



Trabajo Fin de Grado  
Grado en Biología

# Estudio de los efectos de *Vibrio harveyi* en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* a nivel celular y tisular

Autor/a:

Itziar Arranz Veiga

Director/a:

Beñat Zaldibar Aranburu

## Índice

<b>1.Resumen</b> .....	1
<b>1.Abstract</b> .....	1
<b>2.Introducción</b> .....	2
<b>3.Objetivo</b> .....	4
<b>4.Hipótesis</b> .....	4
<b>5.Materiales y métodos</b> .....	4
5.1 Tratamiento de datos.....	7
<b>6.Resultados</b> .....	8
6.1 Hematoxilina-Eosina.....	8
6.2 Lipofuscinas.....	11
6.3 Lípidos neutros.....	13
<b>7.Discusión</b> .....	15
<b>8.Conclusiones</b> .....	16
<b>9.Bibliografía</b> .....	17

## 1. Resumen

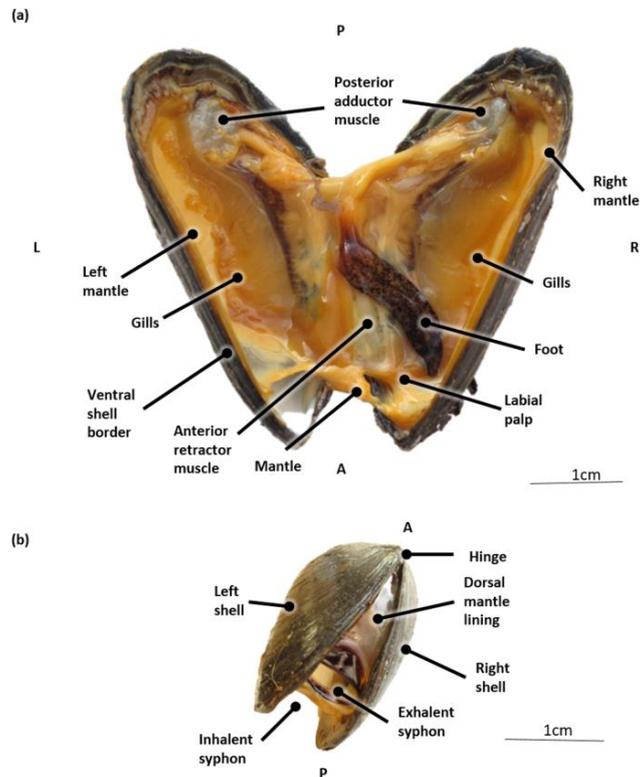
Los mejillones son organismos filtradores capaces de acumular bacterias en sus tejidos. De entre las bacterias que acumulan se encuentran las pertenecientes al género *Vibrio*, que pueden resultar patógenas y producir daños a nivel celular y tisular. En el presente trabajo se han estudiado los efectos de *Vibrio harveyi* en *Mytilus galloprovincialis* a dos temperaturas distintas y durante los 20 primeros minutos de exposición a la bacteria, en intervalos de cinco minutos. El estudio se ha centrado en la realización de análisis histológicos relacionados con el estrés producido por *Vibrio* en los mejillones. Así, tomando como biomarcadores principales los niveles de atrofia en la glándula digestiva, la presencia de infiltraciones hemocíticas, la densidad volumétrica de lipofuscinas y la de lípidos neutros, se han observado las alteraciones después de la exposición a *Vibrio harveyi*. Los resultados muestran que la acumulación de la bacteria se da en los primeros minutos de exposición y la temperatura no parece tener efecto relevante en el rango de tiempo analizado. Se observaron infiltraciones hemocíticas, pero los elevados niveles de atrofia percibidos desde el inicio del estudio dificultaron la observación detallada de la alteración del tejido. Por todo ello, se propone completar el estudio empleando mejillones con un mejor estado de partida, así como el uso de microscopía de fluorescencia y otros marcadores de estrés oxidativo.

## 1. Abstract

Mussels are filter-feeding organisms capable of accumulating bacteria in their tissues, including those belonging to the genus *Vibrio*, which can be pathogenic and cause damage at cellular and tissue level. In the present study, the effects of *Vibrio harveyi* on *Mytilus galloprovincialis* were studied at two different temperatures and during the first 20 minutes of exposure to the bacteria, in intervals of five minutes. The study was focused on histological analyses, which are indicative of the stress produced by *Vibrio* in mussels. Taking as main biomarkers the levels of atrophy in the digestive gland, the presence of haemocytic infiltrations, the volumetric density of lipofuscins and that of neutral lipids, alterations induced by *Vibrio harveyi* have been observed. The results show that the accumulation of bacteria occurs in the first minutes of exposure and temperature does not seem to have a relevant effect on the range analysed. Haemocytic infiltrations were observed, but the high levels of atrophy perceived from the beginning of the study made it difficult to obtain detailed observations of tissue alteration. It is therefore proposed to complete the study collecting mussels with better baseline conditions, as well as using fluorescence microscopy and other markers of oxidative stress.

## 2. Introducción

*Mytilus* es un género de moluscos bivalvos sésiles y suspensívoros que presenta una amplia distribución. En cuanto a su anatomía, los mejillones presentan dos valvas en forma triangular que están unidas por un ligamento dorsal y que sirven como esqueleto de unión para los músculos (Figura 1). En su interior, se encuentra la cavidad palial rodeada por el manto (Eggermont et al., 2020).



**Figura 1:** Anatomía general del mejillón (*Mytilus edulis*). Vista ventral (a). Vista dorsal oblicua (b). (Eggermont et al., 2020).

Son relativamente tolerantes a un amplio rango de cambios medioambientales, por lo que se emplean a menudo en investigaciones ecotoxicológicas y son organismos comercializados en todo el mundo (Venier et al., 2011). La producción de mejillones a nivel mundial lleva en aumento desde la década de 1950, y principalmente proviene de la acuicultura, aunque a nivel europeo, se ha observado un descenso en la producción en las últimas décadas, por causas como el aumento de las enfermedades, los afloramientos de algas, la disminución de desove, la depredación o los bajos ingresos (Avdelas et al., 2020).

Entre las especies de este género se encuentra el mejillón del Mediterráneo o *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Por su condición de filtrador, *M. galloprovincialis* se halla comúnmente expuesto a un gran número de microorganismos (Giovannoni y Stingl, 2005), algunos de ellos patógenos, y a contaminantes medioambientales constituyendo así hábitats para diferentes bacterias (Canesi y Pruzzo, 2016). Muchas de ellas forman parte de la microbiota de los mejillones sanos, ya que tienen la habilidad de concentrarlas en sus fluidos corporales, incluyendo la hemolinfa, así como en sus tejidos, a causa del

sistema circulatorio abierto presente en estos invertebrados (Destoumieux-Garzón et al., 2020). De hecho, recientes estudios han descrito a los mejillones como holobiontes, dada su asociación con distintas comunidades microbianas, que proporcionan al hospedador diferentes funciones probióticas, interviniendo en la homeostasis y en su salud, por lo que los microorganismos deberían considerarse un componente integral de la fisiología del hospedador (Musella et al., 2020).

