

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR

EFICACIA FAGOCÍTICA EN HEMOCITOS DE MEJILLÓN: EFECTOS DEL MERCURIO EN PRESENCIA DE MICROPLÁSTICOS EXTRACELULARES

Autor Ortuño Montesinos, Ramón

Directores Martínez Gómez, Concepción
Torres Gavilá, Francisco Javier

Curso académico 2018-2019



INSTITUTO
ESPAÑOL DE
OCEANOGRFÍA



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer especialmente a mi tutora en el Centro Oceanográfico de Murcia (COMU), la Dra. Concepción Martínez-Gómez, por brindarme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, así como por el tiempo y esfuerzo dedicados a mi aprendizaje durante el desarrollo de las tareas realizadas para el estudio. También, agradecerle cada hora dedicada a la revisión, corrección y a las aportaciones realizadas en el presente trabajo.

Al personal técnico del COMU, Francisco Gómez, Juliana Valdés, y Cristóbal Navarro por su colaboración y apoyo en los trabajos de muestreo y mantenimiento de los mejillones en el laboratorio. A Vicenç Moltó por su ayuda en la elaboración de gráficos con software estadístico.

Al personal científico del COMU, Dr. José Rivera y Dr. Juan Santos por su colaboración y apoyo en los análisis y preparaciones de soluciones de mercurio.

A mi tutor en la Universidad Católica de Valencia (UCV), el Dr. Francisco Javier Torres Gavilá, por el tiempo dedicado a las revisiones del presente trabajo.

A la Dra. Marina Albentosa por la financiación necesaria para realizar las actividades de exposición en el COMU.

A todas las personas que forman parte del COMU, que hicieron mi estancia agradable, con su compañerismo y convivencia diaria.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. El mejillón como organismo modelo para el estudio de la eficacia fagocítica	6
1.3. Objetivos	11
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
2.1. Recolección, aclimatación y mantenimiento de mejillones en laboratorio	13
2.2. Preparación y cuantificación de las soluciones de mercurio (Hg)	14
2.3. Preparación y cuantificación de las suspensiones de microplásticos (MPs)	15
2.4. Preparación de monocapas celulares de hemocitos.....	18
2.5. Ensayo de fagocitosis.....	19
2.6. Gestión de datos y análisis estadístico	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1. Efecto del Hg extracelular sobre la actividad fagocítica de hemocitos	25
3.2. Caracterización de los MPs en las suspensiones de trabajo	27
3.3. Efecto de los MPs extracelulares sobre la eficacia fagocítica de hemocitos	30
3.4. Efecto del Hg en presencia de MPs extracelulares sobre la eficacia fagocítica de hemocitos.....	33
5. CONCLUSIONES	39
5.1. Líneas futuras.....	40
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO I. CULTIVO DE FITOPLANCTON.....	53
ANEXO II. DETERMINACIÓN DEL MERCURIO (Hg) TOTAL	55
ANEXO III. COMPORTAMIENTO DE LOS MICROPLÁSTICOS EN LAS DILUCIONES	57
ANEXO IV. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	61
1. Efecto del Hg extracelular sobre la actividad fagocítica de hemocitos	61
2. Efecto de los MPs extracelulares sobre la actividad fagocítica de hemocitos...	62
3. Efecto del Hg en presencia de MPs extracelulares sobre la actividad fagocítica de hemocitos.....	65
ANEXO V. ABSTRACT CONGRESO MICROMED	69

Resumen

En la última década, ha crecido la preocupación por la presencia de micropartículas plásticas en los ecosistemas marinos, principalmente, por su capacidad de adsorber otros contaminantes químicos sirviendo como vectores para la entrada en organismos acuáticos. En el presente estudio se investigaron los efectos *in vitro* causados sobre la actividad fagocítica en hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) mediante exposición, individual y simultánea en el medio extracelular a mercurio (Hg) y a tres tipos de microplásticos de polietileno (MPP 635 XF, AQUAMATTE 26HD y AQUATEX 325).

Las suspensiones de microplásticos (MPs) utilizadas se caracterizaron (tamaño y número de partículas por mililitro) mediante un contador de partículas Coulter y se determinaron las concentraciones de Hg antes y después de cada experimento. La eficacia fagocítica (EF) se determinó mediante microscopía de fluorescencia.

Los resultados mostraron que en ausencia de MPs en el medio extracelular, son necesarias concentraciones de $\text{Hg} \geq 10^{-6} \text{ M}$ para causar un efecto inhibitorio sobre la EF ($p < 0,05$). La exposición a MPs de manera individual no causó efectos significativos sobre la EF en ningún caso, mientras que concentraciones de MPs > 200.000 partículas por mililitro y en presencia de Hg a concentraciones de 10^{-8} M si causaron efectos inhibitorios significativos ($p < 0,05$), indicando un aumento de la toxicidad asociada al Hg. El enriquecimiento por adsorción de Hg en la superficie de los MPs y su posterior translocación a los lisosomas podría explicar estos resultados, aunque serán necesarios más estudios para elucidar el modo de acción del Hg en presencia de MPs.

Palabras clave

Eficacia fagocítica; hemocitos; in vitro; mejillón; mercurio; microplásticos.

Abstract

In the last decade, concern has grown for the presence of plastic microparticles in marine ecosystems, mainly, because of its ability to adsorb other chemical pollutants, acting as vectors for the entrance into aquatic organisms. In the present study *in vitro* effects caused on phagocytic activity of haemocytes from mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by individual and simultaneous exposure to mercury (Hg) and three types of polyethylene microplastics (MPP 635 XF, AQUAMATTE 26HD and AQUATEX 325) in the extracellular medium were investigated.

Assayed microplastic (MPs) suspensions were characterized by a Coulter particle counter (size and number of particles per milliliter) and Hg concentrations were determined before and after each experiment. The phagocytic efficacy (EF) was determined by fluorescence microscopy.

The results showed that Hg concentrations $\geq 10^{-6}$ M are necessary to cause an inhibitory effect on EF ($p < 0.05$) under the absence of MPs in the extracellular medium. Exposure to MPs individually did not cause significant effects on EF in any case, whereas MPs concentrations $> 200,000$ particles per milliliter caused significant inhibitory effects ($p < 0.05$) under the presence of Hg at concentrations of 10^{-8} M in the extracellular medium, thus pointing to an increase of toxicity associated with Hg. Adsorption enrichment of Hg on the MPs surface and their subsequent translocation to lysosomes might explain these results, although further studies will be necessary to elucidate the mode of action of Hg in the presence of MPs.

Key words

Hemocytes; in vitro; mercury; microplastics; mussels; phagocytic efficacy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

De forma global los ecosistemas acuáticos se ven frecuentemente afectados por la contaminación causada por la presión antropogénica (Cole *et al.*, 2011; Rault *et al.*, 2013; Chaudhry y Malik, 2017). En la década de 1970, Carpenter y Smith fueron los primeros científicos en alertar de la presencia de pequeños fragmentos de plástico en el Océano Atlántico. A pesar de ello, no es hasta esta última década cuando surge una creciente preocupación ambiental y científica por la presencia de éstas partículas en el medio marino, siendo referidas por primera vez con el término microplásticos (MPs) por Thompson *et al.* (2004). En la actualidad, los MPs son uno de los contaminantes ambientales que más interés despierta por sus potenciales efectos negativos sobre los ecosistemas acuáticos (SAPEA, 2018).

Una amplia gama de polímeros plásticos se producen y liberan diariamente al medio ambiente. En Europa, el polietileno (PE) comprende el 29,8%, el polipropileno (PP) el 19,3%, el cloruro de polivinilo (PVC) el 10,2% y el poliestireno (PS) el 6,6% de la producción total (Plastics Europe, 2018). Los agregados marinos que forman los MPs de PE con algas facilitan su ingestión por parte de los bivalvos filtradores, los cuales, translocan estas partículas del intestino al sistema circulatorio, siendo capaces de retenerlas más de un mes (Browne *et al.*, 2008; Fernández y Albentosa., 2019).

Las concentraciones ambientales de MPs en ambientes acuáticos son diversas, como 0,028 partículas por metro cúbico (pp/m³) en el estuario de Tamar (Reino Unido) (Sadri y Thompson, 2014), 300 nanogramos por mililitro (ng/mL) en el giro subtropical del Pacífico Norte (Goldstein, Rosenberg y Cheng, 2012), 0,0032 a 1,18 pp/m³ en el Mar de Ross (Antártida) (Cincinelli *et al.*, 2017), 2,46 pp/m³ en el Océano Atlántico Noreste (Lusher *et al.*, 2014). Además, se han encontrado grandes concentraciones en áreas contaminadas con más de 320 pp/m³ en aguas costeras del Mediterráneo israelí (Van der Hal, Ariel y Angel, 2017), 228 pp/m³ en el Golfo de Qatar (Abayomi *et al.*, 2017). Los datos sobre la concentración de MPs que se encuentran en el ambiente marino son a menudo difíciles de comparar debido a la falta de metodologías de muestreo, unidades de normalización y expresión de datos estandarizados (Avio, Gorbi y Regoli, 2016, citado en Barboza *et al.*, 2018a).

Los MPs son átomos de carbono e hidrógeno unidos en cadenas poliméricas, que típicamente incluyen aditivos químicos tales como los ftalatos, éteres, bifenil polibromados (PBDEs) o tetrabromobisphenol A (TBBPA). Son partículas sólidas, de gran hidrofobicidad, de un tamaño inferior a 5 mm, cuya degradabilidad es muy baja (décadas/siglos) (Derraik, 2002). Muy recientemente expertos de diferentes países han propuesto una definición del término MPs atendiendo a sus condiciones fisicoquímicas (tipo de polímero, estado sólido, solubilidad), y utilizando el tamaño, el color, la forma y el origen como criterios de clasificación de categorías (Frias y Nash, 2019). Los MPs pueden tener un origen primario o secundario. Los MPs primarios se liberan directamente al medio ambiente como pequeñas partículas y se estima que representan entre un 15-21% de los MPs de los océanos (SAPEA, 2018). Las principales fuentes son el lavado de ropa sintética, la abrasión de neumáticos o los que forman parte en la fabricación y composición de productos industriales (pellets, pinturas, abrasivos, etc), o seguidos en menor medida por los incluidos en productos de higiene personal (por ejemplo: cosméticos) (Fendall y Sewell, 2009). Los MPs secundarios proceden de la fragmentación de grandes objetos de plásticos, tales como bolsas de plástico, redes de pesca, botellas, y representan entre el 69-81% de los MPs encontrados en los océanos (Auta, Emenike y Fauziah, 2017). La presencia de MPs en el medio marino debido a fuentes primarias y secundarias es un hecho de escala global y se han identificado como una amenaza emergente importante (Barboza y Gimenez, 2015; SAPEA, 2018).



Figura 1. Microplásticos en cosméticos . Fuente: ISMAC (2017).

En el medio acuático, se estima que los MPs se encuentran disponibles para todos los organismos de la cadena alimentaria (Cole *et al.*, 2011; Auta, Emenike y Fauziah, 2017). Existen evidencias que demuestran que las propiedades físicas y químicas de los MPs facilitan la adsorción de contaminantes sobre la superficie de la partícula (Ashton, Holmes y Turner, 2010), sirviendo como vehículos de contaminantes a los organismos mediante la ingestión (Hartmann *et al.*, 2017). En experimentos controlados se ha podido demostrar que la exposición a altas concentraciones de MPs puede llegar a causar daños físicos a los organismos, incluyendo la inducción de procesos inflamatorios, stress y reducción del estado físico (Besseling *et al.*, 2012; Von Moos, Burkhardt-Holm y Köhler, 2012; Jeong *et al.*, 2017). Sin embargo, los efectos causados a concentraciones ambientales relevantes son muy limitados hasta la fecha (Zarfl *et al.*, 2011; Lönnstedt y Eklöv, 2016).

En el medio marino, los organismos se encuentran siempre expuestos a una mezcla de sustancias, por lo que el estudio de los potenciales efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos de los contaminantes químicos es fundamental a la hora de valorar el posible impacto sobre los organismos. La capacidad de los MPs para adsorber e interactuar con otros contaminantes, como los metales pesados (Ashton, Holmes y Turner, 2010), aumenta la preocupación relacionada con su transferencia y los posibles efectos sobre la biota (Galloway, Cole y Lewis, 2017). Además, la exposición simultánea a MPs y otros contaminantes ambientales puede provocar interacciones toxicológicas, modificando el tipo y/o la magnitud de los efectos tóxicos sobre los organismos acuáticos (Oliveira *et al.*, 2018). Actualmente, el conocimiento sobre los posibles efectos de mezclas de contaminantes y sus interacciones es muy limitado (Kienzler *et al.*, 2016), y se suma a la creciente preocupación por las posibles consecuencias de los contaminantes ambientales sobre las especies acuáticas afectadas (Rault *et al.*, 2013; SAPEA, 2018).

El mercurio (Hg) es un metal pesado extremadamente ubicuo, persistente, altamente tóxico y con capacidad de bioacumularse en los organismos (Branco *et al.*, 2017), y por ello, uno de los contaminantes ambientales más estudiados (Duchemin *et al.*, 2008; Gworek *et al.*, 2016; Branco *et al.*, 2017). Las emisiones antropogénicas de mercurio a la atmósfera han aumentado considerablemente desde el inicio de la era industrial moderna (mayoritariamente las relacionadas con los procesos de producción de cemento), aunque los picos naturales de las erupciones volcánicas han ocurrido a lo largo de milenios (Von Burg, 1995). Su distribución en el medio marino se debe al transporte atmosférico, fluvial o vertical y horizontal de las masas de agua oceánicas entre otros (Gworek *et al.*, 2016). El Hg se puede encontrar en el medio acuático en

varias formas (orgánicas e inorgánicas) dependiendo de las condiciones de oxidación-reducción (Gworek *et al.*, 2016). Aunque el cloruro de mercurio utilizado en el estudio no es una de sus formas más tóxicas (Boudou y Ribeyre, 1997), es de las más solubles, por lo que representa una forma clave entre el metilmercurio que se bioacumula en los organismos acuáticos, resultando altamente tóxico, y el mercurio gaseoso (Duchemin *et al.*, 2008). Una vez entra en el organismo, el Hg puede provocar varios efectos tóxicos y modulaciones de ciertas respuestas biológicas del animal (Pipe y Coles, 1995; Rault *et al.*, 2013; Barboza, Vieira y Guilherme, 2018c).

1.2. El mejillón como organismo modelo para el estudio de la eficacia fagocítica

El mejillón es un molusco bivalvo de la familia Mytilidae. Se encuentra distribuido por todo el mundo, presentando multitud de géneros y especies. Algunas de estas especies son de gran importancia económica en acuicultura (OESA y Fundación biodiversidad, 2017).

Los animales de esta familia son gregarios y viven fijos al sustrato por medio de una estructura filamentosa adherente denominada biso (Gómez-Cabrera, 2000), aunque pueden desplazarse con la ayuda de su pie (FAO, 2019).

Los mejillones se caracterizan por estar comprimidos lateralmente y presentan dos valvas que recubren su cuerpo (Helm, Lovatelli y Bourne, 2006). Estas valvas simétricas están formadas por carbonato cálcico. Las valvas están unidas por un ligamento que junto a la charnela, funciona a modo de bisagra, permitiendo la apertura, por medio de la acción de los músculos aductores posterior y anterior (Gosling, 2015). En el interior de las valvas del mejillón se sitúa el manto, una epidermis en forma de lámina que recubre las partes blandas, cuya función principal es segregar la concha.

Tabla 1. Taxonomía de los organismos modelo utilizados en nuestro estudio.

MEJILLÓN MEDITERRÁNEO		
Taxonomía		
Reino	Animalia	
Filo	Mollusca	
Clase	Bivalvia	
Orden	Mytilida	
Familia	Mytilidae	
Género	<i>Mytilus</i>	
Especie	<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	

Figura 2. Mejillón. Fuente: Elaboración propia.

Fuente: Adaptado de WoRMS Editorial Board (2019).

Las branquias de los bivalvos son órganos bien desarrollados y especializados para la alimentación, así como la respiración (Helm, Lovatelli y Bourne, 2006). La función de las branquias en la alimentación consiste en atrapar (filtrar) las partículas en suspensión en el agua (Peteiro, Filgueria y Fernández-Reiriz, 2007). Se alimentan fundamentalmente de fitoplancton, zooplancton y de pequeñas partículas inertes de materia orgánica (OESA y Fundación biodiversidad, 2017).

Los moluscos tienen un sistema circulatorio abierto. La sangre de los moluscos se denomina hemolinfa y es responsable del transporte de alimento, oxígeno y desecho metabólicos, y representa el principal componente de la respuesta inmune innata de éstos organismos (Carballal *et al.*, 1997). El corazón se encuentra en la cavidad pericárdica y está formado por dos aurículas y un ventrículo (Peteiro, Filgueria y Fernández-Reiriz, 2007).

