

Alteraciones en el contenido hídrico, mineral y lipídico, con particular énfasis en el perfil de ácidos grasos de *Oculina* sp. como respuesta al calentamiento del océano.

**Alterations in the water, mineral, and lipid contents, with
particular emphasis on the fatty acid profile of *Oculina* sp. in
response to ocean warming.**

GRADO EN BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

CURSO 2023-2024

ALUMNO: Imanol León González

TUTORES: José Antonio Pérez Pérez y

Diana Filipa Botelho Reis

Índice

1. Resumen	1
1. Abstract	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	7
4. Material y métodos	7
4.1 <i>Diseño experimental</i>	7
4.2 <i>Extracción lipídica</i>	10
4.3 <i>Determinación de humedad y ceniza</i>	11
4.4 <i>Determinación del perfil de ácidos grasos</i>	13
4.5 Análisis estadístico	14
5. Resultados y Discusión	15
5.1 <i>Perfil lipídico de Oculina sp. recogida del medio natural</i>	15
5.2 <i>Efecto de la temperatura en el contenido lipídico, ceniza y humedad de Oculina sp.</i>	18
5.3 <i>Efecto de la temperatura en el perfil de ácidos grasos de Oculina sp.</i>	20
6. Conclusiones	25
6. Conclusions	25
7. Bibliografía	27

1. Resumen

El cambio climático, atribuido principalmente a la actividad humana, ha desencadenado alteraciones en la dinámica del clima, resultando en una mayor frecuencia de eventos de temperaturas extremas que afectan de manera notable a los ecosistemas marinos en todo el mundo. Frente a este cambio, los estudios sobre la composición lipídica de los organismos marinos han ganado protagonismo como herramienta fundamental para comprender tanto las alteraciones actuales como las futuras en dichos ecosistemas. El objetivo principal del presente estudio ha sido evaluar los efectos de un evento de subida de la temperatura (heatwave) en la composición de lípido total (LT) y ácidos grasos (AG) de colonias del coral *Oculina* sp. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en el contenido de LT. Sin embargo, sí se registraron diferencias en el contenido de cenizas y de ciertos ácidos grasos (AG), destacando variaciones en AG de gran relevancia fisiológica como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) que pueden tener importantes consecuencias tanto en el propio organismo como en toda la cadena trófica marina.

Palabras clave: *Oculina* sp., Ácidos grasos, Aumento de la temperatura

1. Abstract

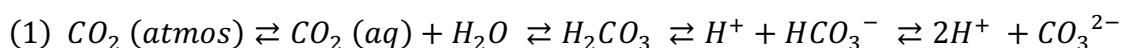
Climate change, mainly attributed to human activity, has caused alterations in climate dynamics, resulting in a higher frequency of extreme temperature events that significantly affect marine ecosystems worldwide. In the face of this change, studies on the lipid composition of marine organisms have gained prominence as a fundamental tool for understanding actual and future alterations in these ecosystems. The main objective of the present study was to evaluate the effects of a heatwave event on the total lipid (TL) content and fatty acid (FA) composition of colonies of the coral *Oculina* sp. The results obtained showed no significant differences in LT content. However, there were differences in ash content and certain fatty acids (FA), highlighting variations in FA of great physiological relevance such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), which can have important consequences in the organism and in the entire marine food chain.

Keywords: *Oculina* sp., Fatty acids, Temperature increase.

2. Introducción

El clima ha experimentado fluctuaciones significativas que han tenido un impacto directo en la especiación y la distribución de los organismos. Sin embargo, a partir del siglo XX, las alteraciones en las condiciones climáticas han adquirido mayor frecuencia y gravedad. Durante miles de años previos a la revolución industrial, las concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂) oscilaban entre 200 y 280 partes por millón (ppm), pero desde esta revolución, las concentraciones de CO₂ han aumentado hasta 387 ppm debido principalmente a las actividades industriales y agrícolas (Feely et al., 2009; Sabine et al., 2004).

Estas altas concentraciones de CO₂ son atenuadas hasta cierto punto gracias a la capacidad que tienen los océanos para actuar como sumideros de este gas, absorbiendo prácticamente un tercio de las emisiones antropogénicas de dióxido de carbono (Sabine & Feely, 2007). Dicho proceso es conocido como acidificación oceánica 'OA' (del inglés *Ocean Acidification*) (Gattuso & Hansson, 2011). El CO₂ presente en la atmósfera reacciona con el agua del mar formando ácido carbónico (H₂CO₃), disociándose posteriormente en hidrógeno (H⁺) y bicarbonato (HCO₃⁻). A su vez, gran parte del hidrógeno formado reacciona con el carbonato cálcico (CaCO₃) presente en el medio, produciendo más iones bicarbonato. Todo esto conlleva a una disminución de las concentraciones de CO₃²⁻ y una disminución del pH debido al aumento de iones hidrógeno (1) (Doney et al., 2009).