En cuanto a su sistema de defensa, los mejillones presentan distintas barreras, tanto físicas como biológicas. Una de las barreras físicas es la valva, que protege al tejido blando, siendo también de gran importancia la piel y la capa mucosa que la cubre y que atrapa a los microorganismos facilitando su eliminación. La defensa interna, por otro lado, es principalmente llevada a cabo por los hemocitos (Canesi et al., 2002), las células del sistema inmunológico en bivalvos, que responden a los patógenos mediante quimiotaxis, encapsulación, actividad fagocítica o la producción de especies de oxígeno reactivas (Allam y Raftos, 2015).

Los órganos principales de acumulación de *Vibrio* han sido la glándula digestiva, las gónadas y las branquias (Uriarte, 2021). La glándula digestiva es una estructura del intestino medio formada por divertículos ramificados donde se da la absorción de nutrientes principalmente, pero también la síntesis de ciertos enzimas que toman parte en la digestión extracelular. Está formada por túbulos ciegos conectados a través de conductos ramificados (primarios y secundarios) procedentes del estómago (Gosling, 2004).

En lo que respecta al sistema reproductor de los bivalvos, las gónadas están emparejadas. Cada gónada es poco más que un sistema de túbulos ramificados, y los gametos se desprenden del revestimiento epitelial de estos túbulos. Los túbulos se unen para formar conductos que conducen a conductos mayores y eventualmente terminan en un gonoducto corto, el cual en la mayoría de los bivalvos se abre a través de poros independientes hacia la cavidad del manto, cerca del nefridioporo. En el caso de los mejillones, presentan diferentes estadios de desarrollo dependiendo de la época del año (Gosling, 2004).

El género *Vibrio* forma una proporción significativa de las bacterias presentes en bivalvos sanos y enfermos, pudiendo alcanzar concentraciones 100 veces mayores en su interior que en las aguas circundantes (Destoumieux-Garzón et al., 2020). Son bacterias gram negativas, curvadas, halófilas y no formadoras de esporas que habitan medios marinos y estuarinos (Cavallo y Stabili, 2002). Este estudio se centra en la especie *Vibrio harveyi*. Este microorganismo ha sido reconocido como causa de enfermedades importantes generalmente en invertebrados (Austin y Zhang, 2006), aunque también ha sido causante de muertes de tiburones (Grimes et al., 1984) y peces (Lee et al., 2002; Ishimaru y Muroga, 1997). Las estadísticas realizadas en las últimas décadas han revelado que este *V. harveyi* ha contribuido en la mortalidad masiva de bivalvos y gambas cultivados bajo condiciones artificiales, produciendo un impacto económico negativo en la industria del marisco (Montánchez y Kaberdin, 2020).

Este trabajo forma parte de un estudio más amplio llevado a cabo junto con el Departamento de Microbiología de la Universidad del País Vasco en el que se pretende estudiar la acumulación de *Vibrio harveyi* en *Mytilus galloprovincialis*, ya que según estudios anteriores (Uriarte, 2021), el mejillón actúa como reservorio, especialmente en los meses de invierno, liberándose posteriormente en verano. El interés de este estudio reside en determinar los posibles daños provocados por bacterias del género *Vibrio* en la costa vasca, tanto en la salud de los bivalvos, como a nivel económico.

### 3. Objetivo

El objetivo general de este estudio es determinar cómo afecta a los mejillones la exposición a *Vibrio harveyi* a 12 y 20°C, temperaturas correspondientes a las del agua en invierno y verano respectivamente en el estuario del Butrón, Plentzia (Ogayar, 2021). Investigaciones anteriores llevadas a cabo (Uriarte, 2021) sugirieron centrar los análisis en los primeros minutos de la bioacumulación, por lo tanto, se realizarán análisis tras 0, 5, 10, 15 y 20 minutos de exposición. Este trabajo se centrará en análisis a nivel histológico, y para ello, dentro del objetivo general, se han definido los siguientes objetivos específicos:

- Se evaluarán los posibles daños causados por *V. harveyi* en la glándula digestiva, gónadas y branquias de los mejillones.
- Se determinarán las densidades volumétricas de lipofuscinas y lípidos en la glándula digestiva como indicadores de estrés ambiental.
- Se observará la acumulación de *Vibrio* en la glándula digestiva mediante microscopía de fluorescencia.

### 4. Hipótesis

A tiempos más prolongados de exposición, se esperan mayores alteraciones provocadas por *Vibrio*, es decir, se espera que alteraciones histopatológicas como el nivel de atrofia y/o la densidad volumétrica de lipofuscinas sean mayores y la densidad volumétrica de lípidos, menor. En cuanto a las observaciones en el microscopio de fluorescencia, se esperan mayores acumulaciones de *Vibrio* en tiempos de exposición más largos. Asimismo, se espera una mayor acumulación de *Vibrio* en los mejillones en las muestras sometidas a 20°C, debido a una mayor actividad metabólica.

### 5. Materiales y métodos

Los mejillones, *Mytilus galloprovincialis*, se recogieron en el estuario Butrón (Bizkaia, 43°24'32.5"N 2°56'44.6"W) en el mes de julio y se transportaron a la Estación Marina de Plentzia, donde se mantuvieron 96h en ayunas, con flujo constante de agua filtrada y una temperatura ambiente de 18°C, para limpiar el tracto digestivo. Antes de realizar el experimento, se mantuvieron a 12°C y 20°C durante 1h.

Los 30 individuos empleados en total se expusieron a *Vibrio* a las distintas temperaturas y tiempos. Por un lado, se expusieron la mitad de los mejillones a una temperatura de 12°C y la otra mitad, a 20°C y se tomaron muestras de mejillón durante cinco tiempos distintos: control sin *Vibrio* (t1), 5 (t2), 10 (t3), 15 (t4) y 20 minutos (t5). Para cada tiempo, se tomaron 3 mejillones.

A continuación, se realizó la disección de los mejillones y se extrajeron los tres órganos que eran objeto de estudio: las gónadas, las glándulas digestivas y las branquias. Dichos órganos se fraccionaron en dos partes con el objetivo de realizar dos procedimientos diferentes.

Por un lado, se fijaron las muestras en formaldehído al 4% en agua marina durante 24 horas en una cámara frigorífica a 4°C y, posteriormente, se procedió a la deshidratación, aclaramiento e inclusión (Tabla 1) mediante un procesador de tejidos Leica ASP300 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

**Tabla 1:** Procesamiento histológico ASP300.

Proceso	Paso	Tiempo
Deshidratación	70% Etanol	1 hora
	96% Etanol (2 pases)	1 hora cada pase
	Etanol puro (2 pases)	1 hora cada pase
Aclaramiento	Xilol-Etanol 1:1	1 hora
	Xilol (2 pases)	1 hora cada pase
Inclusión	Parafina (55-60°C) (3 pases)	2 horas cada pase

Empleando un microtomo Leica RM2125RT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), se realizaron cortes de un grosor de 5µm y se introdujeron en un baño de agua a 50°C para alisar los tejidos, que posteriormente se recogieron sobre portaobjetos a los que previamente se les había aplicado albúmina para ayudar a la fijación de la muestra. Finalmente, se introdujeron en una estufa a 37°C para acelerar el secado.

Posteriormente, parte de los cortes se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (Tabla 2), mediante una estación de tinción Leica Autostainer XL (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), y se montaron con medio de montaje DPX (Merck) utilizando el montador Leica CV5030 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). El resto de cortes se desparafinaron e hidrataron y se pretendió observar las bacterias fluorescentes en un microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse Ni (Nikon Instruments). Sin embargo, por problemas con el microscopio, estas observaciones no se pudieron realizar.

