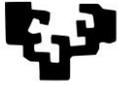


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

ANÁLISIS DE LA TOLERANCIA A LA DESECACIÓN Y NIVELES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN LOS TEJIDOS DE MEJILLONES ACLIMATADOS A DISTINTA ALTURA MAREAL

Autora:

Joana Rodríguez Araujo

Director:

Irrintzi Ibarrola Bellido

Leioa, Junio de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi director Irrintzi Ibarrola por haberme ayudado a realizar este trabajo, pero sobre todo por haberlo hecho siempre con entusiasmo y una sonrisa. Ojalá tenga la suerte de trabajar con más personas como él a lo largo de mi vida.

En segundo lugar, agradecer a mi familia de la universidad por el apoyo y la ayuda que me han dado a lo largo de este camino. En especial, a Xenia Velasco y Laura Sainz de la Maza por “jugarse la vida” junto a mí los días de nuestro con alerta naranja, siempre seréis mi subcontrata. También a mi fiel compañero Isaac Domínguez por haberme acompañado en esos momentos frente al folio en blanco, pero amigo... lo hemos conseguido!

Y por último y no menos importante a mis padres y mi hermana por haber aguantado mis malos ratos en casa.

En definitiva, muchas gracias a todas y cada una de las personas que han formado parte en esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. Área de recolección.....	5
3.2. Diseño experimental.....	5
3.3. Determinación del porcentaje de hidratación de los tejidos.....	7
3.4. Determinación de la concentración de sustancias ninhidrina positivas (NPS).....	7
3.5. Determinación de la tasa de desecación (por pérdida de peso vivo) y tasa de muerte.....	8
3.6. Tratamiento estadístico.....	9
4. RESULTADOS	10
4.1. Caracterización de la tolerancia a la desecación y concentración de NPS en mejillones de tres niveles mareales.....	10
4.1.1. <i>Determinación del porcentaje de hidratación</i>	10
4.1.2. <i>Concentración de NPS en músculo aductor</i>	11
4.1.3. <i>Determinación de la tasa de desecación (por pérdida de peso vivo) y mortalidad de los individuos</i>	12
4.2. Análisis de los niveles de NPS en mejillones sometidos experimentalmente a distintos regímenes de emersión.....	14
5. DISCUSIÓN	15
5.1. Caracterización de la tolerancia a la desecación y concentración de NPS en mejillones de tres niveles mareales.....	15
5.2. Análisis de los niveles de NPS en mejillones sometidos experimentalmente a distintos regímenes de emersión.....	18
6. BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

Los NPS, o sustancias que reaccionan positivamente con la ninhidrina, son efectores osmóticos intracelulares, fundamentalmente aminoácidos, que se han relacionado principalmente, en los moluscos bivalvos, con los procesos de regulación isosmótica del volumen celular (RIVC) para contrarrestar las fluctuaciones de la salinidad en el medio ambiente. Pero hay pocos estudios que relacionen el uso de estos NPS como osmolitos orgánicos para el mantenimiento del volumen celular durante el estrés por desecación. Por ello, este trabajo ha analizado el comportamiento fisiológico de *Mytilus galloprovincialis* frente a este estrés determinando el nivel de aminoácidos en mejillones procedentes de tres alturas diferentes en la zona intermareal. Se han evaluado los siguientes parámetros: concentración de NPS en el músculo aductor, porcentaje de hidratación de sus tejidos, tasa de desecación y tasa de mortalidad. A su vez se ha analizado la variación de la concentración de NPS en un curso-temporal en mejillones sometidos a dos regímenes de emersión-inmersión diferentes para comprobar si esta respuesta puede actuar como mecanismo de compensación a corto plazo o se necesita un periodo de aclimatación. Los datos obtenidos muestran que hay diferencias significativas en el contenido de NPS entre los mejillones de las tres alturas mareales, siendo mayor la concentración en los individuos de la zona alta evitando la pérdida de agua durante la emersión. Este mecanismo para tolerar la desecación no parece ser operativo a corto plazo ya que no se han encontrado diferencias en la concentración de aminoácidos libres durante el tiempo en el que los individuos fueron sometidos a los dos regímenes de emersión diferentes en el laboratorio.

Palabras clave: desecación, intermareal, *Mytilus galloprovincialis*, NPS, regulación isosmótica del volumen celular (RIVC)

1. ABSTRACT

Ninhydrin positive substance (NPS), are intracellular osmotic effectors, mainly amino acids, which in bivalve molluscs have been reported to participate, in the process of isosmotic regulation of cell volume (RIVC) allowing individuals to cope with environmental fluctuations of salinity. But there is scarce information about the possible role of NPS in the regulation of cell volume during desiccation stress. Therefore, this paper has analyzed the physiological behavior of *Mytilus galloprovincialis* coping with this stress, by determining the level of intracellular amino

acids in mussels inhabiting three different heights in the intertidal zone. We have determined the concentration of NPS in the adductor muscle of mussels and, in laboratory experiments, we also analyzed the time- course of a) hydration percentage of soft tissues, b) rate of water-loss and c) rate of mortality during experimental periods of emersion. In turn, we have analyzed the time-course of NPS concentration in the abductor muscle of mussels submitted to two different regimes of emersion-immersion to check whether regulation of intracellular NPS can act as a short-term mechanism of compensation or a period of acclimation is needed. Significant differences in the content of NPS among mussels from the three tidal levels were found, with higher concentrations in individuals collected from high intertidal level. Experimental variation of emersion regime did not promote significant changes in NPS concentration in the muscle of mussels, thus, it seems that regulation of NPS does not contribute to short-term regulation of cellular volume in response to desiccation.

Keywords: desiccation, intertidal, isosmotic regulation of cell volume (IRCV), *Mytilus galloprovincialis*, NPS

2. INTRODUCCIÓN

La zona intermareal es el hábitat de una gran variedad de organismos marinos, entre ellos, numerosas especies de invertebrados (Newell, 1979). Los invertebrados intermareales habitan una zona caracterizada por marcadas fluctuaciones en las condiciones bióticas y abióticas, impuestas por el ciclo de las mareas; estos organismos se ven expuestos a temperaturas extremas durante la emersión, riesgo de desecación, fluctuaciones marcadas de salinidad y también situaciones carenciales de oxígeno (Newell, 1979). La intensidad del estrés fisiológico para los organismos marinos se incrementa desde el intermareal bajo hacia el intermareal alto (Sokolova y Pörtner, 2001), lo cual afectaría su distribución vertical, ocupando los organismos menos resistentes los niveles más bajos del intermareal (Simpfendörfer et al., 1995; Sepúlveda et al., 2003). Por lo tanto, los animales intermareales deben poseer adaptaciones morfológicas, fisiológicas y metabólicas que les permitan adaptarse a las condiciones extremas que presenta la zona intermareal y poder sobrevivir así por períodos prolongados en estas condiciones (Sokolova y Pörtner, 2001; Tomanek y Helmuth, 2002; Almeida y Bainy, 2006).

Para soportar los periodos de emersión, los bivalvos intermareales deben poseer mecanismos de compensación fisiológica (adaptaciones resistivas) que les permitan sobrevivir en estas condiciones. Estos mecanismos incluyen aspectos conductuales tales como la regulación del grado de apertura de las valvas y fisiológicos como la transición de respiración acuática a aérea, la activación de vías metabólicas anaeróbicas (Boyden, 1972; Widdows et al., 1979; Byrne et al., 1990) o la movilización del CaCO_3 de las valvas para mantener el balance ácido-base, evitando la acidosis provocada por el metabolismo anaeróbico (Byrne y McMahon, 1991).

