

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Análisis de ADN ambiental en estuarios
productores de moluscos”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

ADRIÁN MARTÍNEZ MARQUÉS

Julio, 2015



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis tutores Yaisel Juan Borrell Pichs y Carlos Enrique Carleos Artime la oportunidad de realizar este proyecto, así como su interés y ayuda constante.

A mi familia, en especial a mis hermanos, José Alberto y Daniel, por su ayuda, sin la cual, esto habría sido mucho más difícil.

A todos los Incomprendidos, sin los que este largo año no hubiese sido lo mismo.

A mis amigos, y en especial a Isaías por sus consejos y sus siempre interesantes puntos de vista.

Y a las arquitectas sin gafas de madera.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
Lista de figuras, tablas y gráficos	5
Lista de abreviaturas	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. OBJETIVOS	14
3.CONSIDERACIONES TEÓRICAS	15
3.1. Los estuarios como sistemas productivos	15
3.1.1. Ecosistemas estuarinos	15
3.1.2.Producción en estuarios	21
3.1.3.Estuarios del Eo y Villaviciosa	24
3.2. Actividades humanas que afectan a los estuarios	30
3.2.1.Pesca y acuicultura marina costera	31
3.2.2.Contaminación y alteraciones del hábitat	32
Sobrecarga de Nutrientes	32
Patógenos	33
Químicos Tóxicos	33
Pérdida y Degradación de Hábitats	34
Introducción de Especies	34
Alteración al Régimen Natural del Flujo	35

Disminución en la Población de Peces y Vida Silvestre	35
3.3. El uso de marcadores genéticos como herramientas para la mejora de los niveles de producción primaria en los estuarios.....	36
3.3.1.Control del estado general del estuario (biodiversidad). Métodos genéticos.....	36
3.3.2.El problema invasiones biológicas, metodos tradicionales vs NGS	42
4. METODOLOGÍA.....	44
ADN ambiental	44
Extracción de las muestras	44
Extracción de ADN.....	46
PCR, secuenciación masiva y análisis bioinformáticos	48
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
Resultados	51
Muestras del Eo	53
Muestras de Villaviciosa	54
Comparación de las muestras del Eo y Villaviciosa	55
Discusión.....	57
6. CONCLUSIONES	61
7. RECOMENDACIONES	62
8. BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

Los estuarios figuran entre los hábitats más productivos en la tierra, produciendo cada año más materia orgánica que áreas comparables en tamaño, de bosques, prados o tierras agrícolas. Además albergan una alta diversidad biológica. Pero, al mismo tiempo, los estuarios se encuentran entre los ecosistemas costeros más afectados por actividades del hombre. En este trabajo se analizó la situación de los dos estuarios de la costa asturiana más importantes en la producción de alimentos (Ría del Eo y Ría de Villaviciosa) en dos aspectos principales: en primer lugar, respecto a los efectos de la actividad antropogénica derivada de la obtención de alimentos en estuarios productores de moluscos sobre la diversidad biológica; y en segundo lugar, la posible existencia de especies invasoras asociadas a estas actividades y su detección temprana con el fin de ayudar a combatir el preocupante fenómeno de las invasiones biológicas. Para tal fin se utilizó la metodología de Metabarcoding basada en secuenciación masiva NGS (next generation sequencing) a partir del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa C subunidad I (COI). Los resultados obtenidos con el uso de esta metodología demuestran que podría utilizarse como indicador de salud ambiental en estas rías. Se detectaron cambios significativos en la diversidad de moluscos y crustáceos en zonas muy influenciadas por la actividad humana, como cerca de fábricas, puertos o zonas de cultivo de ostras. Además se detectó la posible presencia de géneros de especies potencialmente invasoras (*Crepidula*, *Lymnaea*, *Macrobrachium*), que podrían parasitar las principales especies en cultivo en estos estuarios. Aunque las nuevas técnicas de Metabarcoding aún presentan aspectos sin resolver como la ausencia de iniciadores universales (Barcodes) o de secuencias de referencia para todas las especies conocidas en las bases de datos, representan ya una herramienta genética con un gran potencial para ayudar a garantizar un manejo sostenible a medio y largo plazo de los recursos disponibles y de ecosistemas con tanto valor productivo como los estuarios.

ABSTRACT

Estuaries are among the most productive habitats in Earth, producing more organic materia than other areas comparables in size like forests, meadows or agricultural lands. In addition, estuaries show high, and precious, biodiversity levels. These areas are among the most affected ecosystems by the human activities. In this study a environmental DNA analysis of the situation of the two most important estuaries in Asturias in terms of food production (Ría del Eo and Ría de Villaviciosa) was carried out in order to assess the influence of antropogenic activities like aquaculture of mollusks and crustaces, and contamination, on biodiversity levels; and to study the possibility of early detections after the possible introductions of alien species associated with this activities. To achieve these objectives, a Metabarcoding methodology based in NGS (next generation sequencing) and the mitochondrial COI gene was used. Results obtained showed that this methodology could be useful as indicator of enviromental health in the estuaries. Significant changes in mollusks and crustaces diversity were detected in human-influenced areas, like factories, ports and harvesting zones. Besides this, the presence of alien genera (*Crepidula*, *Lymnaea*, *Macrobrachium*) that could be parasitating cultured species in these estuaries were also detected. Though Metabarcoding has still unsolved problems such as the lack of 100% universal primer pairs (Barcodes) or the availability of reference sequences for all the species in databases, it already represents a powerful tool to manage the resources of this importants ecosystems and to guarantee its long-term sustainailibity.

Lista de figuras

Figura 1. Principales presiones responsables de la pérdida de diversidad.....	9
Figura 2. Esquema del proceso de invasión, que ilustra la terminología, etapas, barreras y acciones de manejo.....	11
Figura 3. Evolución del transporte naval a través de la historia.....	12
Figura 4. Especies exóticas introducidas en Europa mediante acuicultura, en periodos de 20 años.....	12
Figura 5. Partes típicas de un estuario en función de la influencia marina.....	16
Figura 6. Evolución de la producción de la acuicultura en España, por especies, en el periodo 1962-2012.....	22
Figura 7. Ejemplar de <i>Mytilus edulis</i>	23
Figura 8. Evolución de la producción de producción acuícola de mejillón en España entre 1962 y 2012.....	23
Figura 9. Ejemplar de <i>Crassostrea gigas</i>	24
Figura 10. Evolución de la producción acuícola de ostras en España entre 1983 y 2012.....	24
Figura 11. Ubicación del estuario del Eo en Asturias.....	25
Figura 12. Ubicación del estuario de Villaviciosa en Asturias.....	27
Figura 13. Diferentes actividades antropogénicas que afectan a los estuarios.....	31
Figura 14. Aumento exponencial del ADN en ciclos de PCR.....	37
Figura 15. PCR en emulsión; etapas del proceso.....	40
Figura 16. Pirosecuenciación en placa PicoTiterPlate o PTP.....	41
Figura 17. Puntos de muestreo en la ría de Villaviciosa.....	44
Figura 18. Puntos de muestreo en la ría del Eo.....	45

Figura 19. Tabla con los componentes del kit de extracción de ADN PowerWater.....	46
Figura 20. Imagen de los distintos componentes del kit PowerWater®.....	46
Figura 21. Tabla OTU de especies para moluscos y crustáceos.....	53
Figura 22. 3D PCoA plot calculado a partir de distancias de Bray Curtis para moluscos y crustáceos.....	55
Figura 23. Árbol UPGMA Moluscos y crustáceos.....	56

Lista de tablas

Tabla 1. Muestras totales extraídas.....	45
Tabla 2. Primers directos de la PCR para la secuenciación masiva posterior con Roche/454.....	48
Tabla 3. Primers reversos de la PCR para la secuenciación masiva posterior con Roche/454.....	49
Tabla 4. Número total de lecturas, bases totales y longitudes medias de la lecturas totales y en detalle para cada una de las muestras recogidas en ambas rías.....	51

Lista de gráficos

Gráfico 1. Gráfico de barras de total de lecturas acumuladas por muestra.....	52
--	----

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APROMAR: Asociación Empresarial de Productores de Mariscos de España

ARN: Ácido ribonucleico

BLAST: Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico, del inglés, “*Basic Local Alignment Search Tool*”

BOE: Boletín Oficial del Estado

COI: Citocromo oxidasa 1

eDNA: DNA ambiental, del inglés “*environmental DNA*”

ESACUA: Asociación Española de Productores de Acuicultura Continental.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, del inglés, “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”

ISSG: Grupo especialista de especies invasoras, del inglés, “*Invasive Species Specialist Group*”

JACUMAR: Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos.

MAGRAMA: Ministerio de Alimentación, Agricultura y Medio Ambiente del Gobierno de España

NCBI: Centro Nacional para la información biotecnológica, del inglés, “*National Center for Biotechnology Information*”

NGS: Secuenciación de nueva generación, del inglés “*next generation sequencing*”

NOAA: Administración Nacional Oceánica y Atmosférica, del inglés “*National Oceanic and Atmospheric Administration*”

OESA: Observatorio Español de Acuicultura

pb: par de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “*Polymerase Chain Reaction*”

WoRMS: Registro Mundial de Especies Marinas, del inglés, “*World Register of Marine Species*”

WWF: Fondo Mundial para la Naturaleza, del inglés “*World wild fund*”

1. INTRODUCCIÓN

Los estuarios están entre los ambientes costeros más importantes del planeta, ya que poseen una alta diversidad biológica, alta productividad y son centro de producción de moluscos y crustáceos de gran importancia económica. Pero unido a esto, son altamente vulnerables a los efectos de la contaminación y otros efectos antropogénicos, lo que conlleva una pérdida de biodiversidad, así como a la entrada de potenciales especies invasoras ligadas a las actividades productivas de cultivo de invertebrados que se llevan a cabo en sus aguas. La pérdida de diversidad biológica, y la entrada de especies invasoras, son dos de los problemas más importantes que acucian a todos los ecosistemas del planeta, y más sensiblemente, a estas zonas.

El Convenio de Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica define la biodiversidad o diversidad biológica como “*la variabilidad de organismos vivos de todas las clases, incluida la diversidad dentro de las especies, entre las especies y de los ecosistemas*”. La biodiversidad se está perdiendo a un ritmo sin precedentes, como se constata en la última Perspectiva Mundial sobre la Diversidad Biológica. A pesar de que en las últimas décadas se ha avanzado en su conservación a escala global, el riesgo de extinción de las especies es cada vez más crítico.

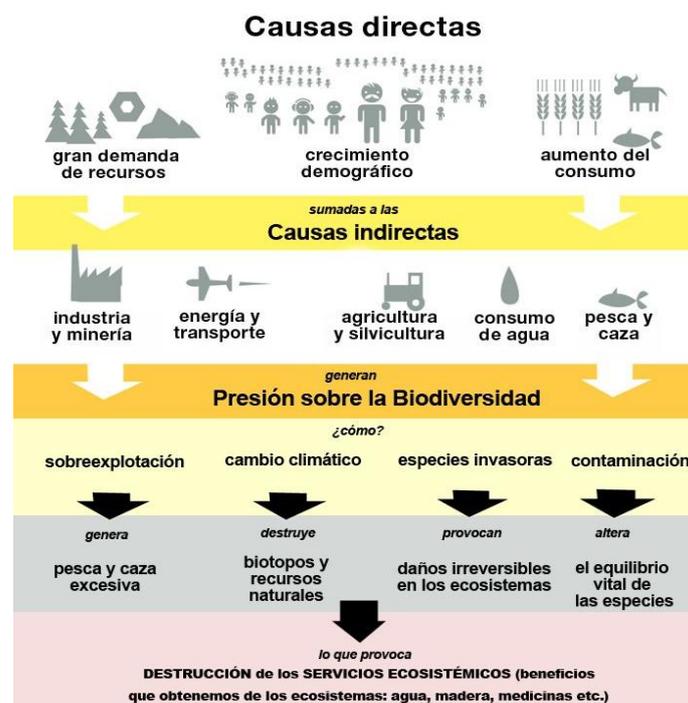


Figura 1 Principales presiones responsables de la pérdida de diversidad (WWF)

Cerca de un cuarto de las especies vegetales del mundo está en peligro de extinción y la abundancia de especies de vertebrados de la Tierra se ha reducido en promedio casi en un tercio en las últimas décadas y sigue decreciendo. Los hábitats naturales también siguen deteriorándose en cuanto a su extensión e integridad. Lo más preocupante es que las cinco presiones principales que impulsan directamente la pérdida de la biodiversidad –la pérdida de hábitats, la sobreexplotación, la contaminación, las especies exóticas invasoras y el cambio climático– (Figura 1) se mantienen constantes o incluso se están intensificando. Por otro lado, la escasa sensibilización social y el hecho de que el valor económico de la biodiversidad no se vea reflejado en los procesos de toma de decisiones contribuyen gravemente a la pérdida de ésta. Esta situación provoca que la capacidad de la biodiversidad para proporcionar bienes y servicios se vea seriamente amenazada. Cerca de dos tercios de los servicios de los ecosistemas se están degradando o se usan de manera no sostenible (Evaluación de los Ecosistemas del Milenio). En España, el 43% de los servicios de los ecosistemas evaluados se están viendo degradados o usados de manera insostenible, siendo los servicios de regulación y los servicios culturales los más afectados (Evaluación de Ecosistemas del Milenio en España).

Otro gran problema al que se enfrentan los estuarios es la introducción de especies invasoras. Este proceso, muchas veces, es causa directa de la pérdida de diversidad ya comentada, y normalmente es consecuencia de las actividades humanas de acuicultura, ya que las especies en cultivo ejercen como vectores de entrada. En los últimos años, la globalización y los avances tecnológicos han incrementado este fenómeno de manera dramática. A partir del siglo XVI, con el descubrimiento de América, la tasa de introducciones se disparó. Hoy, las nuevas tecnologías han intensificado el proceso invasivo (Perrings *et al.*, 2002). La cantidad con la que se introducen nuevas especies ha alcanzado cotas sin precedentes y continúa en aumento (Hulme 2009; Katsanevakis *et al.*, 2013). Pero, antes de continuar, se debe tener claro a que nos referimos con una “especie invasora”. Se define como población invasora como *“un grupo de individuos que han sido introducidos en una nueva área, en la cual se han establecido, incrementándose en número y dispersándose geográficamente”* (Estoup & Guillemaud, 2010).

Como consecuencia de las actividades humanas, que han dado la oportunidad a especies no nativas de llegar a zonas muy alejadas de su hábitat natal, han llegado a

Europa un total de 1369 especies exóticas (Katsanevakis *et al.*, 2013). Podemos resumir el proceso de invasión (Figura 2) desde la importación de una especie nativa en otra región a un país o área nueva (en este momento el organismo está en cautiverio o confinado); después se inicia la etapa de introducción cuando es liberado, escapa o vive en un medio natural, posteriormente ocurre la colonización y el establecimiento cuando constituye una población reproductora y su dispersión, para finalmente considerarse una especie invasora cuando ejerce un fuerte impacto negativo al ambiente, lo cual finalmente tiene impactos directos o indirectos en el bienestar humano. Según las estadísticas presentadas por Williamson y Fitter (1996) el éxito del paso de una etapa a la siguiente es, en promedio de 10% es decir, 1 de cada 10 importados logra liberarse en el medio natural, 1 de cada 10 de estos logra constituir una población y 1 de cada 10 poblaciones resulta invasora. Sin embargo, este porcentaje (o probabilidad) puede cambiar debido a otros factores tales como el cambio climático

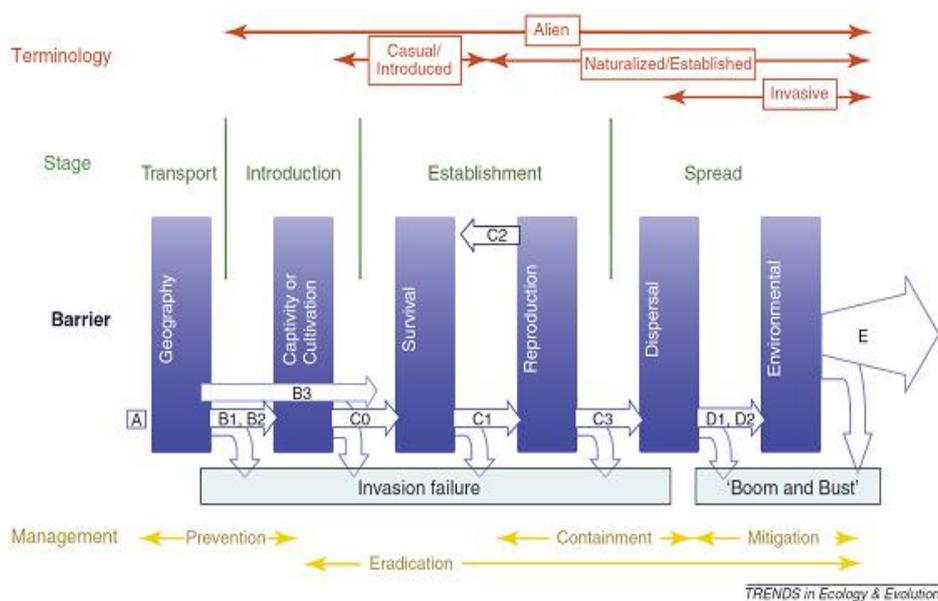


Figura 2. Esquema del proceso de invasión, que ilustra la terminología (rojo), etapas (verde), barreras (azul) y acciones de manejo (amarillo). Las flechas indican el movimiento de especies a lo largo de las barreras y están codificadas según la vía de entrada de la invasión. (Blackburn *et al.*, (2011)

El aumento de las rutas de navegación y el tráfico marino han aumentado considerablemente las probabilidad de transporte de nuevas especies (Figura 3). Además, se calcula que anualmente se transfieren 10 mil millones de toneladas de agua de lastre y cerca de 3 mil especies de plantas y animales son transportados diariamente por este medio en todo el mundo. Debido a esta agua de lastre, se ha incrementado significativamente la cantidad de plancton e invertebrados exóticos introducidos en

diferentes regiones; dichas invasiones afectan severamente a los ecosistemas marinos y estuarianos (Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasoras, 2010).