**Tabla 2:** Protocolo de la tinción de Hematoxilina-Eosina.

Paso	Tiempo
Xilol (2 pases)	10 min
Etanol puro (2 pases)	2 min
Etanol 96% (2 pases)	2 min
Etanol 70%	2 min
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	5 min
Hematoxilina	4 min
Alcohol ácido	10 seg
H <sub>2</sub> O	5 min
Carbonato de Litio	10 seg
H <sub>2</sub> O	5 min
Eosina	90 seg
H <sub>2</sub> O	1 min
H <sub>2</sub> O	2 min
Etanol 70%	30 seg
Etanol 96%	30 seg
Etanol puro (2 pases)	30 seg
Xilol (2 pases)	1 min

Las muestras se observaron en el microscopio y se determinó el nivel de atrofia del epitelio digestivo basándonos en la escala propuesta por Kim et al. (2006).

Por otro lado, la mitad restante de los órganos de las muestras se introdujeron en crioviales y se congelaron en nitrógeno líquido. Una vez congelados, se almacenaron en el congelador a -40°C, se cortaron empleando un Criostato Leica CM3050 S a -25°C con un grosor de 10µm y se devolvieron al congelador durante un día. Posteriormente, se realizó una tinción Schmorl, gracias a la que se pudieron observar las lipofuscinas acumuladas en los tejidos. Para ello, las muestras congeladas se metieron en la nevera a 4°C con el objetivo de atemperarla durante 10 minutos, y posteriormente, se fijaron en formol cálcico Baker (Tabla 3), a 4°C durante 15 minutos.

**Tabla 3:** Componentes del formol cálcico Baker.

Compuesto	Volumen/peso
Formaldehído	30 ml
CaCl	3g (disuelto en 30 ml de H <sub>2</sub> O)
NaCl	7,5g
H <sub>2</sub> O	240 ml
Ajustar el pH a 7,2	

A continuación, se lavaron las muestras en H<sub>2</sub>O y se tiñeron empleando una disolución de cloruro férrico al 1% (3 volúmenes) y ferrocianuro (1 volumen). Se mezcló todo y se mantuvo en la oscuridad durante 5 minutos. Posteriormente, se lavaron las muestras con una disolución de H<sub>2</sub>O con ácido acético al 1%, tras lo que se volvieron a lavar en H<sub>2</sub>O y, finalmente se montaron las muestras empleando glicerina. Transcurridos unos días, se pudieron observar al microscopio óptico.

Además, se realizó una tinción Oil red O para la detección lípidos acumulados en el tejido digestivo. Para ello, al igual que en la tinción Schmorl, las muestras congeladas se metieron en la nevera a 4°C con el objetivo de atemperarlas durante 10 minutos y, posteriormente, se fijaron en formol cálcico Baker (Tabla 3), a 4°C durante 15 minutos. Las muestras se lavaron en isopropanol al 60% y después los lípidos neutros se tiñeron con una disolución de Oil Red O en isopropanol al 60% durante 20 minutos. Una vez lavadas en agua destilada, las muestras se contrastaron con Fast Green durante 30 minutos y, finalmente, se montaron las muestras usando glicerina. Transcurridos unos días, se pudieron observar en el microscopio óptico.

Se empleó el microscopio óptico para hacer capturas aleatorias del tejido digestivo y, posteriormente, con el programa *Image J* se midieron parámetros como el número de partículas de lípidos y lipofuscinas, el área ocupada por los lípidos o lipofuscinas, el área total o el tamaño promedio.

### **5.1 Tratamiento de datos**

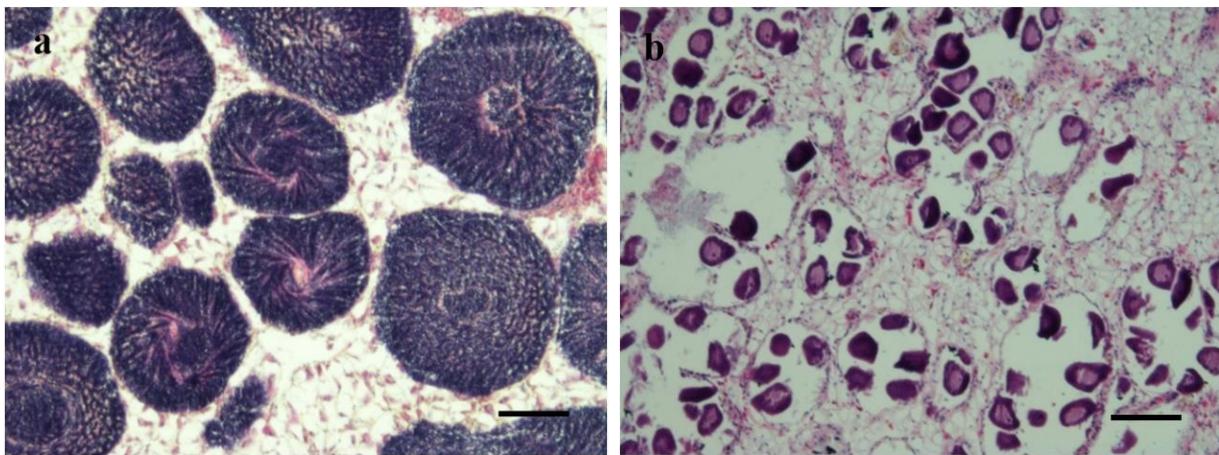
Se calculó el ratio entre el área ocupada por los lípidos y las lipofuscinas respecto al área del tejido y así se obtuvo la densidad volumétrica. Para cada tiempo se calculó la media de densidades volumétricas, así como las desviaciones estándar y con estos datos se realizaron representaciones gráficas mediante el programa *Graph Pad Prism*. Se realizó una ANOVA de un solo sentido, así como un Test de Tukey para comprobar las diferencias entre grupos y se estableció un p-valor de 0,05 para indicar significancia estadística. En el caso de la atrofia, al tratarse de valores discretos, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis.

