

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

MÁSTER UNIVERSITARIO EN EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DE
ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS



**“Estudio del efecto tóxico de dos
contaminantes en la especie *Donax
trunculus* mediante el ensayo de Retención
del Rojo Neutro.”**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Autor/a:

Verónica Julián Durán

Director/a:

Dra. Silvia Laura Falco Giaccaglia

GANDIA, 2015

Resumen:

Mediante el análisis de retención del rojo neutro se ha analizado la estabilidad de la membrana lisosomal en células de la hemolinfa de *Donax trunculus* como indicador del estrés causado por dos tóxicos: el pesticida acetamiprid y el metal cadmio. Se expusieron tellinas (*D. trunculus*) a los dos contaminantes durante 7 y 14 días en dos experimentos de laboratorio. En el primer experimento las tellinas se expusieron a concentraciones de control, 10 µg/L y 100 µg/L del pesticida acetamiprid. En el segundo, se utilizaron concentraciones de cadmio de control, 5 µg/L y 10 µg/L. Los resultados obtenidos han mostrado que, tanto para el cadmio como para el acetamiprid, aunque no se muestran diferencias significativas ante el tiempo de exposición al contaminante, sí que se han encontrado diferencias significativas según la concentración de contaminante presente en el agua. Tras la comparación de los tiempos de retención para ambos contaminantes, el cadmio presenta tiempos de retención menores que el acetamiprid.

Palabras Clave: *Donax trunculus*, cadmio, acetamiprid, rojo neutro, lisosomas, toxicidad.

Abstract:

By the neutral red retention assay we have studied the lysosomal membrane of cells of hemolymph in *Donax trunculus* as an indicator of toxic stress caused by the toxics acetamiprid (pesticide) and cadmium (metal). *D. trunculus* was exposed to both contaminants during 7 and 14 days in two different laboratory experiments. In the first one, *D. trunculus* was exposed to concentrations of control, 10 µg/L and 100 µg/L of the pesticide acetamiprid. In the second experiment were used concentrations of control, 5 µg/L and 10 µg/L of cadmium. The results obtained show that both cadmium and acetamiprid, although they show no statistical differences on the time of exposure to the contaminant, it does have significant differences depending on the concentration of contaminant in the water. Upon comparison of the retention times for both pollutants, cadmium presents times less retention than acetamiprid.

Keywords: *Donax trunculus*, cadmium, acetamiprid, neutral red, lysosome, toxicity.

Agradecimientos.

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han ayudado a realizar este trabajo. En primer lugar, a Silvia por todo lo aprendido con ella, además de toda su ayuda y constancia. A Julia y Ferran por toda su ayuda y paciencia en el laboratorio. A Miguel e Iván por su ayuda en los muestreos. Y finalmente a todos los compañeros que me han acompañado durante este maravilloso tiempo.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
3.1. Recolección de <i>Donax trunculus</i>	5
3.2. Exposición a contaminantes y mantenimiento de los individuos en laboratorio.....	6
3.3. Análisis de retención del rojo neutro.....	8
3.4. Análisis estadístico de los datos.....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1. Experimento con acetamiprid.....	11
4.1.1. Características fisicoquímicas del agua.....	11
4.1.2. Biometría de los individuos analizados.....	12
4.1.3. Resultados del análisis de retención del rojo neutro.....	13
4.1.4. Comparación de resultados a 7 días.....	14
4.1.5. Comparación de los resultados a 14 días.....	15
4.1.6. Comparación de resultados a 7 y 14 días.....	17
4.2. Experimento con cadmio.....	18
4.2.1. Características fisicoquímicas del agua.....	18
4.2.2. Biometría de los individuos analizados.....	19
4.2.3. Resultados del análisis de retención del rojo neutro.....	20
4.2.4. Comparación de resultados a 7 días.....	21
4.2.5. Comparación de resultados a 14 días.....	22
4.2.6. Comparación de resultados a 7 y 14 días.....	23
4.3. Comparación de los resultados obtenidos con acetamiprid y cadmio.....	24
4.4. Discusión.....	25
5. CONCLUSIONES.....	28
6. BIBLIOGRAFÍA.....	29

1. Introducción.

Donax trunculus es una especie de bivalvo de las aguas cálidas y templadas del Atlántico y el Mediterráneo. Vive en zonas de alta energía en playas arenosas. Aparece hasta los 6 metros de profundidad, presentando mayores densidades a profundidades entre 0 y 3 metros (Gaspar et al., 1999; Fishelson et al., 1999).

Los diferentes grupos de tamaño de la población se distribuyen de forma vertical en la costa (Zeichen et al., 2002). Los individuos más jóvenes (tamaños entre 3 y 9 mm) son más abundantes en zonas más superficiales mientras que los individuos mayores (tamaños entre 25 y 37 mm) se encuentran principalmente en las zonas más profundas por debajo de 0.7 m de profundidad (Zeichen et al., 2002).

Aunque se trata de una especie de interés pesquero, las tasas de captura de tellina por unidad de esfuerzo (CPUE) han descendido en los últimos años hasta valores de 10.95 kg barco/día en la Comunidad Valenciana. Por este motivo, y para aumentar los niveles de biomasa, en la Resolución *del 3 de junio de 2015, de la Consellería de Presidencia y Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua*, se ha optado por cerrar las pesquerías, prohibiendo el marisqueo de tellina (*Donax trunculus*) y chirla en cualquier modalidad en las zonas de producción de moluscos CVA– 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7.

Actualmente se estudian las causas de este descenso poblacional, planteando, entre otras posibles causas, la sobrepesca. Otro motivo que puede afectar a la actividad de marisqueo es la contaminación química (Bille et al., 2015).

En este sentido, *Donax trunculus* se ha utilizado como organismo centinela para la contaminación en ecosistemas de playas arenosas y dadas sus características (suspensívoro, sedentario y bioacumulador) se le considera un bioindicador de la contaminación (Fishelson et al., 1999; Neuberger-Cywiak et al., 2007; Tlili et al., 2010., Tlili et al., 2011).

Las respuestas bioquímicas y celulares son los primeros efectos de componentes potencialmente tóxicos en los organismos y las respuestas fisiológicas son las observadas en la totalidad de los organismos como respuesta directa a los contaminantes (Martins et al., 2006; Neuberger-Cywiak et al., 2007). Se define como biomarcador a una variación biológica, celular, fisiológica o de comportamiento que se puede medir en el tejido, en muestras de fluidos corporales o al nivel del organismo completo y que provee la evidencia de exposición a los efectos de uno o más contaminantes (Depledge & Fossi, 1994).

En este contexto, los lisosomas acumulan activamente componentes catiónicos pero cualquier daño celular o alteración de la permeabilidad de la membrana disminuye esta función (Fishelson et al., 1999; Martins et al., 2006). La presencia de elevados niveles de contaminantes orgánicos (PAHs, PCBs) o metales pesados puede provocar el mal funcionamiento de la membrana de los lisosomas (Lowe et al., 1992; Ringwood et al., 2002). Por tanto, la estabilidad de la membrana lisosomal es un biomarcador inespecífico o general ya que corresponde a un amplio rango de contaminantes.

Valores alterados de estabilidad de la membrana lisosomal también pueden ser inducidos por otros factores de estrés naturales como la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de alimento, el oleaje o los ciclos reproductivos (Carajaville et al., 2000; Ringwood et al., 2002).

Unos de los contaminantes más preocupantes en el medio marino son los metales pesados. Entre ellos, el cadmio es un elemento que puede parecer en el medio tanto por causas naturales como antropogénicas ya sean industriales (minería, metalúrgica, incineraciones y producción de pesticidas y barnices) o fuentes agrícolas (como son el uso de pesticidas y fertilizantes) (Storelli, 2008; Bille et al., 2015).

Aunque presenta bajas concentraciones en el medio si lo comparamos con otros metales pesados, se han detectado concentraciones elevadas en los tejidos de aquellas especies animales que tienen una relación estrecha con el sedimento (El-Sikaily et al., 2004).

La toxicidad del cadmio se relaciona con la cantidad de metal libre que interactúa con las estructuras celulares (estrés oxidativo) y/o enzimas, afectando a las rutas metabólicas (Neuberger-Cywiak et al., 2007).

Por otro lado, resulta complicado establecer relaciones específicas entre los pesticidas y sus efectos en moluscos bivalvos recogidos en la costa (Damásio et al., 2010). Aun así existen estudios que relacionan la presencia de pesticidas en ostras y mejillones con toxicidad y episodios de elevadas mortalidades (Köck et al., 2010).

Entre los diferentes pesticidas, este estudio se ha centrado en el acetamiprid, un insecticida neonicotinoide, es decir, que actúa en el sistema nervioso central (Taillebois et al., 2015). Entre las características de este pesticida destacan su elevada solubilidad en agua (2950 mg/l a 20°C) (PPDB., 2015). Aunque presenta un potencial de lixiviación bajo (PPDB., 2015) se ha relacionado ya su presencia en humedales con episodios de precipitaciones (Anderson et al., 2013).

Estudio del efecto tóxico de dos contaminantes en la especie *Donax trunculus* mediante el ensayo de retención del rojo neutro.

No existen muchos estudios acerca de los efectos del acetamiprid en la fauna, aunque se le ha reconocido elevada toxicidad para larvas de insectos (Taillebois et al., 2015) y una toxicidad moderada para mamíferos (PPDB., 2015). No se ha encontrado ningún estudio sobre la toxicidad en especies marinas.