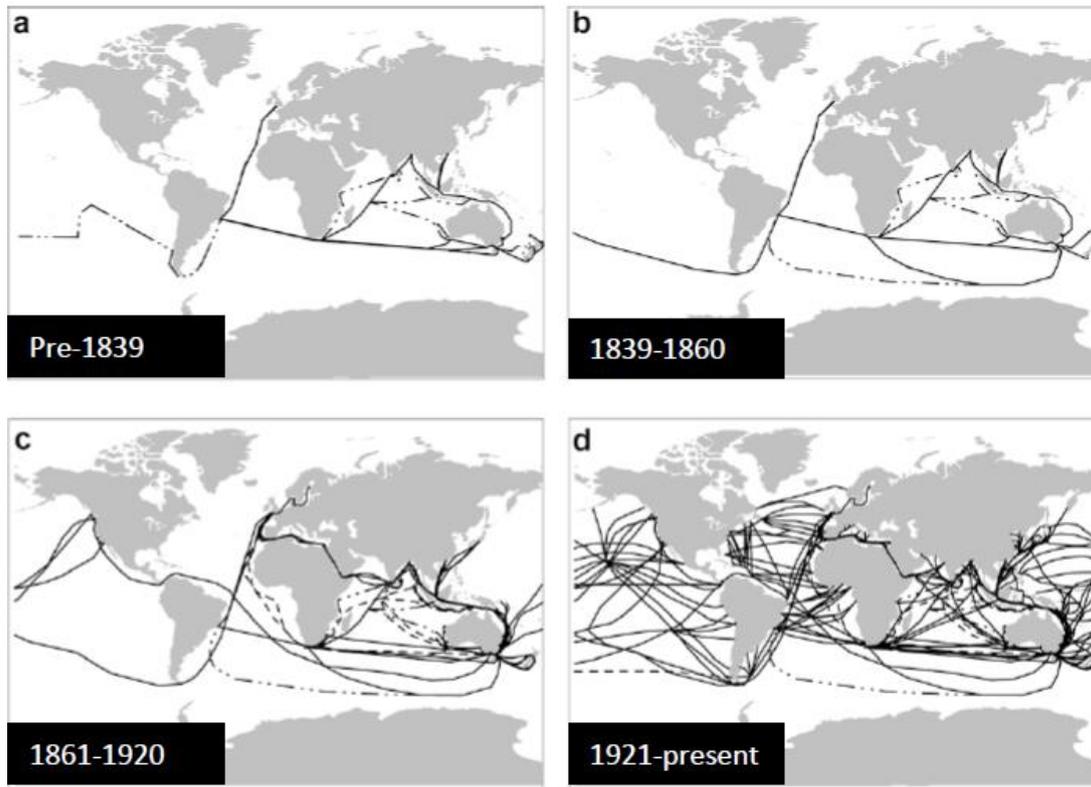


Figura 3. Evolución del transporte naval a través de la historia (Hewitt *et al.*, 2004)

En Europa, las principales vías de entrada de especies marinas son Italia y Francia, así como Israel para el caso del mar Mediterráneo, aunque en el caso de cada país difiere dependiendo de las principales actividades de éste (Nunes *et al.*, 2014). En España, ha aumentado debido a la acuicultura en los últimos 20 años (Figura 4).

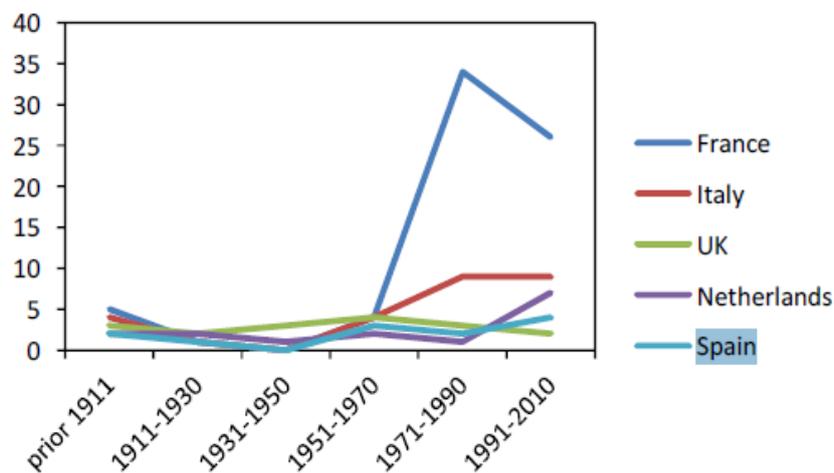


Figura 4. Especies exóticas introducidas en Europa mediante acuicultura, en periodos de 20 años (Nunes *et al.*, 2014)

Los ambientes acuáticos han demostrado ser extremadamente sensibles; hasta un 40% de las extinciones de especies que habitan en ambientes acuáticos han estado relacionados con la depredación, el parasitismo o la competencia con especies invasoras. Se estima que la tasa de extinción en los ambientes acuáticos es cinco veces mayor que en los terrestres (Ricciardi y Rasmussen, 1999). Por lo tanto, los ambientes esturianos donde la producción de moluscos para consumo humano es una fuente de ingresos y actividad económica, se pueden ver seriamente afectados por la introducción accidental o intencionada de especies exóticas, que pueden no solo afectar a la salud ecológica del ambiente, sino que también pueden afectar de manera determinante a la producción, o a la calidad de los moluscos y crustáceos producidos en las rías asturianas, en este caso.

Hasta ahora, la detección de una especie invasora en un lugar se podía llevar a cabo solo una vez que ésta se había establecido y reproducido en el nuevo ambiente, de forma visual, en un estadio en el cual su control y erradicación es muy difícil de llevar a cabo. Para evitar esto, se han desarrollado nuevas técnicas moleculares que permiten la rápida detección de los invasores aún cuando están en una primera fase de colonización del nuevo hábitat, lo que permite abordar el problema de manera más efectiva y rápida.

Cuando Hebert *et al.*, (2003) propusieron el gen mitocondrial de la citocromo oxidasa C subunidad I (COI) como el núcleo del DNA barcoding, la taxonomía molecular sufrió una gran aceleración. Las nuevas técnicas moleculares como el NGS (next generation sequencing) propuestas por Taylor y Harris (2012) parecen ser hoy el futuro para la monitorización de la biodiversidad. Usando DNA ambiental (eDNA) para amplificar las regiones informativas de DNA se ha cambiado el modo de detección de especies invasoras. Diferentes estudios (Frischer *et al.*, 2012; Mahon *et al.*, 2013), han demostrado que el uso de eDNA con marcadores especie-específicos es efectivo, técnicamente fácil y barato.

2. OBJETIVOS

- 1) Analizar los cambios en la diversidad biológica en estuarios productores de moluscos debidos a las actividades humanas que puedan afectar a las producciones de moluscos mediante técnicas de Metabarcoding y NGS.
- 2) Utilizar esta metodología para la detección temprana de potenciales especies invasoras que utilicen como vector de introducción las actividades antropogénicas y puedan causar perjuicios tanto ecológicos como económicos.

3.CONSIDERACIONES TEÓRICAS

3.1. LOS ESTUARIOS COMO SISTEMAS PRODUCTIVOS

3.1.1. ECOSISTEMAS ESTUARINOS

Se define como estuario a un cuerpo de agua parcialmente encerrado que se forma cuando las aguas dulces provenientes de ríos y riachuelos fluyen hacia el océano y se mezclan con el agua salada del mar. Los estuarios y las áreas circundantes son áreas de transición de tierra a mar y de agua dulce a salada. En general, se trata de espacios parcialmente aislados del mar por una barra arenosa, o con menos frecuencia un estrechamiento rocoso, en los que se producen fenómenos de mezcla de las aguas fluviales y marinas y de sedimentación de los materiales erosionados en la cuenca hidrográfica. La definición clásica más aceptada es la de Pritchard (1967): “*un estuario es una masa de agua costera semicerrada que tiene conexión libre con el mar y en la cual el agua marina está parcialmente diluida con el agua dulce proveniente del drenaje continental*”. Esta definición tampoco incluye adecuadamente los estuarios micromareales, asociados a los tramos finales de los ríos que forman deltas (Mississippi, Nilo, Ebro, etc.)

En un estuario típico se pueden distinguir, a modo general y siguiendo un gradiente de influencia marina las siguientes partes (Ibañez, C.*et al.*, 2009) (Ver figura 5):

- Una parte externa distal (boca) en libre conexión con el mar, dominada por la energía de las olas y de las mareas, presentando una dominancia de sedimentos gruesos y un transporte aguas arriba de los sedimentos más finos; se correspondería con la zona inframareal (estuario bajo).

- Una parte central donde se equilibran la influencia marina y fluvial, donde se depositan los sedimentos más finos; esta zona media se correspondería con la zona intermareal (estuario medio).

- Una parte interna proximal (cabeza) dominada por la energía del río, que produce una sedimentación gruesa con transporte de finos aguas abajo; se

correspondería con la zona supramareal (estuario alto), con influencia de la marea pero con escasa (o nula) mezcla con agua marina.

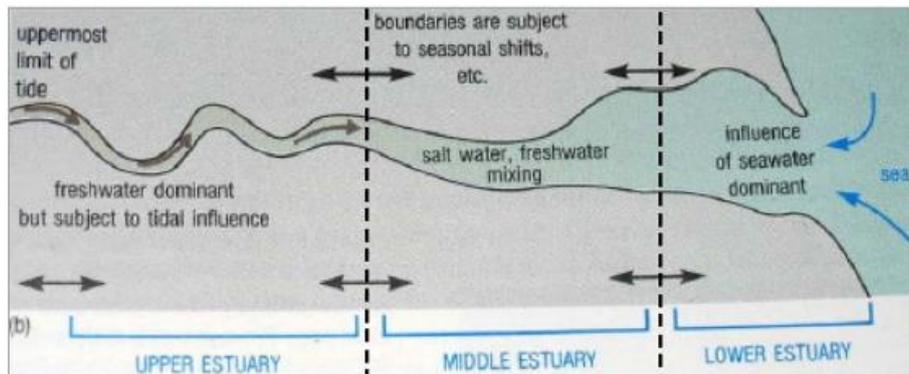


Figura 5. Partes típicas de un estuario en función de la influencia marina. La influencia marina va disminuyendo a medida que avanzamos hacia la zona superior donde dominan las condiciones fluviales. (Ibáñez, C. *et al*)

Podría parecer que los estuarios son meras mezclas de agua salada del mar y la dulce de los cauces fluviales, disfrutando por tanto parcialmente de las características de uno y otro medio. Sin embargo, en absoluto es así. Los estuarios son medios radicalmente distintos a ambos, con características propias y muy definidas. Los factores ecológicos que determinan la vida en los estuarios son fundamentalmente dos: la dinámica marina y la dinámica sedimentaria.

En el interior de los estuarios se produce la mezcla del agua salada del mar (35g/l) y las dulces de los ríos (0,5 g/l), produciéndose un gradiente de salinidad entre las zonas externa e interna del estuario. Durante la subida de la marea, el agua del mar penetra en el estuario formando lo que se denomina onda salina (Red Ambiental de Asturias). Sin embargo, el efecto de la pleamar se deja notar más arriba de donde alcanza la onda salina, pues las aguas fluviales no pueden ser evacuadas e incluso son empujadas por la subida de la marea, a lo que se denomina onda fluvial.

Las condiciones del estuario varían radicalmente en función de la importancia que tengan los cauces fluviales que vierten al sistema. En los estuarios alimentados por cauces de importancia no llega a producirse la mezcla completa de aguas. Las dulces del río, menos densas, fluyen sobre las del mar, que avanzan por debajo formando lo que se

denomina una cuña salina. En esas condiciones, la onda mareal sube más allá de donde llega la salina y se anticipa en el tiempo. Sin embargo, en los estuarios que no son alimentados por cauces de importancia se produce la mezcla completa de las aguas y las ondas mareal y salina avanzan casi a la par.

Los procesos descritos determinan las plantas y animales que utilizan el medio. En estuarios de escasa dinámica fluvial, como el de Villaviciosa, las comunidades vegetales se ven sometidas a un alto grado de salinidad de las aguas. Durante la pleamar son inundadas por las aguas marinas y, en la bajamar, éstas quedan retenidas en charcos y canales, que incrementan aún más su concentración salina a causa de la evaporación. En esas condiciones, de alta salinidad, se desarrollan las comunidades vegetales que se han denominado de marisma halófila (Red Ambiental de Asturias). En los estuarios de importante dinámica fluvial, como el Eo, el Nalón o el Sella, las condiciones de salinidad son menos extremas. Durante la pleamar la onda salina avanza menos, y en ocasiones solo en profundidad, y en la bajamar las aguas dulces fluviales lavan charcos y canales. En esas condiciones se desarrollan comunidades vegetales menos tolerantes a la salinidad, que se suelen denominar de marisma subhalófila. Obviamente ambos tipos de comunidades conviven en el estuario. La marisma halófila se desarrolla en las zonas más profundas y cercanas al mar, adquiriendo mayor importancia en los estuarios de escaso aporte fluvial. Las de marisma subhalófila, en cambio, ocupan áreas inundadas por el mar con menos frecuencia y situadas en la cola del estuario, adquiriendo mayor importancia cuanto mayor sea el caudal de aguas dulces afluentes.

El segundo gran factor que condiciona la vida en los estuarios es la dinámica sedimentaria. Los estuarios, como las playas y los sistemas dunares y al contrario que los acantilados, son ambientes sedimentarios. La baja pendiente del estuario y la entrada de las mareas hacen que la velocidad de las aguas se reduzca y el sedimento arrastrado por el río no llegue a alcanzar el mar, depositándose en el propio estuario. El fenómeno se ve favorecido por el encuentro del sedimento con las aguas saladas del mar, que alteran los equilibrios electrostáticos de las arcillas y los coloides orgánicos provocando su sedimentación por el fenómeno que se ha denominado floculación. Además, durante la pleamar pueden introducirse sedimentos de origen marino, procedentes de la erosión de playas o acantilados cercanos. En general, los sedimentos más gruesos, arenas, se sitúan cercanos a la desembocadura, mientras que los de grano fino, arcillas, se depositan más cerca de la cola del estuario. Con el tiempo, la cantidad de sedimento

acumulado es tal que forma amplias llanuras de fangos sobre las que en bajamar se dibuja una compleja red de canales anastomosados que desaguan hacia el canal principal. La distribución del sedimento condiciona también las comunidades vegetales que se instalan en el estuario, algunas de las cuales se distribuyen de acuerdo a la granulometría más o menos arenosa del sustrato. En general las áreas menos ricas y diversas son las de sustratos arenosos. El mayor tamaño de grano hace que los espacios intersticiales sean también mayores y, por ello, incapaces de retener agua o elementos nutritivos. Cuando en el sustrato son mayoritarios limos y arcillas, sin embargo, los espacios intersticiales son de menor tamaño y actúan como una trampa para el agua y la materia orgánica, favoreciendo la instalación de la vegetación. El fenómeno resulta evidente para cualquier observador que se acerque a los estuarios durante la bajamar. Las áreas arenosas expuestas al sol pierden rápidamente el agua y secan con facilidad, provocando un cambio drástico en las condiciones del suelo, sin embargo las llanuras fangosas retienen la mayor parte del agua y no llegan a secarse por completo. La trampa que para los nutrientes orgánicos constituyen las llanuras fangosas, la fertilización que supone el aporte de materia orgánica arrastrada por los cauces fluviales y la floculación de ésta al contacto con las aguas salobres del estuario hacen que el medio estuarino sea extraordinariamente productivo, hasta 30 veces más fértil que el mar abierto, pudiendo dar sustento a grandes comunidades biológicas.