Desde la etapa preindustrial se ha producido un descenso de 0,1 unidades de pH a nivel global, y se estima que para finales de siglo haya una disminución de 0,3-0,4 unidades más (Orr et al., 2005). Las altas concentraciones de CO₂ en la atmósfera también han provocado que los océanos sean capaces de captar el calor atmosférico, produciendo un aumento de la temperatura en la capa superficial conocida como 'SST' (del inglés *Sea Surface Temperature*) (Masson-Delmotte et al., 2021). Desde el año 1872 hasta aproximadamente el año 2010 se ha observado un aumento de SST de aproximadamente 0,59°C en todo el océano (Roemmich et al., 2012). Este acontecimiento ha provocado que numerosos investigadores se centren en la toma de datos para así obtener modelos de concentraciones de gases invernadero emitidos en el futuro o 'RCPs' (del inglés *Representative Concentration Pathways*). A partir de los datos recogidos se establecen cuatro escenarios descritos en el informe del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre Cambio Climático (IPCC). Por ejemplo, para 2100 el escenario más leve

(RCP2.6) prevé un aumento de 1°C de la SST, mientras que el escenario más severo (RCP8.5) prevé hasta un aumento de más de 3°C (Figura 1) (Collins et al., 2013).

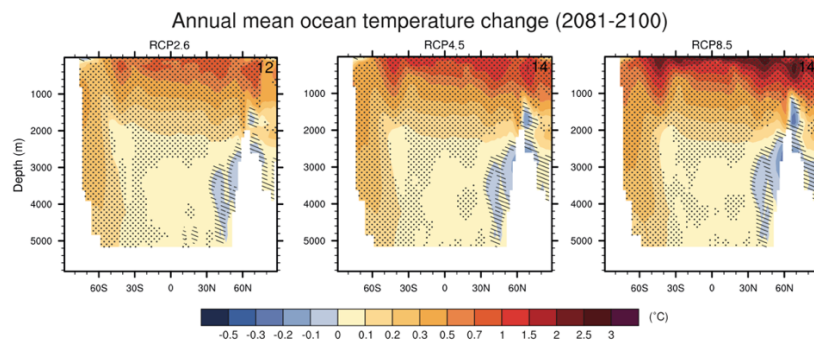


Figura 1. Modelo extraído de IPCC 2013 sobre la predicción de la temperatura anual media en los océanos para 2081-2100 bajo los escenarios RCP2.6 (izquierda), RCP4.5 (centro) y RCP8.5 (derecha).

Bajo estas nuevas condiciones cada vez más frecuentes, se han observado cambios en áreas de distribución, fenología y genética de las especies (Parmesan, 2006). Entre los organismos más vulnerables a estos cambios se encuentran los arrecifes de coral debido a su alta sensibilidad térmica (Veron, 1995). Sin embargo, aunque son bastante sensibles a los cambios de temperatura, se han registrado especies invasoras de corales en distintas partes del mundo (Figueira et al., 2004).

En noviembre de 2016 se registra por primera vez en las Islas Canarias la presencia del género *Oculina*, concretamente en el puerto de Las Palmas de Gran Canaria (Brito et al., 2017). Este género fue descrito por primera vez en 1908 en la costa sureste de América del Norte, donde se clasificó como una nueva variedad (variedad patagónica) de *Oculina mississippiensis*, una especie fósil de América del norte (De Angelis, 1908). Hasta hace un par de décadas, su distribución se había centrado en América y África Occidental (Gravier, 1909), pero en 1966 se citó por primera vez en aguas del Mar Mediterráneo, concretamente en el puerto de Savona, Italia. A partir de entonces se han ido reportando nuevos avistamientos a lo largo de todo el Mediterráneo debido muy probablemente al intenso tráfico marítimo intramediterráneo, llegando a establecer poblaciones estables en España, Grecia e Israel (Schwindt et al., 2014; Zibrowius, 1992). En la actualidad, la presencia de este género se ha expandido hasta el puerto de Santa Cruz de Tenerife. Este fenómeno probablemente se debe al intenso tráfico de plataformas petrolíferas que caracteriza a este puerto, así como al de Gran Canaria. Deduciendo, por tanto, que la introducción ha ocurrido mediante barcos mercantes, dado que en Canarias solo se encuentra en los dos puertos principales (Brito et al., 2017; López et al., 2019).

