0,050133 > 0,05$ ). (Tabla 10).
- No fue necesario transformar los datos de EML, expresados como TRRN ya que cumplían con el criterio de normalidad. Se aplicó el test de ANOVA (test de Levene, p-

valor= 0,4224 > 0,05; p-valor de la prueba F 0,0006 < 0,05) y se encontraron diferencias significativas en la EML entre grupos de diferente salinidad. Con el test de múltiples rangos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer se demostró que la EML en organismos expuestos a salinidades 37-38 y 27-28 PSU fue estadísticamente distinta a los organismos expuestos a 32-33 PSU, presentando menores valores de EML en este último caso (estrés celular severo). Además, el tratamiento a salinidades bajas (27-28 PSU) muestra ausencia total de estrés en los organismos, presentando un tratamiento óptimo. (Tabla 10).

- c. Del mismo modo, la EML expresada en porcentaje mostró el mismo patrón de respuesta. La EML fue significativamente diferente entre grupos de salinidad (los datos no cumplieron la normalidad, pero sí la homocedasticidad — p-valor de la prueba de Levene 0,6703 > 0,05—. p-valor del test de Kruskal-Wallis 0,006464 < 0,05). El test de Bonferroni mostró qué grupos de salinidad eran estadísticamente distintos: Se encontró que la EML estabilidad de la membrana lisosomal para las salinidades de 37-38 PSU y 32-33 PSU era estadísticamente diferente, alcanzando mayores valores de estabilidad de la membrana lisosomal para la salinidad de 37-38. (Tabla 10).

### Tratamientos a 28°C

- a. En el estudio de la influencia de la talla de los organismos, los datos no cumplieron la normalidad, pero sí la homocedasticidad (p-valor de la prueba de Levene es 0,5808 > 0,05). Aplicando el test de Kruskal-Wallis (p-valor 0,05546 > 0,05) se comprobó la no existencia de diferencias significativas entre grupos de salinidad. (Tabla 10).
- b. Los datos de EML expresados como TRRN fueron analizados utilizando test no paramétricos p-valor del test de Kruskal-Wallis 0,656436 > 0,05). De este modo, se demostró que en los ensayos a temperatura de 28°C todos los grupos de salinidad mostraron una EML similar, presentando niveles de estrés celular entre moderado y severo. (Tabla 10).
- c. Al analizar los datos de EML expresada como % se obtuvieron resultados similares a los observados para el TRRN (p-valor del test no paramétrico de Kruskal-Wallis 0,305407 > 0,05). (Tabla 10).

**Tabla 10.** Resumen de las diferencias significativas encontradas en la EML en hemocitos de *C. gallina* entre tratamientos de salinidad por temperatura constante.

Temperatura	Salinidad	Talla	TRRN	%EML
12°C	37-38 PSU	X	XX	X
	32-33 PSU	X	X	X
	27-28 PSU	X	X	X
20°C	37-38 PSU	X	X	X
	32-33 PSU	X	X	X
	27-28 PSU	X	X	XX
28°C	37-38 PSU	X	X	X
	32-33 PSU	X	X	X
	27-28 PSU	X	X	X

\* La no coincidencia de cruces indica la existencia de diferencias significativas (ya sea de un test paramétrico o no paramétrico) entre los grupos de salinidad. Las cruces de las tallas, el TRRN y %EML están organizadas desde el valor más bajo (izda) al más alto (dcha).

### **Tratamientos a 27-28 PSU de salinidad**

- a. Los datos referentes a la talla de los organismos estudiados cumplieron la normalidad, pero no la homocedasticidad (p-valor de la prueba de Levene  $0,0171 < 0,05$ ). Al aplicar el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (p-valor  $0 < 0,05$ ) se comprobó la existencia de diferencias significativas de talla para los distintos grupos de temperatura. Las tallas de los organismos incubados a  $12^{\circ}\text{C}$  fueron significativamente menores que las tallas de los organismos expuestos a  $20^{\circ}\text{C}$  y  $28^{\circ}\text{C}$ . De este modo, no es posible descartar la contribución de este factor en los resultados obtenidos de estabilidad de la membrana lisosomal a la talla (edad) de los organismos estudiados. (Tabla 11)
- b. Los datos de EML expresados como TRRN resultaron seguir el criterio de normalidad y no fueron transformados. Aplicando el test ANOVA (p-valor del test de Levene  $0,0900 > 0,05$ ; p-valor de la prueba F  $0,0003 < 0,05$ ) se comprobó la existencia de diferencias significativas para grupos de temperatura. Con el test de múltiples rangos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer se observó que la EML para las temperaturas de  $12^{\circ}\text{C}$  y  $28^{\circ}\text{C}$  fue estadísticamente similar (estrés severo), Mientras que la EML resultó significativamente mayor para los organismos expuestos a  $20^{\circ}\text{C}$  (estrés ligero). (Tabla 11).
- c. La EML expresada como % no presentó diferencias significativas entre grupos de salinidad (cumplió la normalidad y la homocedasticidad —p-valor del test de Levene  $0,5681 > 0,05$ —, p-valor del test F del ANOVA  $0,4450 > 0,05$ ). Es decir, el porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal fue estadísticamente igual independientemente del tratamiento de temperatura ensayado. (Tabla 11).

### **Tratamientos a 32-33 PSU de salinidad**

- a. La talla de los organismos estudiados presentó diferencias significativas entre los diferentes grupos de temperatura. Se trató de un grupo heterogéneo, por lo que las diferencias encontradas en los ensayos de estabilidad de la membrana podrían atribuirse a la talla (edad) de los organismos (los datos cumplieron la normalidad, pero no la homocedasticidad —p-valor de la prueba de Levene es  $0,0033 < 0,05$ —. P-valor del test de Kruskal-Wallis,  $0 < 0,05$ ). El test de Bonferroni mostró que las tallas para grupos de temperatura  $20^{\circ}\text{C}$  y  $28^{\circ}\text{C}$  fue estadísticamente igual entre sí, pero significativamente mayor para los tratamientos a  $12^{\circ}\text{C}$  de temperatura. (Tabla 11).
- b. Los datos de EML expresados como TRRN no cumplieron los criterios para ser analizados mediante test paramétricos, incluso después de ser transformados. Consecuentemente, se aplicó el test de Kruskal-Wallis (p-valor del test de Levene  $0,0455 < 0,05$ ; p-valor del test de Kruskal-Wallis  $0,0155794 < 0,05$ ) y se encontró que existían diferencias significativas en la EML entre tratamientos a diferentes temperaturas. Con el test de Bonferroni se demostró que la EML fue significativamente más baja a  $20^{\circ}\text{C}$  que a  $12^{\circ}\text{C}$ . (Tabla 11).
- c. Del mismo modo, el porcentaje de EML también fue significativamente diferente entre grupos de temperatura (los datos no cumplieron la normalidad, pero sí la homocedasticidad — p-valor de la prueba de Levene  $0,1524 > 0,05$ —. p-valor del test de Kruskal-Wallis  $0,003650 < 0,05$ ). El test de Bonferroni mostró que el % de EML en el tratamiento a  $12^{\circ}\text{C}$  fue significativamente más alto que en los tratamientos a temperaturas de  $20^{\circ}\text{C}$  y  $28^{\circ}\text{C}$ . (Tabla 11).