La vida vegetal

Todas las plantas de los medios costeros tienen una característica común: su resistencia a la salinidad del mar a través del desarrollo de adaptaciones xerohalofíticas, muy similares en ocasiones a las de las plantas que habitan en los desiertos. En definitiva, y aunque pueda parecer paradójico, los ambientes costeros se caracterizan por su sequedad. La presencia de altas concentraciones salinas, en el agua o en el aire, conlleva la pérdida de agua por ósmosis y exige el desarrollo de mecanismos para la economía hídrica: hojas con bordes lisos para reducir la transpiración, mecanismos de cierre de los estomas, tallos gruesos y suculentos que permitan el almacenamiento de agua, etc. La resistencia a la salinidad es también una característica de las plantas que habitan en otros sistemas costeros, playas, dunas o acantilados. Sin embargo, al

contrario que las anteriores, las plantas del estuario deben someterse además al influjo de las mareas, que suponen una inundación permanente, diaria u ocasional. Por ello, los estuarios albergan una flora exclusiva y singular capaz de sobrevivir únicamente en la medida en que se logre la conservación de sus hábitats característicos. La destrucción de las características naturales de muchos de los estuarios asturianos ha puesto a algunas especies en peligro, hasta el punto de que de la flora legalmente protegida de Asturias un 19%, 12 especies, son exclusiva o principalmente estuarinas.

La complejidad biológica de los estuarios y la sutileza con que varían sus condiciones ambientales hacen que la descripción de la distribución de la vegetación sea tarea muy laboriosa. Habitualmente se adopta un esquema que diferencia dos grandes tipos de ambiente: el de marisma halófila y el de marisma subhalófila. En el primero crecen especies y comunidades muy adaptadas a la salinidad y en el segundo aquellas otras menos tolerantes, que habitan la cola del estuario.

En los estuarios de importante influencia mareal la marisma halófila adquiere una notable complejidad. Los biotopos de menor cota, inundados permanentemente, se pueblan de seda de mar ancha (*Zostera marina*), fanerógama de aspecto similar a un alga, y aquellos otros descubiertos en la bajamar de otra especie parecida pero de aspecto más filamentososeda de mar estrecha (*Zostera noltii*). Por encima de ellas, descubiertas durante gran parte del ciclo mareal, aparecen céspedes de la gramínea (*Spartina marítima*) que es sustituida en las áreas aún más elevadas por matas de aspecto almohadillado entre las que predominan diferentes especies de quenopodiáceas: *Sarcocornia perennis*, *Sarcocornia fruticosa*, *Suaeda vera*, *Halimione portulacoides*, etc.(Red ambiental de Asturias). En los estuarios de mayor influencia fluvial, sin embargo, la marisma halófila se empobrece llegando a desaparecer los matorrales halófilos para dar paso a las comunidades de gramales, cañaverales y juncales de la marisma subhalófila.

La vida animal

La alta productividad de los estuarios hace que alberguen una multitud de organismos animales que moran en ellos permanente o temporalmente: sencillos organismos unicelulares, multitud de invertebrados que se guarecen enterrados en el sedimento o bajo la vegetación estuarina, peces que aprovechan la pleamar para alimentarse en el estuario o aves que acuden a alimentarse de los anteriores y refugiarse en los densos cañaverales de la marisma.

Los estuarios son ecosistemas con un interés especial para las aves acuáticas. La diversidad de recursos alimenticios de estos medios (peces, crustáceos, moluscos, gusanos, etc.) y la abundancia de los mismos permiten dar sustento a una gran variedad y cantidad de aves.

La mayor parte de las aves acuáticas son migradoras. La migración les permite utilizar aquellas áreas que ofrecen gran riqueza de alimentos en ciertas épocas del año, pero resultan poco hospitalarias o completamente inhabitables en otras. En definitiva se trata de una estrategia oportunista. Gracias a su capacidad para realizar largos desplazamientos, las aves pueden acudir en cada momento a la zona en que los recursos sean más abundantes.

No obstante, para su periplo migratorio, deben acumular ingentes cantidades de grasa. Algunas especies doblan su peso antes del inicio del viaje. Las rías del litoral cantábrico desempeñan un papel esencial para las poblaciones de aves migradoras de Europa, pues están estratégicamente situadas a medio camino en las rutas que siguen muchas especies, desde sus cuarteles de invernada en África a las costas norteeuropeas y las áreas palustres escandinavas, sirviendo de lugar de descanso y engorde para muchas de las aves

Las aves acuáticas que utilizan los estuarios asturianos pueden clasificarse morfológicamente en tres grupos adaptados a ambientes distintos: las nadadoras o palmípedas, las vadeadoras o zancudas y las marinas. Las primeras presentan cortas patas, de amplias membranas adaptadas a la natación en aguas libres. Las segundas tienen patas largas, sin membranas o con éstas poco desarrolladas, y caminan a la búsqueda de alimento por los fondos fangosos del estuario. Las diferencias morfológicas hacen que las nadadoras tiendan a utilizar las zonas inundadas del estuario

mientras las zancudas se congregan en las áreas ya emergidas. Estuarios como el del Eo, con importante influencia fluvial tienen aún en la bajamar amplias superficies inundadas y concentran amplias poblaciones de palmípedas. En otros como en el de Villaviciosa, carente de caudales fluviales significativos, durante la bajamar emergen extensas llanuras de fangos que reúnen poblados bandos de zancudas.

3.1.2.PRODUCCIÓN EN ESTUARIOS

Acuicultura es la cría de organismos acuáticos como los peces, moluscos, crustáceos y las plantas acuáticas. Esta actividad supone la intervención en el proceso de producción, a través, por ejemplo, de reposición constante, alimentación, protección contra los depredadores, etc. *Producción acuícola* es específicamente el producto de las actividades acuícolas, cuyo objetivo final es el consumo. Por el momento, no se contempla la cría con fines decorativos (FAO).

La acuicultura es una importante fuente de productos acuáticos de calidad en la Unión Europea. En 2012 la UE produjo 1,27 millones de toneladas de productos de la acuicultura. Este dato supone una reducción del 1,3% respecto de lo puesto en el mercado en 2011, y un descenso acumulado del 12% desde el pico de producción acuícola europea que tuvo lugar en 1999. La acuicultura representa el 21,2% del volumen de la producción acuática total (acuicultura + pesca) de la UE, lo que supone un incremento en su importancia relativa respecto del año anterior, en el que fue del 20,0% (Informe Acuicultura 2014).

La producción de acuicultura tuvo un valor en primera venta de 3842 millones de euros, un 6,3% menos que en 2011. Sin embargo, la importancia de la acuicultura no es igual en todos los países de la UE. En algunos, su relevancia económica y social supera ya a la de la pesca, como también ocurre en España en algunas Comunidades autónomas. La acuicultura desempeña un papel muy significativo en el desarrollo social y económico de determinadas zonas costeras y fluviales, además de en la preservación de la cultura marítimo-fluvial y pesquera de estas mismas zonas (ESACUA).

La principal especie producida en la UE es el mejillón, con 466995 t repartidos entre las especies *Mytilus edulis* (Figura 7) y *Mytilus galloprovincialis*, lo que supone

un 77.6% del total de moluscos producidos España es el Estado miembro de la UE con un mayor volumen de producción en acuicultura, con 264.162 t en 2012 (21,0% del total de la UE) y el principal recurso acuático vivo producido en España es el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), del que en 2012 se produjeron 231754 t provenientes íntegramente de la acuicultura (Figura 6).

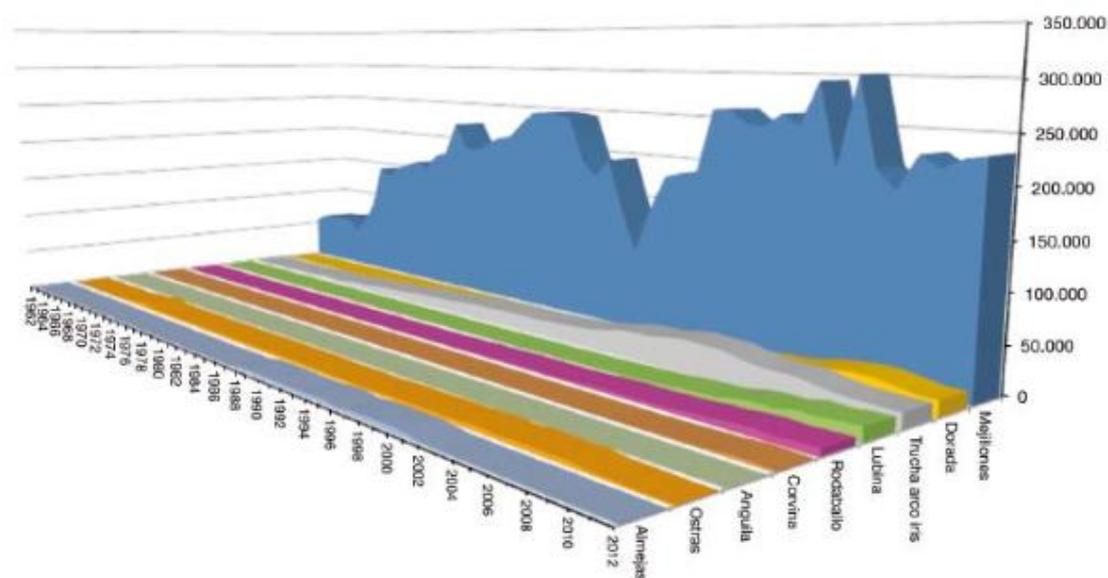


Figura 6. Evolución de la producción de la acuicultura en España, por especies, en el periodo 1962-2012. (MAGRAMA, JACUMAR, ESACUA, APROMAR y OPP)

La acuicultura española destaca a nivel europeo y mundial por la crianza de moluscos bivalvos. En el año 2012 supuso 214521 t (MAGRAMA-FAO), el 81,2% de la producción acuícola nacional. Este subsector se asienta sobre todo en el tradicional cultivo de mejillón en las 5 rías gallegas. En los últimos años, la producción de mejillón ha experimentado una cierta estabilización en el entorno de las 170000 - 230000 t, encontrándose el principal elemento de diferencias interanuales en la mayor o menor frecuencia de aparición de los episodios de mareas rojas que impiden la recolección regular del mejillón en las bateas. La producción recogida en las estadísticas de JACUMAR expone una cifra de 231754 t en 2012 (Figura 8) y un valor total en

primera venta de 107,8 millones de euros. La producción se concentra casi por completo en Galicia, con el 98% del total.

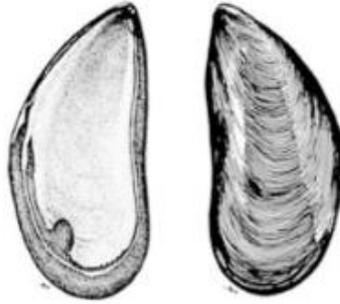


Figura 7. Ejemplar de *Mytilus edulis* (FAO)



Figura 8. Evolución de la producción de producción acuícola de mejillón en España entre 1962 y 2012 (FAO-MAGRAMA-JACUMAR)

La ostra es la segunda especie en importancia en términos productivos dentro del cultivo de moluscos en España. Dos son las especies producidas: la ostra plana (*Ostrea edulis*) y el ostión japonés (*Crassostrea gigas*) (Figura 9). La producción agregada en 2012 para ambas especies fue de 1756 t y su valor económico 4,4 millones de euros (Figura 10).

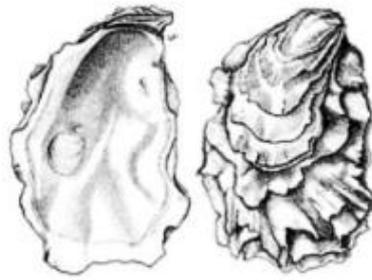


Figura 9. Ejemplar de *Crassostrea gigas* (FAO)

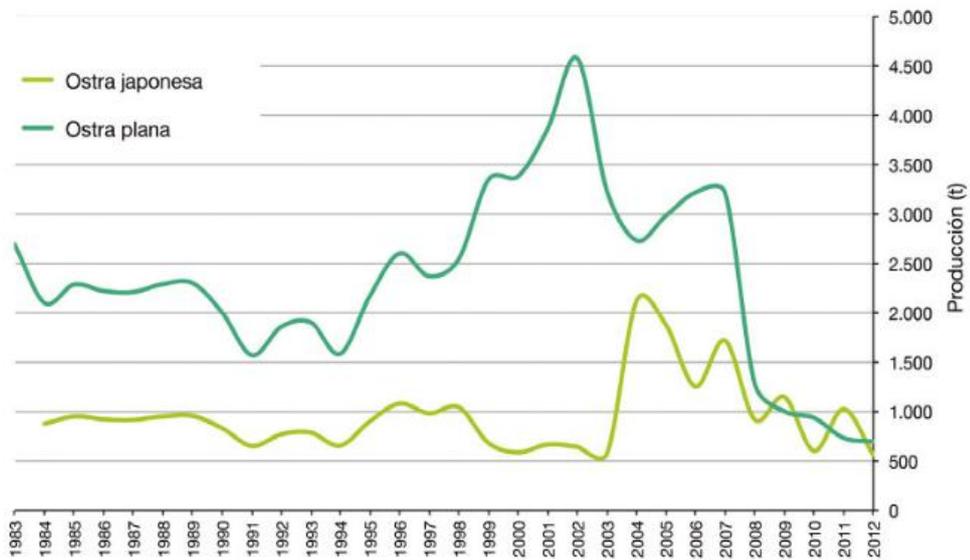


Figura 10. Evolución de la producción acuícola de ostras en España entre 1983 y 2012 (MAGRAMA-FAO)

3.1.3. ESTUARIOS DEL EO Y VILLAVICIOSA

Ría del Eo

La Ría del Eo es el mayor de los estuarios asturianos, actuando de límite occidental de la región con la vecina Galicia, autonomía en la que se incluye la mitad occidental del estuario. El territorio de la zona asturiana se reparte entre los concejos de Castropol, al norte, y Vegadeo, al sur (Figura 11).



Figura 11. Ubicación del estuario del Eo en Asturias (Red Ambiental de Asturias)

Tiene una forma alargada y estrecha, pudiéndose dividir en dos grandes segmentos. El comprendido entre la desembocadura y la villa de Vegadeo, en que adquiere una alineación prácticamente N-S, sobre una longitud de 9 km 750 m y una anchura media de 800 m, sin tener en cuenta las ensenadas laterales. Y el tramo Vegadeo- Abres, en que la orientación cambia a NNE-SSO en una longitud de 4 km 500 m y anchuras sumamente variables, con un máximo de 571 m al NE de Ría de Abres y un mínimo de 95 m justo al N de esta área. (Flor, 1992)

El estuario del Eo está semiconfinado por un estrechamiento rocoso que hace las veces de una barra arenosa; es el paso de Los Santos el que permite el cierre estuarino, mejor que el más externo comprendido entre las puntas de La Cruz (Asturias) y la isla de La Pancha (Galicia). En esta ensenada de Arnao se estabilizan las playas más occidentales de Asturias que se cubren prácticamente durante las pleamares (Red Ambiental de Asturias).

En el estuario del Eo la importancia del aporte aguas dulces hace que se encuentren muy desarrolladas las marismas de tipo subhalófilo. Las marismas halófilas, en cambio, se desarrollan principalmente en las ensenadas laterales de La Linera y el Torrón. Estuarios de características muy similares al del Eo debieron de ser el de Navia y el del Nalón. Sin embargo, ambos presentan en la actualidad un peor estado de conservación.