## 6. Resultados

### 6.1 Hematoxilina-eosina

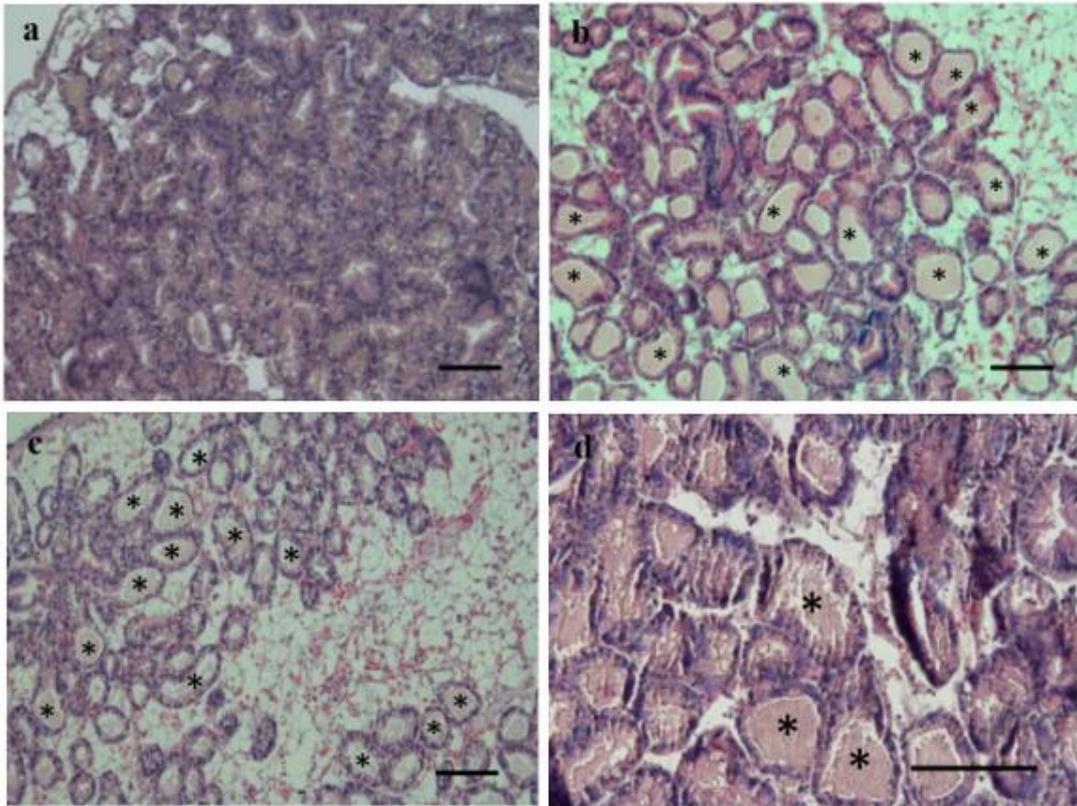
Las alteraciones provocadas por la exposición a *V. harveyi* fueron observadas en la glándula digestiva, las branquias y las gónadas de los mejillones tras realizar la tinción con Hematoxilina-Eosina.

Las branquias no presentaron alteraciones y en las gónadas se observaron las distintas fases de desarrollo, y se comprobó cómo en general los machos (Figura 2a) se encontraban en fases más avanzadas que las hembras (Figura 2b), aunque no se apreciaron patrones claros en función de la temperatura o el tiempo de exposición.

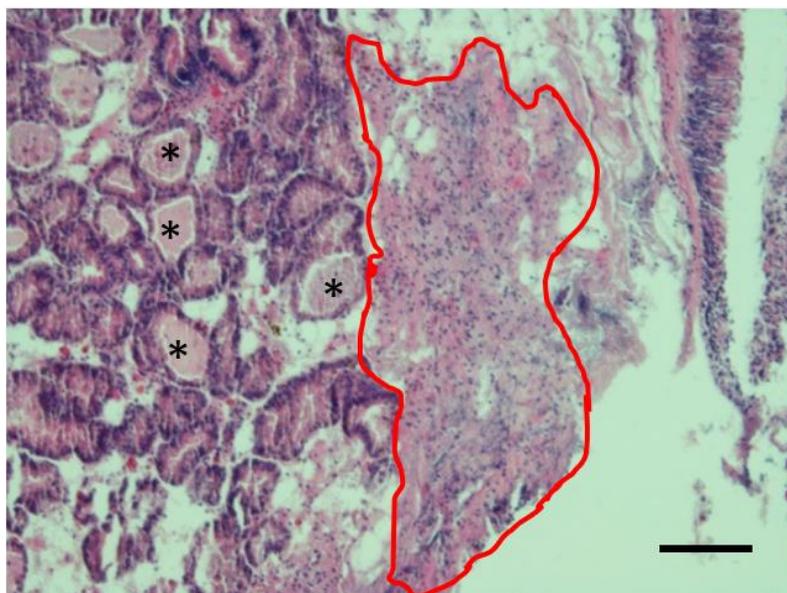


**Figura 2:** Micrografías de la gónada masculina (a) y femenina (b) de *Mytilus galloprovincialis* teñidas con Hematoxilina-Eosina. Las barras de escala corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

En la glándula digestiva, si bien se pudieron apreciar organismos con un bajo nivel de atrofia (Figura 3a), en general los túbulos presentaron alteraciones importantes, como grandes diámetros de la luz y un epitelio digestivo fino (Figuras 3b,3c y 3d). Además, se apreciaron también infiltraciones hemocíticas posiblemente causadas por la respuesta inmune ante la infección de *V. harveyi* (Figura 4).

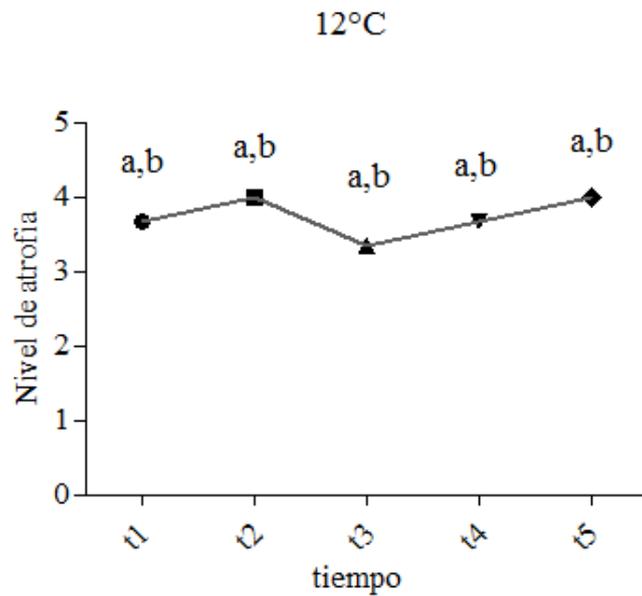


**Figura 3:** Micrografías de la glándula digestiva de mejillones teñidas con Hematoxilina-Eosina en estado de poca atrofia tras 5 minutos de exposición a *Vibrio* (a) y de altos niveles de atrofia tras 5(b), 15 (c) y 20 minutos (d). Los asteriscos indican perfiles atróficos o en desintegración. Las barras de escala corresponden a 100  $\mu$ m.

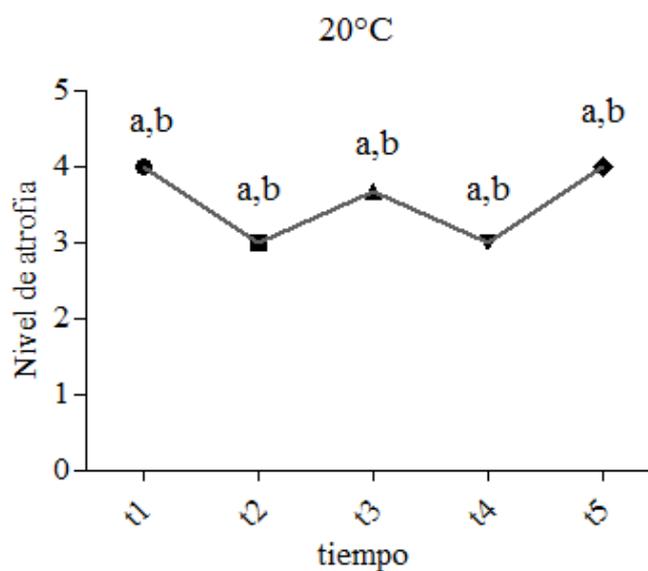


**Figura 4:** Micrografía de la glándula digestiva de un mejillón presentando, en rojo, una infiltración hemocítica tras 10 minutos de exposición a *Vibrio*. Los asteriscos indican perfiles atróficos o en desintegración. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

Se establecieron cuatro niveles de atrofia de acuerdo a la escala propuesta por Kim et al. (2006) en función del grosor de las células del epitelio digestivo y el diámetro de la luz de los túbulos y se observó un grosor epitelial muy bajo en la mayoría de las muestras, así como un gran tamaño de la luz, mostrando grandes niveles de atrofia independientemente del tiempo de exposición a *V. harveyi.*, tanto a 12°C (Figura 5) como a 20°C (Figura 6) en todos los tiempos analizados, incluyendo el control.