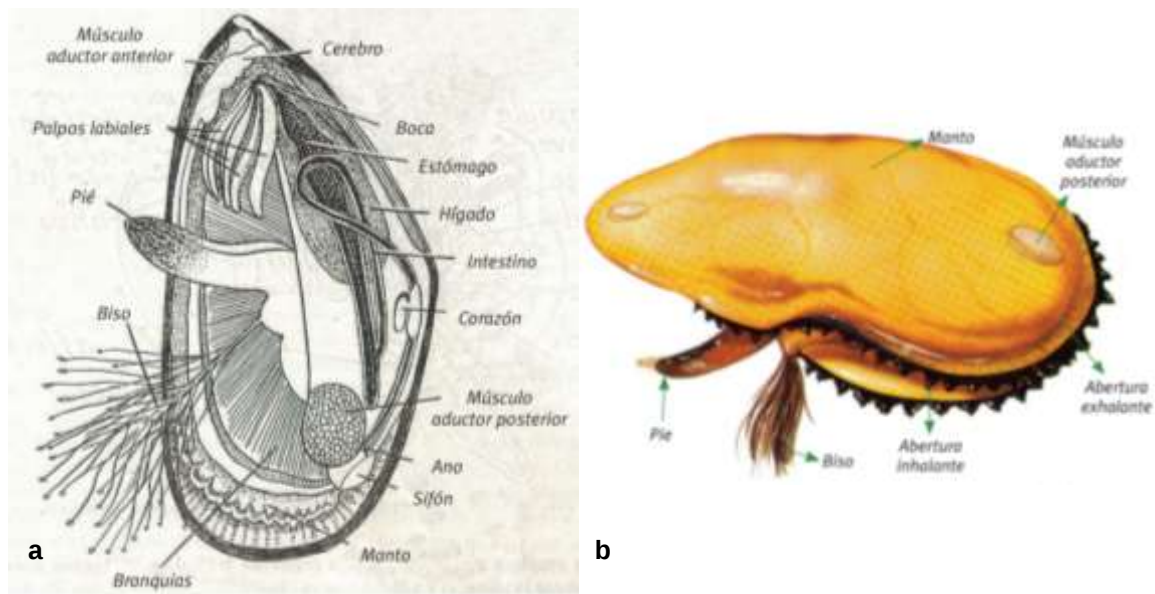


Figura 3.(a) Esquema de las partes interna del mejillón. (b) Morfología del cuerpo del mejillón.

Fuente: OESA y Fundación Biodiversidad (2017).

Los moluscos bivalvos han sido empleados para biomonitorizar la contaminación ambiental marina desde el lanzamiento del programa *Mussel Watch* (Goldberg, 1975). De hecho, es una de las especies objetivo en los programas nacionales del seguimiento de la contaminación química marina en aguas atlánticas y mediterráneas españolas (MITECO, 2012) y en los programas regionales de seguimiento de la contaminación (CIESM, Convención OSPAR; MED POL, Convención de Barcelona) (Martínez-Gómez *et al.*, 2008; Vethaak *et al.*, 2017). Por otro lado, los mejillones y otras especies afines de bivalvos son organismos ideales para estudios ecotoxicológicos (Sauvé *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2018; Brate, 2019). Esto es debido principalmente a que son organismos sésiles, filtradores, con mecanismos de detoxificación poco desarrollados y, por tanto, con una alta capacidad para bioacumular contaminantes presentes en la columna de agua en solución o adheridos a partículas (Rivera-Hernández *et al.*, 2019). Además, presentan una elevada tasa de supervivencia en condiciones de laboratorio.

Las especies de mejillón *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* son frecuentemente empleadas como organismo modelo para estos estudios (Duchemin *et al.*, 2008; Rault *et al.*, 2013; Rivera-Hernández *et al.*, 2019), siendo *Mytilus galloprovincialis* la especie utilizada en nuestro estudio (tabla 1).

En estudios previos al presente trabajo, ya han utilizado especies del género *Mytilus* spp. para evaluar los posibles efectos toxicológicos, así como los modos de acción de los MPs (Von Moos, Burkhardt-Holm y Köhler, 2012; Avio *et al.*, 2015; Pittura *et al.*, 2018) y de otros contaminantes, como los metales pesados (Sauvé *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2012; Rault *et al.*, 2013; Martínez-Gómez *et al.*, 2017).

La exposición directa a contaminantes ambientales y a otros factores de estrés pueden alterar los mecanismos homeostáticos de los organismos, como el sistema inmune. Como se mencionó anteriormente, en mejillones, la respuesta inmune innata está mediada por mecanismos humorales y celulares (Carballal *et al.*, 1997), siendo este último desempeñado por los hemocitos (Feng, 1988).

Los hemocitos son las células presentes en la hemolinfa y se desplazan por todo el sistema circulatorio de los moluscos bivalvos (Costa, 2008). Estas células desempeñan gran variedad de respuestas fisiológicas (Burgos-Aceves y Faggio, 2017), siendo su función principal la defensa frente a patógenos (Feng, 1988). Se identifican dos tipos principales de hemocitos circulantes en los moluscos: los hialinocitos y los granulocitos (Cheng, 1981) (figura 4). Este último tipo celular presenta una mayor actividad fagocítica (Carballal *et al.*, 1997), así como un mayor tamaño (10-20 μm) que los primeros (Costa, 2008).

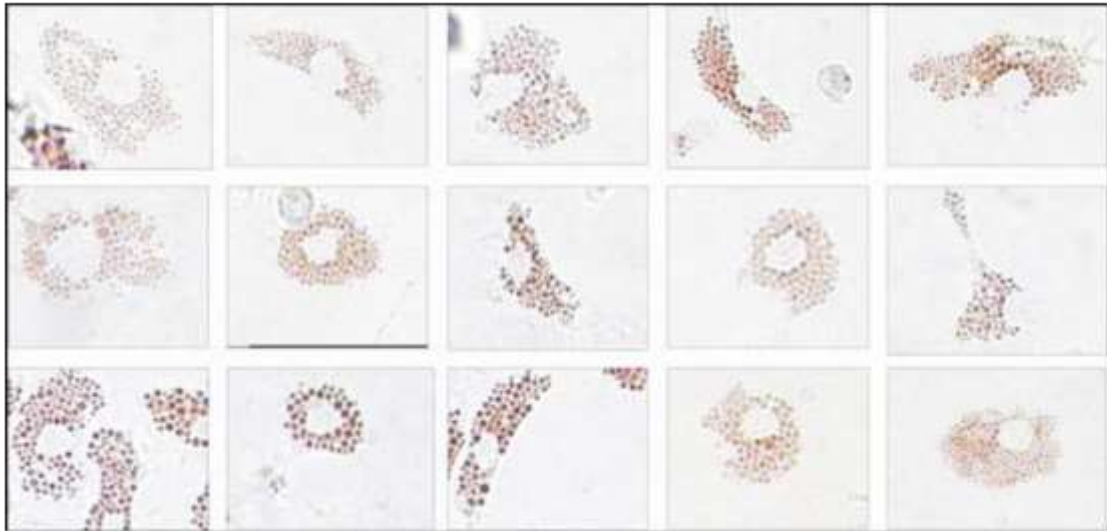


Figura 4. Ejemplos de hemocitos granulares de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). Las vesículas rojas se corresponden con los lisosomas teñidos con el colorante rojo neutro.

Fuente: Martínez-Gómez, Bignell y Lowe, (2015).

La fagocitosis es el mecanismo por el cual las células tienen capacidad de absorber partículas alimenticias (Costa, 2008), y está ampliamente estudiada en moluscos bivalvos (Carballal *et al.*, 1997; Beaudry *et al.*, 2016). En mejillones, es realizada por los hemocitos, los cuales desempeñan un papel fundamental en la eliminación de patógenos o partículas extrañas. Estos bivalvos presentan procesos de fagocitosis altamente desarrollados para la internalización celular de las micropartículas (0.1-100 μm) (Moore *et al.*, 2006), por lo que representan organismos modelo adecuados para investigar el comportamiento y los efectos de micropartículas en células de invertebrados acuáticos. La fagocitosis en hemocitos invertebrados se considera un biomarcador de la inmunotoxicidad, debido a que puede resultar alterada por los efectos de los contaminantes químicos ambientales, afectando así la capacidad de respuesta inmune (Fournier *et al.*, 2000).

Para distinguir claramente los efectos adversos causados por la exposición a MPs, productos químicos o sus efectos combinados en organismos, se necesitan experimentos de laboratorio controlados. En general, las líneas celulares son mucho más sensibles a los efectos tóxicos de los contaminantes que los organismos completos (Fournier *et al.*, 2000), lo que es un gran inconveniente para su uso como alternativas a las pruebas *in vivo*. Una forma de evitar estos problemas es utilizar cultivos primarios recién aislados (Fournier *et al.*, 2000). Estos cultivos están más diferenciados, contienen diferentes tipos de células y, por tanto, se piensa que responden de manera similar a un organismo vivo, mientras que al mismo tiempo reducen la cantidad de trabajo y ejemplares necesarios para las pruebas *in vivo*.

Este trabajo se desarrolla dentro del proyecto de investigación internacional JPI-2016 EPHEMARE (Exotoxicological Effects of Microplastics in Marine Ecosystems), cuyo objetivo es “examinar la adsorción de químicos en MPs, su ingestión, transferencia trófica y liberación de químicos”, y evaluar una amplia gama de efectos ecotoxicológicos que causan sobre organismos modelo vertebrados e invertebrados (MITECO, 2012).

En el Centro Oceanográfico de Murcia ya se han llevado a cabo estudios englobados dentro del marco de este proyecto, y sirven como referencias para el presente trabajo. Destaca el estudio de Rivera-Hernández *et al.* (2019) que utilizando al mejillón (*Mytilus* spp.) como organismo modelo, evalúa cómo la liberación del Hg adsorbido por los MPs afecta a la biodinámica del químico en los tejidos. Otros estudios relevantes, examinan la absorción, eliminación y acumulación de MPs en *Mytilus galloprovincialis* (Fernández y Albentosa, 2019) o los efectos tóxicos y la influencia en la bioacumulación de fluoranteno de los MPs de PS (Paul-Pont *et al.*, 2016).

1.3. Objetivos

La hipótesis de trabajo de este estudio está basada en la idea de que la presencia simultánea en el medio extracelular de contaminantes químicos y MPs aumenta el efecto inhibitorio de la actividad fagocítica en hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). En consecuencia, el objetivo general de este trabajo es evaluar los efectos causados sobre la actividad fagocítica de hemocitos de mejillón por la exposición *in vitro* al Hg (seleccionado como contaminante modelo), y como éstos efectos son modulados por la presencia o ausencia de diferentes tipos de MPs de PE de alta densidad (15 a $<1\mu\text{m}$) (seleccionado como polímero modelo) en el medio extracelular.

Para este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- i) Determinación de la concentración crítica de Hg (CC-Hg) en el medio extracelular a partir de la cual se causa un efecto inhibitorio significativo en la eficacia fagocítica de hemocitos.
- ii) Evaluación de la eficacia fagocítica de hemocitos expuestos a dos concentraciones de tres tipos de MPs de PE en el medio extracelular.
- iii) Evaluación de la eficacia fagocítica de hemocitos expuestos a dos concentraciones de tres tipos de MPs de PE en presencia de Hg a concentraciones inferiores a la CC-Hg en el medio extracelular.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Recolección, aclimatación y mantenimiento de mejillones en laboratorio

Los moluscos bivalvos, especialmente el mejillón, presentan una serie de cualidades que los hacen idóneos para su uso en estudios de toxicología marina (Fernández *et al.*, 2012; Rault *et al.*, 2013; Avio *et al.*, 2015), debido entre otras razones, a que son organismos de fácil manejo y aclimatación, con una elevada tasa de supervivencia en condiciones de laboratorio. Para la realización de este trabajo, se obtuvieron ejemplares juveniles de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) (rango de talla 35-45 mm) procedentes de poblaciones naturales adheridas a estructuras de cultivos marinos situadas en aguas costeras del municipio de San Pedro del Pinatar (Región de Murcia, España).

Tras su recolección (21 de febrero de 2019), los mejillones fueron transportados inmediatamente a las instalaciones experimentales del Centro Oceanográfico de Murcia (Instituto Español de Oceanografía) situado en San Pedro del Pinatar. Una vez en el laboratorio, los organismos se introdujeron en un tanque (500 Litros) con agua de mar filtrada (FSW), a 0,45 μm , para su aclimatación y mantenimiento (figura 5). Los ejemplares se mantuvieron en circuito semiabierto (renovándose completamente el agua dos veces por semana) con condiciones naturales de fotoperiodo, con aireación constante y control de temperatura ($18 \pm 1^\circ\text{C}$) y salinidad (37 ± 1 psu). Los mejillones fueron alimentados diariamente con un monocultivo de fitoplancton de la especie *Isochrysis galbana*, en una ración equivalente al 3% del peso corporal seco de los individuos, considerado suficiente para mantener el balance energético positivo de los ejemplares (Albentosa *et al.*, 2012) (detalles sobre el cultivo de fitoplancton realizado se presentan en el Anexo I). Los mejillones se aclimataron un mínimo de dos semanas antes de proceder a la extracción de la hemolinfa. Los mejillones seleccionados para la realización del estudio fueron separados unos de otros mediante corte con tijeras del biso y posteriormente, limpiados superficialmente de epibiontes.



Figura 5. Tanque de mantenimiento con los mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) empleados en el presente estudio. Fuente: Elaboración propia.

2.2. Preparación y cuantificación de las soluciones de mercurio (Hg)

A partir de cloruro de mercurio ("Mercurio II Cloruro para análisis – ACS" de Panreac), se prepararon varias soluciones de trabajo teniendo en cuenta los objetivos planteados en cada una de las exposiciones. Se prepararon 5 disoluciones de trabajo de cloruro de mercurio (HgCl_2) en FSW a diferentes concentraciones nominales (*Control*, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M).

Las disoluciones fueron almacenadas en frascos de vidrio de 50 mL, previamente lavados con ácido nítrico. Transcurridas 24 horas, se desecharon éstas disoluciones y se volvieron a preparar utilizando los mismos frascos de vidrio. Tanto el lavado de los frascos con ácido nítrico, como el vaciado y posterior rellenado de los frascos, tienen como finalidad evitar contaminación o pérdidas de HgCl_2 por adsorción a las paredes del frasco de vidrio.

Con el objeto de comprobar que no se producían pérdidas significativas en las soluciones de trabajo durante el estudio, se cuantificó la concentración de mercurio total en cada una de las soluciones inmediatamente después de su preparación, así como en los días sucesivos a su uso en los experimentos de exposición (Anexo II). Las cuantificaciones se realizaron utilizando un analizador de mercurio (AMA 254 de LECO) (figura 6).



Figura 6. Analizador de mercurio AMA 254 de LECO. Fuente: Elaboración propia.

2.3. Preparación y cuantificación de las suspensiones de microplásticos (MPs)

Para el desarrollo del estudio se utilizaron tres tipos de MPs comerciales de PE con diferentes propiedades físicoquímicas y compuestos por partículas con formas heterogéneas (tabla 2). Todos los MPs utilizados fueron distribuidos por Micro Powders, Inc. (EE.UU.). El proceso seguido para oxidar (AQUATEX-325 and AQUAMATTE-26HD) y modificar (AQUAMATTE-26HD) la superficie de los MPs de PE no fueron facilitadas por el proveedor.

Tabla 2. Microplásticos comerciales utilizados.

Microplastic	Commercial name	Particle size	Density at 25°C
Polyethylene	MPP-635 XF	< 6 μm	0.96 g/cm ³
Oxidezed polyethylene	AQUATEX 325	< 15 μm	0.99 g/cm ³
Oxidezed and modified polyethylene	AQUAMATTE-26HD	< 8.5 μm	1.07 g/cm ³

Fuente: Adaptado de Micro Powders, Inc. (USA)

Las suspensiones de cada tipo de MPs fueron preparadas en frascos de vidrio de 50 mL, lavados previamente con ácido nítrico. Para cada tipo de MPs se prepararon cuatro suspensiones de trabajo diferentes:

- $1 \mu\text{g MPs} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ FSW}$
- $100 \mu\text{g MPs} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ FSW}$
- $1 \mu\text{g MPs} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ solución de Hg en FSW (a CC-Hg)}$
- $100 \mu\text{g MPs} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ solución de Hg en FSW (a CC-Hg)}$

Las suspensiones de MPs fueron preparadas mediante pesada de precisión de los MPs y posterior suspensión en 50 mL de FSW (figura 7a) o solución de trabajo de Hg (<CC-Hg), almacenadas en oscuridad a 16°C por un tiempo máximo de 24 horas. Inmediatamente antes de su uso, las suspensiones de MPs fueron sonicadas durante 30 segundos 5 veces a 100W, en un generador de ultrasonidos (Branson 250), para conseguir una mayor homogenización de la muestra antes de su uso (figura 7b).