El mejillón, *Mytilus galloprovincialis*, es uno de los organismos que habitualmente se encuentra en la zona intermareal. Es un molusco bivalvo caracterizado por ser osmoconformista, es decir, es un organismo que carece de mecanismos homeostáticos capaces de mantener la concentración osmótica del medio interno, por lo tanto, esta concentración depende de las oscilaciones ambientales (Lange, 1970; Pierce, 1970, 1971a; Gilles, 1972; Anderson y Anderson, 1975; Shumway, 1977a, b). Las diferencias entre las concentraciones osmóticas dentro y fuera de la célula dan lugar a la corriente de agua a través de la membrana celular provocando un cambio neto en el volumen celular (Kelly y Macklen, 1991; Sackin, 1994). La primera respuesta a un entorno anisomótico es un flujo de agua que puede entrar o salir de la célula, hasta que la diferencia de las presiones osmóticas se igualen y se consiga un nuevo equilibrio (Wehner et al., 2003).

Muchas células poseen mecanismos para mantener estable el volumen celular, ya que es esencial para una variedad de funciones, tales como: la regulación metabólica, el mantenimiento de pH celular y el transporte transmembrana (Wehner et al., 2003). Las células de los osmoconformistas eurihalinos, como los mejillones, se caracterizan por una enorme capacidad de regulación isoosmótica del volumen celular (RIVC) y esto se consigue principalmente modificando las cantidades de solutos orgánicos en las células para limitar los intercambios de agua y ciertos electrolitos. En respuesta a la dilución del medio, las células captarían agua por ósmosis y se hincharían, pero para restaurar el volumen original se reduce la concentración osmótica interna reduciendo la concentración de aminoácidos libres (Strange y Crowe, 1979; Livingstone et al., 1979; Henry y Mangum, 1980; Weber et al., 1992). Por el contrario, si los organismos se encuentran en un medio más concentrado, la regulación del volumen celular exige que

sus células incrementen la concentración intracelular de sustancias osmóticamente efectivas (Gainey, 1978; Pierce et al., 1992).

Los solutos orgánicos utilizados por los invertebrados marinos en la RIVC son principalmente compuestos intracelulares de bajo peso molecular y electroneutros como aminoácidos libres y otras moléculas nitrogenadas no proteicas que se engloban dentro de la denominación de NPS: sustancias ninhidrina positivas (Campbell y Bishop, 1970; Lange, 1972; Schoffeniels y Gilles, 1972; Bayne et al., 1976b; Bishop, 1976).

Como ya se ha dicho anteriormente, los mejillones pueden experimentar a corto plazo, sucesivos desafíos osmóticos durante las fluctuaciones diarias de las mareas. Principalmente hay dos factores ambientales que pueden generar un estrés osmótico para los mejillones: una alteración de la salinidad del agua y la exposición aérea durante los periodos de emersión. Se ha descrito que algunos bivalvos intermareales deben soportar más de 12 h de emersión antes de la siguiente pleamar (Byrne y McMahon, 1991). De este modo, tanto las modificaciones en la salinidad como los periodos de desecación dan lugar a la modificación del volumen celular, provocando que los mejillones activen el RIVC. Hay numerosos estudios que demuestran que los invertebrados marinos utilizan los aminoácidos libres como solutos compatibles para la regulación del volumen celular durante el estrés por salinidad (Florkin y Schoffenieb, 1969; Lange, 1972; Gilles, 1975; Schoffeniels, 1976), pero aún no se ha demostrado que utilicen esta regulación activa en la concentración de NPS para tolerar la desecación en situaciones de emersión.

Por ello el presente estudio tiene dos objetivos:

- Comprobar si *Mytilus galloprovincialis*, procedente de diferentes alturas mareales, utiliza esta regulación activa en el contenido de NPS en la RIVC cuando está sometido al estrés por desecación, producido por la exposición aérea durante las mareas bajas. Observando si este mecanismo se obtiene por adaptación al medio en el que habitan o es una respuesta a corto plazo.

- Comprobar la tolerancia a la desecación que presentan estos organismos debido a su posición en el intermareal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de recolección

Los individuos de *Mytilus galloprovincialis*, utilizados en la realización de los diferentes experimentos contemplados en el presente estudio fueron recolectados manualmente, mediante espátula, en periodos de marea baja en Enero y Marzo de 2015 en el Puerto Viejo de Algorta, situado en la localidad de Getxo (Bizkaia, País Vasco).

Los mejillones, de una longitud homogénea, fueron recogidos en una pared de la zona mediolitoral o intermareal (Figura 1) de tres alturas diferentes que presentan diferencias significativas en el ciclo de emersión-inmersión: Zona alta (mediolitoral superior): zona próxima a la altura normalmente alcanzada por la pleamar; Zona intermedia (mediolitoral intermedio): comprendida entre la zona mediolitoral superior e inferior y Zona baja (mediolitoral inferior): zona próxima al nivel normalmente alcanzado por la bajamar.



Figura 1. Pared de la zona mediolitoral donde fueron recogidos los individuos de *M.galloprovincialis*.

3.2. Diseño experimental

El estudio realizado consta de dos experimentos. En el primero de ellos los mejillones obtenidos de las 3 zonas intermareales se llevaron al laboratorio para determinar la posible existencia de diferencias en: a) porcentaje de hidratación de los tejidos, b) concentración de efectores osmóticos orgánicos (NPS) en músculo, así como c) la tolerancia a la desecación durante emersión aérea prolongada, determinada como tasa de desecación y tasa de mortalidad. Para llevar a cabo esta caracterización se

recogieron 30 mejillones de cada una de las tres zonas (alta, intermedia y baja). Una vez en el laboratorio, se lavaron eliminando cualquier organismo que tuviesen en sus conchas para evitar errores en su peso y se dividieron en dos grupos:

- Un grupo de 10 ejemplares de cada zona fue utilizado para determinar su tolerancia a la desecación y para ello se observó la modificación del peso vivo de cada mejillón en continua emersión durante 20 días y a la vez se calculó la tasa de desecación.

- Un segundo grupo formado por los 20 mejillones restantes, fue utilizado para hallar la concentración de aminoácidos libres (NPS) en uno de sus órganos: músculo aductor. Con estos ejemplares también se determinó el porcentaje de hidratación de los tejidos.

En el segundo experimento, mejillones colectados en la zona mareal intermedia se trasladaron al laboratorio y allí se analizó el curso-temporal de la variación de la concentración de NPS en mejillones sometidos a 2 distintos regímenes de emersión-inmersión.

Para llevar a cabo este experimento se recogieron aproximadamente 70 mejillones de un solo punto, más concretamente de la zona intermedia. Una vez recogidos fueron llevados al laboratorio y a 10 de ellos se les determinó el nivel de aminoácidos en músculo aductor, para conocer su concentración antes de su aclimatación, considerando esta medición como tiempo 0 (T0). Posteriormente se separaron en dos grupos con regímenes de emersión-inmersión diferentes: un grupo de 30 ejemplares fue sometido a inmersión continua, mientras que otro grupo de 30 mejillones, fue sometido a un régimen que incluía 8 horas de emersión diaria.