### **Tratamientos a 37-38 PSU de salinidad**

- a. En el estudio de la influencia de la talla de los organismos, los datos no cumplieron la normalidad ni la homocedasticidad (p-valor de la prueba de Levene es  $0,0179 < 0,05$ ). Aplicando el test de Kruskal-Wallis (p-valor  $0 < 0,05$ ) se comprobó la existencia de

diferencias significativas de talla para los distintos grupos de temperatura. Con el test de Bonferroni se comprobó que el grupo de 12°C de temperatura difería con las tallas a 20°C y 28°C, recogiendo las menores tallas. (Tabla 11).

- b. Para el estrés celular expresado como TRRN se trabajó con los datos en bruto debido a que la normalidad de los datos. Se comprobó la heterogeneidad de los datos, existiendo diferencias significativas entre grupos de temperatura (p-valor de la prueba de Levene 0,7854 > 0,05; p-valor de la prueba F del test ANOVA 0,0043 < 0,05). Con el test de múltiples rangos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer se comprobó que el tratamiento a 20°C difería estadísticamente con los resultados obtenidos para tratamientos a 12°C y 28°C, presentado los menores niveles de estrés (moderado para 12°C y 28°C y ligero para 20°C). (Tabla 11).
- c. En lo referente a la EML como porcentaje no presentó diferencias significativas entre grupos de temperatura (los datos no cumplieron la normalidad, pero sí la homocedasticidad — p-valor de la prueba de Levene 0,1061 > 0,05—, p-valor del test no paramétrico de Kruskal-Wallis 0,0613853 > 0,05). (Tabla 11).

**Tabla 11.** Resumen de las diferencias significativas encontradas en la EML en hemocitos de *C. gallina* entre tratamientos de temperatura por salinidad constante.

Salinidad	Temperatura	Talla	TRRN	%EML
27-28 PSU	12°C	X	X	X
	20°C	X	X	X
	28°C	X	X	X
32-33 PSU	12°C	X	X	X
	20°C	X	X	X
	28°C	X	XX	X
37-38 PSU	12°C	X	X	X
	20°C	X	X	X
	28°C	X	X	X

\* La no coincidencia de cruces indica la existencia de diferencias significativas (ya sea de un test paramétrico o no paramétrico) entre los grupos de salinidad. Las cruces de las tallas, el TRRN y %EML están organizadas desde el valor más bajo (izda) al más alto (dcha).

La talla de los organismos estudiados permaneció uniforme dentro de cada grupo de temperatura (tabla 10), pero no entre grupos de salinidad (tabla 11). Debido a la heterogeneidad de los datos, no resulta posible comparar los resultados obtenidos para los ensayos a 12°C con los ensayos a 20°C y 28°C. En cualquier caso, esto permite establecer que el factor talla de los organismos influyó en los resultados, tanto de estabilidad de la membrana como de índice de condición.

Comparando los resultados obtenidos para los tratamientos a 20°C y 28°C se encontró que para salinidad de 32-33 PSU no mostró diferencias significativas ni en el nivel de estrés celular ni en el porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal. Por su parte, a 37-38 PSU y 27-28 PSU de salinidad no hubo diferencia significativa en el porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal, pero sí lo hubo en el nivel de estrés, siendo mayor para los organismos incubados a 28°C a 37-38 PSU en ambos casos. Es decir, los tratamientos a 20°C y 28°C en función de la salinidad no presenta diferencias en el porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal en ninguno de los casos. En lo referente al nivel de estrés, se observaron diferencias entre grupos de salinidad en dos de los tres casos (27-28 PSU y 37-38 PSU)

Por esto mismo, se observó que el factor temperatura influyó de forma significativa en el nivel de estrés de *C. gallina*. Conforme la temperatura del agua aumentó —situación a la que se está acercando el mar Mediterráneo con efecto del calentamiento global—, el TRRN disminuyó (luego el nivel de estrés aumentó). Un factor por tener en cuenta es que, con el efecto del aumento de temperatura, el efecto de la salinidad apenas fue notable en estos ensayos. Esto puede estar, en cierto modo, determinado por el ciclo reproductivo de *C. gallina*, puesto que temperaturas de 28°C coinciden con la época de puesta. Durante esta etapa los organismos presentan un debilitamiento en sus sistemas de defensas puesto que el principal objetivo de la especie y lo que requiere una mayor cantidad de energía es una puesta exitosa para la perpetuidad de la especie. Con el aumento del nivel de estrés se comprometen los ciclos reproductivos de *C. gallina* y así la perpetuidad de la especie.

Cabe destacar la existencia de un tratamiento de salinidad y temperatura que refleja la no existencia de estrés en los organismos. Se trata del tratamiento a 20°C y salinidad de 27-28 PSU. Esto quiere decir que estas condiciones son óptimas para la incubación de los organismos en futuros estudios, asegurando la perpetuidad y el buen estado de los bivalvos de *C. gallina*.

En cuanto a la estabilidad de la membrana, no se encontraron diferencias significativas entre el comportamiento para los individuos incubados a 20°C y 28°C. No obstante, sí que mostró una preferencia por salinidades altas (37-38 PSU) a 20°C, adquiriendo de este modo los mayores valores para la estabilidad. A temperaturas bajas (12°C), sin embargo, la preferencia fueron las salinidades intermedias (32-33 PSU).