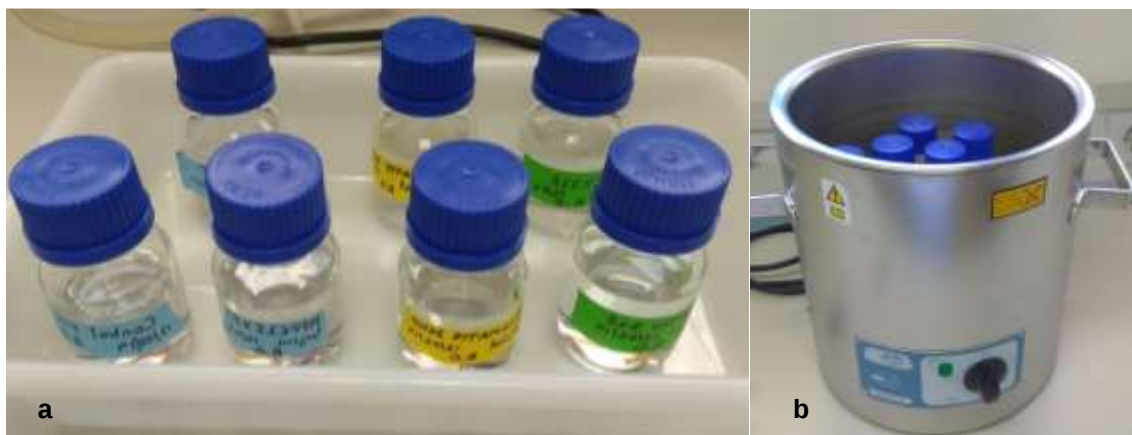


Figura 7. (a) Suspensiones de MPs preparadas en frascos de 50 mL. (b) Generador de ultrasonidos Branson 250. Fuente: Elaboración propia.

El número de micropartículas plásticas por mililitro (pp/mL), así como el percentil 90 del diámetro de partícula (P90 D), de cada una de las suspensiones de MPs utilizadas fue cuantificado por medio de un contador de partículas Coulter Multisizer™ III (MSIII) (figura 8), con un límite de cuantificación entre 1.4 y $42 \mu\text{m}$. Con el fin de obtener el tamaño de partícula, el MSIII asume una forma esférica y muestra su equivalente diámetro esférico (ESD, μm). Para realizar las cuantificaciones en el MSIII a las concentraciones de trabajo de MPs preparadas (1 y $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), fue necesario realizar diluciones (factor de dilución $1/10$ y $1/20$) de éstas debido a limitaciones técnicas del aparato (saturación de lecturas). El número de partículas por mL en los tratamientos *Control* (FSW) y en el agua de dilución fue cuantificado y extraído de los resultados de las suspensiones de MPs.

Para estimar las concentraciones (pp/mL) y los tamaños (P90D) en las suspensiones de MPs utilizados en los experimentos de exposición, se tuvo en cuenta los posibles efectos no lineales causados por la dilución en FSW durante la cuantificación con el MSII. Las suspensiones de MPs fueron analizadas por triplicado en diluciones sucesivas (suspensiones de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ diluidas 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80; suspensiones de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ diluidas 1/20, 1/40 1/60 y 1/80). Los datos obtenidos se utilizaron para obtener las funciones modelo correspondientes y estimar las concentraciones de partículas (pp/mL) y los tamaños (P90D) de éstas en las suspensiones de MPs utilizadas en los experimentos de exposición (factor de dilución 1/1) (Anexo III).



Figura 8. Coulter modelo Multisizer™ III, Beckman Coulter . Fuente: Elaboración propia.

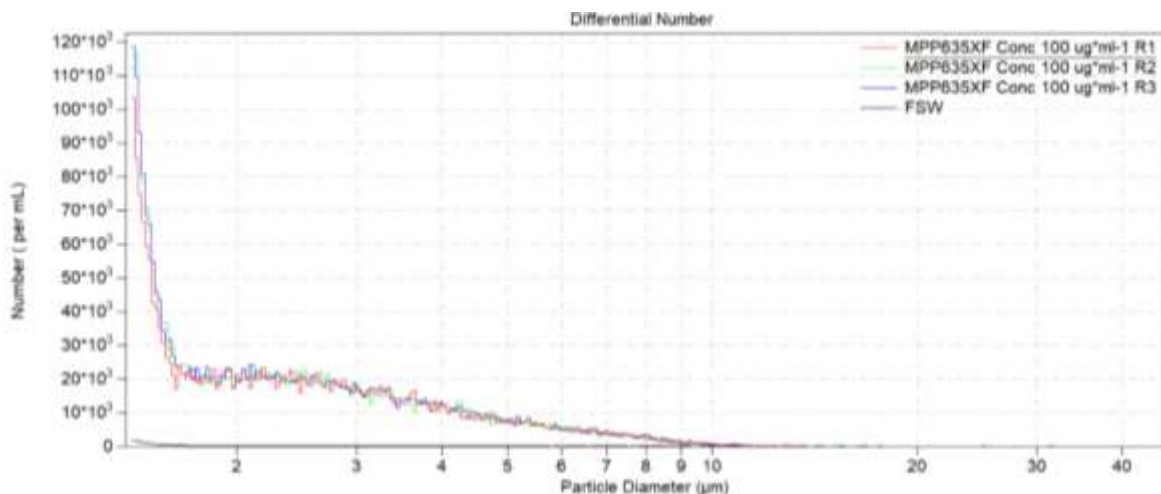


Figura 9. Representación gráfica con el número de partículas por mililitro (pp/mL) del microplástico MPP 635 XF con una concentración de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y de su respectivo control.

Fuente: Elaboración propia.

2.4. Preparación de monocapas celulares de hemocitos

La preparación de las monocapas celulares de hemocitos fue realizada siguiendo el procedimiento aplicado por Martínez-Gómez, Bignell y Lowe (2015), con mínimas modificaciones.

La hemolinfa se obtuvo de manera independiente y como mínimo de 12 ejemplares de mejillón para cada experimento/tratamiento. Para la extracción de la hemolinfa, se separaron las valvas del mejillón con ayuda de unas tijeras de disección, y a continuación, se introdujo una punta de pipeta para mantener las valvas suficientemente abiertas como para insertar una aguja hipodérmica y permitir el drenaje del agua intervalvar. Posteriormente, se retiró 0,2 mL de hemolinfa del seno del músculo aductor anterior de cada individuo, con una jeringa de 1 mL equipada con una aguja 21G, y con un contenido previo de 0,2 mL de FSW (un fallo en el mantenimiento del ratio 50:50 de hemolinfa en agua marina filtrada puede dar lugar a “coagulación” de hemocitos).



Figura 10. Extracción de la hemolinfa mediante la inserción intervalvar de una aguja hipodérmica. Fuente: Elaboración propia.

Una vez obtenida la muestra de hemolinfa, se retiró la aguja de la jeringuilla y se expulsó suavemente el contenido en tubos eppendorf de 1,5 mL. Los tubos eppendorf se mantuvieron sobre hielo, por un tiempo máximo de 10 minutos, hasta su posterior uso. Inmediatamente después, dispensamos 40 μ L de la muestra sobre los portaobjetos, los situamos en cámaras de humedad oscuras (Sigma-Aldrich) e incubamos durante 30 minutos a 16°C para permitir la adhesión de los hemocitos granulares a la superficie del portaobjetos. Los portaobjetos utilizados fueron previamente tratados con Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich P4707) para optimizar las condiciones de adhesión celular a la superficie del portaobjetos. Los hemocitos no adheridos fueron eliminados lavando suavemente las preparaciones tres veces antes de empezar la exposición experimental.



Figura 11. Cámaras de humedad oscuras (Sigma-Aldrich) utilizadas para realizar las incubaciones y las exposiciones de hemocitos.

Fuente: Elaboración propia.

2.5. Ensayo de fagocitosis

El ensayo de fagocitosis en hemocitos se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Avio *et al.* (2015) con ligeras modificaciones. Inmediatamente después de la obtención de las monocapas de hemocitos, las muestras se expusieron a diferentes tratamientos (tabla 3), añadiendo 40 μ L de la suspensión de trabajo. Las exposiciones se realizaron siempre en los portaobjetos ubicados en las cámaras de humedad, en oscuridad y a 16°C. Los tiempos de exposición a Hg, MPs y MPs+Hg siempre fueron de 30 minutos. Una vez transcurrido este periodo de exposición, las muestras se lavaron suavemente tres veces con FSW y se añadieron otros 40 μ L con biopartículas de zymosan A (Invitrogen) marcadas con fluoresceína a un ratio de 1:30 hemocitos:zymosan y se incubaron 30 minutos más. El número de hemocitos por mililitros de hemolinfa fue determinado previamente en 30 individuos mediante examen microscópico con un hemocitómetro (cámara de conteo de *Improved Neubauer*).

Tras la incubación con zymosan, las partículas no internalizadas se eliminaron lavando tres veces con FSW. Posteriormente, las muestras se fijaron aplicando el reactivo Beker's durante 20 minutos (+2.5% NaCl), se enjuagaron con agua destilada y se tiñeron con la solución Giemsa (3% en agua destilada) durante 8 minutos. A continuación, las muestras se enjuagaron en agua destilada, se secaron (figura 10) y, finalmente, se montaron con medio de montaje para sustitutos de xileno DC (Panreac).

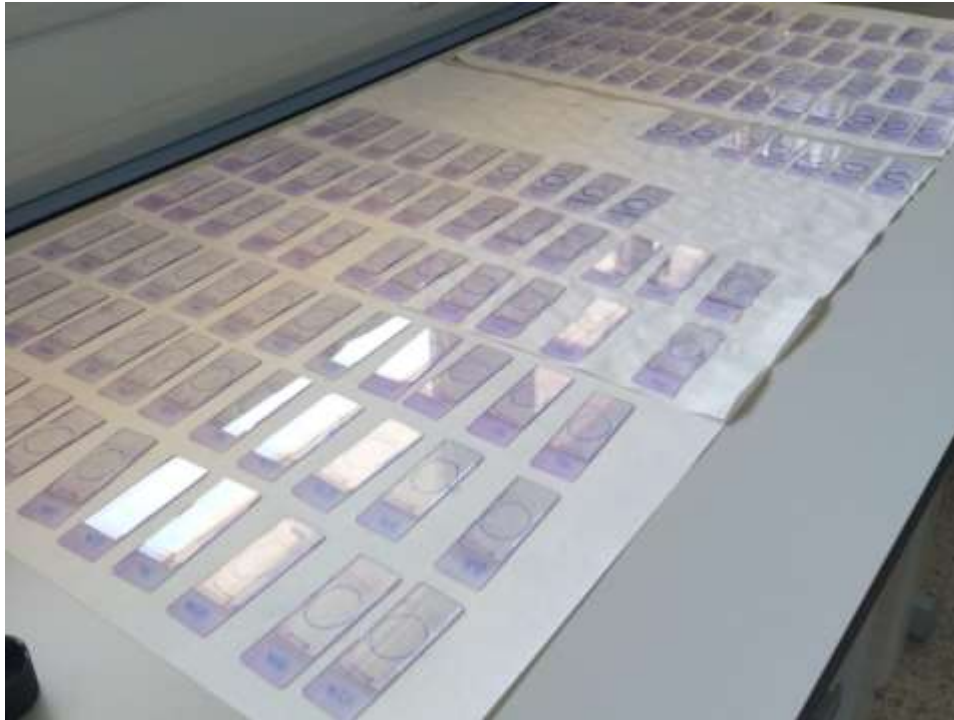


Figura 12. Muestras secándose tras su tinción con Giemsa previo al montaje de las mismas. Fuente: Elaboración propia.

Se realizaron un total de 6 experimentos de exposición independientes y con diferentes niveles de tratamiento:

Tabla 3. Experimentos realizados con sus respectivos niveles de tratamiento (n= número de organismos analizados). Se indican las concentraciones nominales de HgCl_2 ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y de MPs ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Experimentos			Tratamientos				
	Tratamiento 1 (Control)		Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
1	n	11	11	11	11	11	11
	FSW		HgCl ₂ (10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹)	HgCl ₂ (10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹)	HgCl ₂ (10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹)	HgCl ₂ (10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹)	HgCl ₂ (10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹)
	Tratamiento 1 (Control)		Tratamiento 2		Tratamiento 3		
2	n	12	12		12		
	FSW		MPP 635 XF 1 µg·mL ⁻¹		MPP 635 XF 100 µg·mL ⁻¹		
3	n	31	15		16		
	FSW		AQUAMATTE 26HD 1 µg·mL ⁻¹		AQUAMATTE 26HD 100 µg·mL ⁻¹		
4	n	26	13		15		
	FSW		AQUATEX 325 1 µg·mL ⁻¹		AQUATEX 325 100 µg·mL ⁻¹		
	Tratamiento 1 (Control)		Tratamiento 2	Tratamiento 3		Tratamiento 4	
5	n	16	16	16		16	
	FSW		MPP 635 XF 1 µg·mL ⁻¹ HgCl ₂ (10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹)	AQUAMATTE 26HD 1 µg·mL ⁻¹ HgCl ₂ (10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹)		AQUATEX 325 1 µg·mL ⁻¹ HgCl ₂ (10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹)	
6	n	15	15	15		15	
	FSW		MPP 635 XF 100 µg·mL ⁻¹ HgCl ₂ (10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹)	AQUAMATTE 26HD 100 µg·mL ⁻¹ HgCl ₂ (10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹)		AQUATEX 325 100 µg·mL ⁻¹ HgCl ₂ (10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹)	

Fuente: Elaboración propia.

La actividad fagocítica se evaluó independientemente en cada muestra cuantificando el número de células que internalizaron 3 o más partículas fluorescentes (eficacia fagocítica), así como el número total de células con al menos una partícula fluorescente fagocitada (capacidad fagocítica) (figura 13a y 13b) (Beaudry *et al.*, 2016). Las muestras fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia con un aumento de x400 (Olympus BX43). La eficacia fagocítica (EF) así como la capacidad fagocítica (CF) de cada muestra se expresaron como porcentajes (%) del número de células examinadas por muestra ($n \geq 300$).

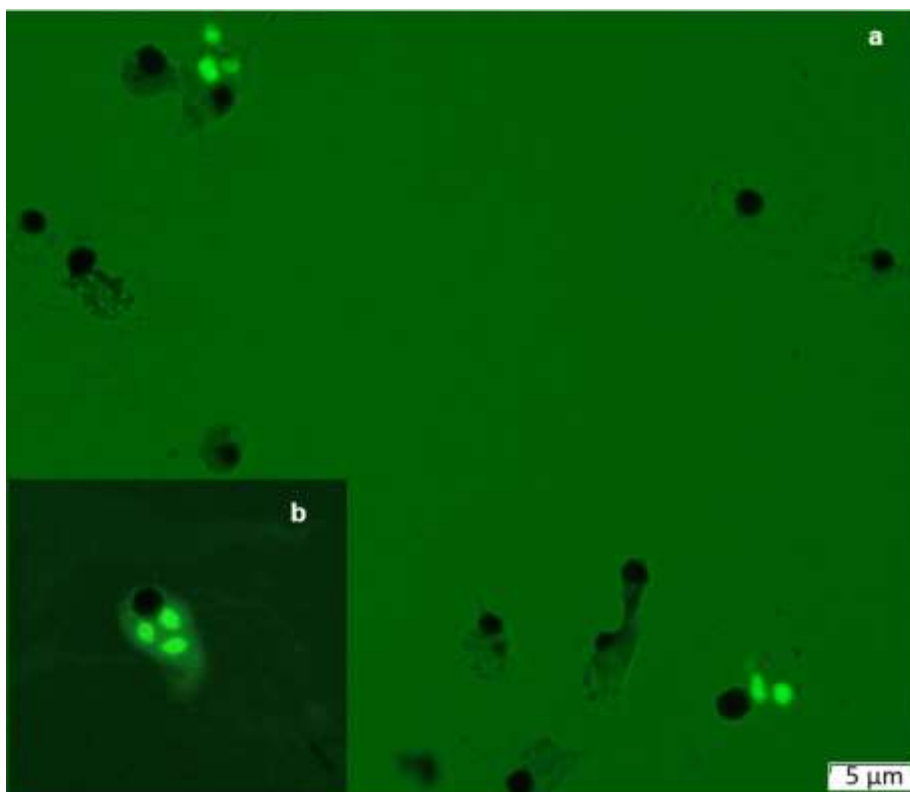


Figura 13. (a) Hemocitos granulares del mejillón observados al microscopio de fluorescencia tras la realización del ensayo de fagocitosis. (b) Hemocito con tres partículas de zymosan internalizadas (célula positiva). Fuente: Elaboración propia.