La rápida expansión que ha tenido *Oculina* sp. se debe principalmente a los ventajosos métodos de dispersión que presenta. Su reproducción puede ser tanto asexual mediante la expulsión de pólipos, como sexual mediante la liberación de gónadas cuando las colonias son pequeñas. Además, presentan la capacidad de crecer y reproducirse ante unas amplias variaciones de temperatura, salinidad, radiación ultravioleta y turbidez (Serrano et al., 2013).

Oculina sp. se clasifica como un coral escleractinio, que se caracteriza por presentar un esqueleto calcáreo sólido llamado coenosteum recubriendo los tejidos vivos (Figura 2 A-B) (Daly et al., 2006). Estos tejidos están completamente inmersos en el coenosteum, de forma que el borde superior de sus septos apenas sobrepasa esta estructura. En cuanto a su estructura interna, la boca del pólipo suele presentar un color amarillo-naranja y tiene una forma de hendidura transversal, mientras que los tentáculos suelen presentar un color azul grisáceo, presentando además numerosos puntos blancos que corresponden a concentraciones de nematocistos. Todos los tejidos están rellenos de simbioses del grupo dinooxanthellae, estas zooxantelas son las responsables de la coloración rojo-parda que presenta finalmente la colonia (Figura 2.C-D) (Zibrowius, 1980).

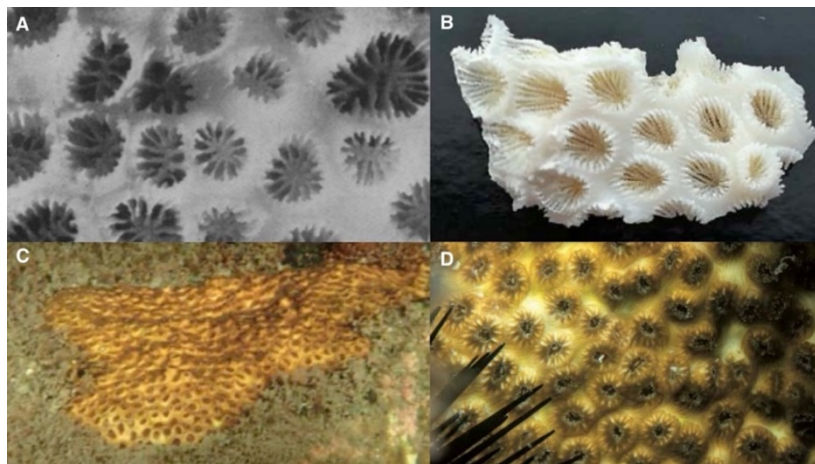


Figura 2. *Oculina* sp. (A) Muestra de una colonia del mediterráneo donde se puede observar la variabilidad de las hendiduras (Zibrowius, 1980). (B) Esqueleto calcáreo de una colonia. (C) Colonia de Las Alcaravaneras (Las Palmas de Gran Canaria). (D) Mayor detalle de una colonia de Las Alcaravaneras (Brito et al., 2017).

Las zooxantelas aportan hasta el 95% de sus productos fotosintéticos (glucosa, aminoácidos, lípidos) al huésped, siendo por tanto cruciales para el crecimiento del coral (Muscatine et al., 1981). Sin embargo, esta simbiosis se puede ver afectada por variables ambientales, donde un aumento de la temperatura del mar podría causar la inhibición de la calcificación del coral (Marshall & Clode, 2004).

Aunque por lo general *Oculina* sp. presenta zooxantelas, se trata de un coral zooxantelado facultativo, ante situaciones de estrés puede romper la relación simbiótica y sobrevivir sin zooxantelas hasta que las condiciones vuelvan a ser óptimas. Esta falta de dependencia permite que sean más selectivos en sus asociaciones, siendo la asociación más común con *Symbiodinium* tipo B2. Estudios fisiológicos sugieren que el tipo B2 es capaz de soportar una amplia gama de temperaturas, siendo incluso resistente a la exposición a corto plazo a temperaturas elevadas, ofreciéndole una gran ventaja frente a otras especies (Leydet, 2016).