#### 4.1.2 Análisis multifactorial

Debido a la falta de normalidad ya comprobada para los datos de estudio no es posible aplicar pruebas paramétricas para estudiar la influencia de varios factores simultáneamente sobre una variable. Por ello, se deben aplicar tests no paramétricos. En este caso, se aplica un análisis factorial. Este test refleja la posibilidad o no, de eliminar algunos factores por su baja influencia o por contener información redundante.

Los factores incluidos en este caso son la talla de los organismos de estudio, la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto de los acuarios y la propia variable de estudio, en este caso, TRRN o %EML. En este caso, se extraen factores estandarizando los datos, con el método de factorización de componentes principales y con la rotación varimax.

Para el TRRN es posible extraer dos factores (puesto que sus valores propios superan a 1,0). Estos dos factores reúnen el 74,86% de la variabilidad de los datos, lo que podría resultar suficiente. El primer factor explica el 52,07 % de la varianza total. Al intentar ver el concepto que está describiendo este factor se observa que está regido por la talla y la temperatura de los acuarios de forma positiva y por el OD de forma negativa (tabla 12). Por tanto, en gran medida parece ser indicativo del efecto de la temperatura en un ambiente acuático ya que altera al medio físicoquímico (a medida que aumenta la temperatura, la solubilidad del oxígeno en el agua disminuye) y a los organismos macroinvertebrados, por aumentar el tamaño debido al crecimiento a consecuencia de las mayores tasas de alimentación que desarrollan a mayor temperatura. El segundo factor que representa el 21,23 % de la varianza y está dominado por la acción de la salinidad media y los propios valores de TRRN (ambos positivamente) por lo que indicaría el efecto positivo de la salinidad sobre la estabilidad de la membrana lisosomal. Esto tiene sentido ya que los organismos estudiados fueron recogidos en el mar Mediterráneo —zona de alta concentración salina. Muestra que los organismos son capaces de adaptarse a condiciones más bajas de salinidad, pero presentaron preferencia por la salinidad más alta (37-38 PSU).

**Tabla 12.** Matriz de cargas de para los factores tras la rotación Varimax para el TRRN

	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>
<b>TRRN</b>	-0,00882682	0,749815
<b>Talla</b>	0,847916	0,0469773
<b>Sal Media</b>	0,00742621	0,704072
<b>Temp Media</b>	0,962891	-0,0330074
<b>OD Medio</b>	-0,978368	0,0220536

La prueba de factorabilidad, indica la calidad del análisis factorial. Sirve para determinar si los factores extraídos describen con éxito las relaciones entre las variables ensayadas. Para ello se emplea el índice KMO (Kaiser-Meyer-Olkin). En la tabla 13 se muestra la calidad del análisis factorial en función de lo propuesto por Sharma, 1996 [65].

**Tabla 13.** Calidad del análisis factorial en función del valor del índice KMO propuesto por Sharma, 1996 [65].

<b>KMO</b>	<b>RECOMENDACIÓN</b>
<b>&gt; 0,90</b>	Magnífico
<b>0,80</b>	Meritorio
<b>0,70</b>	Mediano
<b>0,60</b>	Mediocre
<b>0,50</b>	Despreciable
<b>&lt; 0,50</b>	Inaceptable

En este caso, el índice KMO indica que el análisis de factores realizado para TRRN es mediocre (KMO 0,561181), por lo que puede aprobarse.

En cuanto al porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal también pueden extraerse dos factores que explican el 74,62 % de la variabilidad total de los datos. Al igual que en el caso anterior, el primer factor está regido por la talla y la temperatura de los acuarios de forma positiva y por el OD de forma negativa (tabla 14), explicando el 52,22% de la varianza. En definitiva, refleja el efecto de la temperatura en el ambiente acuático. Por su parte, el segundo factor está dominado por la acción de la salinidad media y los propios valores de %EML explicando el 22,39 % de la variabilidad.

**Tabla 14.** Matriz de cargas de para los factores tras la rotación Varimax para el %EML

	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>
<b>%EML</b>	-0,069877	0,74155
<b>Talla</b>	0,846625	-0,00547226
<b>Sal Media</b>	0,0363735	0,756949
<b>Temp Media</b>	0,962575	-0,0299095
<b>OD Medio</b>	-0,978135	0,0289425

La prueba de factorabilidad mostró la mediocridad de la bondad del índice KMO (KMO 0,5608), por lo que se pudo aceptar el análisis de factores.

## 4.2 Resultados del índice de condición

Se estudió el índice de condición de los individuos de los distintos tratamientos a fin de obtener variables de apoyo para la medición de los efectos biológicos en *C. gallina* que ayuden a la interpretación de los resultados mostrados para el biomarcador ensayado y para futuros análisis [42].

Como se dijo anteriormente, los ensayos de IC y EML se realizaron sobre distintos organismos debido a la imposibilidad de realizarlos sobre los mismos organismos —los organismos empleados para el análisis de la estabilidad de la membrana lisosomal se utilizaron para otros ensayos toxicológicos (como la acetilcolinesterasa) que no conciernen a este TFM.

En el presente trabajo no fue posible comparar la evolución del estado de salud y del estrés de los organismos ensayados con respecto a los valores de referencia puesto que no se hicieron análisis de IC a tiempo 0 para los ensayos a 12°C. Para todos los tratamientos, se determinó el IC (Tabla 9), sin embargo, para los tratamientos realizados a 12°C, se tuvo que trabajar con organismos de menor tamaño dada la inexistencia de tallas mayores.

Dado que el índice de condición se ve fuertemente afectado por la talla de los organismos estudiados (además de otros factores como el sexo, la localización, etc. [42]) se trabajó con un IC ajustado, siempre que fue posible, en el que se seleccionaron organismos dentro de un mismo rango de tallas. En este caso, el rango escogido fue de 17 a 20 mm para los organismos a 20°C y 28°C y de 13 a 16 mm para los organismos incubados a 12°C (tabla 9). Por todo ello, para poder hacer comparaciones en este apartado se analizaron únicamente los organismos incubados a 20°C y 28°C, además de los organismos de referencia.

La influencia de la talla puede comprobarse analizando los resultados obtenidos para el IC a 12°C y 28°C en este caso. Se consiguen valores similares en el IC pese a que los organismos incubados a 12°C cuentan con tallas notablemente menores.