2. Objetivos.

- Determinar los niveles de retención del rojo neutro en tellinas (*Donax trunculus*) a diferentes concentraciones del pesticida acetamiprid y tiempos de exposición.
- Determinar los niveles de retención del rojo neutro en tellinas (*Donax trunculus*) a diferentes concentraciones de cadmio y tiempos de exposición.
- Comparar el efecto tóxico de los dos contaminantes en las tellinas.

3. Material y métodos.

3.1. Recolección de *Donax trunculus*.

El muestreo de los individuos de *D. trunculus* necesarios para llevar a cabo el experimento se realizó en la playa de l'Ahuir, en Gandía (Valencia). La situación del punto de muestreo se muestra en la figura 3.1.



Figura 3.1. Situación del punto de muestreo.

Para la recolección de individuos se utilizó un rastrillo unido a una red con un tamaño de malla aproximado de 0.5 cm (Figura 3.2). Se tomaron 84 individuos para cada experimento. Como se ha descrito la influencia del peso en los biomarcadores en especies acuáticas, se seleccionaron sólo aquellos individuos que presentaban un tamaño medio comprendido entre 1.7 y 2.8 cm (Fishelson et al., 1999 y Alla et al., 2006). Por otro lado, se realizaron mediciones físico-químicas del agua de procedencia de los ejemplares de *D. trunculus*. Temperatura y oxígeno disuelto (OD) con una sonda óptica (proODO YSI), y salinidad (Multi 340i WTW).



Figura 3.2. Rastrillo utilizado durante el muestreo.

Para minimizar el estrés de los ejemplares durante el transcurso del experimento, se recogió el agua necesaria para llenar los acuarios en el punto de extracción, de modo que las características físico-químicas del agua se vieron afectadas lo mínimo posible. Durante el traslado de los individuos recolectados, se mantuvieron con un sistema de aireación hasta situarlos en los acuarios utilizados durante el estudio.

3.2. Exposición a contaminantes y mantenimiento de los individuos en laboratorio.

El experimento se basó en el planteado por Molnar & Fong en 2012. Tras el muestreo los individuos recogidos se llevaron al laboratorio, y se situaron en acuarios con aireación. En un total de 12 acuarios se situaron 7 individuos con 12 litros de agua de mar recogida en el punto de muestreo. Los acuarios se mantuvieron a la temperatura ambiental del laboratorio.

En la puesta a punto del experimento o en los ensayos previos, se produjo una elevada mortalidad causada por la bacteria *Vibrio harveyi*, que afecta a moluscos. Por ese motivo, para asegurar la supervivencia de suficientes individuos para realizar el

Estudio del efecto tóxico de dos contaminantes en la especie *Donax trunculus* mediante el ensayo de retención del rojo neutro.

experimento, se doblaron el número de acuarios de los 6 necesarios a los 12 acuarios utilizados finalmente.

Se realizaron dos experimentos, uno con el pesticida acetamiprid y otro con cadmio.

El primer experimento (figura 3.3), empezó el día 29/6/2015, en él se utilizaron tres concentraciones diferentes del pesticida acetamiprid: Control, 10 y 100 µg/L. Estas concentraciones se obtuvieron mediante disoluciones a partir del pesticida comercial Gazel® Plus SG (Acetamiprid 20%, p/p).

El segundo experimento (figura 3.4), empezó el día 20/7/2015, se utilizaron las concentraciones de control, 5 y 10 µg/L obtenidas a partir de una disolución de Cloruro de Cadmio 2.5 hidratado, extra puro ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ · M=228.34).

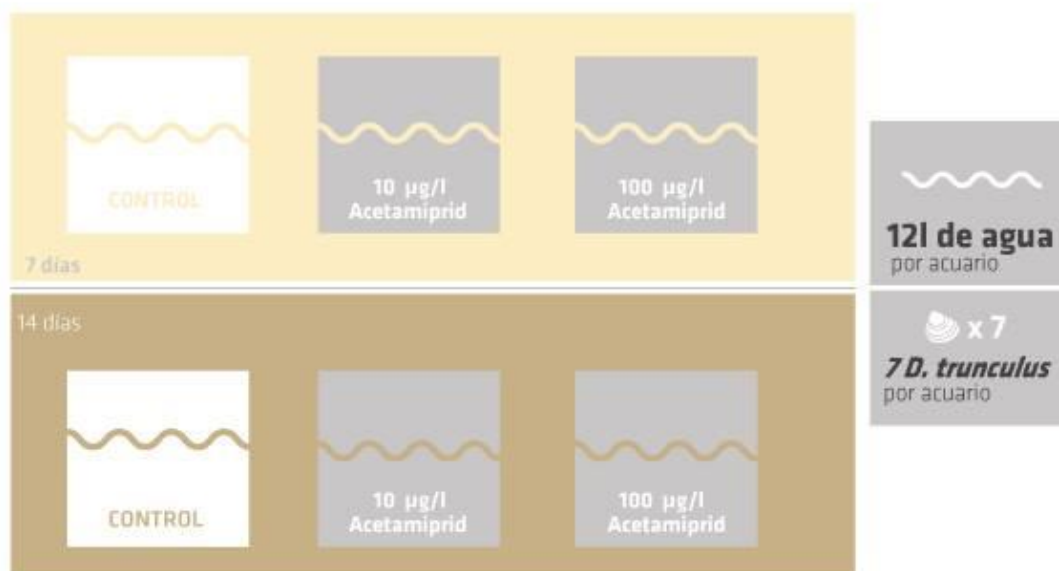


Figura 3.3. Esquema del experimento 1.

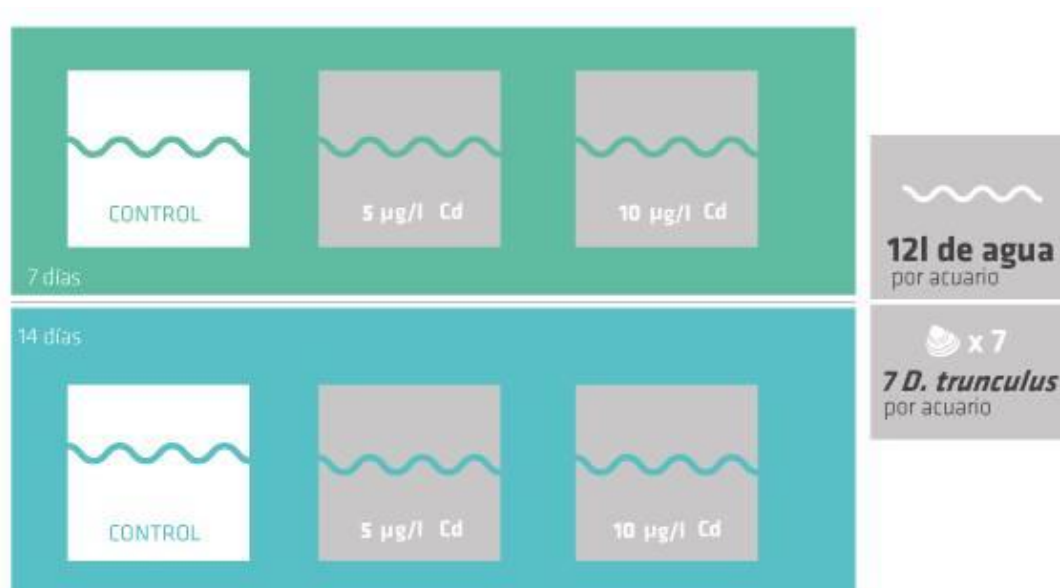


Figura 3.4. Esquema del experimento 2.

En ambos experimentos las tellinas se expusieron a contaminantes durante 7 y 14 días, al octavo día se realizó un cambio parcial de agua en los acuarios con agua procedente del punto de recogida. Los individuos se alimentaban cada dos días con 10 ml de una mezcla de las algas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis chuii* (JACUMAR, 2009).

Diariamente se midieron las características físico-químicas del agua (salinidad, oxígeno disuelto, porcentaje de saturación de oxígeno y temperatura) para asegurar que el agua se encontraba en buen estado. Se controló la salinidad impidiendo que superara los 38 mediante la colocación de tapas en los acuarios y, en caso de ser necesario, añadiendo pequeños volúmenes de agua destilada. También se comprobaba que el oxígeno disuelto se mantuviera similar al medido en el punto de procedencia de los individuos.

Tras 7 o 14 días se realizó el análisis del tiempo de retención del rojo neutro.

3.3. Análisis de retención del rojo neutro.

El análisis de retención del rojo neutro se utiliza como indicador del daño en la membrana lisosomal de diversas células, entre las que se encuentran las células de la hemolinfa (Lowe et al, 1992; Lowe et al, 1995). El rojo neutro es un tinte lipófilo que impregna la membrana celular: dentro de las células el compuesto queda atrapado por protonización en los lisosomas y se acumula en éstos, dónde puede observar microscópicamente. El grado de captura de este marcador depende del pH del lisosoma, así como de la

eficiencia de la bomba de protones de su membrana. Cualquier deterioro de este sistema se traduce en una reducción del tiempo de retención del tinte (UNEP, 1999; Fishelson et al, 1999).