**Figura 5:** Nivel de atrofia de los túbulos digestivos (1-4) en mejillones sometidos a una temperatura de 12°C durante 0 minutos (control, t1), 5 minutos (t2), 10 minutos (t3), 15 minutos (t4) y 20 minutos (t5). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

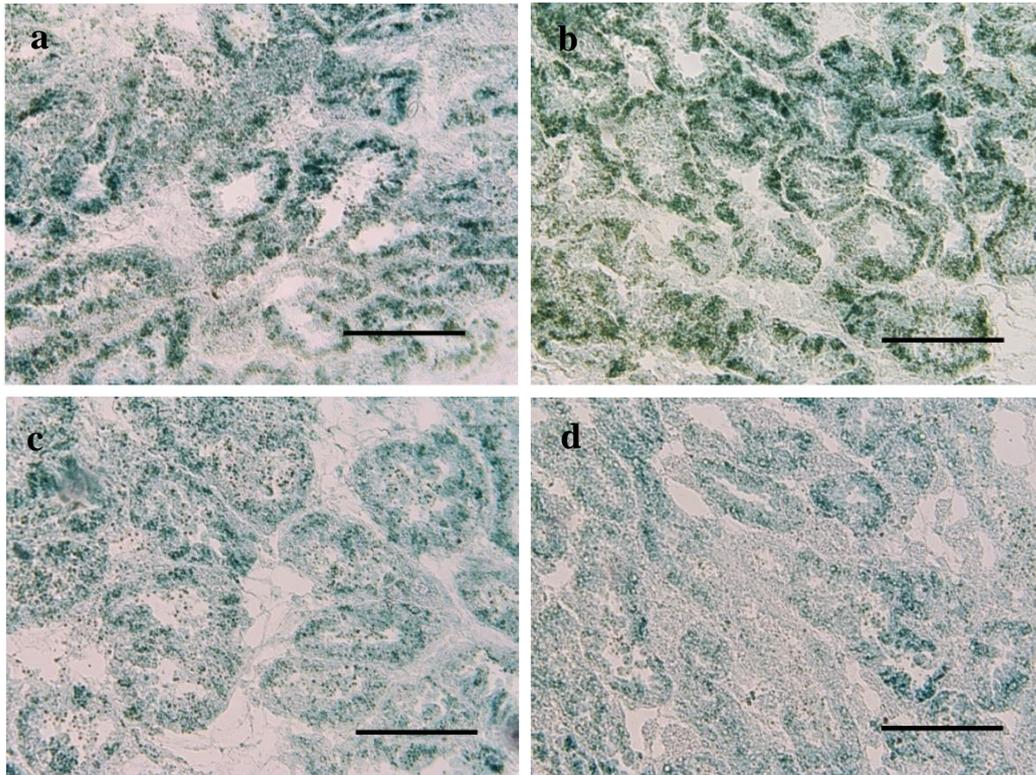


**Figura 6:** Nivel de atrofia de los túbulos digestivos (1-4) en mejillones sometidos a una temperatura de 20°C durante 0 minutos (control, t1), 5 minutos (t2), 10 minutos (t3), 15 minutos (t4) y 20 minutos (t5). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

## **6.2 Lipofuscinas**

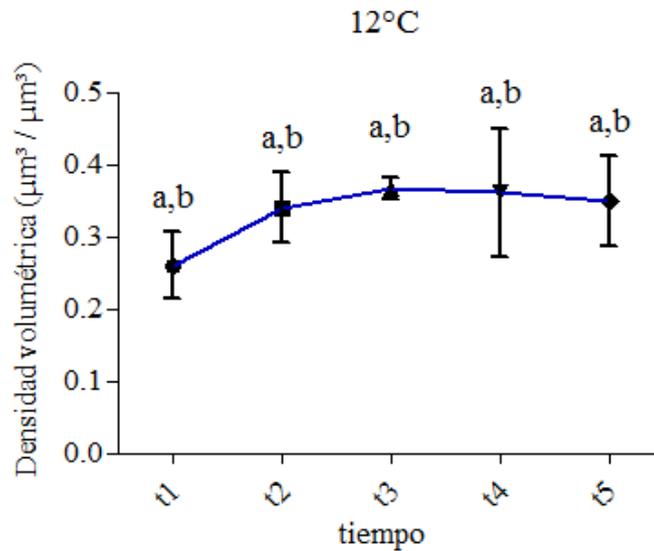
Las lipofuscinas son uno de los productos finales de la peroxidación de lípidos y su acumulación en los lisosomas es indicadora de estrés oxidativo en la glándula digestiva (Canesi et al., 2010).

En las imágenes de microscopía las lipofuscinas se aprecian en forma de puntos en tonos verdes-azulados más oscuros que el tejido circundante (Figura 7) después de la tinción de Schmorl.



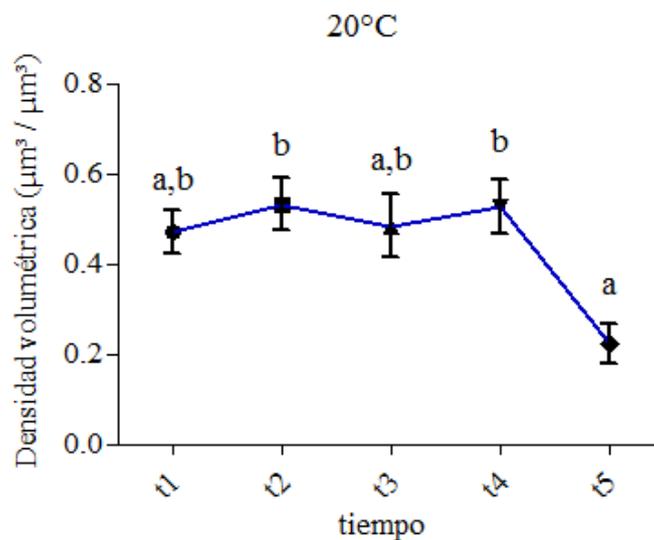
**Figura 7:** Micrografías de la glándula digestiva teñida con tinción Schmorl tras 0 (a), 5(b), 10 (c) y 15 minutos (d) de exposición a *Vibrio*. Las barras de escala corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

Tras la medición de la densidad volumétrica de las lipofuscinas en los individuos sometidos a una temperatura de 12°C, se vio un aumento en el área ocupada por las lipofuscinas respecto al área de tejido total a lo largo del tiempo, especialmente, durante los cinco primeros minutos. A partir de los diez minutos, se observó que el valor se mantuvo, llegando incluso a disminuir ligeramente a partir de los 15 minutos (Figura 8). Sin embargo, en ninguno de los tiempos se obtuvieron resultados con diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 8:** Media de la densidad volumétrica de lipofuscinas ( $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$ ) en diferentes tiempos de experimentación a 12°C. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