De este modo, fue posible comparar los valores de IC de referencia a tiempo 0 con los resultados para cada tratamiento tras los 21 días de incubación para los tratamientos a 20°C y 28°C de temperatura. En la figura 36 se muestran los valores medios junto a los errores estándar para cada uno de los tratamientos (salinidad y temperatura) ensayados, además de los análisis de referencia.

Se comprobó que, para los organismos de referencia, que no sufrieron incubación, el IC ajustado de 19,5 y 23,5°C se mantuvo sin apenas variaciones. Esta variable evalúa de forma conjunta el estado de salud, crecimiento, rendimiento cárnico, madurez sexual entre otros.

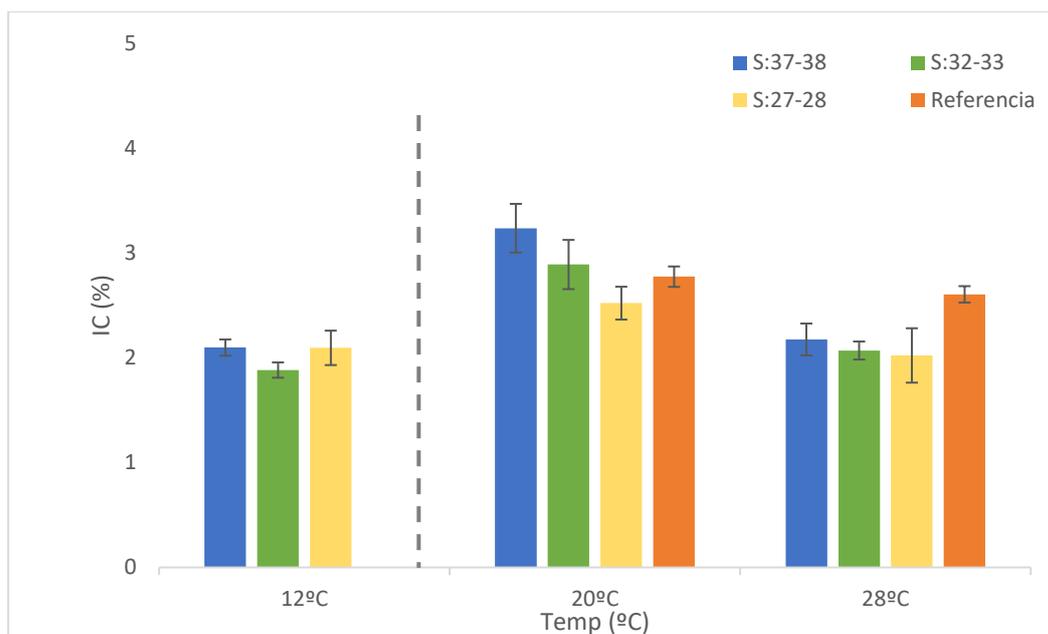
Cuando comparamos los IC de referencia con los tratamientos, se observaron mayores diferencias entre el IC de referencia tomado a 23,5°C con los del tratamiento a 28°C, reflejando un claro empeoramiento de las condiciones generales de los individuos tras ser mantenidos durante 21 días a esas temperaturas para los 3 rangos de salinidad. En el caso del IC de referencia tomado a 19,5°C y los tratamientos a 20°C, estas diferencias fueron más heterogéneas entre grupos de salinidad tendiendo a mayores valores para las mayores salinidades. Por ello, se puede asumir de forma general un buen estado general de los organismos tras la incubación aun cuando se observan variaciones entre las distintas salinidades.

Parece haber diferencias marcadas entre grupos de salinidad dentro del tratamiento a 20°C. En todos los casos la salinidad 37-38 PSU mostró mayores valores de IC que los grupos de salinidad 32-33 PSU y 27-28 PSU. Este hecho puede deberse a que los organismos de estudio se recogieron en el mar Mediterráneo —lugar con alta salinidad—, por lo que los organismos mostraron una preferencia por dicho ambiente. Sin embargo, reflejaron también su capacidad de adaptación a

otras salinidades (27-28 PSU y 32-33 PSU) llegando a alcanzar valores de IC muy similares que los obtenidos para alta salinidad (37-38 PSU).

Las diferencias por grupos de salinidad dentro de cada tratamiento por temperatura no resultan claras, sin embargo, para los organismos incubados a 12°C y 28°C. Por lo que no parece que la salinidad sea el factor determinante que dicte el desarrollo de tejidos blandos en *C. gallina*.

En cuanto al factor temperatura, sí se obtuvieron diferencias claras entre grupos, teniendo los menores valores de IC para los organismos incubados a 28°C. De este modo, podría decirse que la temperatura sí fue un factor determinante en el desarrollo de tejidos blandos.



**Figura 36.** Resultados de IC (%) para cada tratamiento (representado con la media y el error estándar). IC para 12°C ajustado al rango de tallas 13-16 mm. IC para 20°C y 28°C ajustado al rango de tallas de 17 a 20 mm.

Finalmente, se corroboró la necesidad de haber escogido organismos para el índice de condición dentro del mismo rango de tallas para poder realizar comparaciones por grupos. También se comprobó la necesidad de realizar análisis del IC de los organismos a tiempo 0 (inmediatamente tras el muestreo) para obtener un valor de referencia con el que poder comparar la evolución del crecimiento y estado de salud de los organismos tras la incubación en los acuarios por 21 días para todos los tratamientos ensayados.

## 5 Conclusiones

En el presente Trabajo de Fin de Máster se ha efectuado el estudio de la respuesta basal del biomarcador de la estabilidad de la membrana lisosomal en hemocitos granulares de *C. gallina* bajo distintas condiciones ambientales de temperatura y la salinidad, utilizando la técnica de retención de rojo neutro (NRR).

Como conclusión general, ha quedado demostrado que las condiciones ambientales de salinidad y temperatura afectan de forma directa a la EML de *C. gallina*, no observándose en ninguno de los tratamientos ensayados condiciones de estrés muy severo. Por lo tanto, dentro del rango de temperaturas de 12 a 28°C y de salinidad 27-38 PSU, los efectos sobre la EML encontrados tras 21 días pueden ser reversibles cuando los organismos se encuentren nuevamente expuestos a condiciones óptimas de temperatura y salinidad. Sin embargo, se ha encontrado para un tratamiento condiciones de ausencia de estrés, correspondiente a 20°C y 27-28 PSU de salinidad. Los resultados más favorables (teniendo en cuenta el TRRN y el %EML de forma conjunta) se han observado a 20°C y 37-38° PSU (correspondientes a condiciones de primavera/otoño en aguas mediterráneas) y a 12°C y 32-33 PSU (correspondientes con condiciones de invierno en aguas de transición. Dentro del contexto de cambio climático y calentamiento de las aguas, los resultados de este estudio han mostrado una disminución de la EML a temperaturas de 28°C, sugiriendo un mayor riesgo de sufrir estrés celular muy severo si la temperatura del agua supera este valor.