Los fangos cubiertos casi permanentemente por las aguas aparecen poblados de seda de mar ancha (*Zostera marina*), mientras que aquellos otros descubiertos habitualmente en la bajamar se pueblan de seda de mar estrecha (*Zostera noltii*). Ambos tipos de comunidad son muy raros en Asturias y aparecen exclusivamente en las rías del Eo y Villaviciosa. La ensenada lateral de La Linera de características muy halófilas alberga algunas de las praderas de *Zostera marina* más extensas del litoral cantábrico, que sin embargo sufren el impacto negativo que provoca la ocupación del área para actividades de acuicultura y los trabajos de extracción de xorra para cebo. La conservación de las comunidades de *Zostera marina* es de especial interés, habida cuenta de que su presencia en Villaviciosa es muy puntual. En áreas más elevadas topográficamente y por tanto que permanecen emergidas durante más tiempo, tienden a desarrollarse matorrales de porte bajo y almohadillado formados por plantas de gruesos tallos carnosos y sin hojas evidentes. En Villaviciosa dichas formaciones tienen una extraordinaria riqueza y diversidad. En el Eo, sin embargo, la menor salinidad del medio hace que los matorrales halófilos sean escasos y más pobres en especies, limitándose a algunas poblaciones de *Sarcocornia perennis* y *Halimione portulacoides*, más abundantes en la margen gallega que en la asturiana, especialmente en la ensenada de Aceñas (Flor, 1992). Cabe destacar que este estuario es la puerta de entrada al río Eo de especies de peces migradores diadromos como la lamprea marina (*Petromyzon marinus*), el sábalo (*Alosa alosa*), el salmón atlántico (*Salmo salar*) y la anguila (*Anguilla anguilla*).

Ría de Villaviciosa

El territorio declarado Reserva Natural Parcial pertenece en su totalidad al concejo de Villaviciosa. El municipio, con una superficie de algo más de 276 km² y una población que supera los 14.000 habitantes, es uno de los 20 concejos costeros del Principado de Asturias. La capital municipal, La Villa, originalmente Maliayo, es el principal núcleo urbano con una población que ronda los 4.800 habitantes. Situada en el extremo sur de la Reserva, dista unos 30 km de Gijón y 42 km de Oviedo. La Ría ha sido un elemento fundamental en la articulación del territorio municipal y aún hoy continúa siéndolo (Figura 12).



Figura 12. Ubicación del estuario de Villaviciosa en Asturias (Red Ambiental de Asturias)

A lo largo del s. XIX, los industriales maliayos intentaron en repetidas ocasiones lograr los fondos necesarios para el drenaje del estuario y la construcción de un puerto de mayor calado, llegándose a redactar, en 1866, un proyecto que pretendía la construcción de una dársena en El Puntal y otra en la cola de la ría, unidas ambas mediante un canal. A la larga, las obras se limitaron a la construcción de la primera de las dársenas y la canalización de la ría entre ésta y la barra arenosa de entrada. Las obras de mejora del puerto estuvieron siempre ligadas a los diferentes proyectos de construcción de una vía férrea que comunicara la cuenca minera de Lieres con el puerto de Villaviciosa para efectuar el embarque del carbón. No obstante, dichos proyectos no llegaron nunca a cuajar, consolidándose en cambio como puertos carboneros los de Avilés, San Esteban de Pravia y Gijón. La Ría de Villaviciosa quedó de ese modo fuera de los flujos principales de tráfico de mercancías, coyuntura histórica que ha permitido que conservara hasta nuestros días sus características naturales. (Red Ambiental de Asturias) (Flor, 1992)

El estuario recibe un escasísimo caudal de agua dulce, lo que determina una acusada influencia mareal que permite el desarrollo de grandes áreas de marisma halófila, es decir, de las comunidades vegetales más tolerantes a la salinidad marina. La escasa influencia fluvial se manifiesta además en la formación de amplios bancos de fango durante la bajamar, áreas que constituyen el hábitat idóneo para multitud de especies de aves limícolas migradoras.

La Ría de Villaviciosa presenta una planta casi triangular de unos 8 km de longitud, desde Puente Güetes a la playa de Rodiles, y una anchura que oscila entre los 1.000 m, a la altura de Misiego, y los 200 en su parte más meridional.

Una de las principales características geomorfológicas del estuario es su alto grado de colmatación sedimentaria, hecho que favorece la formación de diferentes ambientes. Los sedimentos arenosos, de mayor tamaño de grano, son de origen marino y son introducidos en el estuario por el flujo mareal. Al contrario, los limos que forman las llanuras fangosas son de origen fluvial. La distribución de las arenas sigue el modelo general en la costa asturiana y los mayores arenales se sitúan a la derecha de la ría, depositados allí por las corrientes litorales dominantes de componente Oeste a Este

El geólogo Germán Flor (1992), diferencia por sus características geomorfológicas las cuatro unidades que se describen a continuación:

– Desembocadura, que constituye un complejo morfológico con predominio de los depósitos arenosos. El más evidente es la playa de Rodiles, que se extiende al este de la desembocadura con 1 km de longitud y 350.000 m² de superficie en bajamar. La acción del viento crea en Rodiles un campo dunar que cierra por el sur la playa y donde se pueden reconocer dunas primarias, o móviles, y dunas secundarias, o fijas, estas últimas muy alteradas.

– Bahía arenosa, que se extiende sobre la ensenada de Misiego y al sur de El Puntal. A ambos lados del canal principal aparecen amplias llanuras arenosas de superficie rugosa decorada con *ripples*, rizaduras en la arena producidas por las corrientes y oleajes internos. Bordeando estas llanuras se encuentran las playas estuarinas, depósitos arenosos planos. La acción del viento sobre la arena seca modela pequeños campos dunares, dunas estuarinas, en las bajamares.

– Llanuras fangosas, que forman la unidad de mayor extensión. Los sedimentos están formados por una mezcla de limos, arenas y materia orgánica. Esta composición hace que se trate de un área de gran productividad, lo que favorece el desarrollo de la vegetación. Parte de esta superficie ha sufrido procesos de desnaturalización para albergar usos agrarios o urbanos, son los denominados porreos.

– Canal superior, donde predomina la acción fluvial. El canal principal se transforma progresivamente en un cauce de río cuyas márgenes se encuentran fuertemente antropizadas.

En los estuarios asturianos pueden diferenciarse dos grandes ambientes: el de la marisma halófila y el de la marisma subhalófila. En el primero la influencia mareal es muy acusada y con ello la salinidad de las aguas. En el segundo, dicha influencia es contrarrestada por las aguas dulces aportadas por los cauces fluviales que desembocan en el estuario. Obviamente, cuanto menor sea dicho caudal, mayor será la superficie ocupada por la marisma externa halófila. El estuario de Villaviciosa es un claro ejemplo de ello, los ríos de Valdebarcu y Sebrayu dan lugar a un escaso aporte de aguas dulces y la influencia marina se deja sentir durante la pleamar casi hasta el fondo de la Ría. Estuarios de similares características debieron de ser los de Aboño, Gijón y Avilés. Sin embargo, todos ellos han sido casi completamente destruidos, de ahí la importancia que para la conservación de la naturaleza tiene la protección de la Ría. El resto de grandes estuarios de Asturias, el del Eo o el del Nalón, por ejemplo, son alimentados por cauces mayores y en ellos tiene gran representación el área ocupada por la marisma subhalófila. Las marismas constituyen medios de extraordinaria complejidad biológica y de gran productividad. La diversidad de la marisma halófila queda evidenciada por las numerosas comunidades vegetales que llegan a reconocerse. En las zonas de mayor profundidad del estuario de Villaviciosa, cubiertas por las aguas en la mayor parte de las bajamares, crece la seda de mar ancha (*Zostera marina*), especie protegida por la normativa autonómica que en Villaviciosa está escasamente representada, siendo mucho más abundante en la ría del Eo, su otra localización asturiana. Sin embargo, en zonas que quedan al descubierto en la mayoría de bajamares crece la seda de mar estrecha (*Zostera noltii*), especie también protegida por la normativa autonómica y muy abundante en Villaviciosa. La seda de mar estrecha ocupa amplias zonas del estuario desde el islote arenoso de El Bornizal a los Muelles de la Espuncia, casi en la cola del estuario. La comunidad sufre no obstante la importante agresión que supone la intensidad de las actividades de extracción de xorra para su uso como cebo de pesca.

3.2. ACTIVIDADES HUMANAS QUE AFECTAN A LOS ESTUARIOS

Estas zonas son afectadas de manera muy importante por numerosas actividades humanas, que aprovechan, entre otras características de estos entornos, la anteriormente comentada de su capacidad de producción. En este caso, es especialmente llamativa en las costas cantábricas (con las rías gallegas como ejemplo paradigmático) la producción de moluscos para el consumo humano. Estos efectos se dejan notar no sólo sobre las especies que son de consumo para el ser humano, sino que también afectan a numerosas otras, y teniendo influencia, además, en la calidad del agua, el deterioro del hábitat, cambios tróficos y, como consecuencia de todo esto, también en la salud y el entorno humanos.

Existen numerosas causas provocadas por los humanos que conducen a la pérdida de hábitats y a la destrucción de los estuarios. Una de las grandes y más importantes actividades que conllevan la destrucción de los estuarios es el drenaje para convertirlos en zonas de cultivo. Otras veces, para convertirlas en puertos o expandir las zonas urbanas. Otras de las principales actividades, que veremos a continuación, y que tienen gran relevancia tanto económico como ambiental, son la pesca y la acuicultura. Y por último, la explotación de la tierra circundante, así como el desagüe de contaminantes, la actividad portuaria, las infiltraciones y las poblaciones costeras, como podemos observar en la figura 13:



Figura 13. Diferentes actividades antropogénicas que afectan a los estuarios(<http://www.waikatoregion.govt.nz>)

3.2.1.PESCA Y ACUICULTURA MARINA COSTERA

En zonas de gran densidad de cría y de un intercambio reducido de agua, la propia acuicultura puede provocar problemas como el del enriquecimiento béntico y de aguas hipóxicas. Unas cargas excesivas de nutrientes procedentes de la acuicultura puede dar lugar a una eutrofización local en zonas con bajo intercambio de agua. En casos extremos, los brotes de marea roja (Baden *et al.*, 1990) pueden derivar de la escorrentía de nutrientes (Ackefors y Enell, 1994). Éstas tienen graves repercusiones en la propia acuicultura y en otros sectores. En algunas zonas tropicales, la conversión extensiva de aguas pantanosas del litoral y bosques de manglares para el cultivo de peces y camarones en estanques ha reducido considerablemente la reposición de las poblaciones naturales de camarones que emplean esas zonas como criaderos (Phillips *et al.*, 1993). También ha acabado con zonas de gran diversidad y ha repercutido en otras funciones de las marismas costeras. Por ejemplo, ha comprometido la función que estas

tierras pantanosas costeras desempeñan en servir de lugares de reproducción y criaderos de peces y otras especies, y en proteger a la zona costera contra tormentas, al propio tiempo que sirven de zonas amortiguadoras que reducen la escorrentía de nutrientes y limo en el medio ambiente marino

3.2.2. CONTAMINACIÓN Y ALTERACIONES DEL HÁBITAT

Numerosas causas independientes de la pesca y la acuicultura normalmente debidas a la actividad antropogénica pueden afectar a la salud ambiental de los estuarios (NOAA):

Sobrecarga de Nutrientes

Los nutrientes tales como el nitrógeno y el fósforo son necesarios para el crecimiento de las plantas y los animales y sostener un ecosistema acuático saludable. Sin embargo, en exceso, los nutrientes pueden contribuir a enfermedades de peces, mareas marrones y rojas, florecimiento de algas y baja concentración de oxígeno disuelto. Las condiciones donde el oxígeno disuelto es menos de 2 partes por millón se conoce como *hipoxia*. Muchas especies no sobreviven por debajo de ese nivel (el nivel saludable de oxígeno disuelto en las aguas debe ser entre 5-6 partes por millón). Las fuentes de nutrientes incluyen fuentes precisas y fuentes dispersas tales como descargas de aguas de plantas de tratamiento, aguas de escorrentías de la agricultura, pozos sépticos, desperdicios de animales, sedimento, deposición atmosférica originada por plantas generadoras o por vehículos y descargas subterráneas.

El exceso de nutrientes estimula el crecimiento de algas. Según las algas mueren, se pudren y roban el oxígeno del agua. Las aguas también previenen que los rayos solares penetren en el agua. Los peces y los moluscos son privados de oxígeno y las hierbas marinas de los rayos solares y todo esto representa pérdidas. Los animales que dependen de las hierbas marinas como fuente de alimento o refugios abandonan el área o se mueren. Además, el crecimiento excesivo de algas puede resultar en mareas marrones y rojas, las cuales han sido asociadas a mortandad de peces e impactos

negativos a los animales de concha. El aumento de algas puede también causar malos olores y disminuir el valor estético del estuario.

Patógenos

Los agentes patógenos son organismos causantes de enfermedades tales como virus, bacterias y parásitos. Se encuentran en las aguas marinas y pueden ser una amenaza a la salud de los nadadores, buzos, surfistas y consumidores de mariscos. Los peces y los moluscos concentran los patógenos en sus tejidos y pueden causar enfermedades a las personas que los consumen. La contaminación con patógenos puede causar el cierre de playas y áreas de pesca. Los agentes patógenos pueden provenir de aguas de escorrentías urbanas y agrícolas, desperdicios de botes y marinas, mal manejo de sistemas de pozos sépticos, descargas de plantas de tratamiento, vehículos recreacionales, conexiones ilegales de sanitarios y desperdicios de animales.

Químicos Tóxicos

Sustancias tóxicas tales como metales, hidrocarburos policíclicos aromáticos, bifenilos policlorinados, metales pesados, pesticidas, aceites y plaguicidas son de interés para el ambiente estuarino. Estas sustancias entran al agua a través de pluviales, descargas industriales y escorrentías de aguas agrícolas y de la calle, descargas de plantas de tratamiento y de la deposición atmosférica. Muchos contaminantes tóxicos se encuentran también en los sedimentos y son resuspendidos al medioambiente por actividades tales como dragados y paseos en bote. Una vez consumidos por las plantas y los animales, éstos se acumulan en los tejidos, en un proceso conocido como biomagnificación. Productos de la actividad humana como el insecticida DDT o el metal mercurio, son conocidos por pasar desde la base de la cadena alimenticia (algas, ostras, peces) a la cima (aves, osos, humanos).

Los organismos que viven en las profundidades están expuestos a estas sustancias y pueden representar un riesgo a la salud humana si se consumen; como consecuencia, se pueden cerrar lugares de pesca.

Pérdida y Degradación de Hábitats

El bienestar y la biodiversidad de los sistemas marinos y estuarinos dependen del mantenimiento de una calidad superior del hábitat. Las mismas áreas que frecuentemente atraen el desarrollo humano también proveen alimento, albergue, corredores migratorios y criaderos para una variedad de organismos costeros y marinos. Además, estos hábitats también desarrollan otras funciones importantes tales como almacenamiento de agua y protección de inundaciones. Los ecosistemas pueden ser degradados a través de pérdida de hábitat –tal como la conversión de un área de hierbas marinas a una isla de material dragado– o por un cambio o degradación en la estructura, función o composición. Las amenazas a los hábitats incluyen la conversión de espacios abiertos de tierras y bosques a zonas comerciales y agrícolas, construcción de carreteras, presas y canalizaciones. La pérdida y degradación de humedales causada por el dragado y el relleno ha limitado la cantidad disponible de hábitats para sostener poblaciones silvestres y organismos marinos. Todas estas actividades pueden causar incremento en las escorrentías de sedimento, nutrientes y sustancias químicas. El exceso de nutrientes tales como el nitrógeno puede llevar a la proliferación de algas que disminuyen el oxígeno y bloquean la luz solar, matando la vegetación submarina.

Introducción de Especies

Intencionalmente o accidentalmente la introducción de especies invasivas generalmente resultan en impactos ecológicos, económicos y sociales inesperados para el ambiente estuarino.

A través de la depredación y la competencia, las especies introducidas han contribuido a la erradicación de algunas poblaciones nativas y a la reducción de otras, alterando la cadena alimentaria. La sobrepoblación con algunas especies herbívoras introducidas ha resultado en la sobreproducción de pasto y ha generado degradación y pérdida de ciénagas. Otros impactos incluyen: 1) alteración a los niveles de agua; 2) modificación de los ciclos de nutrientes o fertilidad del suelo; 3) aumento en erosión; 4) interferencia con la navegación, irrigación agrícola, pesca comercial y deportiva, uso de botes y de la playa; y 5) posible introducción de patógenos. Las fuentes de introducción de especies incluyen el lastre de navíos, cultivo en el mar y comercio de acuarios.