El procedimiento específico para realizar el análisis en las tellinas es una adaptación del descrito por Lowe et al en 1992 y en 1995.

En un portaobjetos se dispersaron 10 μ l de una preparación compuesta por 10 μ l de poli-L-lisina (SIGMA) y 90 μ l de agua destilada. Posteriormente se dejó secar en una cámara con condiciones de oscuridad y humedad durante 30 minutos.

A continuación se extrajo la hemolinfa de *D. trunculus*. Se insertaron unas pinzas en la superficie ventral de la tellina para abrir parcialmente las valvas. Seguidamente, se insertó una aguja hipodérmica con 0.1 ml de solución salina fisiológica (4.77 g Hepes, 25.48 g NaCl, 13.06 g MgSO₄, 0.75 g de KCl y 1.47 g de CaCl₂, disueltos en un litro de agua destilada. Gasificados durante 10 minutos a 95%O₂:5%CO₂ y con el pH ajustado a 7.3 con NaOH 1M) en el músculo abductor y se extrajo 0.1 ml de hemolinfa. Para evitar la rotura de células, se descartó la aguja y se expelió el contenido en un tubo eppendorf.

Se dispensaron 40 μ l de la mezcla de la hemolinfa y la solución salina en el portaobjetos que se había dejado en la cámara húmeda, y se dejó incubar durante 30 minutos más en la cámara húmeda para conseguir que las células se adhirieran. Pasado ese tiempo, se drenó el exceso de solución en el portaobjetos.

A continuación se añadieron 40 μ l de solución de trabajo rojo neutro en el porta, esta solución de trabajo se obtuvo con 7 μ l de la solución stock de rojo neutro (20 mg de rojo neutro disueltos en 1 ml de dimetil sulfóxido) disueltos en 993 μ l de solución salina. La preparación se dejó en la cámara húmeda en oscuridad y tras 15 minutos, se aplicó un cubreobjetos y se inspeccionó la preparación en un microscopio a 40 aumentos.

Cada 15 minutos se observaron los portaobjetos. Se determinó el tiempo en el que el 50% de los lisosomas en las células de los granulocitos (Carballal et al; 1997) liberaron el rojo neutro al citosol.

Tras la extracción de la hemolinfa se tomaron medidas de los parámetros morfométricos (longitud, largo, peso total y peso de las valvas) de todos los individuos analizados.

3.4. Análisis estadístico de los datos.

Los resultados obtenidos en el análisis del tiempo de retención del rojo neutro se estudiaron con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.17.

En primer lugar se comprobó la normalidad de los datos mediante el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada. Los datos siguen una distribución normal cuando los parámetros anteriores se encuentran comprendidos en un rango entre 2 y -2.

También se evaluó la homocedasticidad, para ello se aplicó el test de Levene para realizar una verificación de la varianza. Se evalúa la hipótesis nula de que las desviaciones estándar son iguales. Se calcula el p-valor, si éste es mayor o igual a 0.05, se puede concluir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95% de confianza.

Finalmente, mediante el análisis de Varianza (ANOVA), se buscaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos medidos en el ensayo para las diferentes concentraciones y tiempos de exposición al contaminante. La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes, una componente entre grupos y otra componente dentro de grupos. Si el p-valor de la prueba-F es mayor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las variables a analizar, con un nivel del 95% de confianza.

Junto a la tabla ANOVA se realizó el método LSD (least significant difference) o prueba de Fisher, en el que se calculan los intervalos de mínima diferencia significativa de las medidas de los grupos. Posteriormente se realiza un gráfico en el que se muestran los intervalos, si éstos se solapan, las medias son iguales; si no se solapan, son diferentes.

4. Resultados y discusión.

4.1. Experimento con acetamiprid.

4.1.1. Características fisicoquímicas del agua.

En la tabla 4.1 se muestran los datos fisicoquímicos del agua recogida en el punto de muestreo así como el rango, promedio y desviación estándar de los datos obtenidos en las distintas peceras a lo largo de todos los días que duró el experimento.

Tabla 4.1. Resumen fisicoquímico del agua in situ y en las peceras.

	Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (%)
<i>In situ</i>	25,3	37,7	97,3
Control 7 días	25,1±0,3 [25,6-26,4]	37,7±0,3 [37,1-38,1]	98,0±0,9 [95,7-99,0]
10 µg/L 7 días	25,7±0,3 [25,2-26,4]	37,8±0,4 [37,3-38,4]	97,9±0,7 [96,4-99]
100 µg/L 7 días	25,7±0,3 [25,1-26,4]	37,7±0,3 [37,2-38,2]	97,8±0,6 [98,8-96,6]
Control 14 días	25,7±0,3 [25,1-26,4]	37,8±0,3 [37,3-38,2]	97,7±0,7 [96,1-98,8]
10 µg/L 14 días	25,7±0,3 [25,1-26,4]	37,7±0,3 [37,3-38,1]	97,9±0,5 [96,9-98,9]
100 µg/L 14 días	25,7±0,4 [25,1-26,4]	37,9±0,3 [37,3-38,4]	99,7±0,5 [94,6-102,3]

Al comparar las características fisicoquímicas del agua en el punto de muestreo con los valores medios diarios medidos en las peceras en las que se mantenían los individuos de *D. trunculus* analizados, no se observó un cambio relevante en los valores (tabla 4.1). La diferencia entre el valor máximo y el mínimo sí que fue más variable, presentando extremos más notables en todos los parámetros medidos. Entre estas variaciones destaca la de la temperatura, que aumentó más de un grado en todas las peceras. La salinidad y el porcentaje de oxígeno disuelto se mantuvieron más estables.

Los valores de salinidad superiores a 38, sólo se alcanzaron en momentos puntuales y se procedió al momento a disminuirlos mediante los pasos detallados en el apartado 3.2 (material y métodos).

La principal diferencia en la calidad fisicoquímica del agua de los acuarios era consecuencia de las diferentes concentraciones de acetamiprid que se añadieron a los acuarios.

4.1.2. Biometría de los individuos analizados.

Se realizó un análisis estadístico de la biometría de los individuos de *D. trunculus* analizados.

En la tabla 4.2 se ven las medias de las medidas para los 5 individuos analizados, así como los valores máximos y mínimos. Todos los individuos presentaban una longitud superior a 15 mm y se podían considerar como adultos (Zeichen et al, 2002).

Tabla 4.2. Biometrías de las tellinas utilizadas en el experimento con acetamiprid a 7 y 14 días. Valor medio \pm desviación estándar y valor máximo y mínimo.

7 días	Control	10 μg acetamiprid/L	100 μg acetamiprid/L
Longitud (mm)	25,0 \pm 2,5 [20,7-27,2]	23,5 \pm 1,6 [21,9-25,6]	23,7 \pm 2,3 [20,6-26,5]
Ancho (mm)	14,3 \pm 1,1 [12,6-15,7]	13,3 \pm 0,8 [12,5-14,5]	13,7 \pm 1,4 [11,9-15,2]
Peso total (g)	1,9370 \pm 0,5100 [1,2156-2,6201]	1,6383 \pm 0,4226 [1,1959-2,2756]	1,5704 \pm 0,4355 [1,0113-2,0992]
Peso concha (g)	1,3289 \pm 0,3085 [0,8626-1,6940]	1,1240 \pm 0,2770 [0,8703-1,5419]	1,2035 \pm 0,3646 [0,7251-1,5435]
14 días			
Longitud (mm)	24,2 \pm 2,0 [21,5-26,2]	21,5 \pm 1,6 [19,9-23,4]	22,3 \pm 2,2 [19,9-25,0]
Ancho (mm)	13,1 \pm 1,3 [11,0-14,4]	12,5 \pm 1,3 [11,3-14,6]	12,5 \pm 1,4 [10,2-13,6]
Peso total (g)	1,6697 \pm 0,4387 [1,1639-2,3249]	1,2475 \pm 0,3222 [0,9022-1,6868]	1,2577 \pm 0,4429 [1,1688-1,8401]
Peso concha (g)	1,1794 \pm 0,3724 [0,7106-1,7460]	0,9131 \pm 0,1958 [0,6996-1,2109]	1,0463 \pm 0,2243 [0,8221-1,3218]

Se analizó la distribución de las longitudes de los individuos (sesgo estandarizado y curtosis estandarizada). Todos los datos de peso se encontraban en el rango entre -2 y 2, por tanto seguían una distribución normal. Con un p-valor mayor a 0.05, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar (p-valor de 0,985926), mediante el test de Levene, por lo que se cumplió el requisito de la homocedasticidad de las varianzas. Según el resultado del ANOVA (p-valor de 0,1176) no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las longitudes de los individuos utilizados en el análisis.

Para el peso, los datos siguieron una distribución normal. Con un p-valor mayor a 0.05, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar (p-valor de 0,985926), se cumplió el requisito de homocedasticidad de la varianza. Según el resultado del ANOVA (p-valor de 0,1374) no había una diferencia estadísticamente significativa entre los pesos de los individuos utilizados en el análisis.

En resumen, los organismos estudiados entre los 6 grupos no mostraron diferencias significativas entre ellos ni en peso ni en longitud, que son dos de las características biométricas más estudiadas.