2.6. Gestión de datos y análisis estadístico

Los datos de fagocitosis (expresados como %CF y %EF) fueron transformados (arcoseno ($\sqrt{(\%EF/100)}$)), con el fin de mejorar los requerimientos de normalidad y homogeneidad en las varianzas necesarios para los análisis paramétricos. Para cada conjunto de datos se verificó la normalidad de la distribución utilizando la prueba de Shapiro-Wilks (recomendada cuando $n < 30$) o la prueba de Kolmogorov-Smirnov (recomendada cuando $n \geq 30$). Posteriormente, se determinó la homogeneidad de las varianzas utilizando la prueba de Levene. Para cada conjunto de datos, se compararon las medias de los diferentes tratamientos aplicando el análisis de varianzas (ANOVA) de un factor. Cuando se detectaron diferencias significativas entre las medias, se aplicaron pruebas de rango post-hoc para determinar entre qué medias se producían tales diferencias. La prueba de Tukey se aplicó para comparar todos los tratamientos entre sí, mientras que la de Dunnett se utilizó para detectar diferencias entre cada tratamiento respecto al tratamiento *Control* en cada experimento. Las comparaciones entre dos tratamientos se hicieron utilizando la prueba de *t de Student* para dos muestras independientes. El nivel de significación en todos los análisis fue fijado en 5%. Todos los análisis estadísticos mencionados y las representaciones gráficas de la CF y EF, obtenidos en cada experimento, se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics v23.0 para Windows (IBM®, EE. UU.).

Los datos del número de partículas plásticas por mililitro (pp/mL) y del tamaño de éstas (cuantificadas como percentil 90 del diámetro) en las suspensiones de MPs (MPP 635 XF, AQUAMATTE 26 HD y AQUATEX 325) preparadas a 1 y 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y cuantificadas en el MSIII utilizando diferentes diluciones, se usaron para calcular funciones de regresión (software Microsoft® Excel v16.0 para Windows, EE.UU.). La tendencia de cada función de regresión se seleccionó atendiendo al coeficiente de determinación más alto (R^2). Posteriormente, éstas funciones se ajustaron utilizando datos individuales (pp/mL y factor de dilución) de las suspensiones de MPs utilizadas en los experimentos de exposición. Por último, se estimó el número de partículas en las suspensiones de trabajo sin diluir. Las representaciones gráficas se realizaron con el software R v3.5.3. para Windows (R Core Team, Austria).

La concentración a la cual se inhibe el 50% de la CF y EF (IC_{50}) de los hemocitos expuestos al tóxico (HgCl_2) se estimó mediante extrapolación gráfica a partir de una regresión lineal, utilizando para ello el software Microsoft® Excel v16.0 para Windows (Microsoft®, EE.UU.). Los resultados se indican como la media $\pm$ error estándar de la media.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto del Hg extracelular sobre la actividad fagocítica de hemocitos

La actividad fagocítica de los hemocitos de mejillón (expresada como CF y EF) se redujo de manera significativa en las muestras expuestas a concentraciones de HgCl_2 extracelular $\geq 10^{-6}$ M (ANOVA p-valor = 0,00; test de Tukey, p-valor < 0,05; test de Dunnet, p-valor = 0,00) (figura 14). También se observó un ligero aumento de la actividad fagocítica con respecto a la muestra *Control* en los hemocitos expuestos a concentraciones de Hg de 10^{-9} M, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo (figura 14). Estos resultados sugieren un efecto hormético del Hg sobre la actividad fagocítica caracterizado por una estimulación de la CF y EF a dosis bajas de Hg ($<10^{-7}$ M y 10^{-8} M, respectivamente) y una inhibición a dosis más altas ($\geq 10^{-6}$ M). Duchemin *et al.* (2008) y Rault *et al.* (2013) también observaron fenómenos de hormesis similares en sus estudios (estudios *in vitro* de fagocitosis realizados con hemocitos de mejillón expuestos a diferentes concentraciones de Hg), apoyando así los resultados del presente trabajo y explicando el modo de acción del Hg sobre la actividad fagocítica.

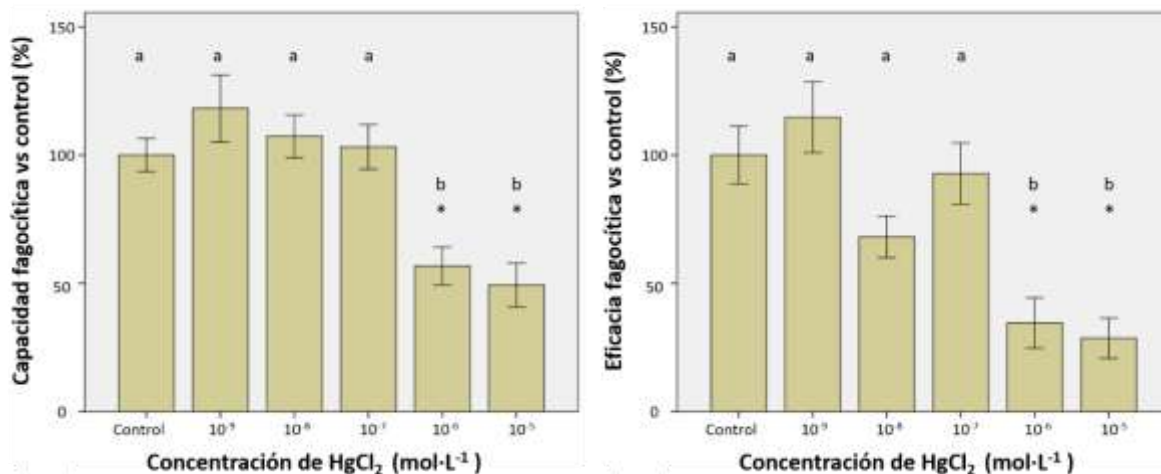


Figura 14. Resultados (media $\pm$ error estándar) de la capacidad fagocítica (al menos una partícula) y de la eficacia fagocítica (al menos tres partículas) de hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) expuestos *in vitro* a cinco concentraciones diferentes de HgCl_2 . Los resultados se expresan con referencia a su muestra *Control* (n=11). Las letras indican subconjuntos homogéneos (ANOVA, test de Tukey; p-valor < 0,05). Los asteriscos indican diferencias significativas con el tratamiento *Control* (ANOVA, test de Dunnet; p-valor < 0,05).

A la vista de los resultados obtenidos, se determinó la concentración 10^{-7} M de HgCl_2 como la concentración crítica de mercurio (CC-Hg) en nuestro estudio, y se seleccionó una concentración nominal de HgCl_2 de 10^{-8} M para realizar los experimentos de exposición. Estudios previos similares, realizados con hemocitos de mejillón, han encontrado que una concentración de HgCl_2 de 10^{-8} M provoca una actividad fagocítica máxima antes de la fase de inhibición, apoyando nuestras observaciones y las condiciones de concentración de Hg seleccionada en el presente trabajo (Duchemin *et al.*, 2008; Rault *et al.*, 2013).

La IC_{50} de nuestros experimentos (concentración de HgCl_2 a la cual se inhibe el 50% de la actividad fagocítica de los hemocitos) resultó $9,2 \cdot 10^{-5}$ M para la CF, y $8,2 \cdot 10^{-6}$ M para la EF, siendo similar a la hallada por otros autores (Sauvé *et al.*, 2002; Rault *et al.*, 2013).

La CF en los diferentes tratamientos varió desde 14,2% hasta 36,0%, y la EF desde 3,3% hasta 14,2% (tabla 4). En general, los datos obtenidos en este experimento cumplieron la normalidad y la homogeneidad en las varianzas, justificándose los resultados obtenidos en los análisis paramétricos (Apartado 1 del Anexo IV).

Tabla 4. Porcentajes de capacidad fagocítica (%CF) y eficacia fagocítica (%EF) de hemocitos expuestos durante 30 minutos a diferentes concentraciones de Hg en el medio extracelular (media $\pm$ error estándar). En la columna de la derecha se indica la concentración de Hg en la solución de trabajo cuantificada el mismo día de la exposición.

Experimento 1					
Tratamientos	[HgCl_2] nominal ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	n	%EF	%CF	[HgCl_2] cuantificada ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
Tratamiento 1 (Control)	0	11	$12,9 \pm 1,5$	$31,8 \pm 2,1$	-
Tratamiento 2	10^{-9}	11	$14,2 \pm 2,0$	$36,0 \pm 3,1$	$6,5 \cdot 10^{-9}$
Tratamiento 3	10^{-8}	11	$8,7 \pm 1,4$	$33,4 \pm 2,7$	$2,4 \cdot 10^{-8}$
Tratamiento 4	10^{-7}	11	$11,9 \pm 1,8$	$31,9 \pm 2,5$	$4,0 \cdot 10^{-7}$
Tratamiento 5	10^{-6}	11	$3,9 \pm 0,7$	$17,3 \pm 2,0$	$9,7 \cdot 10^{-6}$
Tratamiento 6	10^{-5}	11	$3,3 \pm 0,8$	$14,2 \pm 1,7$	$3,3 \cdot 10^{-4}$

3.2. Caracterización de los MPs en las suspensiones de trabajo

Atendiendo a las funciones modelo obtenidas (figura 15), el número de micropartículas por mililitro en las suspensiones utilizadas en los experimentos de exposición variaron notablemente (hasta varios órdenes de magnitud) entre tipos de MPs y entre concentraciones empleadas (tabla 5, tabla S5 del Anexo III). Las menores (4.843 pp/mL) y mayores (2.459.279 pp/mL) concentraciones se encontraron en las suspensiones de MPP 635 XF de 1 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Por otro lado, para algunos MPs y concentraciones, se observó una dispersión de los resultados constante (por ejemplo: suspensión de MPP 635 XF de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) o creciente en relación con el factor de dilución (por ejemplo: suspensión de AQUATEX 325 de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Los experimentos de dilución de las suspensiones de MPs mostraron correlación positiva entre el número de micropartículas plásticas por mL y el factor de dilución empleado para su cuantificación en el MSIII. Estos resultados sugieren procesos de disgregación de las micropartículas en el agua de mar conforme aumenta el factor de dilución, y procesos de agregación a menor factor de dilución (figura 15). Aunque en todos los casos se observa un aumento del número de partículas por mL a mayor factor de dilución, los comportamientos variaron ligeramente entre tipos de MPs y entre concentraciones empleadas, observándose en la mayoría de los casos tendencias lineales, aunque también exponenciales y potenciales (figura 15). Por otro lado, el número de partículas por mL en todos los tipos de MPs fue generalmente menor a la concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que a la 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todas las funciones de regresión aplicadas para el cálculo del número de partículas plásticas por mL presentan un coeficiente de determinación (R^2) superior a 0,80 (figura 15).

Además, también se observó que el tamaño del diámetro de las partículas (cuantificado como P90D) fue menor ($<4\ \mu\text{m}$) en las suspensiones más diluidas (datos no mostrados), aunque los datos no permitieron la creación de funciones modelo al resultar los coeficiente de determinación en la mayoría de los casos $< 0,80$. La probable disgregación de las micropartículas de plástico en tamaños inferiores al límite de cuantificación del MSIII (1,4 μm) podría explicar esta ausencia de correlaciones significativas. En consecuencia, se consideró el P90D medio obtenido en las suspensiones más diluidas como valor próximo más cercano del existente en las suspensiones de trabajo (tabla 5).

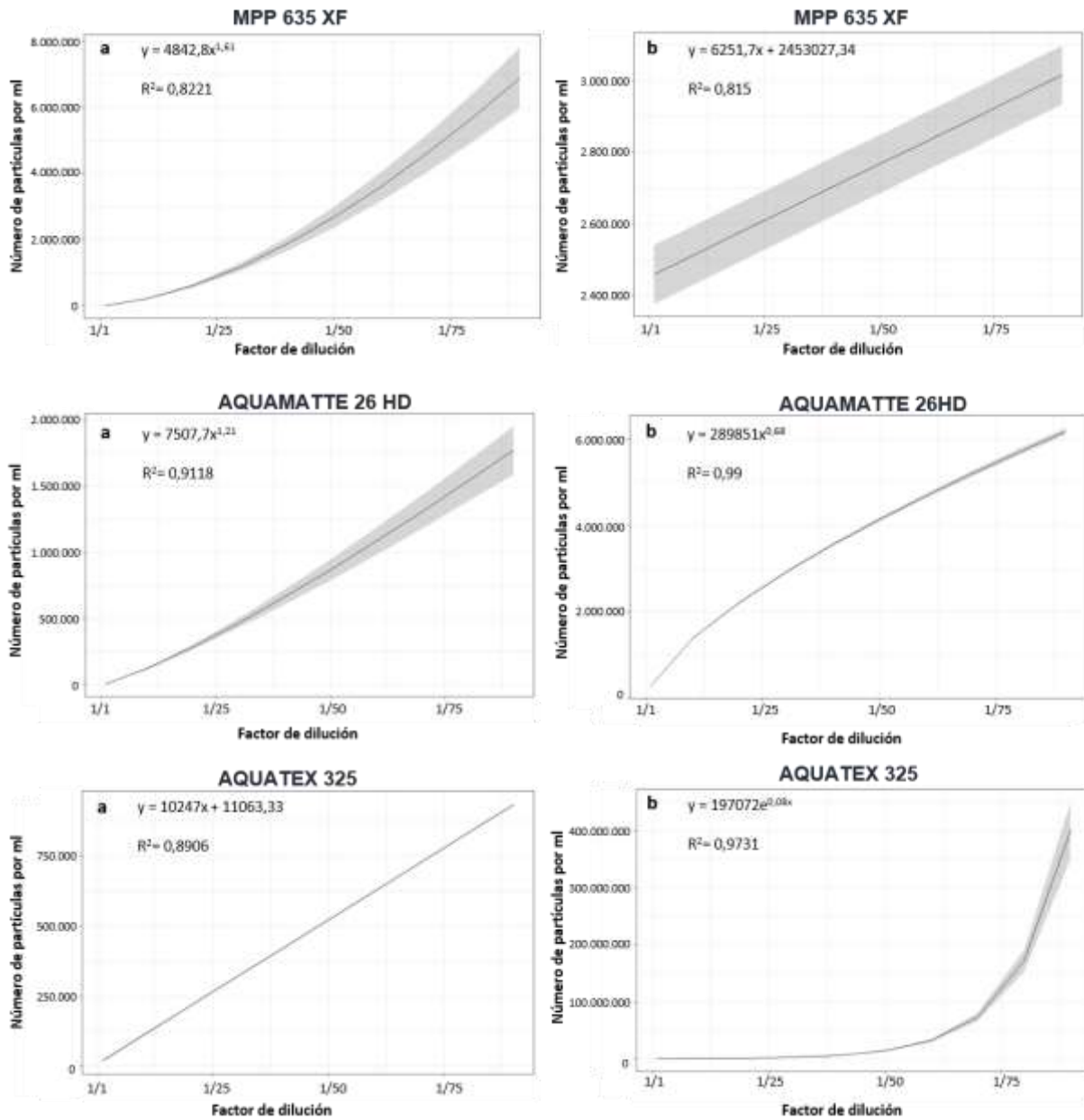


Figura 15. Funciones modelo del número de partículas por mL de agua de mar filtrada obtenidas mediante dilución de suspensiones de tres tipos de microplásticos preparados a dos concentraciones: 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (a) y 100 $\mu\cdot\text{mL}^{-1}$ (b). En cada gráfica se presenta una línea con su tendencia (línea negra) y su desviación estándar (sombreado gris). Las muestras se analizaron por triplicado de manera independiente utilizando un contador de partículas MSIII.

Tabla 5. Estimación del número de partículas plásticas por mL y tamaño (percentil 90 del diámetro de partícula= P90D) en las suspensiones de microplásticos de trabajo, usadas en los ensayos de exposición (media $\pm$ desviación estándar) (n=3) .

Suspensiones de trabajo	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Factor de dilución	Nº de partícula por mL	P90D (μm)
MPP 635 XF <i>Low</i>	1	1/1	4.843 $\pm$ 0	3,7 $\pm$ 0,1
MPP 635 XF <i>High</i>	100	1/1	2.459.279 $\pm$ 81.773	4,8 $\pm$ 0,1
AQUAMATTE 26HD <i>Low</i>	1	1/1	7.508 $\pm$ 0	3,3 $\pm$ 0,2
AQUAMATTE 26HD <i>High</i>	100	1/1	289.851 $\pm$ 0	4,7 $\pm$ 0,1
AQUATEX 325 <i>Low</i>	1	1/1	21.310 $\pm$ 3.335	3,3 $\pm$ 0,1
AQUATEX 325 <i>High</i>	100	1/1	213.486 $\pm$ 299	5,5 $\pm$ 0,1

Los resultados indican que a pesar de haber preparado suspensiones de los diferentes MPs a concentraciones en peso de MPs iguales, las condiciones de exposición resultaron muy diferentes en algunos de los casos. En las suspensiones *Low* de MPP 635 XF y AQUAMATTE 26HD el número de partículas resultó similar, pero fueron de un orden de magnitud menor a las suspensiones *Low* de AQUATEX 325 (tabla 5). Por otro lado, las suspensiones *High* de AQUAMATTE 26HD y AQUATEX 325 tuvieron un número casi igual de partículas por mL, mientras que las suspensiones *High* de MPP 635 XF fueron de un orden de magnitud mayor a las anteriores (tabla 5). En relación al tamaño de las partículas, éstas fueron bastante similares entre las suspensiones de trabajo y el percentil 90 del diámetro de partícula resultó inferior al valor medio indicado por el proveedor, con particular referencia al microplástico AQUATEX 325 (Tabla 2 y 5).