No obstante, aunque tengan la capacidad de prescindir de las zooxantelas ante situaciones de estrés, siguen presentando vulnerabilidad a la subida de temperatura. Durante las últimas décadas, ha aumentado la prevalencia y la gravedad de los brotes de enfermedades en los corales. Aunque se desconoce la mayoría de patógenos responsables de estas enfermedades, se han identificado varios agentes pertenecientes a la familia Vibrionaceae (Kushmaro et al., 1996; Mills et al., 2013). Este patógeno penetra en el coral y se multiplica, produce una toxina que se une a las membranas de las zooxantelas formando un canal que permite que el amoníaco pase rápidamente, destruyendo así el gradiente de pH a través de la membrana y bloqueando la fotosíntesis del coral, provocando finalmente su blanqueamiento. Esta toxina se produce en niveles mucho más altos a 28°C que a 16°C, aumentando por tanto las probabilidades de blanqueamiento a altas temperaturas (Banin et al., 2000, 2001).

Desde inicios de la década de 1980 los fenómenos de blanqueamiento han aumentado en extensión y frecuencia. Uno de los ejemplos más claros es el blanqueamiento masivo que hubo después de El Niño en 1998, donde las temperaturas superficiales estuvieron más de 0,9°C por encima de lo normal en el mes más cálido (Goreau et al., 2000). En Canarias, las aguas llevan más de un año sufriendo una ola de calor. Así, en el año 2023 los termómetros marcaron una temperatura mínima de 19,4°C y casi 27°C de máxima, lo que supone dos grados por encima del valor máximo observado en años anteriores.

Conociendo los problemas a los que se enfrentan estos ecosistemas marinos, surge la necesidad de estudiar cómo será su desarrollo bajo estas condiciones. Han sido ya varias las investigaciones que han estudiado las tasas de crecimiento y calcificación bajo estos nuevos escenarios (Cohen et al., 2017). Sin embargo, aunque hay una amplia variedad de metodología para estudiar el crecimiento y desarrollo de los corales, el estudio de su fisiología y más precisamente de su perfil lipídico, es quizás uno de los que menos protagonismo ha tenido hasta la fecha.

Los lípidos representan hasta el 40% de la biomasa seca del coral. Participan en gran parte de los procesos bioquímicos y fisiológicos, permitiendo conocer el estado nutricional y de salud del organismo a partir de cambios en la composición de estas moléculas (Imbs et al., 2010). También permiten conocer otras características como gastos energéticos o estrategias reproductivas (Imbs et al., 2021). La composición lipídica de los corales, como organismos politróficos, dependen de diversos factores como, las diferentes fuentes de alimento (dieta exógena y zooxantelas), las cuales influyen significativamente en su contenido lipídico, además, de las condiciones ambientales como la exposición a la luz, la salinidad y/o la temperatura. Diversos estudios, relatan que el estrés térmico aumenta el proceso de peroxidación lipídica, donde los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, del inglés *Polyunsaturated Fatty Acids*), que contienen dos o más insaturaciones, son los objetivos principales los ácidos grasos saturados (SFA, del inglés *Saturated Fatty Acids*), sin dobles enlaces o insaturaciones en su cadena hidrocarbonada, parecen ser resistentes (Lesser, 1997; Wada et al., 1994). Los PUFA están estrechamente relacionados con la estructura de la membrana celular, así como con su protección frente a ataques oxidativos, siendo además los responsables en gran parte de su fluidez (Tocher, 2003). Como resultado, las proporciones de PUFA en el total de ácidos grasos (AG) de los corales estresados deben ser bajas para preservar la integridad de la membrana huésped frente al aumento de las temperaturas. A su vez, la presencia de PUFA de la serie omega-3 (n-3 PUFA) está asociada con una mejora en la estabilidad de las membranas celulares ante variaciones en la temperatura del agua de mar (Hall et al., 2000).

La exposición a altas temperaturas induce el deterioro de la maquinaria fotosintética de los simbioses (Jones et al., 1998; Warner et al., 1999). Los contenidos de lípidos y de AG en los corales están directamente relacionados con la fotosíntesis (Oku et al., 2003) por lo que, la pérdida de la función fotosintética inducida térmicamente en el simbiote podría afectar al metabolismo de los AG, provocando cambios en su perfil y reduciendo la producción lipídica (Díaz-Almeyda et al., 2011; Yamashiro et al., 2005). Además, existen PUFA específicos en los corales duros, en particular 18:3n-6 y 18:4n-3, que son biomarcadores de zooxantelas, pudiendo establecer por tanto una relación entre el estrés térmico que sufre el organismo y la cantidad existente de estos AG (Imbs et al., 2010). En el caso de *Oculina* sp., a pesar de que su distribución abarca amplios rangos de temperatura, resulta de gran dificultad encontrar estudios sobre su perfil lipídico, ya que la mayoría de investigaciones se han centrado en la relación simbiótica o los patógenos a los que se enfrenta.