4.1.3. Resultados del análisis de retención del rojo neutro.

Mediante el análisis de retención del rojo neutro se obtuvo el tiempo al que la mitad de las células de la hemolinfa liberaban el rojo neutro al citosol. Estos tiempos se calcularon en 5 individuos para cada concentración (control, 10 µg/l y 100 µg/l) y tiempo de exposición (7 y 14 días). En la figura 4.3 se muestran los valores medios obtenidos.

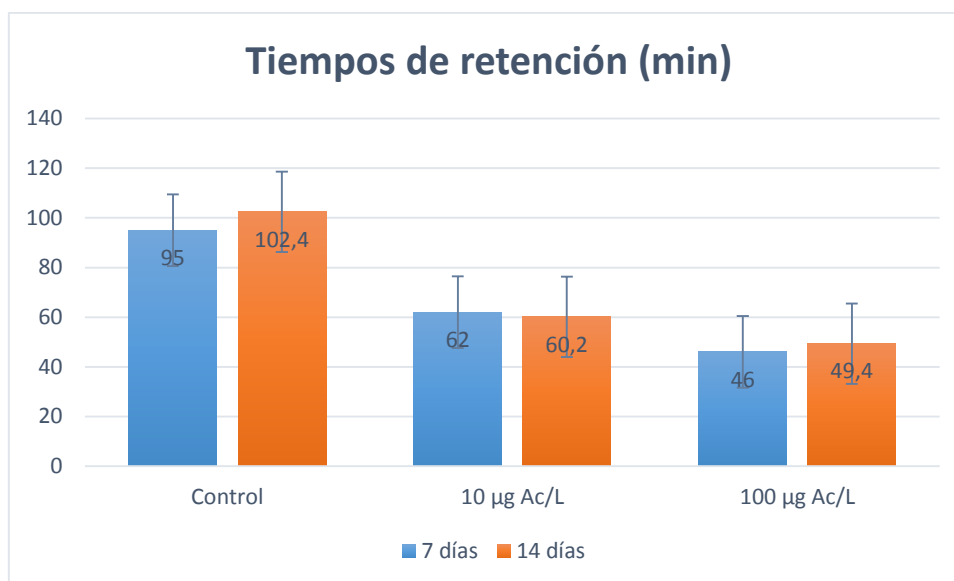


Figura 4.1. Valor medio del tiempo de RRN para cada concentración a cada tiempo de retención con acetamiprid.

Como se ve en la figura 4.1, los valores más altos fueron los del control, a medida que aumentaba la concentración de acetamiprid descendía el tiempo de retención del rojo neutro. Esta disminución del tiempo indica una mayor desestabilización de la membrana lisosomal como consecuencia de la mayor concentración de contaminante. Para el mismo nivel de contaminante no se pudo apreciar una pauta clara entre 7 y 14 días, obteniendo resultados similares.

Se realizó un análisis estadístico para conocer la estabilidad de la membrana lisosomal a las diferentes concentraciones y tiempos de retención. Atendiendo al sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, se observó que todos los resultados obtenidos durante el análisis de retención del rojo neutro siguieron una distribución normal.

4.1.4. Comparación resultados a 7 días.

Se compararon los resultados obtenidos a los siete días para las concentraciones de control, 10 µg Ac/L y 100 µg Ac/L.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

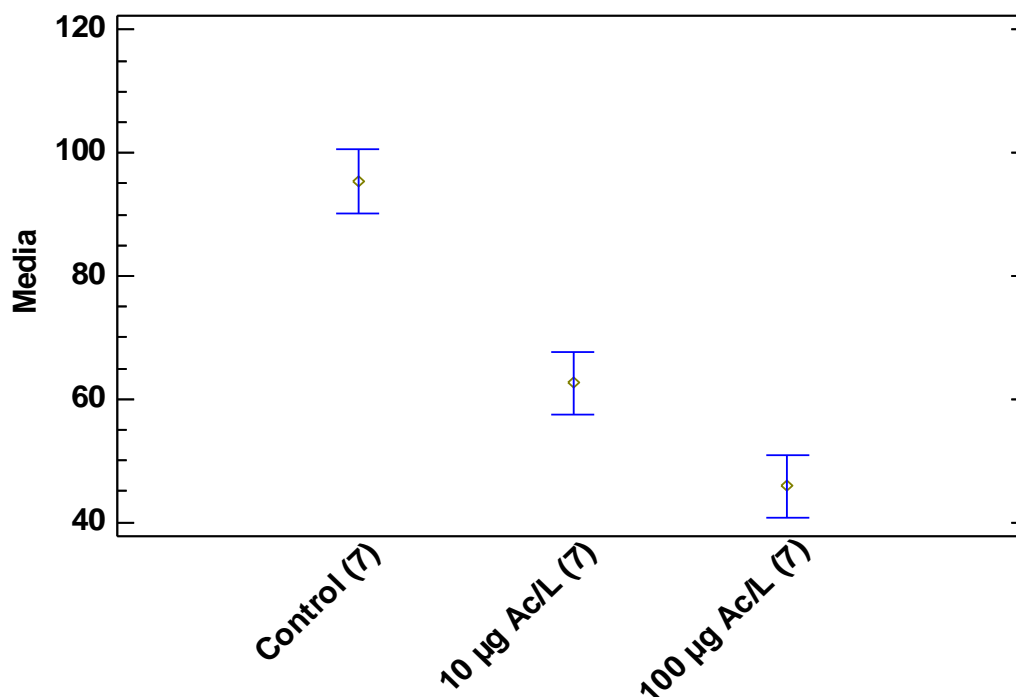


Figura 4.2. Gráfico LSD de las medias de los resultados obtenidos a 7 días de exposición para acetamiprid.

Mediante el test de Levene observando el P-valor ($0,640378 > 0,05$), con un nivel de confianza del 95% no se encontraron diferencias significativas entre las desviaciones estándar. En el ANOVA, el P-valor de la prueba-F ($0,0000 < 0,05$), indicó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las tres variables. Según los resultados representados en el gráfico 4.2, se observó que todas las medias resultaron distintas entre sí para cada una de las concentraciones a los 7 días de exposición.

Los tiempos de retención disminuyeron conforme aumentaba la concentración de acetamiprid.

4.1.5. Comparación de resultados a 14 días.

Se compararon los resultados obtenidos a los catorce días para las concentraciones de control, 10 µg de acetamiprid/L y 100 µg de acetamiprid/L.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

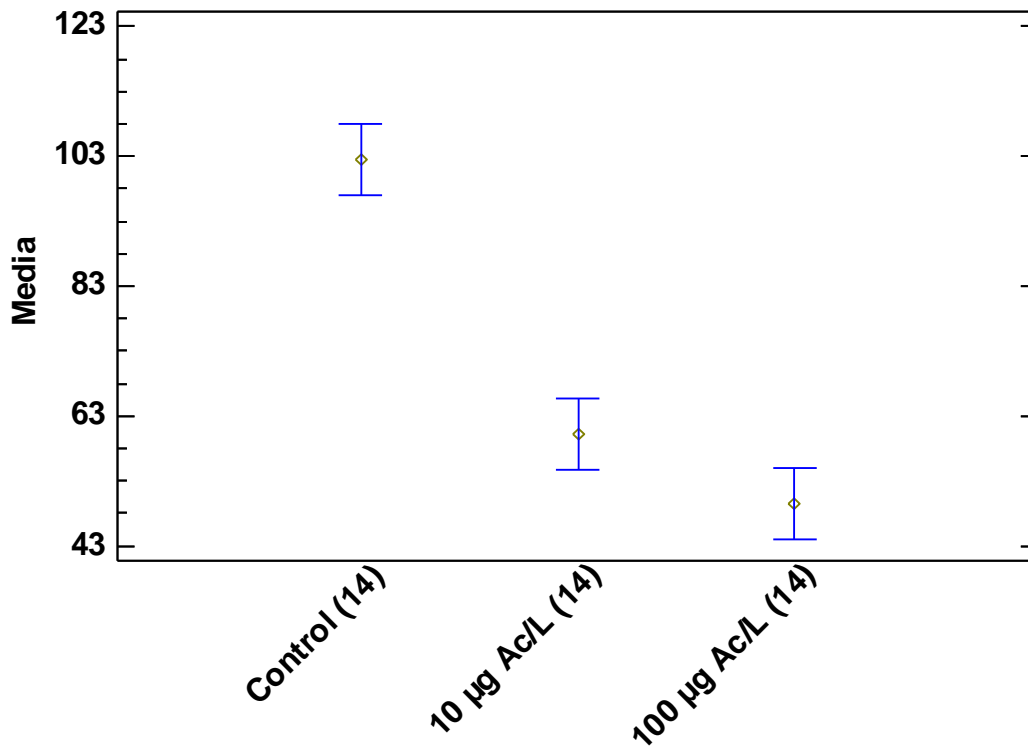


Figura 4.3. Gráfico LSD de las medias de los resultados obtenidos a 14 días de exposición para acetamiprid.

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar ($0,774703 > 0,05$) con el test de Levene. La tabla ANOVA, mostró diferencias significativas entre las medias de las tres concentraciones ($0,0000 < 0,05$). En el gráfico se ven diferencias entre el control y las concentraciones de 10 µg/L y 100 µg/L, pero entre 10 µg/L y 100 µg/L no se aprecian diferencias ya que los intervalos LSD se solapan.