El índice de condición se ve claramente afectado por la talla de los organismos. Además, el efecto de la temperatura en los extremos (12°C y 28°C) dicta la producción de tejido blando sobre el efecto de la salinidad. Por su parte, a temperaturas intermedias (20°C) el efecto de la salinidad sí provoca distinciones notables.

## 6 Bibliografía

- [1] Bargione, G., Donato, F., Barone, G., Virgili, M., Penna, P. y Lucchetti, A. (2021) “Chamelea gallina” reproductive biology and Minimum Conservation Reference Size: implications for fishery management in the Adriatic Sea’, *BMC Zoology*, vol. (n. ° 6), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40850-021-00096-4>
- [2] Guglielmi, M. V., Semeraro, D., Ricci, P. y Mastrodonato, M. (2023) ‘First data on the effect of Aluminium intake in “Chamelea gallina” of exploited stocks in the Southern Adriatic Sea (Central Mediterranean Sea)’, *Regional Studies in Marine Science*, vol. (n. ° 63). <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.103025>
- [3] Baeta, M., Antonio, M., Ballesteros, M. y Defeo, O. (2021) ‘Long-term trends in striped venus clam (“Chamelea gallina”) fisheries in the western Mediterranean Sea: The case of Ebro Delta (NE Spain)’, *Marine Policy*, vol. (n. ° 134). <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2021.104798>
- [4] Pampanin, D. M., Ballarin, L., Carotenuto, L. y Marin, M. G. (2002) ‘Air exposure and functionality of “Chamelea gallina” haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents’, *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. (n. ° 131), 605-614. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(01\)00512-8](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(01)00512-8)
- [5] Moschino, V. y Marin, M. G. (2006) ‘Seasonal changes in physiological responses and evaluation of “well-being” in the Venus clam “Chamelea gallina” from the Northern Adriatic Sea’, *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. (n. ° 145), 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.021>
- [6] Cascione, D. y Ricci, P. (2022) ‘Observations on benthic assemblages impacted by hydraulic dredges in the Southern Adriatic Sea (Central Mediterranean Sea)’, Institute of Electrical and Electronics Engineers. *IEEE International Workshop on Metrology for the Sea; Learning to Measure Sea Health Parameters (MetroSea)*. Milazzo, Italy, 3-5 Octubre 2022. 252-256. <https://doi.org/10.1109/MetroSea55331.2022.9950864>
- [7] Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Paolo, G. y Otello, S. (2007) ‘Effects of salinity on the clam “Chamelea gallina”. Part I: alterations in immune responses’, *Marine Biology*, vol. (n. ° 151), 1051-1058. <https://10.1007/s00227-006-0543-6>
- [8] Carducci, F., Biscotti, M. A., Trucchi, E., Giuliani, M. E., Gorbi, S., Coluccelli, A., Barucca, M. y Canapa, A. (2020) ‘Omics approaches for conservation biology research on the bivalve “Chamelea gallina”’, *Scientific Reports*, vol. (n. ° 10), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75984-9>
- [9] Pampanin, D. M., Marin, M. G. y Ballarin, L. (2002) ‘Morphological and cytoenzymatic characterization of haemocytes of the venus clam “Chamelea gallina”’, *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. (n. ° 49), 227-234. <https://doi.org/10.3354/dao049227>
- [10] Repetto, G., Peso, A. y Zurita, J. L. (2008) ‘Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity’, *Nature Protocols*, vol. (n. ° 3), 1125-1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- [11] Reanult, T. (2015) ‘Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves’, *Fish & Shellfish Immunology*, vol. (n. ° 46), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.011>
- [12] Mancuso, A., Stagoni, M., Prada, F., Sacartponi, D., Corrado, P. y Goffredo, S. (2019) ‘Environmental influence on calcification of the bivalve “Chamelea gallina” along a latitudinal

gradient in the Adriatic Sea', *Nature*, vol. (n. ° 9), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47538-1>

- [13] España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, (1995). Real Decreto 560/1995, de 7 de abril, por el que se establece las tallas mínimas de determinadas especies pesqueras. <https://www.boe.es/eli/es/rd/1995/04/07/560/con>
- [14] Martínez-Pita, I. y Moreno, O. (2022) 'A method to predict the reproductive cycle of the striped Venus clam "Chamelea gallina" based on the influence of environmental factors: Application in its fishery management', *Fisheries Research*, vol. (n. ° 245). <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106133>
- [15] Ramón, M. (1990) 'Estudio del ciclo ovárico de "Chamelea gallina" (Linneo, 1758) del Golfo de Valencia', *Iberus revista de la Sociedad Española de Malacología*, vol. (n. ° 9), 175-179.
- [16] Rodríguez de la Rúa, A., Prado, M. A. y Buzón, M. A. (2003) 'Estudio del ciclo reproductor de "Chamelea gallina" (L., 1758) (Mollusca: Bivalvia) en tres poblaciones del litoral andaluz', *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, vol. (n. ° 19), 57-63. <https://core.ac.uk/download/pdf/71765047.pdf>
- [17] Rodríguez de la Rúa, A. (2008) *Estudio del ciclo reproductor y la talla mínima de madurez de moluscos bivalvos y cefalópodos de interés pesquero en las costas andaluzas*. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz.
- [18] Ogunola, O. (2017) 'Physiological, Immunological, Genotoxic and Histopathological biomarker responses of molluscs to heavy metal and water-quality parameter exposures: a critical review', *Journal of Oceanography and Marine Research*, vol. (n. ° 5), 1-6. <https://doi.org/10.4172/2572-3103.1000158>
- [19] Ballarin, L., Pampanin, D. M. y Marin, M. G. (2003) 'Mechanical disturbance affects haemocyte functionality in the Venus clam "Chamelea gallina"', *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. (n. ° 136), 631-640. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00216-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00216-2)
- [20] Munari, M., Marozzo, V., Chemello, G., Riedl, V., Pastore, P., Badocco, D. y Main, M. G. (2019) 'Seawater acidification and emerging contaminants: A dangerous marriage for haemocytes of marine bivalves', *Environmental Research*, vol. (n. ° 175), 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.032>
- [21] Matozzo, V., Rova, G. y Marin, M. G. (2007) 'Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Morphological characterisation and involvement in immune responses', *Fish & Shellfish Immunology*, vol. (n. ° 23), 732-746. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.01.020>
- [22] Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Paolo, G. y Marin, M. G. (2007) 'Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam "Chamelea gallina"', *Fish & Shellfish Immunology*, vol. (n. ° 22), 98-114. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.016>
- [23] Brunk, U. T., Nuzil, J. y Eaton, J. W. (2013) 'Lysosomal involvement in apoptosis', *Redox Report*, vol. (n. ° 6). <https://doi.org/10.1179/135100001101536094>
- [24] Biondi, S. y Del Piero, D. (2012) 'Survey on "Chamelea gallina" beds in the lignano area (Gulf of Trieste, Adriatic Sea)', *Annales: Histoire, Sciences Sociales*, vol. (n. ° 22), 35-44. [https://www.researchgate.net/publication/260420315\\_survey\\_on\\_chamelea\\_gallina\\_beds\\_in\\_the\\_lignano\\_area\\_gulf\\_of\\_triESTE\\_adriatic\\_sea](https://www.researchgate.net/publication/260420315_survey_on_chamelea_gallina_beds_in_the_lignano_area_gulf_of_triESTE_adriatic_sea)