En la mayoría de estudios de exposición de MPs a invertebrados marinos publicados hasta la fecha, la caracterización de los MPs utilizados es limitada y se basa en concentraciones nominales de las suspensiones empleadas y/o su tamaño medio, bien cuantificado mediante observaciones microscópicas o proporcionado previamente por el proveedor (Von Moos, Burkhardt-Holm y Köhler, 2012; Avio *et al.*, 2015; Beiras *et al.*, 2018a; Oliveira *et al.*, 2018). En otros estudios realizados con micro y nanopartículas, el tamaño de éstas en las suspensiones de trabajo se ha cuantificado mediante microscopía electrónica de transmisión y la carga potencial de las partículas mediante espectroscopía de dispersión dinámica de luz (DLS, "Dynamic light Scattering") (Canesi *et al.*, 2015; Oliviero *et al.*, 2019).

Recientemente, el uso del contador de partículas como herramienta para caracterizar las suspensiones de MPs ha sido referenciado en varios estudios (Beiras, Tato y López-Ibáñez, 2018b; Fernández y Albentosa, 2019; Oliviero *et al.*, 2019). Sin embargo y hasta la fecha, este es el primer estudio de exposición a partículas de MPs realizados con invertebrados marinos donde se ha caracterizado cuantitativamente el número de MPs por mL en el medio de exposición.

3.3. Efecto de los MPs extracelulares sobre la eficacia fagocítica de hemocitos

La eficacia fagocítica (EF) de los hemocitos de mejillón expuestos a diferentes tipos de MPs y a dos concentraciones de trabajo *Low* ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y *High* ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) no fue estadísticamente diferente a la de los tratamientos *Control* en ningún caso (ANOVA; test de Dunnett, p-valor > 0,05) (figuras 16).

En la exposición a MPP 635 XF los hemocitos mostraron un aumento en su EF con relación al control y proporcional a la concentración de las suspensiones, mientras que en las exposiciones a AQUAMATTE 26HD y AQUATEX 325 se observa un aumento en la EF a la concentración *Low* y una disminución en la EF a la concentración *High* con respecto al control. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas como refleja el análisis estadístico. Sólo en el caso de la exposición al microplástico AQUAMATTE 26 HD se observaron diferencias significativas de la EF entre las concentraciones de exposición *Low* e *High* (ANOVA; test de Tukey, p-valor < 0,05), mostrándose la presencia de dos subconjuntos diferenciados: a) tratamiento *Control* y *Low* y b) tratamiento *Control* y *High*.

Las EF en los diferentes tratamientos con MPs varió desde 2,5% hasta 6,1% (tabla 6). En general, los datos obtenidos en este experimento cumplieron la normalidad y la homogeneidad en las varianzas, justificándose los resultados obtenidos en los análisis paramétricos (Apartado 2 del Anexo IV).

Tabla 6. Porcentaje de eficacia fagocítica (%EF) (media $\pm$ error estándar) en hemocitos expuestos durante 30 minutos a diferentes concentraciones y tipos de MPs de PE.

Experimento 2				
Tratamientos			n	%EF
Tratamiento 1	<i>Control</i>	FSW	12	2,7 $\pm$ 0,7
Tratamiento 2	<i>Low</i>	MPP 635 XF 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12	2,5 $\pm$ 0,6
Tratamiento 3	<i>High</i>	MPP 635 XF 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12	2,7 $\pm$ 0,9
Experimento 3				
Tratamientos			n	%EF
Tratamiento 1	<i>Control</i>	FSW	31	4,9 $\pm$ 0,5
Tratamiento 2	<i>Low</i>	AQUAMATTE 26HD 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	15	3,6 $\pm$ 0,7
Tratamiento 3	<i>High</i>	AQUAMATTE 26HD 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	16	6,1 $\pm$ 0,6
Experimento 4				
Tratamientos			n	%EF
Tratamiento 1	<i>Control</i>	FSW	26	4,9 $\pm$ 0,7
Tratamiento 2	<i>Low</i>	AQUATEX 325 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	13	6,0 $\pm$ 1,0
Tratamiento 3	<i>High</i>	AQUATEX 325 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	15	4,6 $\pm$ 0,5

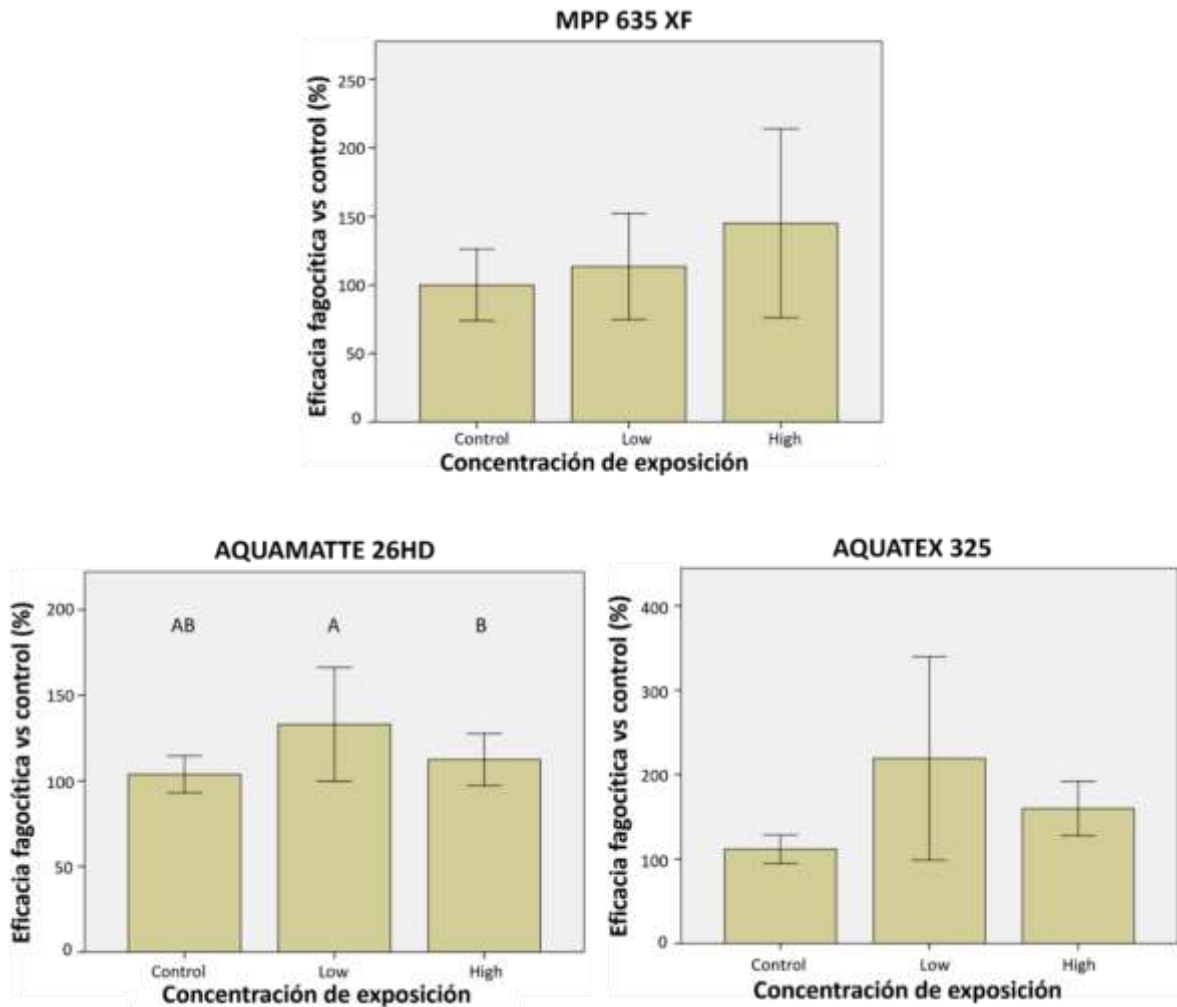


Figura 16. Eficacia fagocítica relativa al control (media $\pm$ error estándar) en hemocitos de mejillón, tras su exposición *in vitro* a tres tipos de MPs de PE a dos concentraciones (*Low* ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y *High* ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)), suspendidos en agua de mar filtrada (FSW), y a sus respectivos tratamientos *Control* (FSW). Las letras mayúsculas indican subconjuntos homogéneos (ANOVA, test de Tukey, p -valor $< 0,05$).

Atendiendo a los resultados obtenidos no se muestran evidencias significativas de que los MPs de PE causen efectos inhibitorios sobre la EF en hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) a ninguna de las concentraciones ensayadas (1 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se observa una tendencia a la estimulación de la EF, particularmente a bajas concentraciones ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), apuntando a una posible inducción de la fagocitosis, aunque como se dijo anteriormente, no fue posible demostrarlo estadísticamente. En un estudio realizado por Canesi *et al.* (2015) se observó una disminución de la actividad fagocítica dependiente de las dosis ($1,5$ y $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en hemocitos de mejillón

expuestos a nanopartículas de poliestireno amino modificadas. En otros estudios previos también se han observado diferentes efectos tóxicos en mejillones y otros organismos marinos expuestos a diferentes tipos de MPs (Besseling *et al.*, 2012; Von Moos, Burkhardt-Holm y Köhler, 2012; Jeong *et al.*, 2017).

Un estudio de laboratorio publicado recientemente, demostró que la ingesta de microplásticos MPP 635 XF (el mismo que el usado en el presente estudio) por parte del mejillón desde la columna de agua se correlaciona positivamente con la concentración del MPs en esta matriz, y que los MPs más pequeños (2-4 μm) son eliminados del organismo con menor eficiencia que los de mayor tamaño (> 10 μm) (Fernández y Albentosa, 2019). La información ambiental disponible sobre concentraciones de MPs en el agua de mar y tejidos de mejillón es limitada, y está referida a tamaños de partículas mayores (>6 μm), que los del presente trabajo (P90D<6 μm), por lo que los estudios existentes son difícilmente comparables (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015; Karlsson *et al.*, 2017; Barboza *et al.*, 2018b). Las concentraciones de MPs ensayadas en nuestros estudios se pueden considerar *a priori* no relevantes ambientalmente (mínimo observado en este trabajo > 4.000 pp/mL), aunque hay que considerar que hasta la fecha, se desconoce el número de MPs de tamaño < 8 μm acumuladas por organismos filtradores procedentes de poblaciones naturales.

3.4. Efecto del Hg en presencia de MPs extracelulares sobre la eficacia fagocítica de hemocitos

Por razones logísticas la exposición de hemocitos a MPs y Hg se realizó en dos experimentos: en el primer experimento se utilizaron las suspensiones de MPs de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparadas en agua de mar contaminada con Hg y en el segundo experimento las suspensiones de MPs de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparadas en agua de mar contaminada con Hg. Los resultados de EF obtenidos en los tratamientos *Control* de estos dos experimentos fueron similares (test *t* de la media, p-valor = 0,327) y, por lo tanto, se consideró un único tratamiento *Control* en los posteriores análisis estadísticos de diferencias entre medias (figura 17).

La eficacia fagocítica (EF) en hemocitos expuestos a las mayores concentraciones de MPs (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) suspendidos en agua contaminada con Hg ($\text{HgCl}_2 = 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) fue significativamente inferior a la de los tratamientos *Control* en los tres tipos de MPs (ANOVA; test de Dunnett, p-valor < 0,05) (figura 17). A la vista de éstos resultados, se deduce un claro efecto inhibitorio de la actividad fagocítica (EF) en las muestras expuestas a suspensiones de MPs con concentraciones superiores a 200.000 pp/mL en

el medio extracelular, como consecuencia de la presencia simultánea de Hg y MPs. Sin embargo, este efecto inhibitorio no fue evidente en las suspensiones de MPs con concentraciones inferiores a 200.000 partículas por mL.

A pesar de que las condiciones de exposición en cuanto a concentración de Hg y el número de partículas plásticas por mL fueron similares en los tratamientos *High*+Hg de los MPs tipo AQUAMATTE 26HD y AQUATEX 325 (tabla 5 y 7), se observó una mayor inhibición de la eficacia fagocítica en el tipo AQUAMATTE 26HD (superficie oxidada y modificada) con respecto al control. Los resultados sugieren además de la dosis de exposición a MPs, la funcionalidad y/o carga de la superficie de la micropartícula puede jugar un papel importante en el proceso de toxicidad. En este estudio, y como se mencionó en la sección de material y métodos, el tipo de oxidación y modificación de los MPs no fueron proporcionados por el proveedor ni fueron analizados en el presente estudio. Existen evidencias de que las micropartículas plásticas con cargas catiónicas tienen efectos más adversos que las micropartículas con cargas aniónicas (Liu *et al.*, 2011; Della Torre *et al.*, 2014; Fleischer y Payne, 2014). Se ha postulado que las micropartículas con superficies catiónicas permiten interactuar más fácilmente con la membrana celular debido a que su estructura molecular es más similar a la de las proteínas, y por lo tanto, se promueve su captación al interior celular (Nel *et al.*, 2009).

De manera similar a lo observado en las exposiciones a MPs sin Hg, en el caso del microplástico MPP 635 XF, se encontró además un aumento significativo de la EF en las muestras expuestas a concentraciones de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del microplástico en presencia de Hg (ANOVA; test de Dunnett, p-valor = 0,00) (figura 17). Este resultado sugiere un efecto hormético de la concentración de Hg sobre la EF relacionado con la presencia de MPs ($< 5.000 \text{ pp/mL}$) en el medio extracelular.

En estudios previos *in vivo* ya se han analizado los efectos tóxicos de la exposición binaria de MPs y Hg, respecto a la acción individualizada de cada contaminante, sobre diferentes organismos acuáticos; Barboza, Vieira y Guilherme (2018c) y Barboza *et al.* (2018b) en la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y Oliveira *et al.* (2018) en el bivalvo de agua dulce *Corbicula fluminea* son algunos ejemplos. Los resultados de los estudios mencionados anteriormente mostraron diferentes interacciones toxicológicas entre los MPs y el Hg en *Corbicula fluminea*, y demostraron la capacidad de éste metal para adsorberse a la superficie de MPs, apoyando los resultados de este estudio. Además, también se encontraron efectos negativos causados por los MPs *per se* sobre la capacidad de natación en *D. labrax*.