4.1.6. Comparación de resultados a 7 y 14 días.

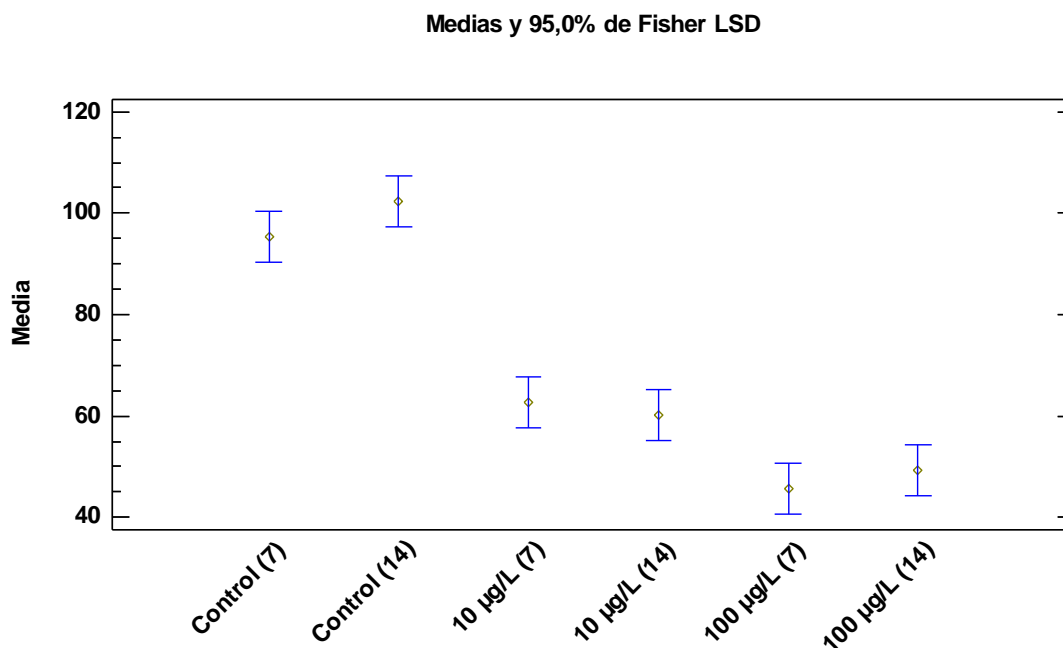


Figura 4.4. Gráfico LSD de las medias de los resultados obtenidos a 7 y 14 días de exposición para acetamiprid.

Para el conjunto de todos los datos, puesto que el p-valor (0,731924) es mayor o igual que 0,05, no existió una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza con el test de Levene. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los resultados con un p-valor de 0,0000. En el gráfico LSD (figura 4.4) se observaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de acetamiprid aplicadas (control, 10 µg/L y 100 µg/L) pero no se apreciaron diferencias significativas según el tiempo de exposición (7 o 14 días). Aunque los resultados según el tiempo de exposición no fueron significativos sí que se pudieron apreciar diferentes tendencias de comportamiento. En el caso de los controles, se aprecia que tiende a aumentar el tiempo de retención del rojo neutro con el tiempo. Para la concentración de 10 µg/L se observó una disminución en el tiempo de retención del rojo neutro al aumentar el tiempo de exposición. Finalmente, para la concentración de 100 µg/L, si bien los resultados indicaron un descenso en el tiempo de retención se apreció un ligero aumento para 14 días de exposición.

4.2. Experimento con cadmio.

4.2.1. Características fisicoquímicas del agua.

En la tabla 4.3 se muestran los datos fisicoquímicos del agua recogida en el punto de muestreo así como el rango, promedio y desviación estándar de los datos obtenidos en las distintas peceras a lo largo de todos los días que duró el segundo experimento.

Tabla 4.3. Resumen fisicoquímico del agua in situ y en las peceras

	Temperatura (°C)	Salinidad	Oxígeno (%)
<i>In situ</i>	27,1	37,6	99,7
Control 7 días	26,6 ± 0,2 [26,1-27,1]	37,8 ± 0,1 [37,6-38]	99,0 ± 0,6 [97,5-99,8]
5 µg/L 7 días	26,8 ± 0,3 [26,4-27,2]	37,9 ± 0,1 [37,7-38,1]	99,3 ± 0,5 [98,5-100,1]
10 µg/L 7 días	27,0 ± 0,3 [26,4-27,2]	37,8 ± 0,2 [37,7-37,9]	98,8 ± 0,8 [96,9-100]
Control 14 días	26,9 ± 0,5 [26,2-28,4]	37,9 ± 0,2 [37,7-38,2]	98,7 ± 1,3 [95,7-100,9]
10 µg/L 14 días	27,3 ± 0,5 [26,4-28,5]	37,8 ± 0,1 [37,5-38]	98,6 ± 1,0 [96,7-100,5]

Se compararon las características fisicoquímicas del agua medidas diariamente en las peceras con las que se tomaron en el punto de muestreo (tabla 4.3). No hubo un cambio relevante en los valores medios. En cuanto a la diferencia entre los valores máximo y mínimo sí que se aprecia un cambio relevante para la temperatura, que llega a variar más de dos grados en los análisis realizados a 14 días. En el caso de la salinidad y la temperatura se mantuvieron valores más estables.

En este experimento también se mantuvieron valores de salinidad por debajo de 38 con los métodos detallados en el apartado 3.2 (material y métodos).

Por este motivo, la principal diferencia en la calidad fisicoquímica del agua era consecuencia de las diferentes concentraciones de cadmio que se añadieron.

4.2.2. Biometría de los individuos analizados.

Se realizó un análisis estadístico de la biometría de los individuos de *D. trunculus* analizados. Dada la elevada mortalidad de los individuos, no fue posible mantener individuos expuestos a 5 µg/L de cadmio durante 14 días. Por ese motivo no existen datos para la concentración de 5 µg/L a 14 días.

En la tabla 4.4 se muestran las medias de las medidas realizadas en cada uno de los individuos analizados, así como los valores máximos y mínimos.

Tabla 4.4. Biometrías de las tellinas utilizadas en el experimento con acetamiprida a 7 y 14 días. Valor medio ± desviación estándar y valor máximo y mínimo.

7 días	Control	5 µg cadmio/L	10 µg cadmio/L
Longitud (mm)	22,0 ± 2,2 [19,2-24,4]	23,1 ± 2,9 [18,4-25,8]	23,7 ± 1,9 [21,9-26,4]
Ancho (mm)	1,25 ± 0,08 [11,5-13,4]	1,50 ± 0,42 [12,3-22,4]	14,9 ± 4,0 [12,3-21,8]
Peso total (g)	1,3078 ± 0,2889 [0,6944-1,6067]	1,6341 ± 0,3479 [1,0360-1,8737]	1,7293 ± 0,5013 [1,2542-2,5367]
Peso concha (g)	0,9575 ± 0,1963 [0,6944-1,1806]	1,2268 ± 0,2863 [0,8066-1,5199]	1,1531 ± 0,3343 [0,8732-1,6927]
14 días			
Longitud (mm)	22,4 ± 1,2 [20,8-23,7]		23,0 ± 3,6 [19,4-26,6]
Ancho (mm)	12,9 ± 0,7 [13,5-11,8]		13,2 ± 1,9 [11,5-15,3]
Peso total (g)	1,2524 ± 0,2159 [0,9859-1,4282]		1,4619 ± 0,5284 [0,9770-2,0250]
Peso concha (g)	0,9328±0,1161 [0,7762-1,0496]		1,0860±0,3617 [0,7811-1,4857]

Tras analizar la distribución de longitudes y pesos, con los valores del sesgo estandarizado y curtosis estandarizada, se concluyó que los datos seguían una distribución normal. Con un p-valor mayor a 0.05 tanto para la longitud (p-valor de 0,50719) como para el peso (p-valor de 0,55157) no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar del peso ni de la longitud de los individuos según el test de Levene. Por ese motivo, se cumplió el requisito de la homocedasticidad de las varianzas. Para la longitud la prueba ANOVA (p-valor de

0,8243) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las longitudes de los individuos analizados. Para el peso, el resultado del análisis ANOVA (p-valor de 0,3017) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los individuos analizados. Por tanto, los organismos estudiados no mostraban diferencias significativas entre los 5 grupos analizados, ni en peso ni en longitud.

4.2.3. Resultados del análisis de retención del rojo neutro.

Mediante el análisis de retención del rojo neutro se obtuvo el tiempo al que la mitad de las células de la hemolinfa liberaban el rojo neutro al citosol. Estos tiempos se calcularon en 5 individuos para cada concentración (control, 5 µg/l y 10 µg/l) a 7 días. Para los análisis realizados a 14 días se analizaron 4 individuos del control, tres de la concentración de 10 µg/L y ninguno de la concentración de 5 µg/L. En la figura 4.5 se muestran los valores medios obtenidos.