- [25] Coppe, A., Bortoluzzi, S., Murari, G., Marino, I. A. M. y Zane, L. (2012) ‘Sequencing and Characterization of Striped Venus Transcriptome Expand Resources for Clam Fishery Genetics’, *PLoS ONE*, vol. (n. ° 7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044185>
- [26] Theodorou, J. A., Akrivos, V., Katselis, G. y Moutopoulos, D. K. (2022) ‘Use of local ecological knowledge on the natural recruitment of bivalve species of commercial exploitation in a natura area’, *Journal of Marine Science and Engineering*, vol. (n. ° 10). <https://doi.org/10.3390/jmse10020125>
- [27] Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Bressan, M. y Marin, M. G. (2013) ‘Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam “Chamelea gallina” and the mussel “Mytilus galloprovincialis”?’’, *Marine pollution bulletin*, vol. (n. ° 72), 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.004>
- [28] Grazioli, E., Guerranti, C., Pastorino, P., Esposito, G., Bianco, E., Simonetti, E., Rainis, S., Renzi, M. y Terlizzi, A. (2022) ‘Review of the scientific literature on Biology, Ecology, and aspects related to the fishing sector of the Striped Venus (“Chamelea gallina”) in Northern Adriatic Sea’, *Journal of Marine Science and Engineering*, vol. (n. ° 10). <https://doi.org/10.3390/jmse10091328>
- [29] McCarty, L. S., Power, M. y Munkittrick, K. R. (2002) ‘Bioindicators versus Biomarkers in ecological risk assesment’, *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. (n. ° 8), 159-164. <https://doi.org/10.1080/20028091056791>
- [30] Moschino, V. y Da Ros, L. (2016) ‘Biochemical and lisosomal biomarkers in the mussel “Mytilus galloprovincialis” from the Mar Piccolo of Tranto (Ionian Sea, Southern Italy)’’, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. (n. ° 23), 12770-12776. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4929-1>
- [31] McCarthy, J. F. y Shugart, L. R. (1990) *Biomarkers of Environmental Contamination*. Estados Unidos: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351070263>
- [32] McCarty, L. S. y Munkittrick, K. R. (1996) ‘Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy or functional?’’, *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. (n. ° 2), 268-274. <https://doi.org/10.1080/10807039609383607>
- [33] Depledge, M. H. y Fossi, M. C. (1994) ‘The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates’, *Ecotoxicology*, vol. (n. ° 3), 161-172. <https://doi.org/10.1007/BF00117081>
- [34] Moore, M. N. (1993) ‘Biomarkers of contaminant exposure and effect: a way forward in marine environmental toxicology’, *Science of The Total Environment*, vol. (n. ° 134), 1335-1343. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80140-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80140-8)
- [35] Au, D. W. T. (2004) ‘The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review’, *Marine Pollution Bulletin*, vol. (n. ° 48), 817-834. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.032>
- [36] Broeg, K., Westernhagen, H. V., Zander, S., Körting, W. y Koehler, A. (2005) ‘The “bioeffect assessment index” (BAI): A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach’, *Marine Pollution Bulletin*, vol. (n. ° 50), 495-503. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.042>
- [37] United Nations Environment Programme / Mediterranean Action Plan (UNEP/MAP) *State of the Mediterranean Marine and Coastal Environment*. <https://www.unep.org/unepmap/taxonomy/term/1777>