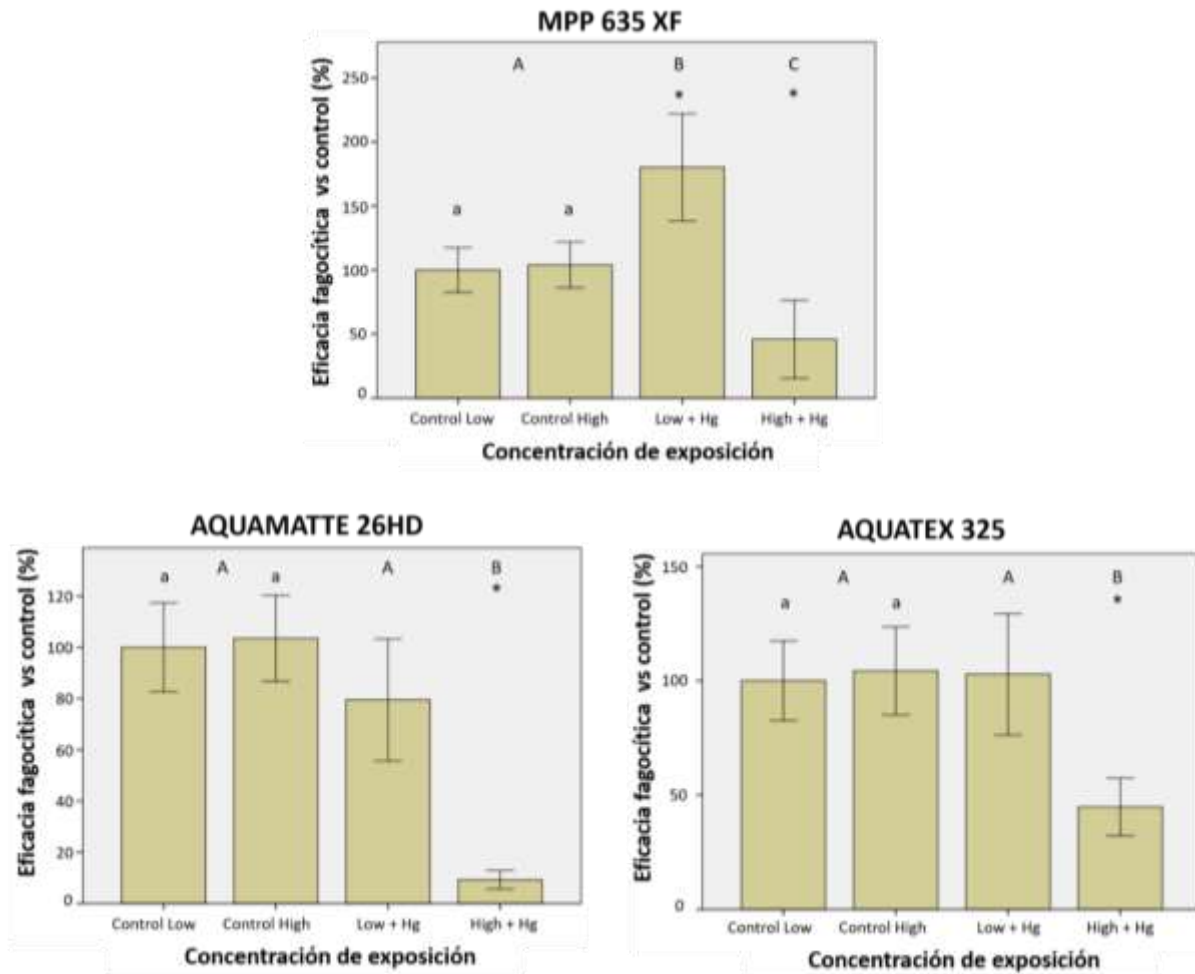


Figura 17. Eficacia fagocítica relativa al control (media $\pm$ error estándar) en hemocitos de mejillón, tras su exposición *in vitro* a tres tipos de MPs de PE a dos concentraciones (*Low* ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y *High* ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)), suspendidos en una solución de HgCl_2 (a CC-Hg), y a sus respectivos tratamientos *Control* (FSW). Las letras indican subconjuntos homogéneos (ANOVA, test de Tukey, p -valor $< 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas con el tratamiento *Control* (ANOVA; test de Dunnet, p -valor $< 0,05$).

La EF en hemocitos expuestos a los diferentes tratamientos con MPs y Hg varió desde 0,1% hasta 2,6% (tabla 7). En general, los datos obtenidos en estos experimentos cumplieron una distribución normal y la homogeneidad en las varianzas, justificándose los resultados obtenidos en los análisis paramétricos (Apartado 3 del Anexo IV).

Tabla 7. Porcentaje de eficacia fagocítica (%EF) (media $\pm$ error estándar) en hemocitos expuestos durante 30 minutos a diferentes concentraciones y tipos de microplásticos (MPs) en presencia de Hg extracelular a concentraciones 10^{-8} M.

Experimento 5						
Tratamientos		MPs ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[HgCl ₂] nominal ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	n	%EF	[HgCl ₂] cuantificada ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Tratamiento 1	Control Low	-	0	16	$1,8 \pm 0,2$	-
Tratamiento 2	Low + Hg	MPP 635XF	10^{-8}	16	$2,6 \pm 0,4$	$2,0\cdot 10^{-8} \pm 1,2\cdot 10^{-10}$
Tratamiento 3	Low + Hg	AQUAMATTE 26HD	10^{-8}	16	$1,2 \pm 0,2$	$2,2\cdot 10^{-8} \pm 1,6\cdot 10^{-9}$
Tratamiento 4	Low + Hg	AQUATEX 325	10^{-8}	16	$1,5 \pm 0,3$	$4,7\cdot 10^{-8} \pm 4,6\cdot 10^{-9}$
Experimento 6						
Tratamientos		MPs ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[HgCl ₂] nominal ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	n	%EF	[HgCl ₂] cuantificada ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Tratamiento 1	Control High	-	0	15	$1,1 \pm 0,7$	-
Tratamiento 2	High + Hg	MPP 635XF	10^{-8}	15	$0,4 \pm 0,2$	$4,6\cdot 10^{-8} \pm 2,6\cdot 10^{-9}$
Tratamiento 3	High + Hg	AQUAMATTE 26HD	10^{-8}	15	$0,1 \pm 0,0$	$5,8\cdot 10^{-8} \pm 1,3\cdot 10^{-9}$
Tratamiento 4	High + Hg	AQUATEX 325	10^{-8}	15	$0,4 \pm 0,1$	$7,3\cdot 10^{-8} \pm 1,5\cdot 10^{-9}$

Para explicar el modo de acción por el cual la presencia simultánea de Hg y MPs en el medio extracelular disminuye la concentración necesaria de Hg individual capaz de inhibir la EF de manera significativa, es necesario un conocimiento exhaustivo de los procesos celulares implicados en la fagocitosis de los MPs, y en la cinética de adsorción y desorción del Hg a la superficie de los MPs utilizados. El aumento de la EF a bajas concentraciones (< 200.000 pp/mL) de MPs observada en este estudio, a pesar de no haber resultado significativa estadísticamente, apunta a una estimulación del sistema inmune innato de los mejillones. Las concentraciones de Hg en las suspensiones de MPs cuantificadas inmediatamente tras su uso, mostraron valores estables (cercaos al nominal), aunque se observó una tendencia relacionada con el número de partículas por mL estimado en la suspensión de trabajo, con mayores concentraciones de Hg total en las suspensiones preparadas a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que en las preparadas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (tabla 7). Estas observaciones apuntan a un enriquecimiento de Hg en la superficie de las partículas, que debiera ser confirmado en posteriores trabajos.

Se ha demostrado en estudios previos que el Hg^{+2} es capaz de aumentar el pH intralisosomal generando una mayor fluidez (y fragilidad) de la membrana lisosomal (Viarengo *et al.*, 2000), bien interaccionando con la bomba de protones de su membrana o induciendo la peroxidación lipídica (Canesi *et al.*, 2015). También se ha demostrado que el Hg^{+2} aumenta el Ca^{+2} citosólico, lo cual puede desencadenar una desestabilización de la membrana lisosomal via activación de la fosfolipasa A2 dependiente de calcio (Canesi *et al.*, 2015). El efecto inhibitorio de la fagocitosis observado a concentraciones de Hg de $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en presencia de MPs de PE (3-6 μm) a concentraciones $> 200.000 \text{ pp/mL}$ en el medio extracelular, podría explicarse por un mayor transporte de Hg hacia el interior de la célula como consecuencia del secuestro de las micropartículas en el interior celular y de los lisosomas (efecto caballo de troya), aunque son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

5. CONCLUSIONES

La presente investigación confirma la hipótesis originalmente planteada de que la presencia simultánea en el medio extracelular de Hg y MPs de PE aumenta la toxicidad asociada al Hg de manera individual, afectando a la eficacia fagocítica en hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*).

Otras conclusiones se obtienen del presente estudio:

- Concentraciones de Hg extracelulares iguales o superiores a 10^{-6} M causan efectos inhibitorios significativos sobre la eficacia fagocítica en hemocitos de mejillón.
- El comportamiento de disgregación/agregación de los MPs de PE en agua de mar observado en este trabajo, así como las diferencias encontradas en el número de partículas por mL entre tipos de MPs, preparados a la misma concentración nominal, indica la necesidad y la importancia de cuantificar este parámetro a la hora de poder valorar los resultados de toxicidad y realizar comparaciones.
- La presencia de MPs de PE (3-6 μm) en el medio extracelular y a concentraciones entre 4.000 y 2.000.000 pp/mL no causa efectos significativos sobre la eficacia fagocítica en hemocitos de mejillón. En cualquier caso, y a la vista de los resultados obtenidos en el estudio, parece probable asumir que la exposición a MPs *per se* de PE con tamaños entre 3-6 μm no suponen un riesgo para la actividad fagocítica.
- La presencia simultánea de Hg a concentraciones $<10^{-8}$ M y MPs de PE a concentraciones extracelulares superiores a 200.000 pp/mL pueden causar efectos sinérgicos negativos en la eficacia fagocítica en hemocitos de mejillón. Sin embargo, la variabilidad en la toxicidad parece estar asociada también a otros factores tales como la funcionalidad y/o carga de la superficie de la micropartículas plásticas.

5.1. Líneas futuras

Los resultados obtenidos en el presente estudio han de ser validados con exposiciones *in vivo* de los organismos. La cuantificación de número de MPs (pp/mL) en muestras de hemolinfa obtenidas en experimentos de exposición *in vivo* resultará de especial interés para establecer la relevancia ambiental de los resultados obtenidos en este estudio.

Para explicar el modo de acción por el cual el efecto sinérgico de Hg y MPs de PE en el medio extracelular aumenta la toxicidad del Hg con respecto a la presencia individual de Hg, es necesario un conocimiento exhaustivo de los procesos celulares implicados en la fagocitosis de los MPs, así como de la cinética de absorción y desorción del Hg a la superficie de los MPs empleados. Para ello, serán necesarios realizar estudios de cinética de absorción/desorción a distintas concentraciones de partículas junto con estudios de bioacumulación y translocación de MPs en hemolinfa de mejillones.

La visualización microscópica de MPs en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* a distintas concentraciones de MPs ayudará a demostrar los procesos de disgregación/agregación de las micropartículas como consecuencia del comportamiento derivado de su tamaño (movimientos coloidales) y las propiedades fisicoquímicas de éstas en agua de mar (por ejemplo: ionización). La caracterización de la carga de superficie de las partículas microplásticas usadas en los ensayos de exposición será necesaria para valorar y comparar resultados con diferentes tipos de microplásticos.

En vista a los resultados obtenidos, también sería conveniente profundizar en la evaluación de potenciales efectos sobre el sistema inmune de bivalvos, valorando la liberación extracelular de enzimas lisosomales o la producción de oxi-radicales extracelulares, tanto en presencia de diferentes tipos de MPs como de mezclas binarias con otros contaminantes modelo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abayomi, O. A., Range, P., Al-Ghouthi, M. A., Obbard, J. P., Almeer, S. H., y Ben-Hamadou, R. (2017) "Microplastics in coastal environments of the Arabian Gulf", *Mar. Pollut. Bull.*, 124(1), pp. 181–188.

Albentosa, M., Sánchez-Hernández, M., Campillo, J. A., y Moyano, F. J. (2012) "Relationship between physiological measurements (SFG-scope for growth-) and the functionality of the digestive gland in *Mytilus galloprovincialis*", *Comp. Biochem. Physiol. A.Mol. Integr. Physiol.*, 163 (3–4), pp. 286–295.

Ashton, K., Holmes, L. y Turner, A. (2010) "Association of metals with plastic production pellets in the marine environment", *Marine Pollution Bulletin*, 60 (11), pp. 2050-2055.

Auta, H. S., Emenike, C. U., y Fauziah, S. H. (2017) "Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions", *Environment international*, 102, pp. 165-176.

Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., ... y Regoli, F. (2015) "Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels", *Environmental Pollution*, 198, pp. 211-222.

Avio, CG, Gorbi, S. y Regoli, F. (2016) "Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat", *Mar. Environ. Res.*, 128 , pp. 2-11

Barboza, L.G.A. y Gimenez, B.C.G. (2015) "Microplastics in the marine environment: Current trends and future perspectives", *Marine Pollution Bulletin*, 97, pp. 5-12.

Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., Branco, V., Carvalho, C., y Guilhermino, L. (2018a) "Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver, and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles", *Scientific reports*, 8(1), p. 15655.

Barboza, L.G.A, Vieira, L. R., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., y Guilhermino, L. (2018b) "Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)", *Aquatic Toxicology*, 195, pp. 49-57.

Barboza, L.G.A., Vieira, L.R. y Guilhermino, L. (2018c) "Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time", *Environmental Pollution*, 236, pp. 1014-1019.

Beaudry, A., Fortier, M., Masson, S., Auffret, M., Brousseau, P., y Fournier, M. (2016) "Effect of temperature on immunocompetence of the blue mussel (*Mytilus edulis*)", *Journal of xenobiotics*, 6(1).

Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Cousin, X., Engwall, M., ... y López-Ibáñez, S. (2018a) "Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton". *Journal of hazardous materials*, 360, pp. 452-460.

Beiras, R., Tato, T., y López-Ibáñez, S. (2018b) "A 2-Tier standard method to test the toxicity of microplastics in marine water using *Paracentrotus lividus* and *Acartia clausi* larvae", *Environmental toxicology and chemistry*, 38(3), pp. 630-637.

Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E. M., Van Den Heuvel-Greve, M. J., y Koelmans, A. A (2012) "Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.)", *Environmental science & technology*, 47(1), pp. 593-600.

Branco, V., Branco, V., Caito, S., Farina, M., Teixeira da Rocha, J., Aschner, M., y Carvalho, C. (2017) "Biomarkers of mercury toxicity: past, present and future trends", *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, 20, pp. 119-154.

Bråte, I. L. N., Hurley, R., Iversen, K., Beyer, J., Thomas, K. V., Steindal, C. C., ... y Lusher, A. (2018) "*Mytilus* spp. as sentinels for monitoring microplastic pollution in Norwegian coastal waters: A qualitative and quantitative study" *Environmental Pollution*, 243, pp. 383-393.

Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., y Thompson, R. C. (2008) "Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.)", *Environmental science & technology*, 42(13), pp. 5026-5031.

Burgos-Aceves, M. A., y Faggio, C. (2017) "An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: physiology and molecular aspects", *Fish & shellfish immunology*, 67, pp. 513-517.

Boudou, A. y Ribeyre, F. (1997) "Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels", *Environmental Health Perspect*, 105 (1), pp. 21-35.

Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M. P., Dawson, K. A., Papa, S., ... y Corsi, I. (2015) "Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*", *Marine environmental research*, 111, pp. 34-40.

Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., y Gallo, G. (2012) "Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity", *Marine Environmental Research*, 76, pp. 16-21.

Carballal, M.J. (1997) "In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Haemocytes", *Fish & Shellfish Immunology*, 7(6), pp. 403-416.

Carpenter, E.J. y Smith, K.L. (1972) "Plastics on the Sargasso sea surface", *Science* 175 (4027), pp. 1240–1241.

Chaudhry, F.N. y Malik M.F. (2017) "Factors affecting water pollution: a review", *Journal of Ecosystem and Ecography* , 7, p. 225.

Cheng, T. C. (1981) In "Invertebrate Blood Cells". Ratcliffe, N.A. y Rowley A.F. *Bivalves*. 11º ed. London: Academic Press, pp. 233-300.

Cincinelli, A., Scopetani, C., Chelazzi, D., Lombardini, E., Martellini, T., Katsoyiannis, A., ... y Corsolini, S. (2017) "Microplastic in the surface waters of the Ross Sea (Antarctica): occurrence, distribution and characterization by FTIR", *Chemosphere*, 175, pp. 391–400

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., y Galloway, T. S. (2011) "Microplastics as contaminants in the marine environment: a review", *Marine pollution bulletin*, 62(12), pp. 2588-2597.

Costa, M. M. (2008) *Estudio de la respuesta inmune y expresión génica del mejillón mediterráneo Mytilus galloprovincialis*. Tesis doctoral. Universidad de Vigo.

Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K. A., y Corsi, I. (2014) "Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*", *Environmental science & technology*, 48(20), pp. 12302-12311.

Derraik, J. G. (2002) "The pollution of the marine environment by plastic debris: a review", *Marine pollution bulletin*, 44(9), pp. 842-852.

Duchemin, M.B., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J., y Fournier, M. (2008) "Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures", *Environmental Pollution*, 153, pp. 416–423.

Fendall, L. S., y Sewell, M. A. (2009) "Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers", *Marine pollution bulletin*, 58(8), pp. 1225-1228.

Feng SY. (1988) "Cellular defense mechanisms of oysters and mussels", *Am. Fish. Soc. Special Publication*, 18, pp. 153-168.

Fernández, B., Campillo, J. A., Martínez-Gómez, C., y Benedicto, J. (2012) "Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites", *Chemosphere*, 87(11), pp. 1235-1245.

Fernández, B., y Albentosa, M. (2019) "Insights into the uptake, elimination and accumulation of microplastics in mussel", *Environmental Pollution*, 249, pp. 321–329.

Fleischer, C. C., y Payne, C. K. (2014) "Nanoparticle–cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes", *Accounts of chemical research*, 47(8), pp. 2651-2659.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019) *Fisheries & Aquaculture. Mytilus galloprovincialis*. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en [Acceso 10-05-2019].

Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., y Brousseau, P. (2000) "Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics", *Integrative and comparative biology*, 40 (3), pp. 412–420.

Frias, J.P.G.L. y Nash, R. (2019) "Microplastics: finding a consensus on the definition" *Mar. Pollut. Bull.*, 138, pp. 145–147.