En ambos grupos los mejillones se mantuvieron en el laboratorio en dos tanques acuario con capacidad aproximada de 15-20 litros de agua de mar con aireación continua y termostatizados, manteniéndolos a una temperatura de alrededor de 18 °C durante la inmersión. El agua de los tanques se renovaba completamente una vez a la semana. Los mejillones fueron convenientemente alimentados con fitoplancton, *Isochrysis galbana*, con la ayuda de una bomba peristáltica.

Este experimento tuvo una duración de 30 días con el fin de analizar el curso temporal de la concentración de NPS en músculo aductor. Se realizó esta medición en 3 tiempos designados como T1, T2 y T3. Entre estos había un intervalo de tiempo de 7 días. En cada tiempo se utilizaron un total de 10 ejemplares de cada una de las dos condiciones experimentales.

3.3. Determinación del porcentaje de hidratación de los tejidos

Una vez diseccionados los mejillones, el resto de los tejidos se procesaron para la determinación de su contenido hídrico. En primer lugar se pesaron los tejidos, de cada uno de los individuos recogidos para la caracterización de la tolerancia a la desecación y concentración de NPS en mejillones de tres niveles mareales, para obtener el peso fresco (PF). Seguidamente tras exponerlos a la estufa a 100 °C durante 24 horas se volvieron a pesar los tejidos obteniendo el peso seco (PS). Mediante la resta de estos dos datos se calculó el peso del agua (P_{agua}). Y por último, mediante el PF y el P_{agua} se determinó el porcentaje de hidratación, a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de hidratación} = \frac{P_{\text{agua}}}{PF} \times 100$$

3.4. Determinación de la concentración de sustancias ninhidrina positivas (NPS)

Para llevar a cabo la determinación de NPS, en primer lugar se diseccionó una porción de músculo aductor (Figura 2). La extracción de NPS se realizó sumergiendo el músculo en etanol al 80% en tubos de ensayo Pyrex. Los tubos se almacenaron durante 48 horas en el frigorífico a 4 °C para la extracción de los aminoácidos y su posterior cuantificación mediante analítica colorimétrica.

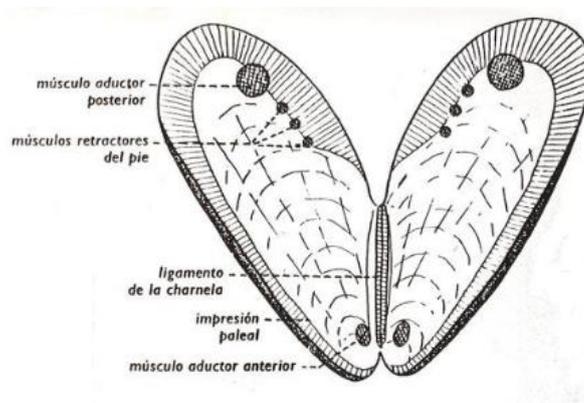


Figura 2. Morfología del mejillón.

La determinación colorimétrica de NPS tisular se llevó a cabo siguiendo el método de Shumway et al (1977).

Este método se basa en la reacción del aminoácido con las sustancias Ninhidrina e Hidracina. Para ello se extrajeron alícuotas de 100 µl de etanol de cada una de las muestras diluyéndolas con 2 ml de agua destilada. Los reactivos utilizados fueron los siguientes: solución de Ninhidrina que contenía 6,7 g de ninhidrina, 500 ml de 2-metoxietanol, 28,5 ml de ácido acético glacial y 100 ml de tampón acetato sódico 4N (pH = 5.3-5.4), llevada a un litro con agua destilada y solución de sulfato de hidracina que contenía 260 mg de sulfato de hidracina, 80 µl de sulfúrico concentrado llevada a un litro con agua destilada. Se añadieron los extractos diluidos a tubos de ensayo que contenían 4 ml de solución de Ninhidrina y 2 ml de solución de sulfato de hidracina. Estos tubos se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos para desarrollar color y posteriormente se enfriaron rápidamente con agua fría y se añadieron 2 ml de agua destilada. Por último, se midió la absorbancia a 570 nm. La curva de calibrado se construyó con patrones de Leucina disuelta en etanol al 80% en el rango de 0-37,5 µg / ml.

Finalmente se extrajeron las piezas de músculo aductor del etanol y se dejaron secar en la estufa a 100 °C durante 24 horas para establecer el peso seco y obtener la concentración de NPS expresada en µg NPS / g de tejido seco, para evitar el problema de los cambios en el volumen celular debido a la hidratación de los tejidos.

3.5. Determinación de la tasa de desecación (por pérdida de peso vivo) y tasa de mortalidad.

Para determinar la tasa de desecación, los mejillones (N= 10 de cada zona) se colocaron sobre papel de filtro, manteniéndolos en continua emersión. La variación en peso vivo de los individuos se determinó pesándolos en balanza de 10^{-4} (g) con una periodicidad conocida hasta su muerte. Se consideró como tiempo cero (T0) al peso obtenido en el mismo momento que fueron trasladados al laboratorio. Los siguientes pesos se obtuvieron transcurridas 21 h (T1), 29 h (T3), 45 h (T4), 52 h (T5), 124 h (T6), 142 h(T7), 171 h(T8), 194 h (T9), 214 h (T10), 291 h(T11), 315 h (T12), 339 h(T13), 363 h (T14) y 387 h (T15).

La tasa de desecación se expresó como el porcentaje de agua pérdida diariamente en relación al peso inicial, denominada tasa de desecación porcentual (TD%):

$$TD\% = \frac{TD \left(\frac{g}{\text{día}} \right)}{W_{\text{inicial}} (g)} \times 100$$

Siendo TD, la tasa de desecación (g / día) y W inicial, el peso inicial del mejillón. La tasa de desecación viene representada por la pendiente de las relaciones de regresión entre peso vivo y tiempo obtenida para cada uno de los individuos.

También se calculó el T50 que indica el tiempo necesario para que el 50% de los individuos mueran sobre el total de individuos testados durante el estudio. Para ello se utilizó la gráfica que representa la tasa de desecación frente al tiempo.

3.6. Tratamiento estadístico

El software empleado para realizar el análisis estadístico fue el programa estadístico IBM SPSS Statistics 23. En el primer experimento, la caracterización de la tolerancia a la desecación y concentración de NPS en mejillones de tres alturas mareales, se llevó a cabo un análisis simple de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación de 0,05, para verificar las diferencias significativas en el contenido de NPS, porcentaje de hidratación y tasa de desecación porcentual en las tres alturas mareales. Tanto en porcentaje de hidratación como en TD%, los datos estaban expresados en porcentaje por lo que se transformaron a arcoseno para poder llevar a cabo los análisis estadísticos. En el caso de existir diferencias significativas, las diferencias *a posteriori* se evaluaron utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. En todos los casos, previamente se comprobó: la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene y si las muestras seguían o no una distribución normal mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

En el segundo experimento, análisis de los niveles de NPS en mejillones sometidos experimentalmente a distintos regímenes de inmersión-emersión, se comparó el contenido de NPS de cada condición en cada tiempo mediante la prueba t de Student para muestras independientes, salvo en el primer tiempo que se realizó una prueba no paramétrica porque los datos no se distribuían de manera normal. La prueba que se llevó

a cabo fue el test para dos muestras independientes de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresan en el texto como promedio \pm error estándar ($\bar{X} \pm EE$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de la tolerancia a la desecación y concentración de NPS en mejillones de tres niveles mareales

4.1.1. Determinación del porcentaje de hidratación

El porcentaje de hidratación de los tejidos en los mejillones recogidos de las tres alturas mareales se representa en la Figura 3. El porcentaje de hidratación fue ligeramente superior en los mejillones de la parte baja ($78,83\% \pm 0,37$) seguidos de los individuos de la zona media ($77,84\% \pm 0,62$). Por último, los menos hidratados fueron los de la zona alta con un porcentaje de hidratación de $76,66\% \pm 0,37$.