Alteración al Régimen Natural del Flujo

La alteración del régimen natural del flujo en los tributarios puede tener efectos significantes en la calidad de las aguas y la distribución de los recursos vivientes en los estuarios recipientes. El agua dulce es un recurso limitado en muchas áreas de la ciudad. El manejo humano de estos recursos ha alterado el ritmo y el volumen del influente a ciertos estuarios. Cambios en el flujo natural de agua dulce a ciertos estuarios pueden tener impactos significativos en la salud y en la distribución de plantas y vida silvestre. Mucho o poco las aguas dulces pueden afectar adversamente el desove de peces, la supervivencia de mariscos, la nidificación de aves, la propagación de semillas y otras actividades de temporada, en peces y vida silvestre. El afluente, además de cambiar los niveles de salinidad, provee nutrientes y sedimentos que son importantes para la productividad general del estuario.

Disminución en la Población de Peces y Vida Silvestre

La distribución y abundancia de peces y vida silvestre en el estuario, temperatura, salinidad, hábitat y disponibilidad de alimento...eventos inducidos por humanos que perturban o cambian las condiciones ambientales, afectan la distribución y abundancia de las especies en los estuarios. La disminución en la población de peces y vida silvestre ha resultado de la fragmentación y la pérdida de hábitats y de ecosistemas,

contaminación y disminución de calidad del agua, sobreexplotación de recursos y especies introducidas.

La pérdida de hábitats y su degradación puede causar la merma de la pesca comercial y deportiva, cambios en la población de especies de aves acuáticas y decrecimiento de hábitats para pájaros migratorios tropicales y otras especies. Contaminantes tales como herbicidas y plaguicidas y otros desperdicios ponen en amenaza los recursos vivientes a través de la contaminación de la cadena alimentaria y la eliminación de fuentes de alimento. Las escorrentías de fincas y ciudades y escapes tóxicos pueden alterar el hábitat acuático, dañar la salud de animales, reducir el potencial reproductivo y convertir muchos peces inadecuados para el consumo humano. Otras amenazas para la vida silvestre son: derrames de aceite, bioacumulación de toxinas, brotes de enfermedades contagiosas e infecciosas, proliferación de algas creando la mareas marrón y rojas. La sobreexplotación ocurre cuando los pescadores y cazadores, capturan tantos individuos, que su capacidad para mantener los niveles estables en la población se ven afectados. Las especies introducidas compiten con las especies nativas por alimento y hábitat.

3.3. EL USO DE MARCADORES GENÉTICOS COMO HERRAMIENTAS PARA LA MEJORA DE LOS NIVELES DE PRODUCCIÓN PRIMARIA EN LOS ESTUARIOS.

3.3.1. Control del estado general del estuario (biodiversidad). Métodos genéticos

3.3.1.1. PCR clásica (Polymerase chain reaction)

La técnica de PCR fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1984 (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988), quien recibió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1993 por esta invención. Esta técnica permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN que sirve como molde gracias a la acción de la enzima *Taq*

polimerasa. Esta enzima, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, es una proteína termoestable (que actúa a altas temperaturas), que polimeriza nucleótidos de manera fiel y permite la formación de nuevas moléculas de ADN. El fundamento de la PCR es la amplificación *in vitro* de ADN mediante una ADN polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos que delimitan el fragmento a amplificar. Este método enzimático permite copiar de forma exponencial un fragmento concreto de un genoma, pudiéndose obtener millones de copias de él. Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. En el primer paso, desnaturalización, la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello, se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). En la alineación, que es la segunda etapa, los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. En el tercer paso, elongación, se produce la síntesis de una cadena sencilla en la dirección 5'→3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde y produciéndose así un fragmento de doble cadena por complementariedad. Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo se tienen 4, al final del tercero 8... Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión exponencial.

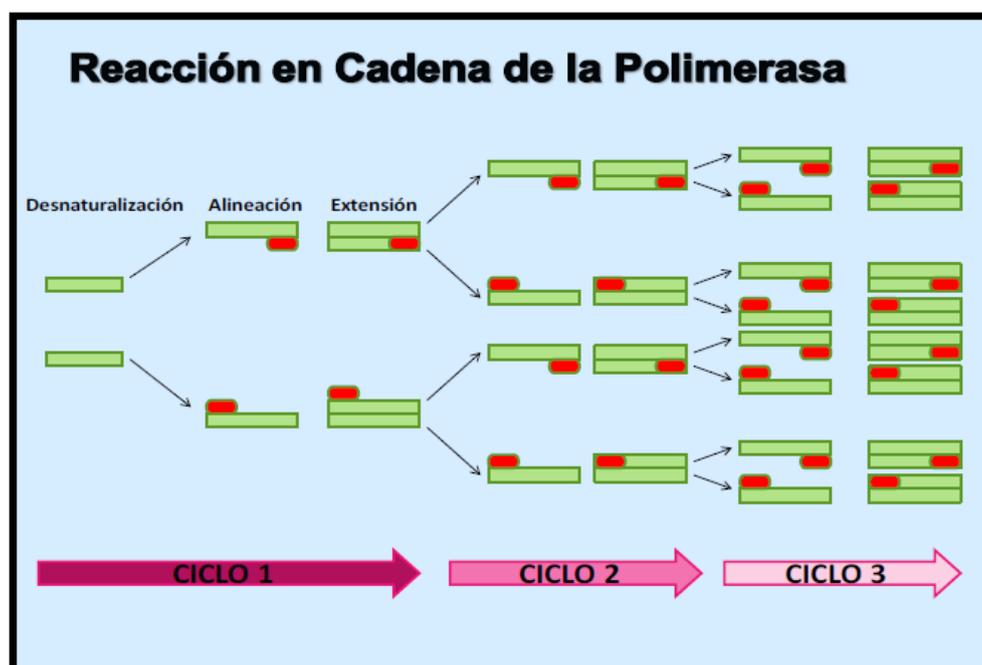


Figura 14. Aumento exponencial del ADN en ciclos de PCR

3.3.1.2. Marcadores genéticos tradicionales

Microsatélites

Las secuencias de tipo microsatélite (SSR o STR, Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats), muy abundantes en los genomas de eucariotas y algunos procariontes, están constituidas por unidades cortas (motivos básicos) de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces. Cada secuencia SSR se define por el tipo de unidad repetida (lo más frecuente mono, di, tri o tetra, aunque también penta o hexanucleótidos) y por el sitio que ocupan en el genoma (locus). Su frecuencia y tipo de repetición varía en los genomas de distintas especies. Se trata de secuencias altamente variables, entre y dentro de individuos. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estas diferencias en longitud surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo en tamaño es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Ellegren, 2004). El uso de las secuencias microsatelites como marcadores genéticos se inicia con el desarrollo y generalización de la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis *et al.*, 1986). A pesar de que los microsatélites poseen altas tasas de mutación, las regiones flanqueantes están más conservadas y se emplean para la amplificación específica de los alelos de cada locus. Al final de los 80 es cuando se publican los primeros trabajos sobre el aislamiento y caracterización de microsatélites (Tautz, 1989). A partir de entonces su uso se ha difundido rápidamente, revolucionando los campos de la biología molecular, la genética cuantitativa y la genética de poblaciones. Los SSRs han sido durante muchos años los marcadores preferidos para múltiples objetivos, genética forense, test de paternidad, análisis poblacionales, estudios de diversidad e identificación varietal, construcción de mapas genéticos y estudios de asociación.

Su detección se basa en la amplificación por PCR de la región que los contiene, empleando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes, y la posterior visualización de la diferencia de tamaño de estos amplicones. Sin embargo, su desarrollo requiere información de secuencia y por tanto, hasta hace poco tiempo, no

eran marcadores muy frecuentes en especies no modelo. Inicialmente, para conocer la secuencia de las regiones flanqueantes de los SSR se empleaban sondas de los motivos repetidos para cribar genotecas completas, secuenciándose los clones positivos. Esta estrategia de aislamiento era efectiva en taxones en los que la cantidad de secuencias microsatélites era alta o cuando se requería un número reducido de marcadores. Pronto se desarrollaron métodos alternativos para aumentar la eficiencia en la identificación de microsatélites. El método más ampliamente utilizado ha sido la utilización de genotecas genómicas enriquecidas en cada especie, en las que los fragmentos utilizados para construir la genoteca ya son ricos en microsatélites. Con el avance de las nuevas tecnologías de secuenciación NGS, (Next Generation Sequencing), fundamentalmente las tecnologías 454 e Illumina, que han llevado al abaratamiento del proceso de obtención de secuencias, actualmente se dispone de grandes colecciones de secuencias, tanto genómicas como de ESTs (Expressed Sequence Tags) para muchas especies, lo que ha supuesto un incremento considerable del número de este tipo de marcadores, que son identificados *in silico*, mediante el empleo de distintos algoritmos informáticos, y después validados experimentalmente.

Gen COI mitocondrial

El fragmento del gen mitocondrial que codifica para la proteína citocromo oxidasa I (COI) (650pb) fue el primero empleado como código de barras, y con gran aceptación en la comunidad científica (Hebert *et al.*, 2003 a,b; Hajibabaei *et al.*, 2006b; Triantafyllidis *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008). Las pruebas hechas hasta el momento en diferentes grupos demuestran que el fragmento de COI, puede ser útil y suficiente para proveer un código de cuatro letras e innumerables combinaciones para lograr la identificación de aproximadamente un 99% de las especies. Se han propuesto otros genes como por ejemplo 16S para anfibios. Esto se debe a que se han presentado dificultades con las amplificaciones del gen COI, posiblemente por la presencia de mutaciones en la región de unión de los oligonucleotidos. Sin embargo, Vences *et al.*, (2005) lo proponen como complementario. Algunos autores como Moura *et al.*, (2008), también han usado el 16S para delimitar especies crípticas en cnidarios. Otros genes propuestos son el gen mitocondrial citocromo b, las subunidades pequeña y grande del

ARN ribosomal nuclear (nSSU y 18S), los nucleares ITS, matK y trnH-psbA, siendo los dos últimos empleados fundamentalmente en plantas.

3.3.1.3. NGS (Secuenciación de nueva generación)

Un punto común entre todas las tecnologías de NGS es que el fragmento a amplificar se une o inmoviliza en una superficie sólida o soporte; esta inmovilización de fragmentos separados espacialmente permite la realización de miles e incluso billones de reacciones de secuenciación simultáneamente. La mayoría de los sistemas de imágenes no pueden detectar (no tienen suficiente sensibilidad) señales de fluorescencia muy bajas, por lo que se necesita la amplificación de los fragmentos. mediante *emulsion PCR* (emPCR). En el caso de Roche/ 454 los fragmentos se amplifican dentro de una gota de agua en un sistema libre de células (emulsiones en microrreactores), tal y como se muestra en la figura 15:

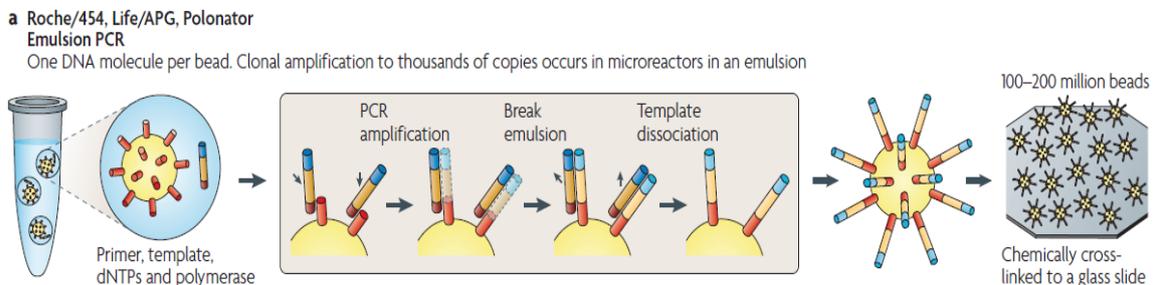


Figura 15. PCR en emulsión; etapas del proceso (Michael L. Metzker)

Después de la amplificación y enriquecimiento de estas bolas, millones de ellas pueden inmovilizarse en un gel de poliacrilamida sobre un portaobjetos estándar, unirse químicamente sobre una superficie de vidrio o depositarse en pocillos individuales de una placa de muy pequeño volumen (PicoTiterPlate o PTP) en los cuales se realizará la posterior secuenciación propiamente dicha. Se intenta que en cada microesfera haya un único fragmento de ADN. A continuación, se realiza en cada celdilla una pirosecuenciación. La secuenciación se realiza en paralelo añadiendo uno

de los cuatro nucleótidos y observando qué celdilla se ilumina, se lava y se añade el siguiente nucleótido (se repite el mismo proceso hasta completar la secuencia) (figura 16). El fundamento de la secuenciación se basa en controlar el flujo secuencial y cíclico de nucleótidos sobre la placa en combinación con un sistema de detección bioluminiscente que permite convertir los productos generados durante la incorporación de nucleótidos (pirofosfato) en luz (por medio de la luciferasa) que es detectable por el dispositivo CCD.

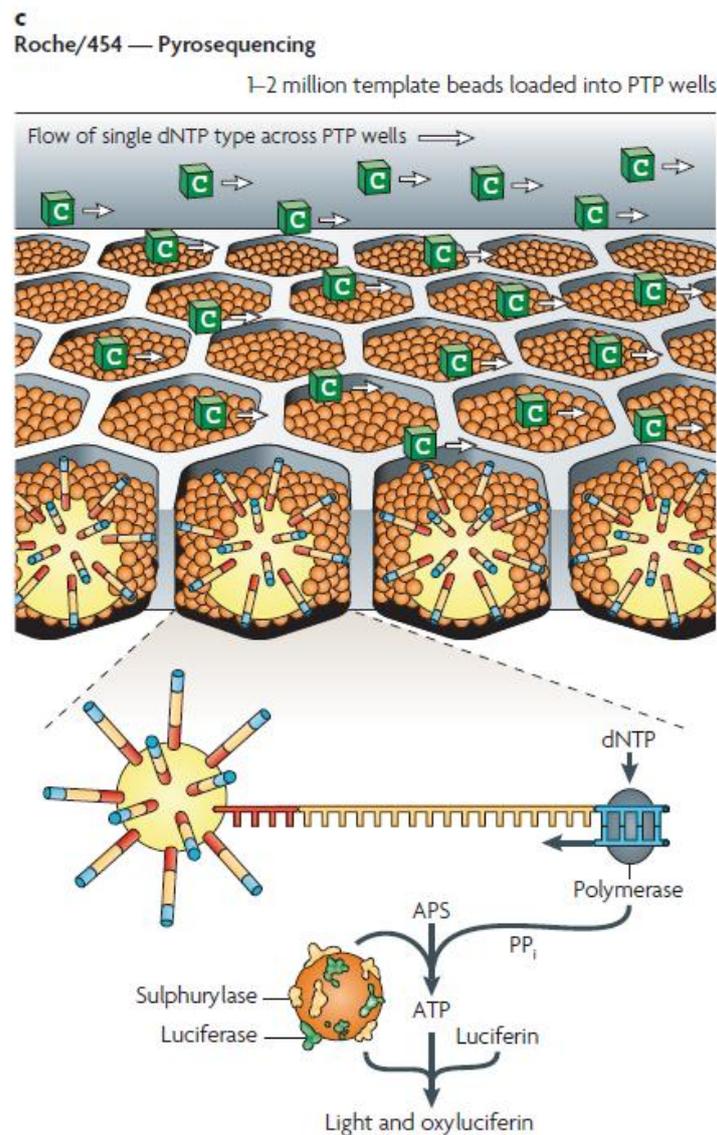


Figura 16. Pirosecuenciación en placa PicoTiterPlate o PTP

3.3.2.El problema invasiones biológicas, metodos tradicionales vs NGS

Las invasiones marinas representan una amenaza global para la biodiversidad, y por tanto para los recursos marinos. Muchas comunidades biológicas acuáticas se deterioran por la expansión incontrolada de invasores, y también actividades productivas como la acuicultura, pesca y marisqueo pueden verse gravemente afectadas, llegando a amenazar la seguridad alimentaria en muchas regiones

Intuitivamente se entiende que es imposible controlar por métodos clásicos de muestreo e inventario visual y/o genético la aparición temprana de todas las especies que potencialmente son focos de invasiones, porque requeriría un esfuerzo inmenso de recursos humanos e innumerables especialistas. El esfuerzo es aún mayor en hábitats tan diversos y con zonas de difícil acceso físico como la costa cantábrica, que incluye playas, marismas, acantilados rocosos, pedreros, estuarios y puertos pesqueros y comerciales de diferente dimensión. Para que el reto de detección temprana de invasores sea realista parece lógico implicar a los ciudadanos y habitantes locales en la vigilancia de las invasiones biológicas en las costas cercanas. La participación de voluntarios podría denominarse "herramienta social" o, de forma más precisa, ciencia ciudadana.