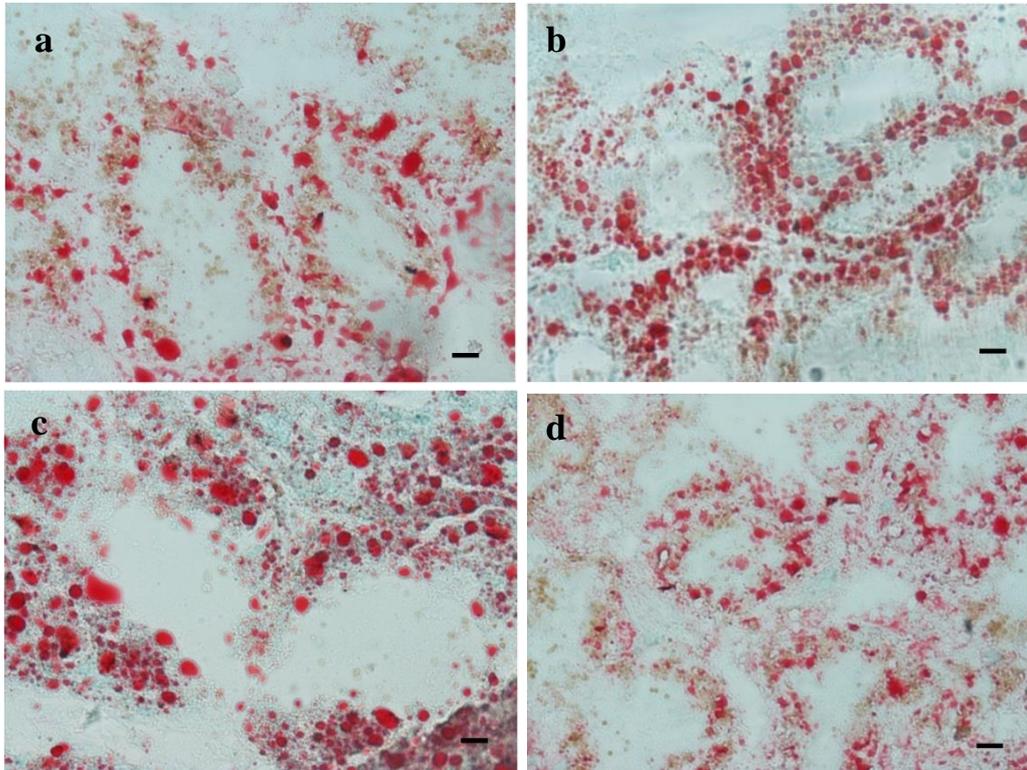
En cuanto a la densidad volumétrica de lipofuscinas en individuos expuestos a *Vibrio* a 20°C, se observó un descenso importante en los mejillones después de 20 minutos de exposición. En el análisis de ANOVA se comprobó que las diferencias sí eran significativas ( $p < 0,05$ ). Concretamente, en el test de Tukey se realizó la comprobación por parejas y se observaron resultados significativos para el tiempo 2 respecto al tiempo 5 y el tiempo 4 respecto al tiempo 5. Hasta los 15 minutos se apreció una densidad volumétrica con pocas variaciones, entre 0,4 y 0,6  $\mu\text{m}^3$  de lipofuscinas/  $\mu\text{m}^3$  de tejido en todos los puntos, pero al alcanzar los 20 minutos se apreció una disminución drástica (Figura 9).



**Figura 9:** Media de la densidad volumétrica de lipofuscinas ( $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$ ) en diferentes tiempos de experimentación a 20°C. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

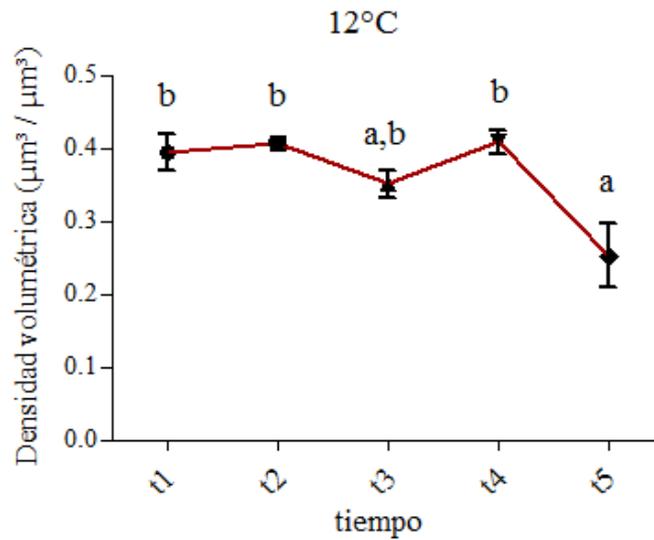
### **6.3 Lípidos neutros**

Otro parámetro indicativo de estrés ambiental son las alteraciones en los lípidos neutros en la glándula digestiva de los mejillones (Koukouzika et al., 2009). En las imágenes a microscopía, después de la tinción Oil Red O, los lípidos se aprecian como gotas rojas sobre un fondo en tonos verdes (Figura 10).



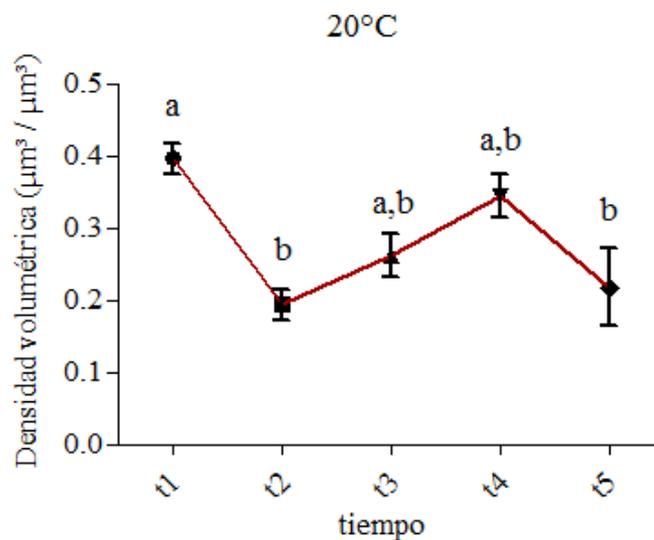
**Figura 10:** Micrografías de la glándula digestiva de mejillones teñidas con Oil Red O tras 0 (a), 5 (b), 15 (c) y 20 minutos (d) de exposición a *Vibrio*. Las barras de escala corresponden a 10  $\mu$ m.

La cuantificación de lípidos neutros en mejillones expuestos a 12°C, presentó un importante descenso de la densidad volumétrica tras 20 minutos de exposición. Así, se observaron diferencias significativas después de realizar la ANOVA. En cuanto al test de Tukey, se comprobó que había diferencias significativas en los tiempos 1 respecto al 5, 2 respecto al 5 y 4 respecto al 5. Tras realizar las medidas de las densidades volumétricas, se observó que hasta los 15 minutos la relación entre el área de los lípidos y el área total del tejido digestivo se mantenía en valores similares. En las muestras sometidas a *Vibrio* durante 20 minutos, en cambio, se observó un descenso significativo en la densidad volumétrica (Figura 11).