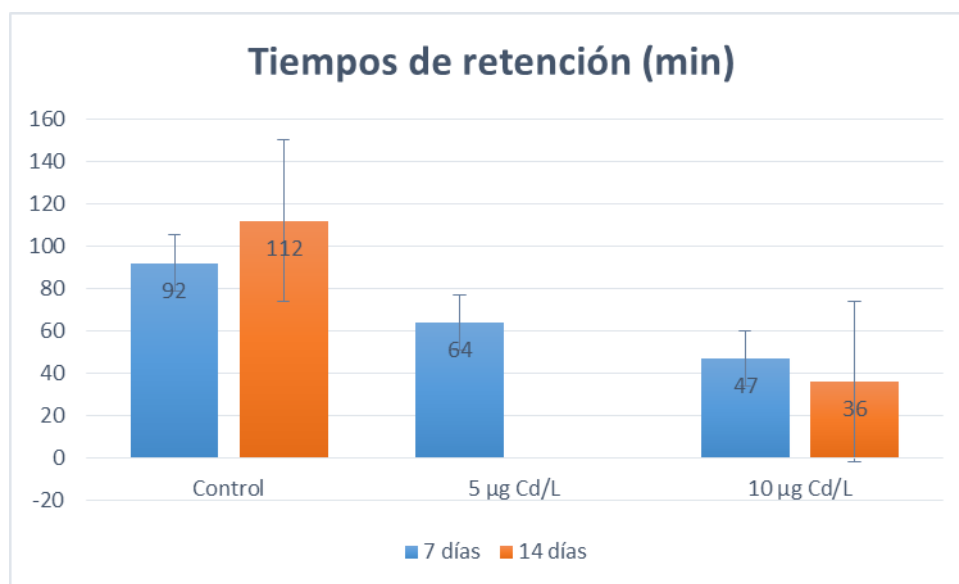


Figura 4.5. Valor medio del tiempo de RRN para cada concentración a cada tiempo de retención para cadmio.

Como se ve en la figura 4.5, se alcanzaron los valores más elevados en los controles, seguidamente, a medida que aumentaba la concentración de cadmio descendía el tiempo de retención del rojo neutro. Esta disminución del tiempo indicó una mayor desestabilización de la membrana lisosomal como consecuencia de la mayor concentración de contaminante. Para el mismo nivel de contaminante no se pudo apreciar una pauta clara entre 7 y 14 días, ya que en el caso de los controles se apreció un aumento del tiempo pero para cadmio 10 µg/l una disminución.

Se realizó un análisis estadístico para conocer la estabilidad de la membrana lisosomal a las diferentes concentraciones y tiempos de retención. Atendiendo al sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, se observó que todos los resultados obtenidos durante el análisis de retención del rojo neutro siguieron una distribución normal.

4.2.4. Comparación resultados a 7 días.

Se compararon los resultados obtenidos a los siete días para las concentraciones de control, 5 µg/L y 10 µg/L.

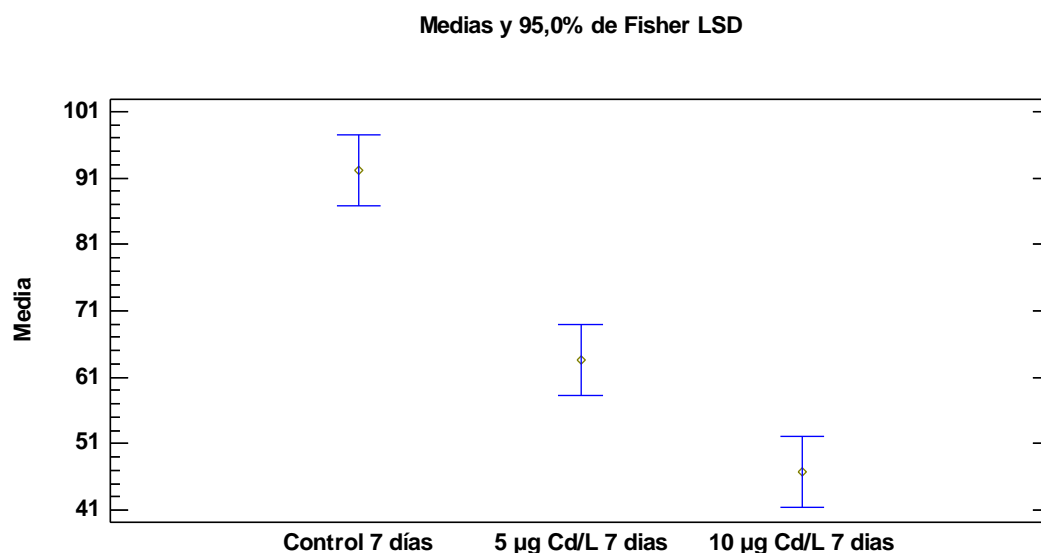


Figura 4.6. Gráfico LSD de las medias de los resultados obtenidos a 7 días de exposición para cadmio.

Con un nivel de confianza del 95% no se encontraron diferencias significativas entre las desviaciones estándar (p-valor de 0,744216) según el test de Levene. En el ANOVA, el P-valor de la prueba-F (0,0000), indicó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las tres variables. Según los resultados representados en el gráfico 4.6, se observó que todas las medias resultaron distintas entre sí para cada una de las concentraciones a los 7 días de exposición.

Los tiempos de retención disminuyeron conforme aumentó la concentración de acetamiprid.

4.2.5. Comparación de resultados a 14 días.

Se compararon los resultados obtenidos a los catorce días para las concentraciones de control, 5 $\mu\text{g/L}$ y 10 $\mu\text{g/L}$.

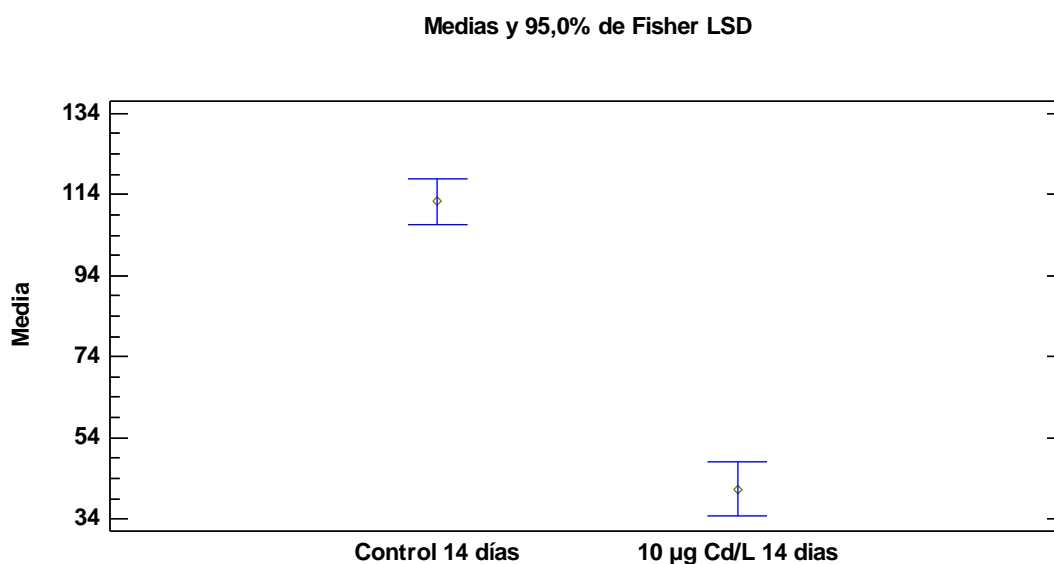


Fig. 4.7. Gráfico LSD de las medias de los resultados obtenidos a 14 días de exposición para cadmio.

Dada la elevada mortalidad de los individuos, en este análisis no se pudo determinar el tiempo de retención del rojo neutro a una concentración de 5 $\mu\text{g Cd/L}$.

Según el test de Levene no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar (0,389718). La tabla ANOVA, mostró diferencias significativas entre las medias de las tres concentraciones (0,0000). En el gráfico de la figura 4.7 se pudo observar que las medias para el control y la concentración de 10 $\mu\text{g/L}$ eran distintas entre sí a 14 días de exposición.

Al igual que en los resultados obtenidos a 7 días se vio que con el aumento de concentración de cadmio disminuyeron los tiempos de retención.

4.2.6. Comparación de resultados a 7 y 14 días.

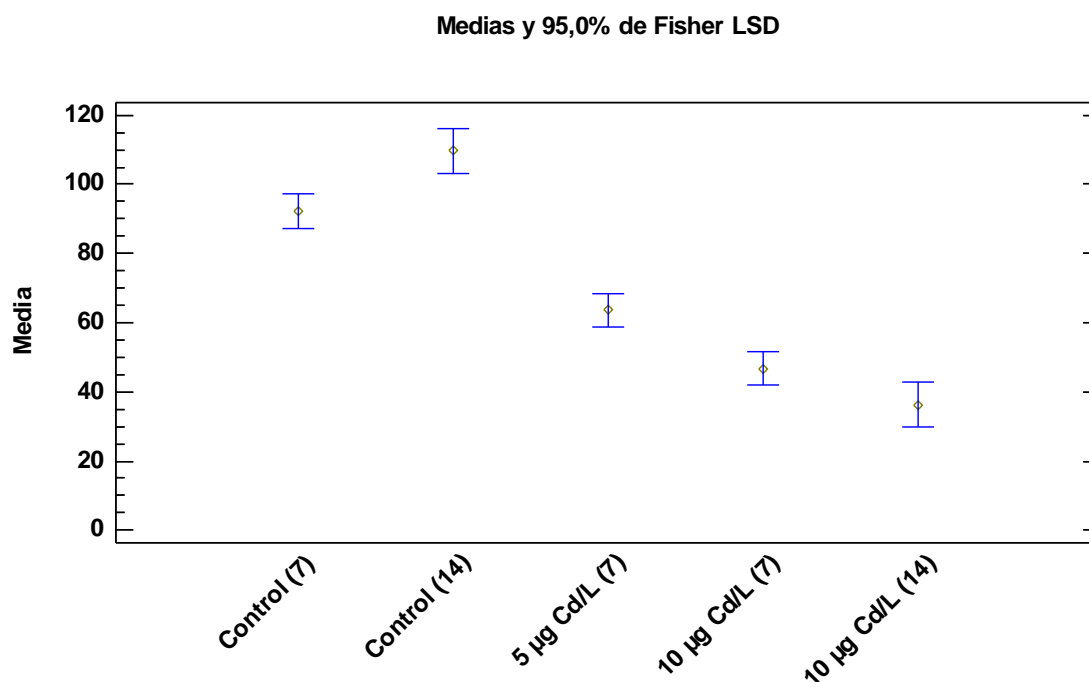


Figura 4.8. Gráfico LSD de las medias de los resultados obtenidos a 7 y 14 días de exposición para cadmio