La identificación de una cepa o especie es algo fundamental en el inicio de cualquier investigación. Esta consiste en la identificación de una especie, cepa o híbrido, ya sea para reconocer la posible presencia de más de una especie dentro de un grupo, o la identificación de especies invasoras. Las herramientas biológicas que se usan actualmente para la detección de especies invasoras implican el muestreo (captura) de individuos problema en el campo y su examen individual, en principio morfológico y en casos de morfología ambigua o incierta, genético. Las herramientas genéticas utilizadas actualmente para identificar especies se basan en amplificación mediante PCR de genes o zonas de ADN conservadas dentro de especie y diferentes entre especies. Los genes, protocolos y marcadores empleados son muy diversos. Hay marcadores universales, como los de tipo Barcoding para identificar animales, para el que se ha propuesto la utilización de la secuenciación del gen mitocondrial Citocromo oxidasa I (COI) (Dupont *et al.*, 2007), el cual permitiría identificar a nivel de especie una gran diversidad de organismos marinos; o plantas (matK, rbc), y específicos de grupo taxonómico que han

sido diseñados cuando los organismos diana se conocen a priori y no se trata de estimar la biodiversidad global sino de localizar determinadas especies o variantes.

4. METODOLOGÍA

ADN ambiental

Extracción de las muestras

Las muestras de agua fueron recolectadas de los dos estuarios en diferentes puntos de muestreo (Tabla 1). Un total de 7,5 l de agua fueron recogidos el 3 de febrero de 2014 en la ría de Villaviciosa, en 3 puntos de muestreo: Centro de Interpretación, La Capilla y cerca de la fábrica en donde se produce sidra (figura 17). Otros 7,5 l de agua fueron también recogidos en la ría del Eo el 18 de febrero en otros tres puntos de muestreo: cerca del parque de ostras (oysterpark), el puerto y aguas arriba de la ría (figura 18). Se utilizaron botellas de 0,5 l. Las muestras se recogieron a una profundidad aproximada de 10-20 cm bajo la superficie del agua con marea baja. A continuación, fueron almacenadas a 20°C hasta la extracción del DNA.



Fig. 17. Puntos de muestreo en la ría de Villaviciosa (ArcGis)



Fig. 18 Puntos de muestreo en la ría del Eo (<http://ana-geo.blogspot.com.es/2009/07/reservas-de-la-biosfera-en-galicia.html>)

<u>Fecha</u>	<u>Número de botellas (0.5 L)</u>	<u>Estuario</u>	<u>Punto de muestreo</u>
03/02/2014	5	Ria de Villiviciosa	Centro Interpretación
03/02/2014	5	Ria de Villiviciosa	La Capilla
03/02/2014	5	Ria de Villiviciosa	Fábrica
18/02/2014	4	Ria del Eo	Oysterpark
18/02/2014	4	Ria del Eo	Port
18/02/2014	4	Ria del Eo	Upstream

Tabla 1. Muestras totales extraídas

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN a partir de las muestras recogidas de agua se utilizó un kit comercial, el PowerWater® DNA isolation kit de MO-BIO Laboratories, Inc.

El kit consta de los siguientes componentes (Figuras 19 y 20):

Component	14900-50-NF
Solution PW1	55 ml
Solution PW2	11 ml
Solution PW3	2 x 18 ml
Solution PW4	2 x 18 ml
Solution PW5	2 x 18 ml
Solution PW6	5.5 ml
PowerWater® Bead Tubes	50
Spin Filters	50
2 ml Collection Tubes	250

Figura 19. Tabla con los componentes del kit de extracción de ADN PowerWater®



Figura 20. Imagen de los distintos componentes del kit PowerWater®

Para llevar a cabo la extracción, se siguió el siguiente protocolo que facilita el propio laboratorio MO-BIO.

- 1) Filtrar las muestras de agua utilizando filtros de embudo desechables o reutilizables junto con una fuente de vacío. En este caso, se utilizaron filtros de membrana de 0.22 μm .
- 2) Retirar la parte superior de 100 ml de la copa de filtrado desenchajándolo.
- 3) Usando dos pares de pinzas estériles, separar la parte blanca del filtro de membrana y enrollarlo con la parte superior de la membrana hacia adentro.
- 4) Introducir el filtro en el PowerWater[®] Bead Tube de 5 ml.
- 5) Añadir 1 ml de solución PW1 al PowerWater[®] Bead Tube. (La solución PW1 debe ser templada para disolver precipitados antes de su uso, y debe ser utilizada mientras aún esté templada)
- 6) Asegurar horizontalmente el PowerWater[®] Bead Tube al adaptador a Vortex MO BIO.
- 7) Agitar al vortex a velocidad máxima durante 5 minutos.
- 8) Centrifugar los tubos a $\leq 4000 \times g$ durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- 9) Transferir el sobrenadante a un 2 ml Collection Tube. Tomar el sobrenadante utilizando una punta de pipeta de 1 ml.
- 10) Centrifugar a $13000 \times g$ durante un minuto
- 11) Evitando el sedimento, transferir el sobrenadante a un 2 ml Collection Tube.
- 12) Añadir 200 μl de solución PW2 y agitar brevemente para mezclar. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
- 13) Centrifugar a $13000 \times g$ durante un minuto
- 14) Evitando el sedimento, transferir el sobrenadante a un 2 ml Collection Tube.
- 15) Añadir 650 μl de solución PW3 y agitar en el vortex ligeramente para mezclar
- 16) Cargar 650 μl de sobrenadante en un Spin filter y centrifugar a $13000 \times g$ durante 1 minuto. Descartar el fluido y repetir la operación hasta que todo el sobrenadante haya sido cargado.
- 17) Colocar el Spin filter en un 2 ml Collection Tube
- 18) Agitar para mezclar, la solución PW4 antes de su uso. Añadir 650 μl de solución PW4 y centrifugar a $13000 \times g$ durante 1 minuto.

- 19) Descartar el fluido y añadir 650 µl de solución PW5 y centrifugar a 13000 x g durante 1 minuto.
- 20) Descartar el fluido y centrifugar de nuevo a 13000 x g durante 2 minutos para eliminar el lavado residual.
- 21) Colocar el Spin filter en un 2 ml Collection Tube.
- 22) Añadir 100 µl de solución PW6 al centro del filtro de membrana blanco.
- 23) Centrifugar a 13000 x g durante 1 minuto.
- 24) Descargar el Spin filter. El DNA está listo para siguientes aplicaciones. Se debe conservar congelado (-20°C a -80°C)

PCR, secuenciación masiva y análisis bioinformáticos

Se utilizó el gen COI mitocondrial y se utilizaron los primers universales jgLCO1490 y jgHCO2198 propuestos por Geller, Meyer, Parker y Hawk (2013)

Para los procedimientos de Metabarcoding se utilizó la secuenciación masiva utilizando la tecnología de secuenciación masiva 454 de Roche GS-FLX. En este caso las PCR tienen algunas peculiaridades. Se utilizaron pares de marcadores iniciadores y fragmentos llave para la secuenciación masiva en la plataforma Roche/454 para la amplificación de los fragmentos cortos por PCR del gen mitocondrial COI (Tablas 2 y 3).

Fusion Primer	Key	MID	Primer
ccatctcatccctgcgtgtctccgac	tcag	ACGAGTGCCT	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG
ccatctcatccctgcgtgtctccgac	tcag	ACGCTCGACA	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG
ccatctcatccctgcgtgtctccgac	tcag	AGACGCACTC	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG
ccatctcatccctgcgtgtctccgac	tcag	AGCACTGTAG	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG
ccatctcatccctgcgtgtctccgac	tcag	ATCAGACACG	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG
ccatctcatccctgcgtgtctccgac	tcag	ATATCGCGAG	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG
ccatctcatccctgcgtgtctccgac	tcag	CGTGTCTCTA	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG

Tabla 2. Primers directos de la PCR para la secuenciación masiva posterior con Roche/ 454

Fusion Primer	Key	MID	Primer
cctatcccctgtgtgccttggcagtc	tcag	ACGAGTGCGT	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA
cctatcccctgtgtgccttggcagtc	tcag	ACGCTCGACA	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA
cctatcccctgtgtgccttggcagtc	tcag	AGACGCACTC	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA
cctatcccctgtgtgccttggcagtc	tcag	AGCACTGTAG	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA
cctatcccctgtgtgccttggcagtc	tcag	ATCAGACACG	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA
cctatcccctgtgtgccttggcagtc	tcag	ATATCGCGAG	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA
cctatcccctgtgtgccttggcagtc	tcag	CGTGTCTCTA	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA

Tabla 3. Primers reversos de la PCR para la secuenciación masiva posterior con Roche/454

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo por Macrogen Corea basadas en el protocolo original de Meusnier *et al.*, (2008). Las bandas de tamaño esperado (\approx 800-900 pb) fueron secuenciadas mediante la tecnología de pirosecuenciación de Roche 454. La siguiente tarea fue asignar las lecturas multiplexadas a muestras basadas en su código nucleotídico. El software utiliza las secuencias código para separar las lecturas de cada muestra mediante la asignación de las bases iniciales y finales de las lecturas a las secuencias conocidas usadas en la preparación de las librerías. Este paso conforma un filtro de calidad basado en las características de cada secuencia, eliminando cualquier secuencia de baja calidad o lecturas ambiguas.

A continuación se llevó a cabo un control de calidad y filtro de las lecturas resultantes (archivos *fasta* y *fasta qual*) mediante PRINSEQ v0.20.4 (Schmieder & Edwards, 2011) y software QIIME (Caporaso *et al.*, 2010). Las secuencias con menor longitud de 100 pb y un *score* de calidad medio \leq 20 o que se revelaron como potenciales secuencias quiméricas fueron eliminadas. Se creó una base de datos taxonómica de referencia a partir de las bases de datos del NCBI (*taxdump.tar.gz* and *gi_taxid_nucl.dmp.gz*) y todos los genes de Citocromo oxidasa I conocidos. Esto se llevó a cabo buscando el texto “mitochondrial COI” en la web del NCBI y descargando un total de 911594 secuencias disponibles en Diciembre de 2014 en formato *fasta*.

El siguiente paso fue la ejecución del *script* llamado *entrez_qiime.py*. Este *script* de python fue creado por Chris Baker (2014) y toma como entradas o *inputs* los archivos *.dmp* que asocia el número de identificación del gen NCBI con su correspondiente número de identificación de taxon generando así los archivos *mitochondrial_COI_stripped.fasta*, *mitochondrial_COI_taxid_taxonomy.txt*, *mitochondrial_COI_gi.txt*, *mitochondrial_COI_gi_taxonomy.txt* and *mitochondrial_COI_gi_taxid.txt* files. Estos archivos fueron utilizados como base de

datos taxonómica. Para las identificaciones OTU, fue adoptado el protocolo de QIIME (<http://qiime.org/tutorials/tutorial.html>) “de novo OTU picking and diversity analyses using 454 data”

Se asignó la taxonomía mediante un BLAST buscando contra nuestra base de datos genética usando un 90% de identidad y un E-value de 0.001 como corte. Tras eso, las secuencias fueron agrupadas en unidades operacionales taxonómicas (OTUs) y se siguieron los procedimientos del QIIME para el resumen de los resultados en composición taxonómica, estimar alpha diversidad y la generación de gráficos de alfa rarefacción. Finalmente, se llevó a cabo la estimación de parámetros de beta-diversidad. En este estudio se centró la atención en la composición de las comunidades en cuanto a moluscos y crustáceos (las especies usualmente cultivadas en los estuarios). Se llevaron a cabo comparaciones de alfa diversidad (índices de Shannon Weaver) y distancias de Bray Curtis entre las muestras. Los índices de alfa-diversidad cuantifican la riqueza biológica entre cada muestra (Kelly *et al.*, 2014). Las métricas de beta-diversidad evalúan las diferencias entre muestras ambientales o comunidades. El resultado fundamental de esas comparaciones es una matriz cuadrada donde la “distancia” o diferencia es calculada entre cada par de muestras de la comunidad, reflejando las diferencias de similaridad entre ellas. Los datos en esta matriz de distancias (distancia de Bray Curtis) pueden ser visualizadas con análisis como un *Principal Coordinate Analysis* (PCoA), árboles UPGMA y agrupaciones jerárquicas usando el software Emperor (Gonzalez *et al.*, 2013).

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Para llevar a cabo el estudio del ADN ambiental se tomaron las 3 muestras de aguas de cada ría anteriormente comentadas (EO, EU, EP, para el Eo; VC, VF, VI para Villaviciosa). La secuenciación masiva para los productos de PCR obtenidos del gen citocromo C oxidasa mitocondrial arrojaron como resultado 92.839 lecturas totales, 62.041.108 bases y una media de longitud de las lecturas de 668,266 pb (Tabla 4) (Gráfico 1).

Sample	#Reads	Total bases	Avg.read length
VF	5.592	3.141.203	561,732
VI	15.478	10.395.235	671,614
VC	17.676	11.943.710	675,703
EU	18.244	12.286.310	673,444
EO	24.443	16.491.648	674,699
EP	11.406	7.783.002	682,361
TOTAL	92.839	62.041.108	668,266

Tabla 4. Número total de lecturas, bases totales y longitudes medias de la lecturas totales y en detalle para cada una de las muestras recogidas en ambas rías

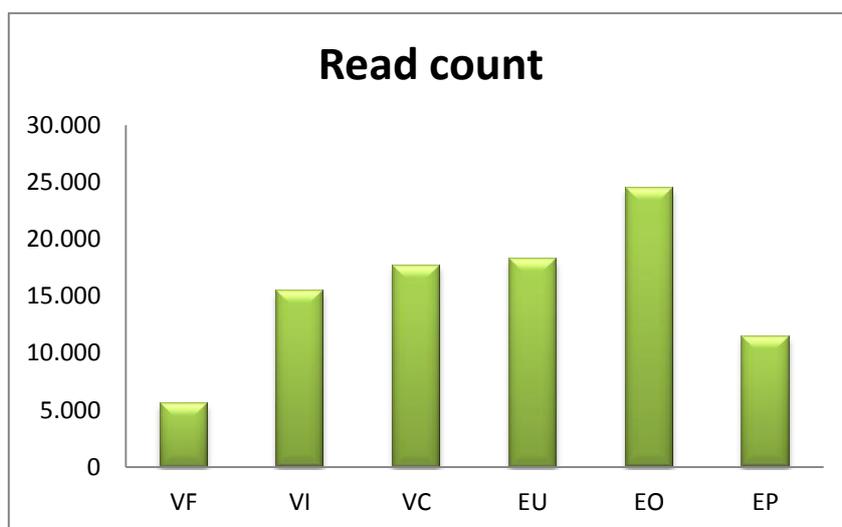


Gráfico 1. Gráfico de barras de total de lecturas acumuladas por muestra

Estos datos se trataron con un análisis mediante un filtro de calidad y longitud de las secuencias mediante PRINSEQ, eliminando las secuencias con longitudes menores a 100pb y a continuación se agruparon en unidades operaciones taxonómicas (OTUs) después del proceso de asignación clasificando las lecturas en niveles taxonómicos (filo, clase, orden, familia, o género) basada en las similitudes mediante un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra el NCBI (National Center for Biotechnology Information). Un total de 55.866 hits fueron obtenidos tras las asignaciones (número medio de hits por muestra = 9.311)

Para centrar la búsqueda, se filtraron y seleccionaron los datos en un gran grupo a partir de la tabla OTU, centrado en los géneros que pertenecen a las mismas clases que aquellas especies comerciales de interés que se producen en esas rías; moluscos y crustáceos sobre todo, y algunos otros artrópodos que también pueden afectar a las producciones.

Un total de 32 géneros de artrópodos y moluscos fueron encontrados a partir de las muestra, apareciendo reflejados en la tabla OTU.