- [38] Brock, V. (1993) 'Effects of mercury on physiological condition and content of the biomarker ALA in the oyster "Ostrea edulis"', *Marine Ecology Progress Series*, vol. (n. ° 96), 169-175. <https://www.jstor.org/stable/24833542>
- [39] Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Orbea, A., Soto, M. y Cajaraville, M. P. (2013) 'Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the interactive biomarker approach', *Aquatic toxicology*, vol. (n. ° 136), 32-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.008>
- [40] Goldberg, E. D. (1986) 'The mussel watch concept', *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. (n. ° 7), 91-103. <https://doi.org/10.1007/BF00398031>
- [41] Hagger, J. A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M. B. y Galloway, T. S. (2010) 'The influence of seasonality on biomarker responses in "Mytilus edulis"', *Ecotoxicology*, vol. (n. ° 19), 953-962. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0477-0>
- [42] Hansson, T., Thain, J., Martínez-Gómez, C., Hylland, K., Gubbins, M. y Balk, L. (2017) 'Supporting variables for biological effects measurements in fish and blue mussels', *ICES Techniques in Marine Environmental Science (TIMES)*, vol. (n. ° 60). <https://doi.org/10.17895/ices.pub.1903>
- [43] Hagger, J. A., Jones, M., Leonard, D. R. P., Owen, R. y Galloway, T. S. (2006) 'Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers?', *Integrated environmental assessment and management*, vol. (n. ° 2), 312-329. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630020403>
- [44] Hylland, K., Bellas, J., Giltrap, M. y Brooks, S. (2021) 'ICES Viewpoint background document: How can we quantify and manage the impact of chemical pollution in the oceans?', *ICES Scientific Reports*. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5446>
- [45] Koukouzika, N. y Dimitriadis, V. K. (2005) 'Multiple biomarker comparison in "Mytilus galloprovincialis" from the Greece Coast: "Lysosomal Membrane Stability, Neutral Red Retention, Micronucleus Frequency and Stress on Stress"', *Ecotoxicology*, vol. (n. ° 14), 449-463. <https://doi.org/10.1007/s10646-004-1350-9>
- [46] Martínez, C., Robinson, C. D., Burgeot, T., Gubbins, M., Halldorsson, H. P., Albentosa, M., Bignell, J. P., Hylland, K. y Vethaak, A. D. (2017) 'Biomarkers of general stress in mussels as common indicators for marine biomonitoring programmes in Europe: The ICON experience', *Marine Environmental Research*, vol. (n. ° 124), 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.10.012>
- [47] De los Ríos, A., Juanes, J. A., Ortiz-Zarragoitia, M., López de Alda, M., Barceló, D. y Cajaraville, M. P. (2012) 'Assessment of the effects of a marine urban outfall discharge on caged mussels using chemical and biomarker analysis', *Marine Pollution Bulletin*, vol. (n. ° 64), 563-573. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.12.018>
- [48] Domouhtsidou, G. P., Dailianis, S., Kaloyianni, M. y Dimitriadis, V. K. (2004) 'Lysosomal membrane stability and metallothionein content in Mytilus galloprovincialis (L.), as biomarkers Combination with trace metal concentrations', *Marine Pollution Bulletin*, vol. (n. ° 48), 572-586. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.013>
- [49] United Nations Environment Programme Mediterranean Action Plan (UNEP). (2021) 'Protocol for in vivo determination of lysosomal membrane stability (LMS) in mussel haemocytes, and for the evaluation and interpretation of the results'. *Meeting of the Ecosystem Approach Correspondence Group on Pollution Monitoring*. Atenas, 26-28 abril 2021. [https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/35976/21wg492\\_04\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/35976/21wg492_04_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- [50] Moore, M. N., Lowe, D. y Köhler, A. (2004) 'Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability', *ICES Techniques in Marine Environmental Science (TIMES)*, vol. (n. ° 36), 1-31. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5060>
- [51] Martínez-Gómez, C., Bignell, J. y Lowe, D. (2015) 'Lysosomal membrane stability in mussels', *ICES Techniques in Marine Environmental Science (TIMES)*, vol. (n. ° 56), 1-46. <https://dx.doi.org/10.25607/OBP-240>
- [52] Svendsen, C., Spurgeon, D. J., Hankard, P. K. y Weeks, J. M. (2004) 'A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker?', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. (n. ° 57), 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.009>
- [53] Zapata-Vivenes, E., Del Valle-Marcano, L. y Acosta, V. (2018) 'Respuestas inmunológicas, estabilidad lososomal y frecuencia de micronúcleos en Eurythoe complanata (Polychaeta: amphinomidae) expuestos a una fracción acuosa de lubricantes usados en motores de automóviles', *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. (n. ° 34), 297-305. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.02.10>
- [54] Seglen, P. O. (1983) 'Inhibitors of lysosomal function', *Methods in enzymology*, vol. (n. ° 96), 737-764. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(83\)96063-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(83)96063-9)
- [55] Acosta, V., Prieto, A., Licett, B., Longart, Y. y Montes, M. (2011) 'Rendimiento, índice de condición y esfuerzo reproductivo del mejillón verde "Perna viridis" en cultivo de fondo en el Golfo de Cariaco, estado sucre, Venezuela', *Zootecnia Tropical*, vol. (n. ° 29), 399-410. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692011000400002&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692011000400002&lng=es&tlng=es)
- [56] Guerrero-Ríos, R., Espinoza, N., Barrios-Garrido, H. y Morales, F. (2015) 'Composición de tallas e índice de condición de la almeja estuarina en Curaire', *Zootecnia Tropical*, vol. (n. ° 33), 327-336. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8809683>
- [57] Cruz, R. A. y Courrau, J. A. (1986) 'Condición y ciclo reproductivo de la almeja "Anodontites Trapesialis Glaucus" (Bivalvia: Mycetopodidae) en Costa Rica', *Unicencia*, vol. (n. ° 3), 37-42. <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/uniciencia/article/view/5363>
- [58] Castillo-Durán, A., Castro-Acedo, A., Arreola-Lizárraga, J. A., Hoyos-Chairez, F., Cáceres-Martínez, C., Mendoza-Salgado, R., Martínez-Córdova, L. y Chávez-Villalba, J. (2013) 'Ciclo gametogénico e índice de condición de la almeja "Chione fluctifraga" en Bahía San Jorge, Golfo de California, México' *Revista de biología marina y oceanografía*, vol. (n. ° 48), 59-72. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000100006>
- [59] Pourmozaffar, S., Jahromi, S. T., Rameshi, H., Sadeghi, A., Bagheri, T., Behzadi, S., Gozari, M., Zahedi, M. R., Lazarjani, S. A. (2019) 'The role of salinity in physiological responses of bivalves', *Reviews in Aquaculture*, vol. (n. ° 12), 1548-1566. <https://doi.org/10.1111/raq.12397>
- [60] Compan, D. (1977) 'Características hidrográficas generales del Mediterráneo', *Cuadernos geográficos de la Universidad de Granada*, 361-375. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1253443>
- [61] Aminot, A., Chaussepied, M. y Centre national pour l'exploitation des océans (CNEXO). (1983) *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. Francia: Jouve.
- [62] Baumgarten, L. F. H., Wallner-Kersanach, M. G. Z. y Niencheski, J. M. R. (2010) *Manual de Análises em Oceanografia Química*. Río Grande: FURG.