Para el conjunto de todos los datos, puesto que el p-valor (0,704661) resultó mayor o igual que 0,05, no existió una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los resultados con un p-valor de 0,0000. En el gráfico LSD (figura 4.8) se observaron diferencias significativas entre los tres niveles ensayados, es decir control, 5 µg/L y 10 µg/L. Además se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles para los dos tiempos de exposición. Al aumentar el tiempo en las peceras, aumentaron los tiempos de retención del rojo neutro de una forma estadísticamente significativa para los controles. Para los resultados obtenidos a la concentración de 10 µg/L no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las medias. Sin embargo se observó una tendencia a la disminución en el tiempo de retención del rojo neutro al aumentar el tiempo de exposición.

4.3. Comparación de los resultados obtenidos con acetamiprid y cadmio.

Se compararon también los resultados obtenidos con los dos contaminantes. Para ello se compararon las mismas concentraciones de contaminante (control y 10 µg/L).

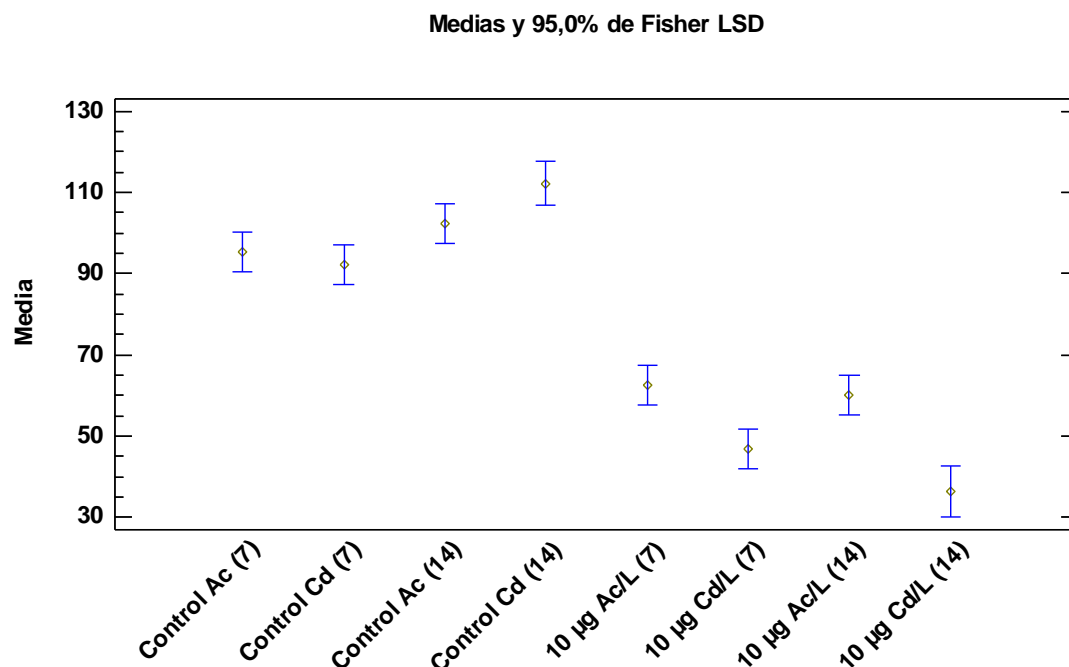


Figura 4.9. Gráfico LSD de las medias de los resultados obtenidos a 7 y 14 días de exposición para las concentraciones de control y 10µg/L para acetamiprid y cadmio.

Para el conjunto de los datos, el test de Levene obtuvo un p-valor de 0,728843, es decir, no se encontraron diferencias estadísticas entre las desviaciones estándar. Según el test ANOVA, con un p-valor de 0,0000, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias del conjunto de los datos. Observando el gráfico LSD de la figura 4.9 se aprecian dos grupos claramente diferenciados. Por un lado los resultados de los controles que obtuvieron los valores de tiempo más elevados; por el otro lado, con tiempos de retención menores, los resultados a 10 µg/L. En el caso de los controles sólo el control del cadmio a 14 días muestra diferencias significativas respecto a los otros controles expuestos a 7 días y no presenta diferencias significativas respecto al control del acetamiprid a 14 días. En cuanto a los contaminantes, también se observan diferencias significativas entre acetamiprid con valores mayores de retención de rojo neutro y cadmio con valores menores. Estas diferencias no se aprecian para ninguno de los dos contaminantes entre los dos tiempos de exposición.

4.4. Discusión.

Se produjo una elevada mortalidad de los individuos de *D. trunculus*. Ésta afectó por igual a los individuos de los acuarios control como a los de los acuarios con tóxico, por este motivo se descarta que el tóxico se encontrara en concentraciones letales. Como ya se ha comentado en el punto 3 (material y métodos), se cree que la principal causa de mortalidad de los individuos de *D. trunculus* se produjo por la contaminación por la bacteria *Vibrio harveyi*, presente en otros experimentos realizados en el mismo laboratorio. Esta bacteria puede provocar la muerte en almejas (Allam, 2002).

Según los datos obtenidos se puede concluir que los contaminantes cadmio y acetamiprid tienen un efecto tóxico que produce estrés en los individuos analizados. El efecto tóxico se puede medir estudiando la estabilidad de la membrana lisosomal en *D. trunculus*.

Existen estudios anteriores que aplican la técnica de retención del rojo neutro en especies del género *Donax* como indicador de estrés (Ringwood et al., 2002; Martins et al., 2006; Wang et al., 2006). No se ha encontrado ningún artículo que relacione esta técnica con el efecto tóxico de contaminantes en *Donax trunculus*. Por ese motivo en el presente trabajo se ha ampliado el rango de factores de estrés que se pueden analizar con la técnica de retención del rojo neutro en *D. trunculus*.

En el caso del acetamiprid no ha sido posible comparar los resultados obtenidos con estudios realizados en otras especies de bivalvos. Existen estudios que demuestran el efecto tóxico de otros pesticidas en bivalvos marinos (ostras) (Damásio et al, 2010; Köck et al 2010; Ochoa et al., 2012). Se demostró una correlación negativa entre el tiempo de retención del rojo neutro y la exposición al pesticida clordano en ostras (*Crassostrea virginica*) (Gold-Bouchot et al., 2007).

Para el pesticida acetamiprid se produce un cambio significativo en el nivel de retención del rojo neutro entre el control, 10 µg/L y 100 µg/L. No hay diferencias significativas en los tiempos de exposición para el control o las concentraciones a 10 µg/L y 100 µg/L, si bien sí que existe una tendencia a disminuir el tiempo de retención cuando aumenta el tiempo de exposición a acetamiprid en 10 µg/L y 100 µg/L mientras que los tiempos de retención tienden a aumentar en los controles.

Se ha detectado un resultado anómalo en los tiempos de retención de los individuos expuestos a una concentración de 100 µg acetamiprid/L. Se observa que el tiempo de retención a 14 días aumenta respecto al tiempo de retención a 7 días para la misma concentración. El resultado esperado sería que el tiempo de retención disminuyera al

estar los individuos más tiempo expuestos al contaminante. Sin embargo, el comportamiento observado podría ser debido a la adaptación de los individuos. A mayor tiempo en las peceras empiezan a subir los niveles de retención del rojo neutro como consecuencia de una mayor aclimatación a tiempos más prolongados. Este proceso de aclimatación se puede observar claramente en los resultados de los controles, en todos los casos los individuos de control mostraron un menor nivel de estrés al aumentar el tiempo en las peceras.

El cadmio provoca estrés por toxicidad en aquellos individuos expuestos a él. Se han encontrado diferencias significativas según la concentración de cadmio en el agua. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre el tiempo de retención a los diferentes tiempos de exposición.

El efecto del cadmio sobre los tiempos de retención del rojo neutro se ha estudiado en otros trabajos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Matozzo et al 2001; Molnar & Fong en 2012) en los que los efectos de toxicidad por cadmio sólo eran significativamente distintos a partir de 14 días. Esta diferencia puede ser debida a que estos experimentos se realizaron con otras especies con características diferentes (*Elliptio complanata*, *Hellisoma trivolis* y *Tapes philippinarum*).