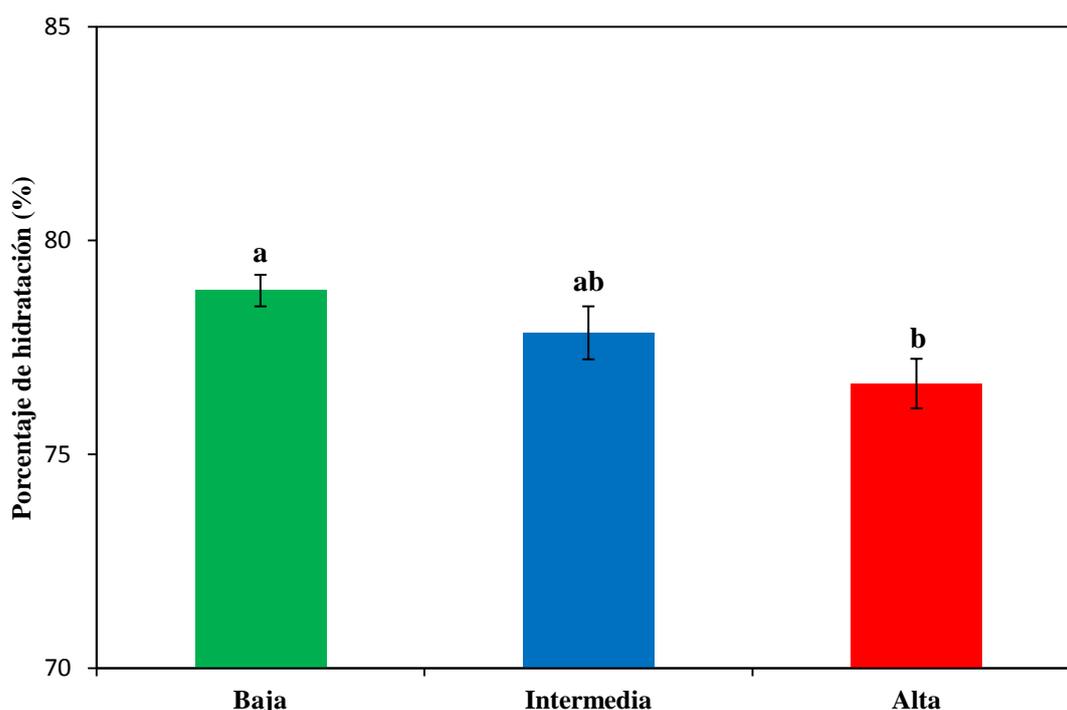


Figura 3. Porcentaje de hidratación de los tejidos en el mejillón *M. galloprovincialis* de diferentes alturas mareales. La figura muestra los valores medios y las barras verticales representan \pm error estándar (EE). Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; post-hoc Tukey) y las medias no significativamente distintas, vienen indicadas con la misma letra ($P > 0,05$; post-hoc Tukey). N= 10

La ANOVA (Tabla 1) indicó que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) en el porcentaje de hidratación de las tres alturas. Por lo que se realizó una prueba post-hoc de Tukey para comprobar las diferencias inter-específicas existentes, y este reveló que

hay diferencias significativas entre los individuos de la zona alta y baja pero estos no presentan diferencias con los de la zona intermedia.

Tabla 1. Resumen de los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) realizado para analizar la existencia de posibles diferencias significativas en el porcentaje de hidratación de los tejidos de mejillones de distintas alturas mareales (baja, intermedia y alta).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Entre grupos	,006	2	,003	4,137	,027
Dentro de grupos	,019	27	,001		
Total	,025	29			

4.1.2. Concentración de NPS en músculo aductor.

El contenido de NPS en el músculo aductor ($\mu\text{g NPS} / \text{g músculo}$) de los mejillones de las tres alturas mareales analizadas (baja, intermedia y alta) pueden observarse en la Figura 4. Los individuos de la zona alta son los que mayor concentración presentan, alcanzando una media de $41,94 \pm 2,61$, seguido se encuentran los de la zona intermedia presentando una media de $33,43 \pm 1,40$. Por último, el grupo de mejillones que menor concentración de NPS poseen son los correspondientes a la zona baja con una media de $31,09 \pm 2,61$.

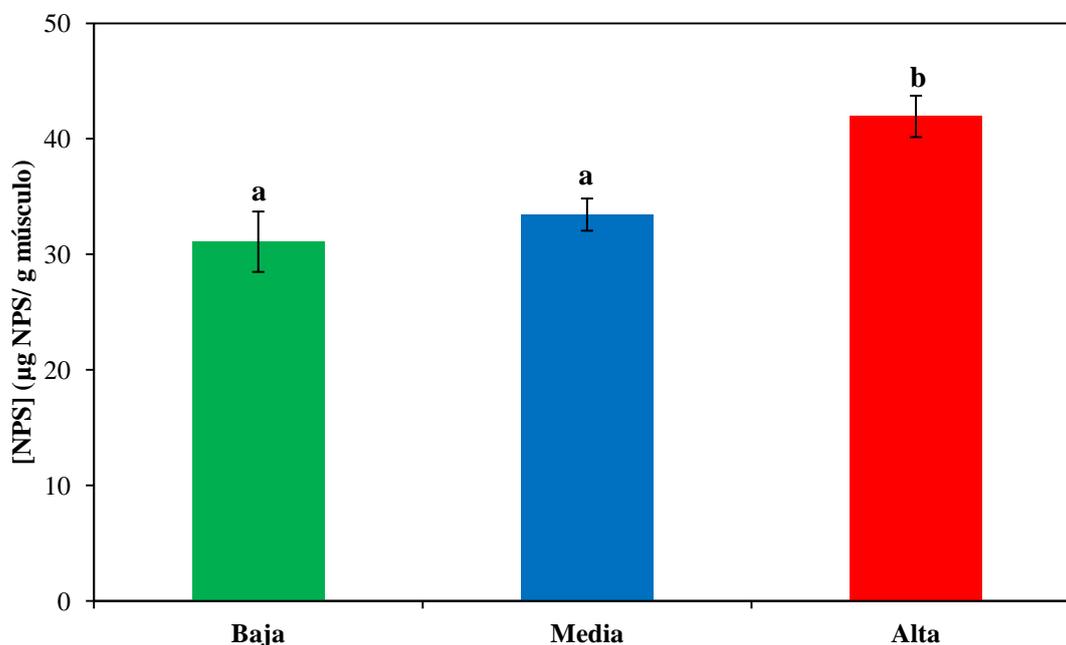


Figura 4. Contenido de NPS en músculo aductor en el mejillón *M.galloprovincialis* de diferentes alturas mareales (baja, intermedia y alta) expresado en $\mu\text{g NPS} / \text{g}$ de músculo. La figura muestra los valores medios y las barras verticales representan \pm error estándar (EE). Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; post-hoc Tukey) y las medias no significativamente distintas, vienen indicadas con la misma letra ($P > 0,05$; post-hoc Tukey). N= 10.