**Figura 11:** Media de la densidad volumétrica de lípidos ( $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$ ) en diferentes tiempos de experimentación a  $12^\circ\text{C}$ . Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

En la exposición de los mejillones a *Vibrio* a  $20^\circ\text{C}$ , se obtuvieron resultados significativos después de realizar la ANOVA ( $p < 0,05$ ) y en el test de Tukey. Se observaron diferencias significativas en el tiempo 1 respecto al tiempo 2 y el tiempo 1 respecto al tiempo 5. En este caso, se aprecia un descenso en la densidad volumétrica de los lípidos, especialmente pronunciado en los primeros 5 minutos (Figura 12), con un ligero incremento posteriormente para volver a descender después de 20 minutos de exposición.



**Figura 12:** Media de la densidad volumétrica de lípidos ( $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$ ) en diferentes tiempos de experimentación a  $20^\circ\text{C}$ . Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

## 7. Discusión

El presente trabajo tiene como referencia un trabajo anterior en el cual después de una exposición de mejillones a *Vibrio harveyi* durante 7 días, la mayor acumulación de las bacterias tenía lugar en los primeros minutos de exposición. Así, nos hemos intentado centrar en los tiempos en los que ocurre esa mayor acumulación (Uriarte, 2021) y se han intentado determinar las alteraciones celulares o tisulares que puede inducir la presencia de *Vibrio* en mejillones después de tiempos de exposición muy cortos.

Así, en las observaciones histológicas realizadas en los cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina, la aparición de infiltraciones hemocíticas a partir del segundo tiempo puede indicar una activación de la respuesta inmunológica por parte del mejillón ante la exposición a *Vibrio* (Parisi et al., 2019). De hecho, los hemocitos, por su actividad fagocítica son las células más importantes involucradas en el mecanismo de inmunidad de bivalvos (Gornati et al., 2016). De manera similar a trabajos anteriores, donde se describía un incremento de infiltraciones hemocíticas (Uriarte, 2021), el presente trabajo parece indicar que dicha respuesta del sistema inmune puede ocurrir en tiempos todavía más cortos. Por otra parte, cabe destacar que las infiltraciones hemocíticas se han detectado en la glándula digestiva, que es el órgano que más bacterias acumula (González, 2022) y, por lo tanto, puede esperarse una respuesta inmune más activa por parte del sistema inmune del mejillón.

Los niveles de atrofia han sido empleados en numerosos estudios histopatológicos como indicadores de deterioro en la glándula digestiva, tanto en mejillones (Al-Subiai et al., 2012; Bignell et al., 2011; Cajaraville et al., 2016; Cuevas et al., 2015) como en ostras (Aguirre-Rubí et al., 2018; Dos Reis et al., 2015). En las muestras recolectadas, los mejillones mostraron un alto grado de atrofia en sus glándulas digestivas que se apreció desde el inicio del estudio, incluyendo las muestras control, dificultando así un estudio más detallado de la degradación tisular en función del tiempo.

Según un estudio de Villalba (1995) llevado a cabo en las costas de Galicia, la gametogénesis en *M. galloprovincialis* se produce durante otoño y comienzos de invierno, empleando las reservas acumuladas durante los meses anteriores, y el desove más importante ocurre durante primavera, tras lo que se da una reabsorción de las gónadas y el desarrollo de tejido de reserva. A pesar de ello, las muestras observadas en el presente estudio, que fueron obtenidas en el mes de julio, muestran distintas fases de desarrollo, observando individuos en fases más tardías y otros en fases más tempranas (Suárez et al., 2005). Aun así, la fase reproductiva en la que se encuentre el mejillón puede condicionar la disponibilidad de reservas de cara a una infección como la de *Vibrio*, dado que los lípidos juegan un papel importante en la maduración de las gónadas y en la estimulación de la gametogénesis (Fokina et al., 2018). Además, el estrés al que es sometido *M. galloprovincialis* en presencia de *V. harveyi* podría haber provocado un mayor requerimiento energético. Esto implicaría un aumento en la peroxidación de lípidos y una utilización rápida de estos, tal y como se ha demostrado en investigaciones anteriores, como la llevada a cabo por Vlahogianni y Vlavanidis (2007) sobre la exposición de *Mytilus* a distintos metales) o la

realizada por Canesi et. al (2010) estudiando los efectos de *V. splendidus* y *V. anguillarum* sobre la glándula digestiva de *M. galloprovincialis*.

Estudios como el llevado a cabo por Viarengo et al. (2007) sugieren que los niveles de lipofuscinas están fuertemente correlacionados con el daño lisosómico, causando una inestabilidad en los lisosomas que provoca la liberación de sus contenidos, pudiendo producir la apoptosis (Brunk y Terman, 2002). Es por ello que cabría esperar mayores daños y un aumento en la densidad volumétrica de lipofuscinas a mayores tiempos de exposición a *V. harveyi*, es decir, a medida que aumenta el estrés, tal y como ya se ha observado en estudios como en el llevado a cabo por Koehler et al. (2008). Esto se observa en los individuos sometidos a 12 °C donde incluso en tiempos tan cortos como cinco minutos se observa un aumento de lipofuscinas que se mantiene a tiempos más largos. En las muestras expuestas a 20°C, en cambio, se da una reducción de la densidad volumétrica de lipofuscinas. Esto podría deberse a una acumulación de estrés, ya que por un lado se han dejado los mejillones en ayuno para depuración y se han expuesto a *V. harveyi* de tal manera que el resultado del descenso observado a los 20 minutos de exposición puede estar relacionado con un funcionamiento alterado de la glándula digestiva (Dimitriadis et al., 2004) que ya se ha observado previamente en los altos niveles de atrofia detectados. Sería conveniente realizar más estudios al respecto en los que el tejido digestivo del mejillón se encontrase en un mejor estado de partida.

## 8. Conclusiones

Con los resultados obtenidos se concluye que:

1. La glándula digestiva es el órgano que responde de manera más significativa al estrés inducido por *Vibrio harveyi*. Sin embargo, los niveles de atrofia y un gran deterioro en la mayoría de individuos analizados, incluyendo los controles, han dificultado la obtención de conclusiones más relevantes.
2. La presencia de infiltraciones hemocíticas es síntoma de la respuesta inmune provocada por *Vibrio*.
3. El descenso a lo largo del tiempo en la densidad volumétrica de lípidos, así como el aumento en la densidad volumétrica de lipofuscinas a 12°C son prueba del estrés provocado por *Vibrio harveyi*.
4. La temperatura en el rango analizado no parece tener efecto en la acumulación de *Vibrio* en los tejidos de *M. galloprovincialis*.

De acuerdo a las conclusiones obtenidas, se sugiere completar el estudio recolectando los mejillones en invierno, para poder observar posibles diferencias estacionales en el estado de los tejidos y en la acumulación. De la misma manera, se sugiere completar las observaciones con observaciones mediante microscopía de fluorescencia, así como el empleo de nuevos biomarcadores de estrés oxidativo como la

determinación de la actividad de enzimas antioxidantes, tal y como se ha realizado en estudios anteriores (Dobal et al., 2022).