Galloway, T., Cole, M. y Lewis, C. (2017) "Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem", *Nature Ecology & Evolution*, 1, p. 0116.

Goldberg, E. D. (1975) "The mussel watch: a first step in global marine monitoring", *Mar. Pollut. Bull.*, 6, pp. 111-114.

Goldstein, M. C., Rosenberg, M. y Cheng, L. (2012) "Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect", *Biol. Lett.*, 8, pp. 817–820.

Gosling, E. (2015) "Morphology of bivalves", *Marine bivalve molluscs*. 2º ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, pp. 12-38.

Gómez-Cabrera, M. M. (2000) *Manual de prácticas de Zoología Marina*. La Palmas de Gran Canarias: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Servicio de Publicaciones y Producción Documental. Departamento de Biología.

Gworek, B., Bemowska-Kałabun, O., Kijeńska, M., y Wrzosek-Jakubowska, J. (2016) "Mercury in marine and oceanic waters - a review", *Water Air Soil Pollution*, 227 (10), p. 371.

Hartmann, N.B., Rist, S., Bodin, J., Jensen, L. H., Schmidt, S. N., Mayer, P., ... y Baun, A. (2017) "Microplastics as vectors for environmental contaminants: Exploring sorption, desorption, and transfer to biota", *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), pp. 488-493.

Helm, M. M., Lovatelli, A., y Bourne, N. (2006) "Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico", *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, 471, p. 184.

IBM Corporation (2015). *IBM SPSS Statistics para Windows* (Versión 23.0.) [Programa para ordenador]. Armonk, EE.UU.: IBM Corporation.

Instituto de Estudios Macromoleculares (ISMAC). (2017) *Microplastics in cosmetics: CNR ISMAC BEILLA contribution to the studies for the ban. en cosméticos*. Disponible en: <http://www.ismac.cnr.it/en/2017/11/microplastics-in-cosmetics-cnr-ismac-biella-contribution-to-the-studies-for-the-ban> [Acceso 5-6-2019].

Jeong, C. B., Kang, H. M., Lee, M. C., Kim, D. H., Han, J., Hwang, D. S., ... y Lee, J. S. (2017) "Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*", *Scientific reports*, 7, p. 41323.

JPI Oceans . (2016) *JPI Healthy and Productive Seas and Oceans. Acerca de EPHEMARE*. Disponible en: <http://www.jpi-oceans.eu/ephemare/about> [Acceso 10-03-2019].

Karlsson, T. M., Vethaak, A. D., Almroth, B. C., Ariese, F., van Velzen, M., Hassellöv, M., y Leslie, H. A. (2017) "Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation", *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), pp. 403-408.

Kienzler, A., Bopp, SK, van der Linden, S., Berggren, E., y Worth, A. (2016) "Regulatory assessment of chemical mixtures: requirements, current approaches and future perspectives", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80, pp. 321-333.

Lusher, A. L., Burke, A., O'Connor, I. y Officer, R. (2014) "Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling", *Mar. Pollut. Bull.* 88(1), pp. 325–333.

Liu, Y., Li, W., Lao, F., Liu, Y., Wang, L., Bai, R., ... y Chen, C. (2011). "Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes", *Biomaterials*, 32(32), pp. 8291-8303.

Martínez-Gómez, C., Bignell, J., y Lowe, D. (2015) "Lysosomal membrane stability in mussels", *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 56, pp. 1-41.

Martínez-Gómez, C., Benedicto, J., Campillo, JA, y Moore, M. (2008) "Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast", *Journal of Environmental Monitoring*, 10(4), pp. 490-499.

Martínez-Gómez, C., Robinson, C. D., Burgeot, T., Gubbins, M., Halldorsson, H. P., Albentosa, M., ... y Vethaak, A. D. (2017) "Biomarkers of general stress in mussels as common indicators for marine biomonitoring programmes in Europe: The ICON experience", *Marine environmental research*, 124, pp. 70-80.

Micro Powders, Inc . (2018) *MICRO POWDERS, INC. High-Performance Wax Additives*. Disponible en: <http://www.micropowders.com/default.aspx> [Acceso 01-04-2019].

Microsoft® (2016). *Microsoft Office Professional Plus, paquete Excel*. (Versión 16.0). [Programa de ordenador]. EE.UU.: Microsoft® .

Ministerio para la Transición Ecológica (MITECO). (2012) *Estrategia marina. Demarcación marina levantino-balear. Parte IV. Descriptores del buen estado ambiental. Descriptor 8: contaminantes y sus efectos. Evaluación inicial y buen estado ambiental*. Madrid: Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/costas/temas/proteccion-mediomarino/IV_D8_Levantino-Balear_tcm30-130924.pdf [Acceso 22-05-2019].

Moore, M. N. (2006) "Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?", *Environment international*, 32(8), pp. 967-976.

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., ... y Thompson, M. (2009) "Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface", *Nature materials*, 8(7), pp. 543.

Laing, I. (1991) "Cultivation of marine unicellular algae", MAFF Laboratory Leaflet, 67, p. 31.

Lönnstedt, O. M. y Eklöv, P. (2016) "Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology", *Science*, 352(6290), pp. 1213-1216.

Observatorio Español de Acuicultura (OESA) y Fundación Biodiversidad. (2017) *Cultivo del mejillón (Mytilus galloprovincialis)*. Madrid: Fundación Biodiversidad.

Oliveira, P., Barboza, L. G. A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., y Guilhermino, L. (2018) "Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, pp. 155-163.

Oliviero, M., Tato, T., Schiavo, S., Fernández, V., Manzo, S., & Beiras, R. (2019) "Leachates of micronized plastic toys provoke embryotoxic effects upon sea urchin *Paracentrotus lividus*", *Environmental Pollution*, 247, pp. 706-715.

Paul-Pont, I., Lacroix, C., Fernández, CG, Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., ... y Guyomarch, J. (2016) "Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation", *Environmental pollution*, 216, pp. 724-737.

Peteiro, L. G., Filgueira, R., y Fernández-Reiriz, M. J. (2007) *Anatomía funcional de moluscos bivalvos*. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/150914/1/MemorialIM_2007.pdf [Acceso 23-5-2019].

Pipe, R.K. y Coles, J.A. (1995) "Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs", *Fish & Shellfish Immunology*, 5, pp. 581-95.

Pittura, L., Avio, CG, Giuliani, ME, d'Errico, G., Keiter, SH, Cormier, B., ... y Regoli, F. (2018) "Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: combined chemical and physical hazards to the Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*", *Frontiers in Marine Science*, 5, p. 103.

Plastics Europe. (2018) *Plastics – the Facts 2018*. Disponible en: <http://www.plasticseurope.org> [Acceso 25-4-2019].

R Core Team (2019). *R: Un lenguaje y entorno para la estadística*. Fundación R para Informática Estadística. (Versión 3.5.3.) [Programa de ordenador]. Viena, Austria: R Core Team.

Rault, P., Fortier, M., Pédelucq, J., Lacaze, E., Brousseau, P., Auffret, M., y Fournier, M. (2013) "Immunotoxicity of heavy metals (silver, cadmium, mercury and lead) on marine bivalve *Mytilus edulis*: in vitro exposure of hemocytes", *Journal of Xenobiotics*, p. e8-e8.

Rivera-Hernández, J. R., JR, Fernández, B., Santos-Echeandia, J., Garrido, S., Morante, M., Santos, P., y Albentosa, M. (2019) "Biodynamics of mercury in mussel tissues as a function of exposure pathway: natural vs microplastic routes", *Science of The Total Environment*, 674, pp. 412-423.

Sadri, S. S. y Thompson, R. C. (2014) "On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England", *Mar. Pollut. Bull.*, 81(1), pp. 55–60.

SAPEA, Science Advice for Policy by European Academies. (2018) *A Scientific Perspective on Microplastics in Nature and Society*. Disponible en: <http://www.sapea.info/microplastics> [Acceso 17-05-2019].

Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senécal, L., Goudreau, P., y Fournier, M. (2002) "Phagocytic Activity of Marine and Freshwater Bivalves: In Vitro Exposure of Hemocytes to Metals (Ag, Cd, Hg and Zn)", *Aquatic toxicology*, 58, pp. 189-200.

Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W., ... y Russell, A. E. (2004) "Lost at sea: where is all the plastic?", *Science*, 304(5672), pp. 838-838.

Van der Hal, N., Ariel, A. y Angel, D. L. (2017) "Exceptionally high abundances of microplastics in the oligotrophic Israeli Mediterranean coastal waters", *Mar. Pollut. Bull.*, 116, pp. 151–155.

Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., y Janssen, C. R. (2015) "Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats", *Environmental Pollution*, 199, pp. 10-17.

Vethaak, A. D., Davies, I. M., Thain, J. E., Gubbins, M. J., Martínez-Gómez, C., Robinson, C. D., ... y Giltrap, M. (2017) "Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment", *Marine environmental research*, 124, pp. 11-20.

Viarengo, A., Marro, A., Marchi, B., y Burlando, B. (2000) "Single and combined effects of heavy metals and hormones on lysosomes of haemolymph cells from the mussel *Mytilus galloprovincialis*", *Marine Biology*, 137(5-6), pp. 907-912.

Von Burg, R. (1995) "Inorganic mercury", *Journal of Applied Toxicology*, 15(6), pp. 483-493.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P. y Köhler, A. (2012) "Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure", *Environmental science & technology*, 46(20), pp. 11327-11335.

WoRMS Editorial Board (2019). *World Register of Marine Species. Taxa*. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140481#images> [Acceso 14-05-2019].

Zarfl, C., Fleet, D., Fries, E., Galgani, F., Gerdts, G., Hanke, G., y Matthies, M. (2011) "Microplastics in oceans", *Marine Pollution Bulletin*, 62, pp. 1589-1591.

ANEXO I. CULTIVO DE FITOPLANCTON

Diariamente se realizaban cultivos, de la especie *Isochrysis galbana*, añadiendo aproximadamente 20 mL del cultivo iniciador a balones esterilizados de 5 litros (figura S1a). Posteriormente, se les administraba 1 mL de una preparación del medio WALNE con oligoelementos y 100 µl del complejo de vitaminas (tabla S1) por cada litro de agua marina filtrada.

Los cultivos eran almacenados en estanterías del laboratorio con luz y aireación constante, y a temperatura (20-25°C) óptima para su desarrollo (figura S1b). Tras diez o doce días, los cultivos habían alcanzado su máximo desarrollo y eran vertidos al tanque de los mejillones.

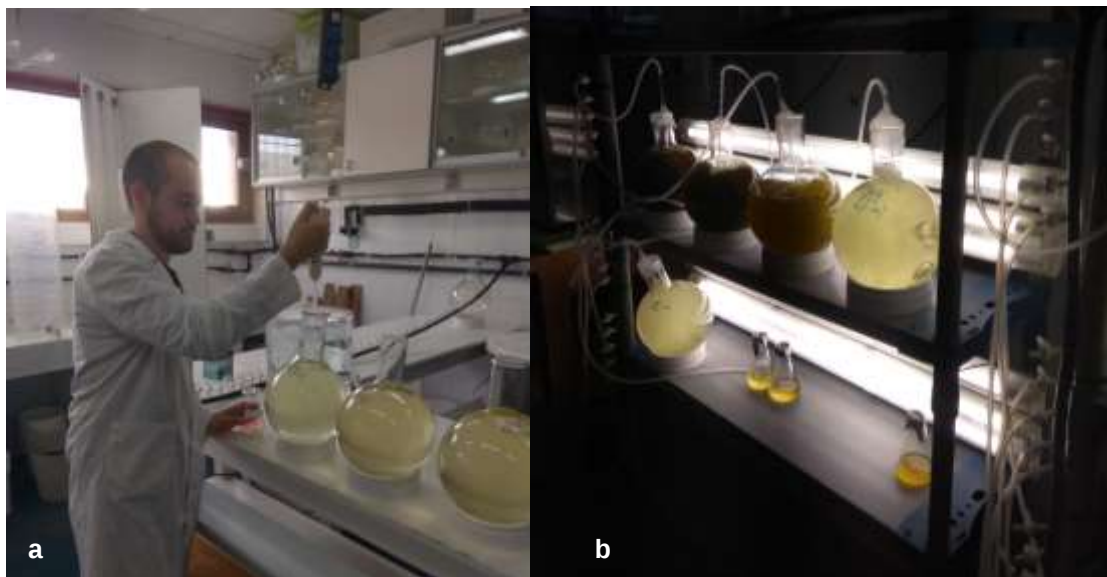


Figura S1.(a) Adicción de la preparación de WALNE, oligomentos y vitaminas al cultivo de *Isochrysis galbana* .(b) Almacenamiento en estanterías de los cultivos de fitoplancton a condiciones óptimas para su desarrollo. Fuente: Elaboración propia.

Tabla S1. Composición y preparación del medio WALNE con oligoelementos y el complejo vitamínico.

MEDIO WALNE	
1. Se preparan 500 ml de agua destilada en un erlenmeyer estéril. 2. Se coloca otro erlenmeyer de 500 ml estéril en un agitador magnético con control de temperatura (se ajusta a una temperatura suave) y se añade un fondo de agua destilada. 3. Se van añadiendo los siguientes componentes siguiendo este orden: 16.8 g.....H_3BO_3 0.65 g.....$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.18 g.....$\text{MnCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.5 g.....$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50.00 g.....NaNO_3 10.00 g.....$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4. Una vez añadidos se enrasa hasta 500 ml con agua destilada. 5. Una vez disueltos todos los componentes, se añaden 0.5 ml de la disolución de oligoelemento.	
OLIGOELEMENTOS	
1. Se preparan 50 ml de agua destilada en un Erlenmeyer de 100 ml estéril. 2. Se coloca en el agitador y se van añadiendo los siguientes componentes: 1.05 g.....ZnCl_2 1.0 g.....$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.45 g.....$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g.....$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3. Esta disolución se acidifica con 2 gotas de ácido clorhídrico (HCl).	
COMPLEJO VITAMÍNICO	
1. Se preparan 50 ml de agua destilada en un Erlenmeyer de 100 ml estéril. 2. Se coloca en el agitador y se van añadiendo los siguientes componentes: 2.5 mg.....Vitamina B_{12} 50.0 mg.....Vitamina B_1	

Fuente: Adaptado de Laing (1991).

ANEXO II. DETERMINACIÓN DEL MERCURIO (Hg) TOTAL

Tabla S2. Cuantificación del Hg total en las soluciones de agua de mar con diferentes concentraciones de mercurio el día de elaboración (0 días)(A) y tras días sucesivos (21 días)(B). Resultados expresados en nanogramos (ng) de Hg (masa) y molaridad.

Muestra	Volumen analizado (μl)	Masa (ng)		Concentración molar de Hg (mol·L ⁻¹)	
		A	B	A	B
10 ⁻⁵ M	30	80,43	79,08	3,29·10 ⁻⁴	3,24·10 ⁻⁴
10 ⁻⁶ M	100	26,21	25,13	9,65·10 ⁻⁶	9,25·10 ⁻⁶
10 ⁻⁷ M	250	6,76	2,81	3,98·10 ⁻⁷	1,66·10 ⁻⁷
10 ⁻⁸ M	500	1,63	1,34	2,41·10 ⁻⁸	1,97·10 ⁻⁸
10 ⁻⁹ M	600	0,63	0,99	6,45·10 ⁻⁹	1,01·10 ⁻⁸

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S3. Cuantificación del Hg total en la solución de agua de mar con la concentración crítica de mercurio (CC-Hg) trabajada el día de elaboración (0 días)(A) y tras días sucesivos (3 días)(B). Resultados expresados en nanogramos (ng) de Hg (masa) y molaridad (media ± desviación estándar, n=3).

Muestra	Volumen analizado (μl)	Masa (ng)		Concentración molar de Hg (mol·L ⁻¹)	
		A	B	A	B
10 ⁻⁸ M	500	1,36 ± 0,08	1,32 ± 0,07	2,01·10 ⁻⁴ ± 1,24·10 ⁻⁹	1,95·10 ⁻⁸ ± 9,93·10 ⁻¹⁰

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S4. Cuantificación del Hg total en seis suspensiones de MPs (tres tipos de MPs a dos concentraciones diferentes cada uno) con agua marina y la CC-Hg (10^{-8} M) establecida en el estudio. Las suspensiones fueron preparadas y analizadas el día de la exposición. Resultados expresados en nanogramos (ng) de Hg (masa) y molaridad (media $\pm$ desviación estándar, $n=3$) .