Consensus Lineage	VF	VC	EP	EO	VI	EU	#OTU ID
Arthropoda;Malacostraca;Amphipoda;Lysianassidae;Eurythenes	28	195	13	152	143	153	44335
Arthropoda;Malacostraca;Amphipoda;Lysianassidae;Scopelocheirus	13	9		2	18	10	228744
Arthropoda;Malacostraca;Decapoda;Alpheidae;Synalpheus		10			2		1503751
Arthropoda;Malacostraca;Decapoda;Palaemonidae;Macrobrachium	26	20	33	49	37	14	345755
Arthropoda;Malacostraca;Decapoda;Solenoceridae;Solenocera	3	38	52	191	91	178	228863
Arthropoda;Malacostraca;Euphausiacea;Euphausiidae;Thysanopoda				13			169012
Arthropoda;Maxillopoda;Calanoida;Scolecitrichidae;Scaphocalanus				20	1		862112
Arthropoda;Maxillopoda;Poecilostomatoida;Sapphirinidae;Copilia	41	400	186	328	205	191	545086
Arthropoda;Ostracoda;Podocopida;Macrocypridae;Macroscapha				19			762657
Mollusca;Bivalvia;Arcoidea;Arcidae;Scapharca		6	5	19	38	27	148819
Mollusca;Bivalvia;Arcoidea;Arcidae;Scapharca			3	21		21	499954
Mollusca;Bivalvia;Myoidea;Pholadidae;Barnea	12	15	55	110	90	55	1478975
Mollusca;Bivalvia;Myoidea;Teredinidae;Bankia	3	14	8	35	32	30	120363
Mollusca;Bivalvia;Pectinoidea;Pectinidae;Mimachlamys						21	50417
Mollusca;Bivalvia;Pterioidea;Pinnidae;Atrina				12			61340
Mollusca;Bivalvia;Unionoida;Unionidae;Lemiox			11	3	7	4	301913
Mollusca;Bivalvia;Unionoida;Unionidae;Obliquaria				12		2	52404
Mollusca;Bivalvia;Veneroidea;Galeommatidae;Galeomma						11	115019
Mollusca;Bivalvia;Veneroidea;Mactridae;Coelomactra	31	3		3	12		340419
Mollusca;Gastropoda;Architectibranchia;Hydatinidae;Hydatina	2	10	24	31	16	13	259632
Mollusca;Gastropoda;NA;Assimineidae;Paludinella		1	1	2		13	1335699
Mollusca;Gastropoda;NA;Calyptraeidae;Crepidula		10	3	27	7		211751
Mollusca;Gastropoda;NA;Camaenidae;Setobaudinia		14					1343726
Mollusca;Gastropoda;NA;Fissurellidae;Fissurella			11	10		1	702828
Mollusca;Gastropoda;NA;Lepetodrilidae;Lepetodrilus	1	4	3	24	10		505974
Mollusca;Gastropoda;NA;Lottiidae;Patelloida			1	3	11	1	225154
Mollusca;Gastropoda;NA;Lymnaeidae;Lymnaea		1	2	15		2	614505
Mollusca;Gastropoda;NA;Melongenidae;Busycotypus		1		3		16	57622
Mollusca;Gastropoda;NA;Muricidae;Nassa		10					508925
Mollusca;Gastropoda;NA;Semisulcospiridae;Semisulcospira				1	7	15	593677
Mollusca;Gastropoda;NA;Strombidae;Strombus				10		1	387450
Mollusca;Gastropoda;NA;Trochidae;Cantharidus	24	42	12	20			648579
Mollusca;Gastropoda;Nudibranchia;Glaucidae;Facelina	5	29	129			7	1290793

Figura 21. Tabla OTU de especies para moluscos y crustáceos

Muestras del Eo

Tomando como referencia estos datos, y buscando más detalle en la tabla OTU, podemos observar cómo la presencia del género *Copilia* es muy importante en todas las zonas de recogida de agua de la ría del Eo, siendo su importancia relativa 37,42% en EP, 26,37% en EO y 23,99% en EU. Además, otros géneros como *Solenocera* y *Barnea* aparecen representados en las tres zonas de la ría con una alta presencia relativa, llegando la primera a ser hasta un 15,35% en el puerto de ostras (EO) y un 22,36% aguas arriba (EU).

Cabe destacar las diferencias que aparecen reflejadas entre las muestras del puerto (EP) y las dos restantes recogidas aguas arriba (EU) y en el parque de ostras (EO). La presencia de los géneros *Eurythenes* y *Bankia* se ven notablemente reducidos

respecto a las otras zonas, y proliferan por el contrario los géneros *Hydatina* (25%), *Cantharidus* (42,86%), y *Facelina* (17,06%). Además, es importante señalar que el 57,47% de todos los genes encontrados del género *Crepidula* se encuentran solamente en la muestra del EO (“oysterpark”), algo reseñable dado el carácter normalmente invasivo de este género.

Muestras de Villaviciosa

En cuanto a las muestras de la ría de Villaviciosa, en la zona de la fábrica se encuentran géneros con gran abundancia relativa como *Eurythenes*, con un 17,50%, que aparecen con casi la misma abundancia en las otras muestras, y que se trata de un género que habita en las costas del Atlántico Norte; así como de nuevo, *Copilia*, con un porcentaje de 25,62%, un copépodo autóctono de las costas europeas. Sin embargo, la presencia de algunos géneros cuya presencia *a priori*, no está considerada como algo normal en las costas de cantábricas, es más aguda en el caso de la muestra de la zona de la fábrica, como son el caso de *Barnea* (7,50%), *Scopelocheirus* (8,13%) y *Coelomacra* (19,38%) (WoRMS)

Coelomacra, con el 19,38% del total de las muestras que aparecen en VF, en contraste con las otras dos muestras tomadas en la ría de Villaviciosa, en las que su presencia es casi nula (0,37% para VC y 1,65% para VI) se trata de un género de bivalvos de las costas del Pacífico, desde Japón a Borneo, y que es normalmente un recurso valioso y fuente de ingresos ya que su consumo es muy apreciado sobre todo, en China. Además de la presencia de este género de forma más significativa, cabe señalar la ausencia de otros que sí aparecen en los dos otros puntos de muestreo de la ría, como podemos observar en la tabla OTU, en la que para las muestras correspondientes a VF, la importancia de *Copilia* es menor, así como para *Bankia*, cuya presencia en el centro de interpretación es del 4,39% frente al 1,88% de la fábrica. Por el contrario, podemos observar la importancia de géneros ya citados como *Eurythenes*, *Copilia* o *Barnea*, así como otras como *Cantharidus*.

De nuevo cabe señalar la presencia del género *Crepidula* en las muestras tomadas en la Capilla (VC) así como la del género *Nassa*, ambos ausentes en las dos muestras restantes.

Comparación de las muestras del Eo y Villaviciosa

Para poder observar las características de las muestras de moluscos y crustáceos generamos PCoA plots (Principal Coordinate Analysis) en la que podemos observar las muestras procedentes del Eo (rojo) y las procedentes de Villaviciosa (azul), mostrando una distribución más centrada y agrupada para las muestras EO, EU, VI, y VC, mientras que las muestra de EP y, sobre todo, VF se encuentran en localizaciones posicionadas más extremamente, con lo que podemos extraer como primer resultado interesante que el estado mediambiental de ambas poblaciones, son distintos. Y más específicamente, la población situada en el puerto de la ría del Eo, y sobre todo, aquella situada en la fábrica de Villaviciosa, como puede observarse en el PCoA (Figura 22).

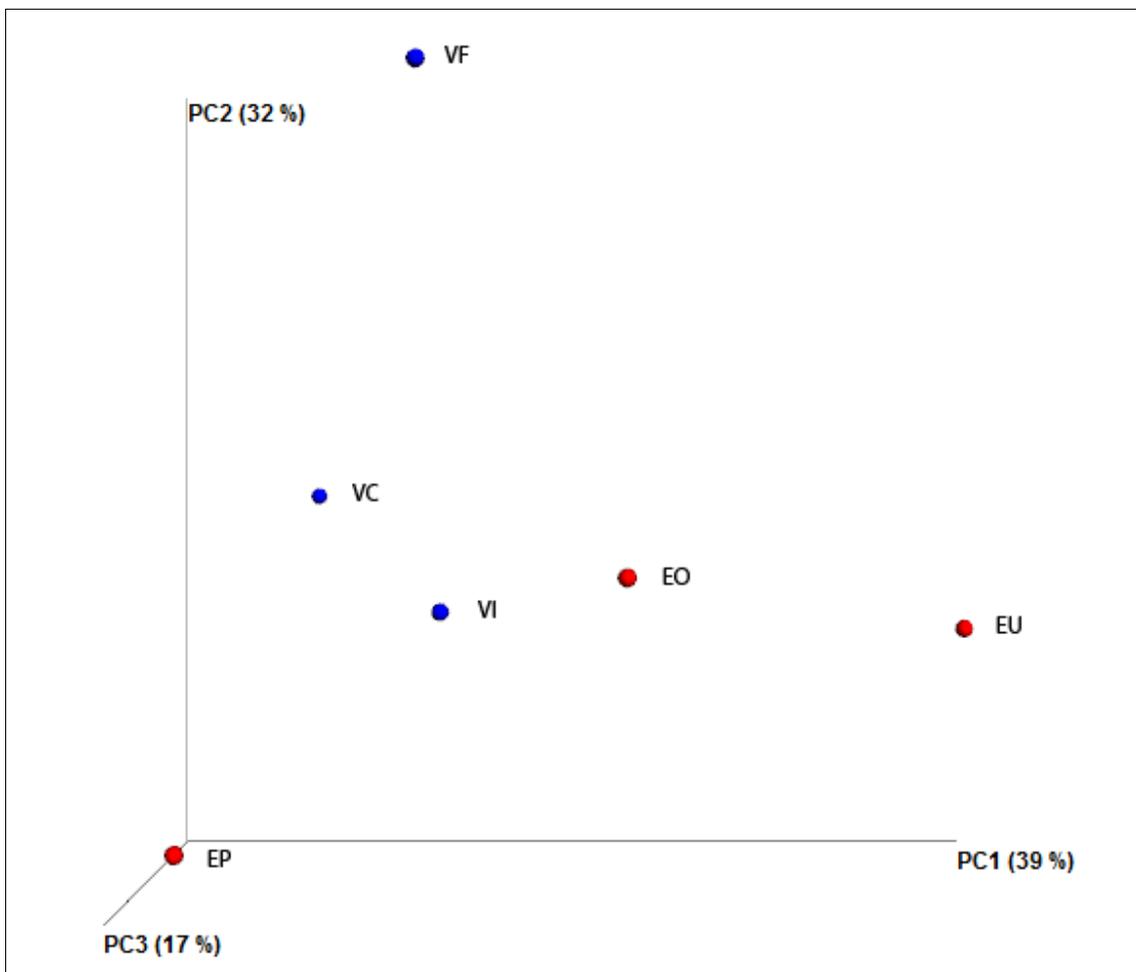


Figura 22.3D PCoA plot calculado a partir de distancias de Bray Curtis para moluscos y crustáceos. Se puede observar como los datos aparecen agrupados en el centro a excepción de los dos casos de VF (“Villaviciosa factory”) y de EP (“Eo port”)

DISCUSIÓN

Este trabajo evalúa el estado de los dos estuarios asturianos más importantes no sólo a nivel ecológico, sino también, y más importante en este caso, a nivel de producción de alimentos producidos por acuicultura. Estos estuarios se ven claramente afectados por la actividad antropogénica y se debería controlar el estado de estos hábitats (Kenchington *et al.*, 2003) para asegurar la calidad ambiental y de los alimentos producidos allí. La identificación de especies es el primer paso para el correcto manejo de estos hábitats (Feral, 2002). En este sentido, las nuevas herramientas basadas en nuevas técnicas genéticas como el NGS (next generation sequencing) permiten llevar a cabo esta tarea de manera más rápida, efectiva y cada vez más barata (Frischer *et al.*, 2012, Mahon *et al.*, 2013). Aunque por el momento el NGS presenta aún inconvenientes. En primer lugar, a pesar de ser cada vez más asequible económicamente, se trata de un método aún más caro que los tradicionales (el coste aproximado por muestra en este trabajo fue de 203€). Sin embargo, como ya se ha comentado, se trata de una metodología que se abaratará próximamente en gran medida, convirtiéndose en una potente herramienta para el control de los ambientes y la detección temprana de especies invasoras.

Este trabajo puede servir para la aproximación hacia dos factores relevantes que resultan importantes en los estuarios. Por una parte, a partir de los resultados obtenidos se puede evidenciar que la actividad humana influye decisivamente en la diversidad de los estuarios. Las muestras tomadas bajo la fábrica de sidra situada en Villaviciosa difieren notablemente de las demás tomadas en la ría. Desaparecen numerosos géneros, lo que apunta a una pérdida de diversidad en esa zona debido probablemente a la contaminación de los residuos vertidos, quedando en esas zonas un menor número de géneros que, además, presentan gran abundancia relativa respecto a los demás dentro de la muestra, pero que a su vez, aparecen en mucho menor número que en las otras 5 localizaciones. Tal caso es el del género de copépodos *Copilia*, cuyo número en VF (41/160) discrepa mucho de los encontrados en otras zonas *a priori* menos contaminadas (400/803 en VC y 205/729 en VI). Se trata de una zona en la que con anterioridad se ha denunciado la presencia de vertidos no depurados tanto por organizaciones ecologistas como por las autoridades competentes, por lo que parece clara, junto con estos datos, que la presencia de esa actividad humana es determinante

en las poblaciones que habitan esa zona y los cambios de diversidad y de hábitat consecuentes.

Cabe destacar como algo reseñable la mayor presencia del género *Crepidula* en las muestras tomadas en la zona bajo la capilla de Villaviciosa (VC) y en el parque de ostras en la ría del Eo (EO). Ambas localizaciones tienen en común la utilización actual, en el caso del Eo, y pasada –en un intento fallido en el caso de Villaviciosa–, de producción de ostras. En la zona de la capilla, se intentó, sin éxito, en la década de los 80 del pasado siglo, la introducción de lo que más tarde se supo era *Crassostrea gigas*. Las consecuencias actuales son que esa especie ha colonizado por completo esa zona, y su presencia es muy alta. Esto podría ser el vector de entrada, en ambos lugares, del género *Crepidula*, y más concretamente podría ser la vía de entrada de una especie de este género con gran capacidad invasora, incluida entre las 100 especies con más capacidad invasora (ISSG), conocida por su alta capacidad de parasitar estas ostras, reduciendo notablemente su producción, *Crepidula fornicata* (BOE). Se trata de una especie que en Galicia fue descubierta por primera vez en la en la ensenada de Aldán en la segunda mitad de los años 70 (Rolán, 1983). Observada después en la Ría de Vigo (Ensenada de San Simón) y hacia finales de la década de los 80 en la Ría de Arousa, mezclada con otras especies procedentes de Italia (Otero & Trigo, 1987). A partir de 1998 y hasta 2009, se localiza ya en las 4 Rías Baixas y en la Ría de Ferrol: Muros-Noia (Portosín), Arousa (O Grove, O Bao y Cambados), Pontevedra (Marín, Bueu y Aldán), Vigo (Cangas, Meira y Domaio) y Ferrol (Rolán & Trigo, 2007; Besteiro *et al.*, 2009). Actualmente continúa su expansión por la costa cantábrica con la importación de ostión u ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Rolán, 1983; Blanchard, 1997). *C. fornicata* también puede ser transportada en los cascos de los buques y en el agua de lastre en la fase larvaria planctónica. Pueden alcanzar grandes densidades, superiores a 1700 individuos por m² y alcanzar biomásas húmedas de hasta 10 kg/m²: como resultado de lo cual hay una competencia trófica y espacial que puede causar una disminución del crecimiento de los bivalvos comerciales en algunas bahías cerradas. Sus deposiciones orgánicas son tan abundantes, que cubren los fondos y cambian su composición, impidiendo que sobrevivan las especies de invertebrados autóctonos que viven en ellas, provocando cambios en la biodiversidad bentónica (Blanchard, 2009). La acumulación de conchas puede provocar cambios en la cobertura del fondo marino con efectos similares. Supone una amenaza para el cultivo de bivalvos comerciales, sobre todo

pectínidos (vieira, zamburiña, volandeira) y ostras. Los cambios sobre el sustrato, que afectan a la distribución de algunas especies, y la reducción del reclutamiento de especies comerciales son también considerados como impactos negativos (Catálogo español de especies exóticas invasoras, BOE)

En esta misma línea, se detectó la presencia de dos géneros susceptibles de convertirse en especies invasoras; los géneros *Lymnaea* y *Macrobrachium*, el primero más notablemente presente en EO y el segundo en VF, EP y EO, de nuevo, zonas de introducción de ostras. Estos dos géneros poseen especies con capacidad invasora, como sería *Lymnaea humilis* o *Lymnaea columella* (De Kock & Wolmarans, 2008) en el primer caso (Freshwater Gastropods of North America). No se puede dejar de apuntar la presencia de especies del género *Lymnaea* autóctonas en España (Manga-González *et al.*, 1991) y en la zona alta del Nalón (García & Núñez, 1986), por lo que se trataría de un caso a estudiar con especial detalle. *Macrobrachium rosenbergii* y *Macrobrachium nipponense*, en el segundo caso; son dos especies de camarones con capacidad invasiva, que se comercializan en países del este asiático así como se cultivan actualmente en numerosos lugares alrededor del mundo, desde Asia hasta el continente Americano, especialmente en Brasil (FAO). Protagonizando, como en el caso del *M. nipponense*, episodios de colonización de hábitats por fugas a partir de espacios de acuicultura (Salman *et al.*, 2006). Se trataría pues, de una hipotética detección temprana de nuevos potenciales géneros con especies invasoras, que en España no estarían detectados y reconocidos como tal (BOE) lo que permitiría hacer frente a la proliferación antes del periodo de establecimiento y dispersión en la que su erradicación es ya muy difícil, como sucede hasta el momento.