No se pudo llevar a cabo el análisis para la concentración de 5 µg cadmio/L a 14 días ya que habían muerto todos los individuos mantenidos en peceras a esa concentración antes de realizar el análisis. Ya que para la concentración de 10 µg cadmio/L no se han encontrado diferencias significativas entre los resultados a 7 y 14 días, se puede pensar que el efecto tóxico del cadmio no presenta diferencias significativas con el tiempo de exposición al contaminante.

Se ha realizado una comparación entre los resultados obtenidos tras la exposición a ambos contaminantes y se han encontrado diferencias significativas entre los tiempos de retención obtenidos con la misma concentración (10 µg/L) de cadmio y de acetamiprid. Los tiempos de retención promedio en individuos expuestos a acetamiprid son significativamente superiores que los tiempos de retención promedio de individuos expuestos a cadmio para los dos tiempos de exposición. Es decir, el cadmio produjo un mayor estrés en la membrana lisosomal de *D. trunculus* que el que produjo el acetamiprid, este estrés se tradujo en tiempos de retención menores para el cadmio. Estos resultados pueden ser debidos a un mayor efecto tóxico del cadmio.

Es importante tener en cuenta efecto de las características fisicoquímicas del agua, que ya han probado ser relevantes en análisis de retención del rojo neutro, afectando a los

Estudio del efecto tóxico de dos contaminantes en la especie *Donax trunculus* mediante el ensayo de retención del rojo neutro.

resultados incluso en cambios de un solo grado (Wang et al., 2006). En estudios posteriores sería conveniente estudiar el efecto de la temperatura en los tiempos de retención de *D. trunculus* y ampliar el rango de contaminantes analizados.

5. Conclusiones.

El uso del biomarcador retención del rojo neutro ha demostrado ser una herramienta adecuada para estudiar el efecto del estrés tóxico causado por contaminantes orgánicos como el acetamiprid y compuestos metálicos como el cadmio. Ambos tóxicos desestabilizan la membrana lisosomal provocando menores tiempos de retención del colorante rojo neutro en los lisosomas de los granulocitos de la hemolinfa de las tellinas.

Para el contaminante orgánico acetamiprid los promedios del tiempo de retención a 7 días han sido de 95 minutos para el control, 62 minutos para la concentración de 10 µg acetamiprid/L y 46 minutos para la concentración de 100 µg acetamiprid/L. A 14 días los resultados han sido, respectivamente de 102, 60 y 50 minutos.

Para el metal pesado cadmio, los promedios del tiempo de retención a 7 días han sido de 92 minutos para el control, 64 minutos para la concentración de 5 µg cadmio/L y 47 minutos para la concentración de 10 µg cadmio/L. A 14 días los resultados han sido, de 112 minutos para el control y 36 minutos para la concentración de 10 µg cadmio/L.

Con ambos contaminantes se producen diferencias significativas según la concentración en el agua, pero con ninguno de los dos se aprecian diferencias significativas en los resultados según el tiempo de exposición.

En todos los casos los individuos de control muestran un menor nivel de estrés al aumentar el tiempo en las peceras. Posiblemente se debe al proceso de adaptación de las tellinas, debido a su aclimatación a los acuarios con el paso del tiempo.

El cadmio parece producir un mayor efecto tóxico que el acetamiprid cuando se exponen individuos de *D. trunculus* a iguales concentraciones de ambos contaminantes.

6. Bibliografía

- Alla, A. A., Mouneyrac, C., Durou, C., Moukrim, A., & Pellerin, J. (2006). Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(1), 23-29.
- Anderson, T. A., Salice, C. J., Erickson, R. A., McMurry, S. T., Cox, S. B., & Smith, L. M. (2013). Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere*, 92(1), 84-90.
- Allam, B., Paillard, C., & Ford, S. E. (2002). Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis Aquat Org*, 48, 221-231.
- Bille, L., Binato, G., Cappa, V., Toson, M., Dalla Pozza, M., Arcangeli, G., ... & Piro, R. (2015). Lead, mercury and cadmium levels in edible marine molluscs and echinoderms from the Veneto region (north-western Adriatic Sea–Italy). *Food Control*, 50, 362-370.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2), 295-311.
- Carballal, M. J., Carmen Lopez, M., Azevedo, C., & Villalba, A. (1997). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of aquatic organisms*, 29(2), 127-135.
- Damáso, J., Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D., Soares, A. M., ... & Barata, C. (2010). Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariate methods. *Ecotoxicology*, 19(6), 1084-1094.
- Depledge, M. H., & Fossi, M. C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3(3), 161-172.
- El-Sikaily, A., Khaled, A., & El Nemr, A. (2004). Heavy metals monitoring using bivalves from Mediterranean Sea and Red Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 98(1-3), 41-58.
- Fishelson, L., Bresler, V., Manelis, R., Zuk-Rimon, Z., Dotan, A., Hornung, H., & Yawetz, A. (1999). Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. *Science of the total environment*, 226(2), 121-131.

- Gaspar, M. B., Ferreira, R., & Monteiro, C. C. (1999). Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L.,(Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research*, 41(3), 309-316.
- Gold-Bouchot, G., Zapata-Perez, O., Ceja-Moreno, V., Rodriguez-Fuentes, G., Sima-Alvarez, R., Aguirre-Macedo, M., ... & Nasci, C. (2007). Biological effects of environmental pollutants in American Oyster, *Crassostrea virginica*: a field study in Laguna de Terminos, Mexico. *International Journal of Environment and Health*, 1(2), 171-184.
- JACUMAR, Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (2009), Planes Nacionales de Cultivos Marinos, *Cultivo de nuevas especies de moluscos bivalvos de Interés en Hatcheries*.
- Köck, M., Farré, M., Martínez, E., Gajda-Schranz, K., Ginebreda, A., Navarro, A., ... & Barceló, D. (2010). Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *Journal of Hydrology*, 383(1), 73-82.
- Lowe, D. M., Moore, M. N., & Evans, B. M. (1992). Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 91(1), 135-140.
- Lowe, D. M., Soverchia, C., & Moore, M. N. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic toxicology*, 33(2), 105-112.
- Martins, L. K. P., Bellotto, V. R., Alves, E. S., & de Brito, P. C. (2006). Effect of a storm event on lysosomes of haemocytes in *Donax hanleyanus* (Mollusca: Bivalvia) on exposed sandy beaches of Santa Catarina State, Brazil. *Journal of Coastal Research*, 1814-1818.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D. M., & Marin, M. G. (2001). Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), 163-170.
- Molnar, N., & Fong, P. P. (2012). Toxic Effects of Copper, Cadmium, and Methoxychlor Shown by Neutral Red Retention Assay in Two Species of Freshwater Molluscs. *Open Environmental Pollution & Toxicology Journal*, 3.
- Neuberger-Cywiak, L., Achituv, Y., & Garcia, E. M. (2007). Effects of sublethal Zn⁺⁺ and Cd⁺⁺ concentrations on filtration rate, absorption efficiency and scope for growth in *Donax trunculus* (Bivalvia; Donacidae). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 79(6), 622-627.

- Ochoa, V., Riva, C., Faria, M., de Alda, M. L., Barceló, D., Tejedor, M. F., ... & Barata, C. (2012). Are pesticide residues associated to rice production affecting oyster production in Delta del Ebro, NE Spain? *Science of the Total Environment*, 437, 209-218.
- RESOLUCIÓN de 3 de junio de 2015, de la Consellería de Presidencia y Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua, por la que se establecen los límites anuales de captura de chirla y tellina con dragas mecanizadas en aguas de la Comunitat Valenciana. [2015/5427]
- Ringwood, A. H., Hoguet, J., & Keppler, C. J. (2002). Seasonal variation in lysosomal destabilization in oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine environmental research*, 54(3), 793-797.
- Storelli, M. M. (2008). Potential human health risks from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via seafood consumption: estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs). *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2782-2788.
- Taillebois, E., Alamiddine, Z., Brazier, C., Graton, J., Laurent, A. D., Thany, S. H., & Le Questel, J. Y. (2015). Molecular features and toxicological properties of four common pesticides, acetamiprid, deltamethrin, chlorpyrifos and fipronil. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(7), 1540-1550.
- Tlili, S., Métails, I., Ayache, N., Boussetta, H., & Mouneyrac, C. (2011). Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination?. *Chemosphere*, 84(10), 1362-1370.
- Tlili, S., Métails, I., Boussetta, H., & Mouneyrac, C. (2010). Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. *Chemosphere*, 81(6), 692-700.
- Tlili, S., Minguéz, L., Giamberini, L., Geffard, A., Boussetta, H., & Mouneyrac, C. (2013). Assessment of the health status of *Donax trunculus* from the Gulf of Tunis using integrative biomarker indices. *Ecological Indicators*, 32, 285-293.
- UNEP/RAMOGÉ. (1999) Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens.
- PPDB. (2015) The FOOTPRINT pesticide properties database. UK: University of Hertfordshire [http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/11.htm (consultado el 24/07/2015)].
- Wang, T., Li, X., Bott, K., Song, L., Clarke, S., & Zhao, W. E. N. (2006). Effects of water temperature on the lysosomal membrane stability in hemocytes of blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach). *Journal of Shellfish Research*, 25(3), 935-940.

Estudio del efecto tóxico de dos contaminantes en la especie *Donax trunculus* mediante el ensayo de retención del rojo neutro.

Zeichen, M. M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A., & Ardizzone, G. D. (2002). Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic coast (Italy). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 54(6), 971-982.