- [63] Helm, M. M. y Bourne, N. (2006) *Documento técnico de pesca 471: Cultivo de bivalvos en criadero*. Italia: FAO. <https://www.fao.org/3/y5720s/y5720s00.htm>
- [64] Vethaak, A. D., Davies, I. M., Thain, J. E., Gubbins, M. J., Martínez-Gómez, C., Robinson, C. D., Moffat, C. F., Burgeot, T., Maes, T., Wosniok, W., Giltrap, M., Lang, T. y Hylland, K. (2017) 'Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment', *Marine Environmental Research*, vol. (n. ° 124), 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.010>
- [65] Sharma, S. (1996) *Applied Multivariate Techniques*. New York: John Wiley and Sons Inc.

## Anexos

### Anexo 1

#### ANÁLISIS DEL NIVEL DE AMONIO ( $N_{NH_4^+}$ ) Y NITRITO ( $N_{NO_2^-}$ ) EN LOS ACUARIOS

Se realizaron análisis de los niveles de amonio y nitrito en los acuarios al menos una vez por tratamiento. De este modo, se comprobó que la calidad del agua era adecuada para la supervivencia de *C. gallina*. Se siguieron los métodos propuestos por Aminot y Chaussepied, 1983, y adaptados por Baumgarten et al., 2010 [61, 62].

En la tabla 15 se muestran las concentraciones (en  $\mu M$ ) para los ensayos de nitrógeno de amonio y nitrógeno de nitrito obtenidas en los análisis realizados. En ninguno de los casos se encontraron valores críticos que pudieran hacer peligrar la vida de *C. gallina*. De hecho, para el nitrógeno de nitrito en la mayoría de los análisis, la concentración obtenida quedó por debajo del límite de detección (0,01). Todo ello indicó que la calidad del agua de los acuarios era apropiada para el estudio.

**Tabla 15.** Resultados del análisis de nitrógeno de amonio y de nitrito en  $\mu M$  en los acuarios según la temperatura de estudio

Temperatura	Fecha	Muestra	$N_{NH_4^+}(\mu M)$	$N_{NO_2^-}(\mu M)$
12°C	30/03/2023	C1-2N	0,3	
		C3-4I	<0,1	
		C5-6B	1,0	
	08/05/2023	C1-2N	<0,1	0,00
		C3-4I	<0,1	0,71
		C5-6B	<0,1	0,00
20°C	15/06/2023	C1N	2,2	0,46
		C2N	0,1	<0,01
		C3I	0,6	<0,01
		C4I	0,8	<0,01
		C5B	0,3	<0,01
		C6B	0,2	<0,01
28°C	11/07/2023	C1N	<0,1	0,23
		C2N	1,3	<0,01
		C3I	1,3	<0,01
		C4I	<0,1	<0,01
		C5B	<0,1	<0,01
		C6B	<0,1	<0,01
	13/07/2023	C1N	0,0	0,46
		C2N	1,9	0,05
		C3I	<0,1	0,46
		C4I	<0,1	<0,01
		C5B	<0,1	<0,01
		C6B	0,5	<0,01

## Anexo 2

### PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LAS MICROALGAS *ISOCHRYSIS GALBANA*

Para la preparación del medio de cultivo se adapta el protocolo sugerido por Derner, 2001.

Los nutrientes necesarios son nitrato, fosfato, silicato y tris. A continuación, se presentan los procedimientos necesarios para la preparación de 2 L de cada uno de ellos (tabla 16).

**Tabla 16.** Reactivos junto a sus respectivas cantidades para la preparación de 2L de nitrato, fosfato, silicato y tris

	REACTIVOS	CANTIDAD
<b>NITRATO</b>	NaNO <sub>3</sub>	300 g
	FeCl <sub>3</sub>	16 g
	EDTA	20 g
	Solución de metales traza <sup>1</sup>	2 mL
	Agua destilada	2 L
<b>FOSFATO</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	32 / 36,8 g
	Astenolit <sup>2</sup>	6 viales
	Agua destilada	2 L
<b>SILICATO</b>	Metasilicato de sodio/ Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> densidad 1,37 g/mL	80 g / 58,4 mL
	Agua destilada	2 L
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano	200 g
	HCl 37%	11,4 mL
	Agua destilada	2 L

<sup>1</sup> La solución de metales traza está compuesta por los elementos que se muestran en la tabla 17.

<sup>2</sup> Los 6 viales de Astenolit contienen 25 mg de vitamina B1, 25 mg de vitamina B6 y B12 para 0,5 L.

**Tabla 17.** Reactivo y cantidades para la preparación de la solución de metales traza

REACTIVO	CANTIDAD
MnCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O / MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	27 g / 22,84 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,6 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,5 g
ZnCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O / ZnCl <sub>2</sub>	1,47 g / 0,76 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,47 g
Agua destilada	150 mL

Para la preparación del medio de cultivo se requieren las cantidades de reactivos preparados que se muestran en la tabla 18. Es importante trabajar en medio lo más estéril posible para no comprometer la vida de las microalgas al introducir agentes extraños en los cultivos. Toda la preparación requiere de materiales autoclavados y de mecheros bunsen para esterilizar el ambiente de trabajo.

**Tabla 18.** Cantidades de cada reactivo para la preparación de 10, 2 y 1 litro de medio de cultivo para *Isochrysis galbana*

<b>NITRATO</b>	6,5 mL	1,3 mL	0,75 mL
<b>FOSFATO</b>	6,5 mL	1,3 mL	0,75 mL
<b>SILICATO</b>	20 mL	4 mL	2 mL
<b>TRIS</b>	50 mL	10 mL	5 mL
<b>Agua de mar autoclavada</b>	10 L	2 L	1 L

### Anexo 3

#### RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenibles</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No procede</b>
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero			X	
ODS 3. Salud y bienestar				X
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables		X		
ODS 13. Acción por el clima		X		
ODS 14. Vida submarina	X			
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos			X	

#### **Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto**

El ODS 14 es el de mayor grado de relación con el TFM que ha analizado la situación de estrés de las poblaciones de *Chamelea gallina* (chirla) en la costa del mar Mediterráneo en la actualidad (2023).

Dado que la especie *C. gallina* es importante tanto a nivel económico como para proveer a la ciudadanía de proteína de origen animal dentro de la UE, ha de hacerse un uso responsable de sus poblaciones. Por otro lado, se han confirmado los efectos del cambio climático sobre *C. gallina*. De este modo, queda confirmada una de las responsabilidades que indica este objetivo: la necesidad de conservar y/o proteger la biodiversidad en este sector.