Suspensiones de trabajo	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Volumen analizado (μl)	Masa (ng)	Concentración molar de Hg ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
MPP 635 XF	1	500	$1,38 \pm 0,01$	$2,04\cdot 10^{-8} \pm 1,16\cdot 10^{-10}$
AQUAMATTE 26HD	1	500	$1,50 \pm 0,11$	$2,20\cdot 10^{-8} \pm 1,58\cdot 10^{-9}$
AQUATEX 325	1	500	$3,18 \pm 0,31$	$4,68\cdot 10^{-8} \pm 4,63\cdot 10^{-9}$
MPP 635 XF	100	500	$3,10 \pm 0,18$	$4,57\cdot 10^{-8} \pm 2,60\cdot 10^{-9}$
AQUAMATTE 26HD	100	500	$3,93 \pm 0,09$	$5,80\cdot 10^{-8} \pm 1,25\cdot 10^{-9}$
AQUATEX 325	100	500	$4,95 \pm 0,10$	$7,29\cdot 10^{-8} \pm 1,49\cdot 10^{-9}$

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO III. COMPORTAMIENTO DE LOS MICROPLÁSTICOS EN LAS DILUCIONES

Tabla S5. Cuantificación del número de partículas por ml a distintas diluciones (media $\pm$ desviación estándar, n=3).

Tipo de MPs	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Factor de dilución	Nº de partícula por mL	P 90D
MPP 635 XF	1	1/10	90.065 $\pm$ 3.756	3,75 $\pm$ 0,68
MPP 635 XF	1	1/20	270.832 $\pm$ 87.800	3,36 $\pm$ 0,37
MPP 635 XF	1	1/40	1.048.032 $\pm$ 610.002	2,63 $\pm$ 0,67
MPP 635 XF	1	1/80	1.440.899 $\pm$ 724.829	2,91 $\pm$ 0,21
MPP 635 XF	100	1/20	1.438.165 $\pm$ 25.091	5,30 $\pm$ 0,03
MPP 635 XF	100	1/40	1.419.832 $\pm$ 34.932	4,71 $\pm$ 0,02
MPP 635 XF	100	1/60	1.637.165 $\pm$ 56.981	4,54 $\pm$ 0,03
MPP 635 XF	100	1/80	1.782.499 $\pm$ 34.881	4,29 $\pm$ 0,04
AQUAMATTE 26HD	1	1/10	155.999 $\pm$ 9.393	2,93 $\pm$ 0,25
AQUAMATTE 26HD	1	1/20	600.499 $\pm$ 288.917	2,45 $\pm$ 0,07
AQUAMATTE 26HD	1	1/40	1.142.099 $\pm$ 302.555	2,18 $\pm$ 0,17
AQUAMATTE 26HD	1	1/80	3.010.365 $\pm$ 960.261	2,08 $\pm$ 0,31
AQUAMATTE 26HD	100	1/20	908.999 $\pm$ 6.837	5,06 $\pm$ 0,01
AQUAMATTE 26HD	100	1/40	1.175.832 $\pm$ 3.091	4,39 $\pm$ 0,04
AQUAMATTE 26HD	100	1/60	1.413.499 $\pm$ 33.257	4,30 $\pm$ 0,04
AQUAMATTE 26HD	100	1/80	1.513.999 $\pm$ 7.500	5,51 $\pm$ 1,85
AQUATEX 325	1	1/10	325.999 $\pm$ 72.806	2,05 $\pm$ 0,31
AQUATEX 325	1	1/20	218.099 $\pm$ 41.371	1,81 $\pm$ 0,10
AQUATEX 325	1	1/40	492.932 $\pm$ 58.362	1,71 $\pm$ 0,04
AQUATEX 325	1	1/80	964.932 $\pm$ 51.022	1,67 $\pm$ 0,03
AQUATEX 325	100	1/20	319.365 $\pm$ 8.909	7,59 $\pm$ 0,62
AQUATEX 325	100	1/40	445.099 $\pm$ 3.410	6,08 $\pm$ 0,85
AQUATEX 325	100	1/60	835.399 $\pm$ 81.341	5,14 $\pm$ 0,39
AQUATEX 325	100	1/80	1.168.832 $\pm$ 45.065	4,39 $\pm$ 0,17

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S6. Cuantificación del número de partículas por ml en las muestras de trabajo (media $\pm$ desviación estándar, n=3).

Tipo de MPs	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Factor de dilución	Nº de partícula por mL
MPP 635 XF	1	1/10	198.600 $\pm$ 13.375
MPP 635 XF	100	1/20	2.578.061 $\pm$ 81.773
AQUAMATTE 26HD	1	1/10	122.733 $\pm$ 6.358
AQUAMATTE 26HD	100	1/20	2.222.728 $\pm$ 19.015
AQUATEX 325	1	1/10	113.533 $\pm$ 3.335
AQUATEX 325	100	1/20	1.069.728 $\pm$ 29.825

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S7. Estimación del número de partículas por ml en las muestras de trabajo a distintas diluciones (media $\pm$ desviación estándar, n=3).

Tipo de MPs	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Factor de dilución	Nº de partícula por mL
MPP 635 XF	1	1/1	4.843 $\pm$ 0
MPP 635 XF	1	1/10	198.600 $\pm$ 13.375
MPP 635 XF	1	1/20	607.980 $\pm$ 53.398
MPP 635 XF	1	1/40	1.861.992 $\pm$ 201.813
MPP 635 XF	1	1/80	5.704.870 $\pm$ 735.973
MPP 635 XF	100	1/1	2.459.279 $\pm$ 81.773
MPP 635 XF	100	1/20	257.8061 $\pm$ 81.773
MPP 635 XF	100	1/40	270.3095 $\pm$ 81.773
MPP 635 XF	100	1/60	2.828.129 $\pm$ 81.773
MPP 635 XF	100	1/80	2.953.163 $\pm$ 81.773
AQUAMATTE 26HD	1	1/1	7.508 $\pm$ 0
AQUAMATTE 26HD	1	1/10	122.733 $\pm$ 6358
AQUAMATTE 26HD	1	1/20	284.758 $\pm$ 19266
AQUAMATTE 26HD	1	1/40	660.838 $\pm$ 55259
AQUAMATTE 26HD	1	1/80	1.533.987 $\pm$ 152.916
AQUAMATTE 26HD	100	1/1	289.851 $\pm$ 0
AQUAMATTE 26HD	100	1/20	2.222.728 $\pm$ 19.015
AQUAMATTE 26HD	100	1/40	3.561.179 $\pm$ 37.537
AQUAMATTE 26HD	100	1/60	4.691.814 $\pm$ 54.911
AQUAMATTE 26HD	100	1/80	5.705.622 $\pm$ 71.487
AQUATEX 325	1	1/1	21.310 $\pm$ 3.335
AQUATEX 325	1	1/10	113.533 $\pm$ 3.335
AQUATEX 325	1	1/20	216.003 $\pm$ 3.335
AQUATEX 325	1	1/40	420.943 $\pm$ 3.335
AQUATEX 325	1	1/80	830.823 $\pm$ 3.335
AQUATEX 325	100	1/1	21.4461 $\pm$ 299
AQUATEX 325	100	1/20	1.069.728 $\pm$ 29.825
AQUATEX 325	100	1/40	5.811.112 $\pm$ 323.429
AQUATEX 325	100	1/60	31.592.290 $\pm$ 2.631.742
AQUATEX 325	100	1/80	171.884.563 $\pm$ 19.044.318

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO IV. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. Efecto del Hg extracelular sobre la actividad fagocítica de hemocitos

A continuación se muestran los resultados del análisis estadístico de la %CF y %EF de hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) expuestos *in vitro* a cinco concentraciones diferentes de HgCl₂:

Tabla S8. Resultados de la prueba de normalidad.

Pruebas de normalidad							
	Hg_concentration	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% EF	Control	,152	11	,200*	,954	11	,700
	10 ⁻⁹ M	,141	11	,200*	,965	11	,828
	10 ⁻⁸ M	,118	11	,200*	,971	11	,894
	10 ⁻⁷ M	,134	11	,200*	,964	11	,816
	10 ⁻⁶ M	,134	11	,200*	,959	11	,753
	10 ⁻⁵ M	,195	11	,200*	,920	11	,318
% CF	Control	,222	11	,134	,899	11	,178
	10 ⁻⁹ M	,195	11	,200*	,950	11	,646
	10 ⁻⁸ M	,152	11	,200*	,953	11	,680
	10 ⁻⁷ M	,197	11	,200*	,909	11	,237
	10 ⁻⁶ M	,179	11	,200*	,931	11	,417
	10 ⁻⁵ M	,191	11	,200*	,936	11	,471

Fuente: Elaboración propia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla S9. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas.

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
% EF	,770	5	60	,575
% CF	,543	5	60	,743

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S10. Resultados del análisis de varianzas (ANOVA).

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
% EF	Entre grupos	,445	5	,089	13,201	,000
	Dentro de grupos	,404	60	,007		
	Total	,849	65			
% CF	Entre grupos	,665	5	,133	16,518	,000
	Dentro de grupos	,483	60	,008		
	Total	1,149	65			

Fuente: Elaboración propia.

2. Efecto de los MPs extracelulares sobre la actividad fagocítica de hemocitos

A continuación se muestran los resultados del análisis estadístico de la %EF de hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) expuestos *in vitro* a tres MPs diferentes (MPP 635 XF, AQUAMATTE 26HD y AQUATEX 325) a diferentes concentraciones (*Low* y *High*).

Tabla S11. Resultados de la prueba de normalidad para el microplástico MPP 635 XF.

Pruebas de normalidad							
	MPs concentration	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% EF	Control	,147	12	,200*	,972	12	,931
	Low	,188	12	,200*	,921	12	,290
	High	,293	12	,005	,868	12	,061

Fuente: Elaboración propia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla S12. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas para el microplástico MPP 635 XF.

Prueba de homogeneidad de varianzas

% EF

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,184	2	33	,833

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S13. Resultados del análisis de varianzas (ANOVA) para el microplástico MPP 635 XF.

ANOVA

% EF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,000	2	,000	,034	,967
Dentro de grupos	,218	33	,007		
Total	,219	35			

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S14. Resultados de la prueba de normalidad para el microplástico AQUAMATTE 26 HD.

Pruebas de normalidad

	MPs concentration	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% EF	Control	,122	31	,200*	,956	31	,230
	Low	,102	15	,200*	,968	15	,829
	High	,147	16	,200*	,944	16	,398

Fuente: Elaboración propia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla S15. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas para el microplástico AQUAMATTE 26 HD.

Prueba de homogeneidad de varianzas

% EF

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,135	2	59	,328

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S16. Resultados del análisis de varianzas (ANOVA) para el microplástico AQUAMATTE 26 HD.**ANOVA**

% EF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,032	2	,016	3,815	,028
Dentro de grupos	,250	59	,004		
Total	,282	61			

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S17. Resultados de la prueba de normalidad para el microplástico AQUATEX 325.**Pruebas de normalidad**

	MPs concentration	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% EF	Control	,087	26	,200*	,972	26	,680
	Low	,154	13	,200*	,964	13	,818
	High	,166	15	,200*	,938	15	,356

Fuente: Elaboración propia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors.

Tabla S18. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas para el microplástico AQUATEX 325.**Prueba de homogeneidad de varianzas**

% EF

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,433	2	51	,651

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S19. Resultados del análisis de varianzas (ANOVA) para el microplástico AQUATEX 325.**ANOVA**

% EF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,010	2	,005	,681	,511
Dentro de grupos	,371	51	,007		
Total	,381	53			

Fuente: Elaboración propia.

3. Efecto del Hg en presencia de MPs extracelulares sobre la actividad fagocítica de hemocitos

A continuación se muestran los resultados del análisis estadístico de la %EF de hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) expuestos *in vitro* a tres MPs diferentes (MPP 635 XF, AQUAMATTE 26HD y AQUATEX 325), a dos concentraciones (*Low* y *High*), suspendidos en una solución de HgCl₂ (a CC-Hg).

Tabla S20. Resultados de la comparación de los tratamientos control (Control *Low* y Control *High*) mediante la prueba *t* de Student para muestras independientes.

Prueba de muestras independientes									
% EF	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	,821	,372	-1,719	29	,096	-,03007	,01749	-,06584	,00571
No se asumen varianzas iguales			-1,735	27,703	,094	-,03007	,01733	-,06558	,00545

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S21. Resultados de la prueba de normalidad para el microplástico MPP 635 XF.

• Pruebas de normalidad							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	MPs_concentration	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% EF	Control	,090	31	,200*	,977	31	,725
	Low	,182	16	,160	,956	16	,599
	High	,276	15	,003	,818	15	,006

Fuente: Elaboración propia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors.

Tabla S22. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas para el microplástico MPP 635 XF.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
% EF			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,004	2	59	,996

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S23. Resultados del análisis de varianzas (ANOVA) para el microplástico MPP 635 XF.

ANOVA					
% EF					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,102	2	,051	20,841	,000
Dentro de grupos	,145	59	,002		
Total	,247	61			

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S24. Resultados de la prueba de normalidad para el microplástico AQUAMATTE 26 HD.

• Pruebas de normalidad							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	MPs_concentration	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% EF	Control	,090	31	,200*	,977	31	,725
	Low	,119	16	,200*	,971	16	,862
	High	,314	15	,000	,712	15	,000

Fuente: Elaboración propia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla S25. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas para el microplástico AQUAMATTE 26 HD.**Prueba de homogeneidad de varianzas**

% EF

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,312	2	59	,277

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S26. Resultados del análisis de varianzas (ANOVA) para el microplástico AQUAMATTE 26 HD.**ANOVA**

% EF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,074	2	,037	18,076	,000
Dentro de grupos	,120	59	,002		
Total	,194	61			

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S27. Resultados de la prueba de normalidad para el microplástico AQUATEX 325.**Pruebas de normalidad**

	MPs concentration	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% EF	Control	,090	31	,200*	,977	31	,725
	Low	,177	16	,192	,943	16	,382
	High	,234	15	,026	,891	15	,069

Fuente: Elaboración propia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla S28. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas para el microplástico AQUATEX 325.**Prueba de homogeneidad de varianzas**

% EF

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,962	2	59	,150

Fuente: Elaboración propia.

Tabla S29. Resultados del análisis de varianzas (ANOVA) para el microplástico AQUATEX 325.

ANOVA

% EF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,034	2	,017	7,356	,001
Dentro de grupos	,136	59	,002		
Total	,170	61			

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO V. ABSTRACT CONGRESO MICROMED

IN VITRO EFFECTS OF MERCURY (HG) ON IMMUNE FUNCTION OF MUSSEL (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) ARE ENHANCED IN PRESENCE OF MICROPLASTICS IN THE EXTRACELLULAR MEDIUM

MARTÍNEZ-GÓMEZ Concepción¹, SANTOS-ECHEANDÍA Juan¹, RIVERA HERNÁNDEZ José R.^{1,2}, ORTUÑO Ramón¹, ALBENTOSA Marina¹, LEÓN Víctor M¹.

1 Instituto Español de Oceanografía (IEO), Marine Contamination and Biological Effects, Varadero 1 San Pedro del Pinatar (Murcia), Spain.

2 U.A. Ingeniería en Tecnología Ambiental, Universidad Politécnica de Sinaloa, Mazatlán, México. *Presenter: Martínez-Gómez Concepción, concepcion.martinez@ieo.es

Keywords: Hemocytes, immune function, mercury, microplastics, mussels, synergistic effects

Main topic: Sources, fate and effects of microplastics

Preferred type of presentation: Oral

We investigated the *in vitro* effects caused by mercury (Hg) on phagocytosis capacity and lysosomal membrane stability (LMS) in freshly primary cultures of hemocytes from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and how these effects are modulated by the presence of different polyethylene (PE) microparticles (commercial stocks with mean size range from 15 to < 6 µm) in testing solutions prepared using seawater. Testing solutions of Hg ranged from 10⁻⁵ to 10⁻⁹ M and microplastics (MPs) suspensions were prepared at 1 and 100 µg/mL for each MP type: MPP-635 XF, AQUATEX-325 (oxidized PE) and AQUAMATTE 26HD (oxidized and modified PE). Analysis of the number of particles per mL and the 90th percentile of particle size (D90) of each MP suspension and its corresponding dilutions as well as Hg concentration in testing solutions were measured before and after performing the bioassays. Hemolymph samples from at least 12 individual mussels were used for each experiment/treatment.

Concentrations of Hg ≥ than 10⁻⁶ M in the extracellular medium caused acute destabilization of LMS and a significant inhibition of phagocytosis. The different MP types at concentrations tested did not cause acute effects on any of these immune-related functions. However, for some MP types, hemocytes exposed to MP suspensions and Hg concentrations < 10⁻⁷ M showed acute effects on LMS and phagocytosis. Notably, the results showed quite different number of particles per mL between suspensions of different MP type that had been prepared at the same concentration (up to an order of magnitude). Furthermore, generally microparticle number was directly correlated with dilution factor, indicating particle disaggregation processes in seawater. Total Hg concentration in MP suspensions tested did not exceed 10⁻⁷ M. Synergetic effects of combined exposure to MPs and Hg are discussed in light of these results.

Further Information

Comments: As requested, I confirm that Martínez-Gómez Concepción (me) will be the presenter of the work during the Conference.

Conference participants: Martínez-Gómez Concepción.