La posible existencia de diferencias significativas se comprobó realizando un análisis de la varianza. Un resumen de la ANOVA se muestra en la Tabla 2. Se considera que sí existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en el contenido de NPS en los individuos de las tres zonas. En cuanto a las diferencias entre los tres grupos de mejillones de la prueba post-hoc de Tukey forma dos subconjuntos. En el primero están incluidas las zonas baja e intermedia cuyas medias no difieren significativamente ($P = 0,688$) y en el segundo solo está la zona alta que difiere de las anteriores.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) realizado para analizar las diferencias significativas en el contenido de NPS ($\mu\text{g NPS/g}$ músculo) en músculo abductor de mejillones de las tres alturas mareales (baja, intermedia y alta).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Entre grupos	651,673	2	325,836	8,156	,002
Dentro de grupos	1078,599	27	39,948		
Total	1730,271	29			

4.1.3. Determinación de la tasa de desecación (por pérdida de peso vivo) y mortalidad de los individuos.

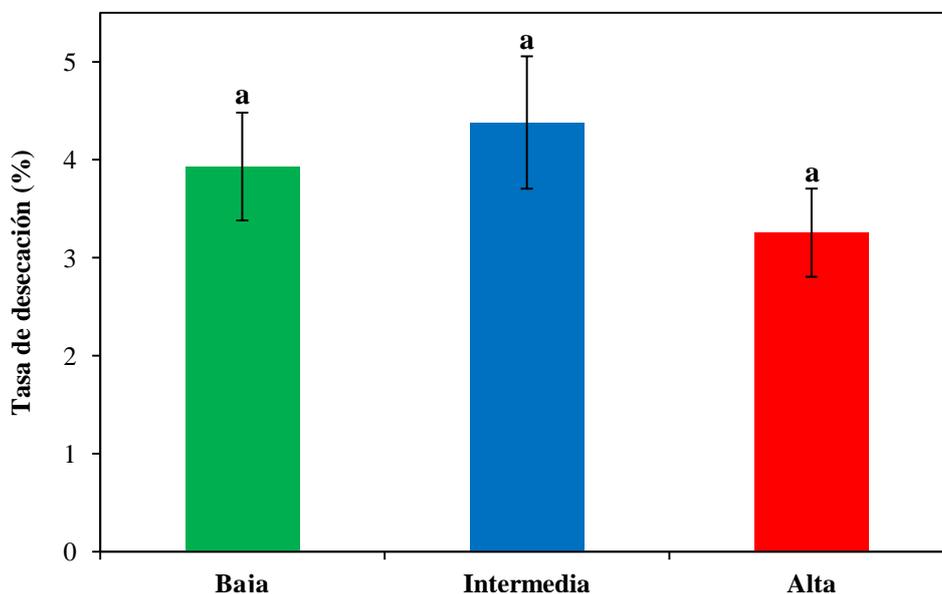


Figura 5. Tasa de desecación porcentual (TD%) experimentada por los mejillones de las tres alturas mareales estudiadas (baja, intermedia y alta). La figura muestra los valores medios y las barras verticales representan el EE. Las letras sobre las barras indican que las medias no son significativamente distintas, ($P > 0,05$; post-hoc Tukey). N=10.

La tasa de desecación (TD%) registrada en los mejillones recolectados de las tres alturas mareales diferentes durante el experimento de emersión continua se muestra en la Figura 5. Se observó que los mejillones recolectados del intermareal alto son los que menor porcentaje de peso diario perdieron con respecto a las otras dos, si bien el análisis de la varianza, que se puede observar en la Tabla 3, reveló que no había diferencias significativas en las TD% en los individuos de las tres alturas mareales dado que el *P-valor* fue superior a 0,05.

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA) realizado para analizar las diferencias significativas en la TD% de mejillones de las tres alturas mareales (baja, intermedia y alta).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Entre grupos	,001	2	,000	1,077	,356
Dentro de grupos	,007	24	,000		
Total	,007	26			

En cuanto a la mortalidad de los mejillones (Figura 6) se observó que los individuos procedentes de la zona alta eran más resistentes en condiciones de continua emersión que los del resto de las zonas.

En la zona alta los mejillones tuvieron un T50 (tiempo en el que se mueren la mitad de los individuos) mayor que en el resto de las alturas mareales, con un valor de 216 horas, en la zona baja de 200 horas aproximadamente y por último, los de la zona intermedia que son los que tuvieron un T50 menor (144 horas).

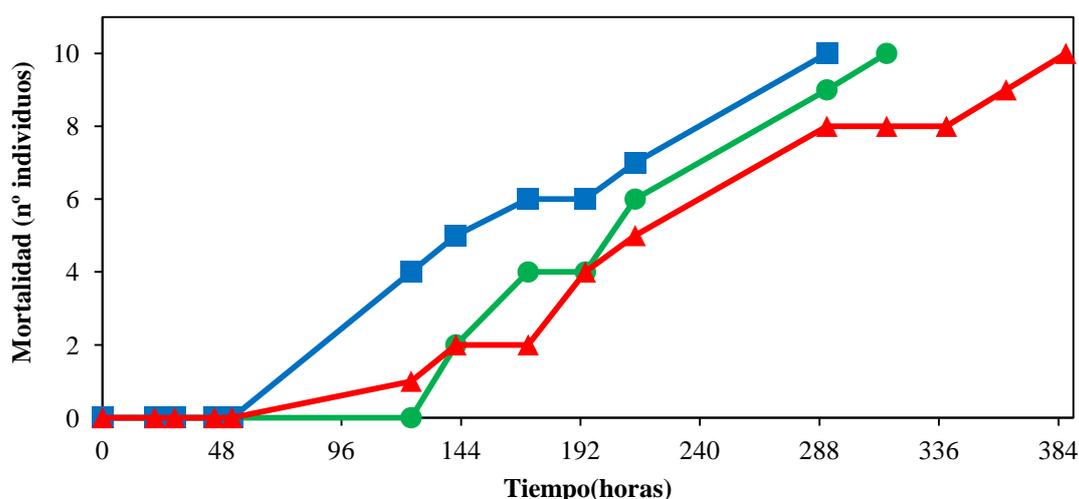


Figura 6. Mortalidad de los individuos *M.galloprovincialis* expuestos al aire en función del tiempo, de cada altura mareal, representadas en: verde la zona baja; azul la intermedia y en rojo la alta. N= 10.

4.2. Análisis de los niveles de NPS en mejillones sometidos experimentalmente a distintos regímenes de emersión

En la Figura 7, se muestran los niveles de NPS en músculo aductor en los mejillones sometidos experimentalmente a distintos niveles de emersión. Se observa que en el tiempo 0, es decir, antes de separar a los mejillones en las dos condiciones, el contenido de NPS en músculo aductor, fue $33,22 \mu\text{g NPS} / \text{g músculo} \pm 7,74$. Tras separarlos, en el día 7 el contenido de NPS disminuyó en ambos grupos. Posteriormente, existió una evolución temporal muy clara de incremento en la concentración de NPS con independencia del grado de inmersión-emersión. Aun así, la concentración de los individuos sometidos a 8 horas de emersión (mareales) fue siempre superior a la de los individuos que estaban en continua inmersión (sumergidos).