En este trabajo se ha limitado la búsqueda de especies a partir del BLAST a nivel de géneros, puesto que la metodología de Metabarcoding utilizada aún se encuentra en un estado de desarrollo. Parece claro que aún pueden existir falsos positivos debido a que en las bases de datos (Genbank, NCBI) existen records mal asignados a nivel de especie y/o que algunas especies no sean detectadas (falsos negativos) debido a la ausencia de iniciadores realmente universales (que amplifiquen en todas las especies) (Zaiko *et al.*, 2014). Las parejas de iniciadores utilizadas aquí (Geller *et al.*, 2013) han mostrado alta eficiencia para amplificar el gen COI en muchos invertebrados marinos (pero no en todos). Estos dos problemas son importantes cuando se trata de estimar la biodiversidad global. En todo caso para las especies invasoras de la

lista del Real Decreto están disponibles muchas secuencias de genes mitocondriales como COI y nucleares como 18S rDNA en las bases de datos como GenBank y BOLD. Este hecho puede facilitar el desarrollo de marcadores específicos para la detección (específica también) de cada una de estas especies en el eDNA. Sería conveniente además la utilización de genes de la subunidad ribosomal 18S y 28S, así como 18S nuclear (Machida & Knowlton, 2012), que completarían la información taxonómica sobre las especies detectadas.

Los resultados de este trabajo son importantes en cuanto dos aspectos fundamentales en el manejo de los estuarios. En primer lugar para reportar a las autoridades responsables del manejo de los estuarios (Principado de Asturias) de la puesta en marcha de esta nueva metodología para incorporarla en los estudios rutinarios de las autoridades para averiguar fuentes de contaminación o prácticas que pueden estar afectando la biodiversidad en estos ecosistemas. A partir de ahí, se pueden poner en práctica medidas como exigir la purificación de residuos de fábricas que vierten a las rías o inspecciones más rigurosas en los puertos de los barcos que atracan (para evitar el *biofouling* o contaminación con individuos vivos) y en la inspección de semillas de ostras y almejas para la acuicultura que se realiza en el Eo y en Villaviciosa. Por otra parte, tal y como se ha comentado, poco se puede hacer cuando un invasor ya se ha establecido. Por lo tanto, la detección temprana de posibles invasores (algunos de ellos como *Crepidula* que afectan directamente a las producciones acuícolas) tiene un alto valor para el manejo. Búsquedas exhaustivas (screening) posteriores que se han realizado en las dos rías, a partir de los resultados de este trabajo, han confirmado físicamente la presencia de *Crepidula fornicata* en las dos rías (Borrell Y.J., comunicación personal), mientras que se trabaja ahora en desarrollar iniciadores específicos de PCR para la detección en ADN ambiental de esta, y otras especies invasoras detectadas, mediante Metabarcoding (Proyecto Nacional MINECO CGL2013-42415-R). Efectivamente, el Metabarcoding da indicios (pistas), que luego deben ser confirmados utilizando PCR específicas para cada una de las especies detectadas, y también mediante muestreos de campo y la localización *in situ*, de esas especies por vías tradicionales. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el Metabarcoding basado en NGS es ya una herramienta poderosa que puede ayudar a un manejo sostenible de ecosistemas fundamentales para la vida de comunidades y regiones pesqueras como los estuarios de Villaviciosa y del Eo en Asturias.

6. CONCLUSIONES

1. El Metabarcoding basado en NGS es una herramienta que puede ayudar a un manejo sostenible de los estuarios marinos como ecosistemas muy relevantes para la vida de comunidades y regiones pesqueras a partir de la detección de cambios en biodiversidad como consecuencia de efectos antropogénicos y de la detección temprana de especies invasoras.
2. Las diferencias significativas de biodiversidad para moluscos y crustáceos encontradas en este trabajo, entre muestras con mayor y menor impacto antropogénico en las dos rías (Ría del Eo y Ría de Villaviciosa), implican que las regulaciones actuales del Principado de Asturias para evitar impactos sobre la biodiversidad en los estuarios asturianos productores de moluscos por parte de fábricas, puertos, e instalaciones de acuicultura no son del todo exitosas y deben ser revisadas.
3. En ambas rías se detectó que probablemente ya están presentes especies invasoras que utilizan como vía de introducción actividades humanas como la acuicultura. Específicamente se detectaron los géneros *Crepidula*, *Lymnaea* y *Macrobrachium*, capaces de degenerar el hábitat así como influir negativamente en la producción de moluscos. Se debe desarrollar por tanto una estrategia para la confirmación de estos resultados por vías tradicionales y para el desarrollo de una estrategia de erradicación y contención de posibles invasiones biológicas en los estuarios asturianos.

7. RECOMENDACIONES

1. Son necesarios estudios posteriores con marcadores genéticos diferentes (18S y 28S ribosomal, 18S nuclear) que complementen a nivel taxonómico los resultados obtenidos con el gen mCOI en las rías de Villaviciosa y del Eo
2. Deben desarrollarse marcadores especie-específicos de PCR para la detección específica de especies invasoras en las rías asturianas.
3. Son necesarios estudios *in situ* y el muestreo de especies en ambas rías para comprobar y describir de manera visual la presencia de los posibles géneros invasores y las causas de la pérdida de diversidad.
4. Las autoridades competentes deben ser alertadas de los cambios en biodiversidad detectados en las zonas de desagües de la Fábrica “El Gaitero” en la ría de Villaviciosa y en el puerto de Figueras (Eo).
5. Las autoridades competentes deben ser alertadas de la posible existencia en ambas rías de especies invasoras cuya presencia no ha sido aún reportada (géneros *Crepidula*, *Lymnaea* y *Macrobrachium*), para que se lleven a cabo las medidas de prevención y erradicación pertinentes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ackefors, H. and Enell, M. (1994). The release of nutrients and organic matter from aquaculture systems in Nordic countries. *Journal Applied Ichthyology* 10(4):225-241
- Baker, C. (2014). ccmbaker@fas.harvard.edu. Pierce Lab, Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University.
- Balden, S., Bostro, C., Tobiasson, S., Arponen, H., and Moksnes P.O., (2010) *Limnology Oceanography*, 55(3), 2010, 1435–1448
- Besteiro, C., Urgorri, V., Moreira, J. and Díaz-Agras, G. (2009) Estudio preliminar de las especies invasoras asentadas en la Ría de Ferrol (NW Península Ibérica). 3º Congreso nacional sobre especies exóticas invasoras. Zaragoza, 24-27 Noviembre de 2009, p. 21
- Blackburn TM, Pyšek P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jarošík V, Wilson JRU, Richardson DM (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends Ecol Evol* 26:333-339
- Blanchard, M. (1997) Spread of the slipper limpet *Crepidula fornicata* (L., 1758) in Europe. Current state and consequences. *Sci. Mar.* 61(Suppl. 2): 109-118.
- Blanchard, M. (2009) Recent expansion of the slipper limpet population (*Crepidula fornicata*) in the Bay of Mont-Saint-Michel (Western Channel, France). *Aquat. Living Resour.* 22: 11-19
- BOE Catálogo español de especies exóticas invasoras. nº 185, 3-8-2013
- BOLD Barcoding of Life database; www.boldsystems.org/
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J. Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D. Costello, E.K. et al., (2010). *Nature Methods*. doi:10.1038/nmeth.f.303
- Convenio sobre Diversidad Biológica. www.cbd.int

- De Kock KN, Wolmarans CT (2008) Invasive alien freshwater snail species in the Kruger National Park, South Africa. *Koedoe* 50 (1): 49–53. doi: 10.4102/koedoe.v50i1.126
- Dupont, S., Wilson, K., Obst, M., Skold, H., Nakamo, H. y Thorndyke, M.C.2007. Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology. *Marine Ecology Progress Series*,332: 257–273
- Ellegren, H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Estoup A., Guillemaud T., Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* (2010) 19, 4113–4130
- Evaluación de los Ecosistemas del Milenio. www.maweb.org
- Evaluación de Ecosistemas del Milenio en España www.ecomilenio.es
- FAO Producción acuícola (<http://www.fao.org/docrep/003/v5321s/V5321S02.htm>)
- FAO.The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2014.Departamento de Pesca.Roma.2014.
- FAO Sobre *Macrobrachium nipponense*
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Macrobrachium_rosenbergii/es
- Feral, J.P.2002. Review – How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity?. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 268: 121–145.
- Frischer ME, Kelly KL, Nierzwicki-Bauer SA (2012) Accuracy and reliability of *Dreissena* spp. larvae detection by cross-polarized light microscopy, imaging flow cytometry, and polymerase chain reaction assays. *Lake and Reservoir Management* 28:265-276
- GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)
- Gonzalez, A., Vazquez-Baeza, Y., Pirrung, M., and Knight, R. (2013). Emperor: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience*, 2 (16).

- García M.A, Núñez M.J.. (1986) Variacion estacional de la fauna dulceacuicola del alto Nalon, Asturias. *Limnética* 2: 173-179
- Hajibabaei, M.; D. H. Janzen; J.M. Burns; W. Hallwachs and P. D. N. Hebert, 2006b. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS* 103(4): 968–971
- Hebert, P.D.N.; A. Cywinska; S.L. Ball and J.R. deWaard, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313-322.
- Hebert, P. D. N.; S. Ratnasingham, and J. R. deWaard, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. B.* 270: S96–S99.
- Hulme, P.E. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization (2009). *Journal of Applied Ecology*, 46, 10–18
- Ibañez, C., Caiola, N., Nebra, A., & Wessels, M., 2009. 1130 Estuarios. En: V.V. A.A., *Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España*. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. 75
- Informe Acuicultura 2014. APROMAR, ESACUA, OPP, OESA <http://esacua.com/wp-content/uploads/2014/11/Informe-ACUICULTURA-2014.pdf>
- Informe Sostenibilidad en España 2010 <http://www.sostenibilidad-es.o>
- ISSG <http://www.issg.org/>
- JACUMAR. Secretaría General de Pesca (MAGRAMA). Estadísticas de producción de acuicultura 2012. Madrid. 2014
- Katsanevakis S, Gatto F, Zenetos A, Cardoso AC (2013) How many marine aliens in Europe. *Management of Biological Invasions* 4:37-42
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., Martone, R. G., Lowell, N., Thomsen, P. F., Mach, M. E., Bennet, M., Prahler, E., Caldwell, M. R. & Crowder, L. B. (2014). Harnessing DNA to improve environmental management. *Science* 344:1455-1456.

- Kenchington, E. H., Mikko; Nielsen, Einar Eg. (2003) Managing marine genetic diversity: time 604 for action? ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil 60(6): 1172-1176.
- Machida J. R., Knowlton N. (2012) PCR primers for metazoan nuclear 18S and 28S ribosomal DNA sequences. Plos One Volume 7: e46180
- MAGRAMA.Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Estadísticas pesqueras.Encuesta de acuicultura. Madrid.2013
- MAGRAMA.Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Datos de consumo alimentario en España 2013.ATOS DE CONSUMO ALIMENTARIO.Madrid.Marzo de 2014
- Mahon AR, Jerde CL, Galaska M, Bergner JL, Chadderton WL, Lodge DM, Hunter ME, Nico LG (2013) Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. PLoS One 8:e58316
- Manga-González Y., González-Lanza C., Otero-Merino B., (1991). Natural infection of *Lymnaea trunculata* by the river fluke *Fasciola hepatica* in the Porma Basin, León, NW Spain. Journal of Heminthology 65, 15-27
- Meusnier, I., Singer, G. A. C., Landry, J. F., Hickey, D. A., Hebert, P. D. N. & Hajibabaei, M. (2008). A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9, 214.
- Moura, C. J.; D. J. Harris; M. R Cunha; and A. D. Rogers, 2008. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta* 37(1): 93-108
- Mullis, K. and F. Faloona, 1987. Specific synthesis of DNA invitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
- NOOA Actividades que afectan a los estuarios
http://oceanservice.noaa.gov/education/kits/estuaries/estuaries09_humandisturb.html
- Nunes, A.L., Katsanevakis, S., Zenetos, A., Cardoso, A. C.(2014). Gateways to alien invasions in the European seas. *Aquatic Invasions*, Volume 9, Issue 2: 133–144

- Otero, J. and Trigo, J.E. (1987) Adiciones a la fauna malacológica de la Ría de Arousa (NO de España). *Iberus* 7 (1): 129-135
- Perrings C, Williamson M, Barbier EB, Delfino D, Dalmazzone S, Shogren J, Simmons P, Watkinson A (2002) Biological invasion risks and the public good: an economic perspective. *Conservation Ecology* 6:1-7
- Perspectiva Mundial sobre la Diversidad Biológica 3 GBO3. www.cbd.int/GBO3
- Pritchard, D.W., (1967) What is an estuary: physical viewpoint. *American Association for the Advancement of Science* , nº 83, 3-5
- Red Ambiental de Asturias Sobre los Estuarios Asturianos
<https://www.asturias.es/medioambiente/articulos/ficheros/Estuarios.pdf>
 (Consultado mayo 2015)
- Red ambiental de Asturias. Sobre las dos Rías.
<http://www.asturias.es/medioambiente/articulos/ficheros/Reserva%20Natural%20Parcial%20de%20la%20R%C3%ADa%20del%20Eo.pdf>
<http://www.asturias.es/medioambiente/articulos/ficheros/Reserva%20Natural%20Parcial%20de%20la%20R%C3%ADa%20de%20Villaviciosa.pdf>
- Ricciardi, A., Rasmussen, J.B.(1999) *Conservation Biology* Volume 13, Issue 5, 1220–1222
- Rolán, E. (1983) Moluscos de la Ría de Vigo 1. Gasterópodos. *Thalassas*, Anex. 1:1-383
- Rolán, E. and Trigo, J. (2007) Especies introducidas en Galicia: algunos nuevos datos. *Noticiario SEM* 47: 37-38.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences

and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354

Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. *PLoS One* 6, 17288.

Salman D.S., Page T. J., Naser M.D., Yasser A.G., (2006) The invasion of *Macrobrachium nipponense*(De Haan, 1849) (Caridea: Palaemonidae) into the Southern Iraqi Marshes. *Aquatic Invasions* Volume 1, Issue 3: 109-115

Semeraro A, Mohammed-Geba K, Arias A, Anadon N, García-Vázquez E, Borrell YJ (2015) Genetic diversity and connectivity patterns of harvested and aquacultured molluscs in estuaries from Asturias (northern Spain). Implications for management strategies. *Aquaculture Research*

Tauz D., (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*; 17(16): 6463–6471.

Taylor H, Harris W (2012) An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Mol Ecol Resour* 12:377-388

Triantafyllidis, A.; D.C. Bobori and C.Koliamitra, 2007. DNA barcoding in Greek freshwater fish: the cases of Doirani and Volvi lakes. ESEB XI Congress Uppsala Sweden. <http://www.dnabarcoding.ca/>

Vences, M.; M. Thomas; A. Van der Meijden; Y. Chiari and D. R. Vieites, 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibian. *Front. Zool.* 2: 1-12.

Ward, R. D.; B. H. Holmes; T. W William and P. R Last, 2008. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59(1): 57-71.

Williamson, M. and Fitter, A. (1996) The varying success of invaders. *Ecological Society of America. Ecology*, 77(6) pp. 1661-1666

WORMS <http://www.marinespecies.org/>

Zaiko Anastasija, Jose L. Martinez, Alba Ardura, Laura Clusa, Yaisel J. Borrell, Aurelija Samuiloviene, Agustín Roca, Eva Garcia-Vazquez, 2015. Detecting nuisance species using NGST: methodology shortcomings and possible application in ballast water monitoring

Libros

Flor G., 1992. Enciclopedia de la Naturaleza de Asturias Volumen VII. Los estuarios 1-32. *La Voz de Asturias*, S.A. Lugones, Asturias.