## 9. Bibliografía

- Aguirre-Rubí, J. R., Luna-Acosta, A., Etxebarria, N., Soto, M., Espinoza, F., Ahrens, M. J., & Marigómez, I. (2018). Chemical contamination assessment in mangrove-lined Caribbean coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae* as biomonitor species. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 13396-13415. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9159-2>
- Allam, B., & Raftos, D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of invertebrate pathology*, 131, 121-136. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>
- Al-Subiai, S. N., Arlt, V. M., Frickers, P. E., Readman, J. W., Stolpe, B., Lead, J. R., ... & Jha, A. N. (2012). Merging nano-genotoxicology with eco-genotoxicology: An integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C60 fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus* sp. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1-2), 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.019>
- Austin, B., & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*, 43(2), 119-124. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>
- Avdelas, L., Avdic-Mravljje, E., Borges Marques, A. C., Cano, S., Capelle, J. J., Carvalho, N., ... & Asche, F. (2021). The decline of mussel aquaculture in the European Union: Causes, economic impacts and opportunities. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 91-118. <https://doi.org/10.1111/raq.12465>
- Bignell, J. P., Stentiford, G. D., Taylor, N. G. H., & Lyons, B. P. (2011). Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK. *Marine environmental research*, 72(1-2), 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.05.004>
- Brunk, U. T., & Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 611-619. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00959-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00959-0)
- Cajaraville, M. P., Orive, E., Villate, F., Laza-Martínez, A., Uriarte, I., Garmendia, L., ... & Marigómez, I. (2016). Health status of the Bilbao estuary: a review of data from a multidisciplinary approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 179, 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.01.013>
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., & Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocytosis interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy research and technique*, 57(6), 469-476. <https://doi.org/10.1002/jemt.10100>

- Canesi, L., Barmo, C., Fabbri, R., Ciacci, C., Vergani, L., Roch, P., & Gallo, G. (2010). Effects of *Vibrio* challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3), 399-406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.06.008>
- Canesi, L., & Pruzzo, C. (2016). Specificity of innate immunity in bivalves: a lesson from bacteria. En *Lessons in Immunity* (pp. 79-91). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803252-7.00006-0>
- Cavallo, R. A., & Stabili, L. (2002). Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research*, 36(15), 3719-3726. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00107-0)
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J., & Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic toxicology*, 162, 152-164. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.011>
- Destoumieux-Garzón, D., Canesi, L., Oyanedel, D., Travers, M. A., Charrière, G. M., Pruzzo, C., & Vezzulli, L. (2020). Vibrio–bivalve interactions in health and disease. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4323-4341. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15055>
- Dimitriadis, V. K., Domouhtsidou, G. P., & Cajaraville, M. P. (2004). Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to function. *Journal of Molecular Histology*, 35(5), 501-509. <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000045952.87268.76>
- Dobal, V., Suárez, P., Ruiz, Y., García-Martín, O., & San Juan, F. (2022). Activity of antioxidant enzymes in *Mytilus galloprovincialis* exposed to tar: Integrated response of different organs as pollution biomarker in aquaculture areas. *Aquaculture*, 548, 737638. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737638>
- Dos Reis, I. M., Mattos, J. J., Garcez, R. C., Zacchi, F. L., Miguelão, T., Flores-Nunes, F., ... & Bairy, A. C. (2015). Histological responses and localization of the cytochrome P450 (CYP2AU1) in *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. *Aquatic Toxicology*, 169, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.011>
- Eggermont, M., Cornillie, P., Dierick, M., Adriaens, D., Nevejan, N., Bossier, P., ... & Declercq, A. M. (2020). The blue mussel inside: 3D visualization and description of the vascular-related anatomy of *Mytilus edulis* to unravel hemolymph extraction. *Scientific reports*, 10(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62933-9>
- Fokina, N., Storhaug, E., Bakhmet, I., Maximovich, N., Frantzen, M., & Nahrgang, J. (2018). Seasonal changes in lipid class content in mussels *Mytilus* spp. from Rakkfjorden in the

Norwegian Sea and Kandalaksha Bay of the White Sea. *Polar Biology*, 41(10), 2103-2117. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2349-7>

- Giovannoni, S. J., & Stingl, U. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature*, 437(7057), 343-348. <https://doi.org/10.1038/nature04158>
- González, M. (2022). *Mytilus galloprovincialis* como reservorio de *Vibrio harveyi* en un sistema estuarino. *Efecto de la temperatura*. [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Gornati, R., Longo, A., Rossi, F., Maisano, M., Sabatino, G., Mauceri, A., ... & Fasulo, S. (2016). Effects of titanium dioxide nanoparticle exposure in *Mytilus galloprovincialis* gills and digestive gland. *Nanotoxicology*, 10(6), 807-817. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1132348>
- Gosling, E. (2004). *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. John Wiley & Sons.
- Grimes, D. J., Colwell, R. R., Stemmler, J., Hada, H., Maneval, D., Hetrick, F. M., ... & Stoskopf, M. (1984). *Vibrio* species as agents of elasmobranch disease. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 37(1), 309-315. <https://doi.org/10.1007/BF01989313>
- Ishimaru, K., & Muroga, K. (1997). Taxonomical re-examination of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathology*, 32(1), 59-64. <https://doi.org/10.3147/jsfp.32.59>
- Kim, Y., Powell, E. N., & Ashton-Alcox, K. A. (2006). Histopathology analysis. *Histological techniques for marine bivalve molluscs: Update*. NOAA Tech. Mem. NOS NCCOS, 27, 19-52.
- Koehler, A., Marx, U., Broeg, K., Bahns, S., & Bressling, J. (2008). Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas—a new threat to marine life? *Marine environmental research*, 66(1), 12-14. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.009>
- Koukouzika, N., Raftopoulou, E. K., & Dimitriadis, V. K. (2009). Seasonal differences of lysosomal, lipid and lipofuscin parameters in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Molluscan Studies*, 75(3), 261-267. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyp022>
- Lee, K. K., Liu, P. C., & Chuang, W. H. (2002). Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology*, 4(3), 267-277. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0018-9>
- Montánchez, I., & Kaberdin, V. R. (2020). *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Marine environmental research*, 154, 104850. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104850>
- Musella, M., Wathsala, R., Tavella, T., Rampelli, S., Barone, M., Palladino, G., ... & Candela, M. (2020). Tissue-scale microbiota of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and

its relationship with the environment. *Science of the Total Environment*, 717, 137209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137209>

- Ogayar, E. (2021). *Efecto del cambio climático en la costa vasca: presencia de bacterias del género Vibrio e influencia de los factores ambientales en su perdurabilidad*. [Tesis doctoral]. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Parisi, M. G., Maisano, M., Cappello, T., Oliva, S., Mauceri, A., Toubiana, M., & Cammarata, M. (2019). Responses of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) after infection with the pathogen *Vibrio splendidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 221, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.005>
- Suárez, M. P., Alvarez, C., Molist, P., & San Juan, F. (2005). Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 531-540. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[531:PAOGCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[531:PAOGCA]2.0.CO;2)
- Uriarte, F. O. (2021). *Mytilus galloprovincialis como reservorio de Vibrio harveyi en el sistema marino*. [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., ... & Pallavicini, A. (2011). Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC genomics*, 12(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-69>
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>
- Villalba, A. (1995). Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (NW Spain). *Aquaculture*, 130(2-3), 269-277. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00213-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00213-8)
- Vlahogianni, T. H., & Valavanidis, A. (2007). Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry and Ecology*, 23(5), 361-371. <https://doi.org/10.1080/02757540701653285>