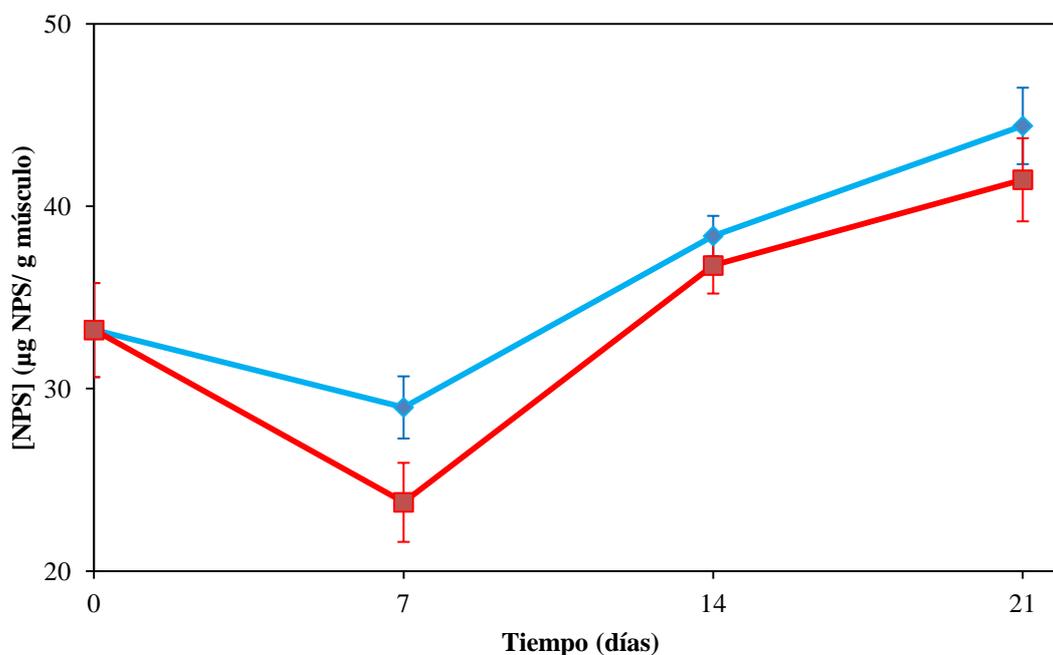


Figura 7. Variación temporal del contenido de NPS en músculo aductor ($\mu\text{g NPS} / \text{g músculo}$) de mejillones, *M. galloprovincialis*, sometidos experimentalmente a dos regímenes distintos de emersión: en azul representados los individuos emergidos diariamente durante 8 horas y en rojo los sometidos a inmersión continua. Los valores del tiempo cero son previos a la distribución de los mejillones en las dos condiciones experimentales. La figura muestra los valores medios y las barras verticales corresponden a \pm EE.

La posible existencia de diferencias entre los mejillones sometidos a distinto grado de emersión se analizó mediante comparación de las medias correspondientes a cada día experimental mediante test t-Student (excepto con el día 7 que se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov ya que no se halló distribución normal de la varianza

de los datos). El contenido de NPS que presentaban tanto los mareales como los sumergidos, no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos ($P > 0,05$) (Tablas 4 y 5). Aunque cabe destacar que para el día 7 las diferencias alcanzaron niveles muy próximos a los requeridos para ser considerados como significativos ($P= 0,055$).

Tabla 4. Resumen de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar las diferencias significativas en el contenido de NPS entre los individuos sometidos a inmersión continua y los emergidos diariamente durante 8 horas en el día 7.

		NPS a los 7 días
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,600
	Positivo	,000
	Negativo	-,600
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,342
P. asintótica(bilateral)		,055

Tabla 5. Resumen de la prueba t-Student para verificar las diferencias significativas en el contenido de NPS entre los individuos sometidos a inmersión continua y los emergidos diariamente durante 8 horas en los días 14 y 21.

Prueba t para la igualdad de medias del día 14						
t	gl	P(bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de EE	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
,857	18	,403	1,61944	1,89055	-2,35247	5,59134

Prueba t para la igualdad de medias del día 21						
t	gl	P(bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de EE	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
,954	18	,353	2,95303	3,095611	-3,55062	9,45992

5. DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la tolerancia a la desecación y concentración de NPS en mejillones de tres niveles mareales

Los mejillones de las distintas alturas mareales analizadas presentaron diferencias significativas en porcentaje de hidratación, tiempo de resistencia (supervivencia) a la exposición aérea y concentración de NPS.

En cuanto al porcentaje de hidratación, los individuos recogidos del intermareal alto fueron los que menor porcentaje presentaron (Figura 3). A pesar de que se observaron diferencias significativas entre los organismos de las tres alturas mareales estas no fueron muy elevadas, ya que los de la parte alta tuvieron un porcentaje similar

al de las otras dos alturas (Tabla 1). Los individuos que habitaban en el submareal alto presentaron un porcentaje de hidratación de $76,66\% \pm 0,37$, tan solo un 3% menos que los de la zona baja. Los mejillones de esta zona también presentaron una tasa de supervivencia mayor con respecto a los demás (Figura 6), fueron los que más días soportaron en condiciones de emersión continua, con un T50 de 216 horas frente a las 144 horas de la zona intermedia. De este dato se deduce que los mejillones del intermareal alto están mejor provistos para la supervivencia al estrés de desecación.

En lo referente a los NPS, en diversas especies de moluscos bivalvos se ha observado que la regulación del balance hídrico o volumen celular durante un estrés osmótico está directamente relacionado con la concentración de osmolitos orgánicos, principalmente aminoácidos libres (Deaton et al., 1985; Matsushima et al., 1987; Matsushima y Hayashi, 1988; Hawkins y Hilbish, 1992). En estos organismos, los aminoácidos libres (FAA) se han relacionado principalmente con los procesos de osmorregulación que los individuos llevan a cabo para contrarrestar las fluctuaciones de la salinidad en el medio ambiente (Shumway y Youngson, 1979). En el presente estudio se ha observado que también pueden ser utilizados para enfrentarse al estrés por desecación provocado por la exposición aérea asociada a la ubicación en la zona intermareal.

En condiciones de emersión se produce un incremento de la presión osmótica en el medio extracelular (estrés hiperosmótico). Para evitar la pérdida de agua e igualar las presiones osmóticas del medio externo e interno de la célula, se produce un aumento de la concentración de aminoácidos libres en el citosol, manteniéndose con esto el volumen celular y un balance hídrico-iónico adecuado. En la Figura 4 puede observarse que efectivamente los individuos procedentes de la zona intermareal superior, que experimentan un mayor grado de estrés por desecación dado que soportan tiempos de emersión aérea más largos, presentan un mayor contenido de NPS, $41,94 \mu\text{g NPS} / \text{g m\u00fasculo} \pm 1,79$ frente a los $31,09 \mu\text{g NPS} / \text{g m\u00fasculo} \pm 2,61$ en la zona baja. Esta diferencia en el contenido de NPS entre los individuos de las dos alturas mareales parece indicar la existencia del RIVC, ya que a mayor altura mareal incrementa el tiempo de exposición al estrés de desecación y por lo tanto deben sintetizarse una mayor cantidad de NPS. En definitiva, los resultados parecen indicar que la regulación activa de los NPS (o solutos orgánicos intracelulares) constituye un mecanismo utilizado por

el mejillón para tolerar periodos de emersión largos característicos de los individuos que habitan la parte más elevada del intermareal.

Otro problema al que se enfrentan los organismos cuando se encuentran expuestos al aire durante las mareas bajas es la escasez de oxígeno. Algunos autores sugieren que el metabolismo aeróbico domina durante la exposición al aire en organismos que habitan en la zona intermareal alta (Houlihan, 1979; Yipp et al., 1986; Simpfendörfer et al., 1995), mientras que otros sostienen que los invertebrados de esta zona dependen más del metabolismo anaeróbico (Kronberg, 1990; McMahon, 1990). Hasta ahora, ha habido muy pocos estudios que cuantifiquen la contribución relativa del metabolismo aeróbico y anaeróbico en el suministro de energía durante la exposición al aire en los invertebrados intermareales. Por ello, que los organismos de la zona intermareal alta tengan un mayor número de NPS puede ser debido a que son capaces de respirar aire durante la marea baja, consumiendo oxígeno atmosférico a través de sus branquias (Sandison, 1966; Houlihan, 1979; Innes y Houlihan, 1985; Marsden y Weatherhead 1998). Esta capacidad, implica un compromiso entre el acceso del aire a la superficie de las vías respiratorias y la pérdida de agua por evaporación que ocurre durante la exposición al aire. Para llevar a cabo la respiración aeróbica, los mejillones deben abrir sus valvas provocando un mayor riesgo de desecación. Por ello, con el fin de intercambiar gases respiratorios y minimizar la pérdida de agua por evaporación, estos organismos deben activar mecanismos de regulación isosmótica del volumen celular que implican básicamente el incremento del contenido de NPS en el citoplasma celular.

Por último, en lo referente a la tasa de desecación, aunque no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los mejillones de las tres alturas, los individuos procedentes del intermareal alto fueron los que menor porcentaje de peso perdieron, a pesar de que éstos deben soportar más horas de exposición aérea (Figura 5 y Tabla 3). La mayor tolerancia a la desecación puede razonablemente entenderse como el efecto derivado de una concentración diferente de NPS que les permite retener el agua en sus tejidos y no perderla al verse sometidos al estrés de desecación.

En conclusión, en este primer experimento se ha demostrado que los individuos que habitan en el intermareal alto tienen una mayor cantidad de NPS, presentan una menor tasa de desecación, un porcentaje de hidratación muy similar al del resto de las

alturas mareales y una mayor capacidad de supervivencia en condiciones de emersión. De lo que puede deducirse que los NPS si parecen ser utilizados como efectores osmóticos durante la RIVC, para tolerar la desecación que sufren los mejillones al estar expuestos al aire durante las mareas bajas.

5.2. Análisis de los niveles de NPS en mejillones sometidos experimentalmente a distintos regímenes de emersión

En este segundo experimento se trató de determinar el curso temporal de la posible regulación del contenido de NPS en mejillones experimentalmente sometidos a distinto grado de emersión aérea. A lo largo de los 21 días que duró el experimento, los organismos que soportaban un mayor estrés por desecación, al estar emergidos 8 horas diarias, presentaban un mayor contenido de NPS, sin mostrar diferencias significativas con el grupo que se encontraba en continua emersión, salvo en el día 7 cuyo *valor de p* fue de 0,055 muy próximo al nivel de significación requerido para la constatación de diferencias significativas (Tablas 4 y 5). Esto podría indicar que la regulación activa de los NPS como mecanismo para tolerar periodos de emersión, se da cuando el estrés osmótico sea prolongado (Figura 7).

Pierce (1971) estableció que el cierre de las valvas era el primer método de regulación del volumen celular para *Modiolus demissus* y *Modiolus squamosus* sometidos a baja salinidad. Después de un tiempo del cierre de las valvas, el animal es forzado a interactuar con el medio externo y por tanto los mejillones se vieron obligados a regular el volumen celular mediante el movimiento de agua y solutos. Por ello, es probable que en el presente estudio los mejillones utilizaran el cierre de valvas como primera opción para evitar la desecación.

En la Figura 7, también se observó, con independencia del grado de inmersión-emersión experimental al que estuvieron sometidos los mejillones, un incremento en la concentración de NPS con el tiempo, exceptuando el día 7 donde presentaron valores inferiores a los del día de muestreo sin explicación alguna. Esto pudo deberse a que los mejillones fueron recogidos en un temporal de lluvia siendo muy posible que existiera cierto grado de dilución en el agua de mar, por lo que estos organismos tuvieron que enfrentarse a un medio hipotónico disminuyendo su concentración de NPS. La dinámica creciente en el laboratorio podría tener que ver con ese cambio en la salinidad, ya que el

medio al que se traspasaron los mejillones en el laboratorio era agua marina con la salinidad normal (no diluida).

En definitiva, los resultados aportados en este trabajo muestran que los mejillones adaptados a las condiciones del intermareal alto acumulan NPS en las células, lo que sugiere que la regulación isosmótica del volumen celular podría jugar un papel importante en la capacidad de supervivencia de los individuos que habitan esa zona en la que el riesgo de desecación es especialmente alto. Sin embargo, los experimentos de laboratorio muestran que dicho mecanismo no parece ser operativo en cambios a corto plazo en el grado de emersión aérea. Los escasos estudios sobre la utilización de NPS en la regulación isosmótica del volumen celular durante los períodos de emersión aérea, ponen de manifiesto una ventana necesaria de investigar.

6. BIBLIOGRAFÍA

Almeida, E. A. D., Bainy, A. C. D., 2006. Effects of aerial exposure on antioxidant defenses in the brown mussel *Perna perna*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 225-229.

Anderson, R. D., Anderson, J. W., 1975. Effects of salinity and selected petroleum hydrocarbons on the osmotic and chloride regulation of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Physiological Zoology*, 48, 420-430.

Bayne, B. L., Thompson, R. J., Widdows, J., 1976b. *Physiology: I. Marine mussels: their ecology and physiology*. International Biological Programme, 10, 207-260. Ed. By B.L.Bayne. Cambridge: University Press.

Bishop, S. H., 1976. Nitrogen metabolism and excretion: regulation of intracellular amino acid concentrations. *Estuarine processes*, 1, 414-431. Ed. by M. Wiley, New York: Academic Press Inc.

Boyden, C. R., 1972. Aerial respiration of the cockle *Cerastoderma edule* in relation to temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 43, 697-712.

Byrne, R. A., Gnaiger, E., McMahon, R. F., Dietz, T. H., 1990. Behavioral and metabolic responses to emersion and subsequent reimmersion in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*. *The Biological Bulletin*, 178, 251-259.

Byrne, R. A., McMahon, B. R., 1991. Acid-base and ionic regulation, during and following emersion, in the freshwater bivalve, *Anodonta grandis simpsoniana* (Bivalvia: Unionidae). *The Biological Bulletin*, 181, 289-297.

Campbell, J. W., Bishop, S. H., 1970. Nitrogen metabolism in molluscs. *Comparative biochemistry of nitrogen metabolism*, 1, 103-206. Ed. by J.W. Campbell. New York and London: Academic Press.

Deaton, L. E., Hilbish, T. J., Koehn, R. K., 1985. Hyperosmotic volume regulation in the tissues of the mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 80, 571-574.

Florkin, M., Schoffeniels, E., 1969. *Molecular approach to ecology*. Academic Press, New York, 89-163.

Gainey Jr, L. F., 1978. The response of the Corbiculidae (Mollusca: Bivalvia) to osmotic stress: the cellular response. *Physiological Zoology*, 51, 79-91.

Gilles, R., 1975. Mechanisms of ion and osmoregulation. *Marine ecology*, 2, 257-347. Ed. by O. Kinne, John Wiley and Sons, New York.

Gilles, R., 1972. Osmoregulation in three molluscs: *Acanthochitona discrepans* (Brown), *Glycymeris glycymeris* (L.) and *Mytilus edulis* (L.). *The Biological Bulletin*, 142, 25-35.

Hawkins, A. J. S., Hilbish, T. J., 1992. The costs of cell volume regulation: protein metabolism during hyperosmotic adjustment. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72, 569-578.

Henry, R. P., Mangum, C. P., 1980. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata* III. Reduction of the free amino acid pool during low salinity adaptation. *Journal of Experimental Zoology*, 211, 25-32.

Houlihan, D. F., 1979. Respiration in air and water of three mangrove snails. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 41, 143-161.

Innes, A. J., Houlihan, D. F., 1985. Aquatic and aerial oxygen consumption of cool temperate gastropods: a comparison with some Mediterranean species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 82, 105-109.

Kelly, S. M., Macklem, P. T., 1991. Direct measurement of intracellular pressure. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 260, C652-C657.

Kronberg, I., 1990. Heat production in *Littorina saxatilis Olivi* and *Littorina neritoides* L. (gastropoda: Prosobranchia) during an experimental exposure to air. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 44, 125-134.

Lange, R., 1970. Isosmotic intracellular regulation and euryhalinity in marine bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 5, 170-179.

Lange, R., 1972. Some recent work on osmotic, ionic and volume regulation in marine animals. *Oceanography and Marine Biology, Annual Review*, 10, 97-136.

Livingstone, D. R., Widdows, J., Fieth, P., 1979. Aspects of nitrogen metabolism of the common mussel *Mytilus edulis*: adaptation to abrupt and fluctuating changes in salinity. *Marine Biology*, 53, 41-55.

Marsden, I. D., Weatherhead, M. A., 1998. Effects of aerial exposure on oxygen consumption by the New Zealand mussel *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791) from an intertidal habitat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 230, 15-29.

Matsushima, O., Hayashi, Y. S., 1988. Uptake and accumulation of amino acids in the brackish-water bivalve *Corbicula japonica* prime during high salinity acclimation. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 123, 201-210.

Matsushima, O., Katayama, H., Yamada, K., 1987. The capacity for intracellular osmoregulation mediated by free amino acids in three bivalve molluscs. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 109, 93-99.

McMahon, R. F., 1990. Thermal tolerance, evaporative water loss, air-water oxygen consumption and zonation of intertidal prosobranchs: a new synthesis. *Progress in Littorinid and Muricid Biology*, 241-260. Springer Netherlands.

Newell, R. C., 1979. *Biology of intertidal animals. Marine Ecological Surveys*, Faversham. Kent, 757.

Pierce, S. K., 1971. A source of solute for volume regulation in marine mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 38, 619-635.

Pierce, S. K., Rowland-Faux, L. M., O'Brien, S. M., 1992. Different salinity tolerance mechanisms in Atlantic and Chesapeake Bay conspecific oysters: glycine betaine and amino acid pool variations. *Marine Biology*, 113, 107-115.

Pierce, S. K., 1970. The water balance of *Modiolus* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae): osmotic concentrations in changing salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 36, 521-533.

Sackin, H., 1994. Stretch-activated ion channels. Strange, K. (Ed.), *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. CRC, Boca Raton, FL, 215–240.

Sandison, E. E., 1966. The oxygen consumption of some intertidal gastropods in relation to zonation. *Journal of Zoology*, 149, 163-173.

Schoffeniels, E., 1976. Adaptation with respect to salinity. *Biochem. Soc. Symp.*, 41, 179-204.

Schoffeniels, E., Gilles, R., 1972. Ionoregulation and osmoregulation in Mollusca. *Chemical zoology*, 7, 393-420. Ed. by M. Florin and B.T. Scheer. New York and London: Academic Press.

Sepúlveda, R. D., Moreno, R. A., Carrasco, F. D., 2003. Diversidad de macroinvertebrados asociados a arrecifes de *Phragmatopoma moerchi* Kinberg, 1867 (Polychaeta: Sabellariidae) en el intermareal rocoso de Cocholgue, Chile. *Gayana (Concepción)*, 67, 45-54.

Shumway, S. E., 1977a. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. *Marine Biology*, 41, 153-177.

Shumway, S. E., 1977b. The effect of fluctuating salinity on the tissue water content of eight species of bivalve molluscs. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 116, 269-285.

Shumway, S. E., Gabbott, P. A., & Youngson, A., 1977. The effect of fluctuating salinity on the concentrations of free amino acids and ninhydrin-positive substances in the adductor muscles of eight species of bivalve molluscs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29, 131-150.

Shumway, S. E., Youngson, A., 1979. The effects of fluctuating salinity on the physiology of *Modiolus demissus* (Dillwyn). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40, 167-181.

Simpfendorfer, R. W., Vial, M. V., López, D. A., Verdala, M., González, M. L., 1995. Relationship between the aerobic and anaerobic metabolic capacities and the vertical distribution of three intertidal sessile invertebrates: *Jehlius cirratus* (Darwin) (Cirripedia), *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) (Bivalvia) and *Mytilus chilensis* (Hupé)(Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 111, 615-623.

Sokolova, I. M., Pörtner, H. O., 2001. Physiological adaptations to high intertidal life involve improved water conservation abilities and metabolic rate depression in *Littorina saxatilis*. *Marine Ecology Progress Series*, 224, 171-186.

Strange, K. B., Crowe, J. H., 1979. Acclimation to successive short term salinity changes by the bivalve *Modiolus demissus*. II. Nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Zoology*, 210, 227-236.

Tomanek, L., Helmuth, B., 2002. Physiological ecology of rocky intertidal organisms: a synergy of concepts. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 771-775.

Weber, R. E., de Zwaan, A., Bang, A., 1992. Interactive effects of ambient copper and anoxic, temperature and salinity stress on survival and hemolymph and muscle tissue osmotic effectors in *Mytilus edulis*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 159, 135-156.

Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. K., 2003. Cell volume regulation: osmolyte transport and signal transduction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, 148-180.

Widdows, J., Bayne, B. L., Livingstone, D. R., Newell, R. I. E., Donkin, P., 1979. Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology*: 62, 301-308.

Yipp, M. W., Dudgeon, D., Cha, M. W., 1986. Respiratory adaptations and survival of three high-intertidal littorinids (Gastropoda) from Hong Kong rocky shores. *The marine flora and fauna of Hong Kong and Southern China*, 2, 1041-1054.