3. Objetivos

El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de una ola de calor (aumento de la temperatura del agua por un determinado periodo de tiempo) en el perfil de AG de colonias de *Oculina* sp. Con ello, se intentará determinar la relación existente entre la temperatura y el perfil lipídico de este coral para así completar la escasa información existente sobre su composición lipídica. Este enfoque también permitirá comprender mejor la respuesta fisiológica de estos organismos al cambio climático y evaluar su capacidad de adaptación, proporcionando valiosa información para el desarrollo de estrategias de conservación y manejo de estos ecosistemas marinos.

4. Material y métodos

4.1 Diseño experimental

El presente estudio se realizó en el marco del proyecto ThinkInAzul (financiado por la Unión Europea, Programa de Recuperación y Resiliencia (Next Generation EU) y el Gobierno de Canarias (Consejería de Economía, Conocimiento y Empleo)), estando encuadrado dentro de un experimento más amplio, donde se han realizado estudios ecofisiológicos y de metabarcoding de zooxantelas, cuyos resultados serán incluidos en el Trabajo de Fin de Grado de Xavi Alonso Bonfill (Universidad de Barcelona).

Para poder llevar a cabo este estudio fue necesaria la recolección de varias colonias de *Oculina* sp. Los ejemplares fueron recogidos por la Dra. Adriana Rodríguez (investigadora del Grupo de Investigación BIOECOMAC, Biodiversidad, Ecología Marina y Conservación de la ULL) y su equipo de trabajo, el día 18 de enero de 2024 en el puerto de Santa Cruz de Tenerife (28° 27' 37"N, 16° 14' 47"O). Dicha recolección se realizó en un mismo punto, a la misma profundidad y orientación, con el objetivo de minimizar las variaciones entre las colonias recolectadas. Además, se registraron los datos de temperatura para mantener esas condiciones durante el posterior periodo de aclimatación de los ejemplares experimentales. Los individuos recolectados fueron trasladados al Laboratorio Húmedo del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna. Una vez examinadas las colonias recogidas, se seleccionaron nueve, las cuales fueron fragmentadas en trozos más pequeños. Un fragmento de cada colonia (n=9) se conservó a -80°C hasta su posterior análisis lipídico (Muestra Inicial – T0). Los demás fragmentos fueron fijados a FRAGS para colonias

debidamente numerados y colocados en un total de nueve acuarios (6 fragmentos de una misma colonia por acuario), donde en cada grupo de tres acuarios se aplicó un tratamiento diferente. De esta forma, había tres tratamientos con tres replicas (n=3): Temperatura control 20°C (acuarios 1, 2 y 3); Temperatura alta 26°C (acuarios 4, 5 y 6) y Temperatura muy alta 28°C (acuarios 7, 8 y 9).

Una vez distribuidos los FRAGS en los acuarios, se inició el periodo de aclimatación de 7 días (del 18 al 24 enero), en los cuales todos los acuarios se encontraban a una temperatura de 20°C. Posteriormente, se inició la rampa de temperatura, donde se subió la temperatura gradualmente durante 8 días (24 de enero a 1 de febrero) hasta llegar a 26° (tratamiento de temperatura alta; n=3) y 28° (tratamiento de temperatura muy alta; n=3). Una vez alcanzadas las temperaturas pretendidas, estas se mantuvieron durante 19 días (1 a 19 de febrero). Trascurridos los 19 días, se retiró un FRAG de cada acuario (n=3 por tratamiento) y el fragmento de *Oculina* sp. correspondiente se conservó a -80°C para su posterior análisis (Muestras T1; n=3). A continuación, se inició el proceso de bajada de temperatura, el cual se llevó a cabo gradualmente durante 10 días (19 a 29 de febrero) hasta llegar a alcanzar la temperatura inicial de 20°C, momento en el cual se retiró otro FRAG de cada acuario (n=3 por tratamiento) que correspondía con las muestras finales (T2) del experimento.

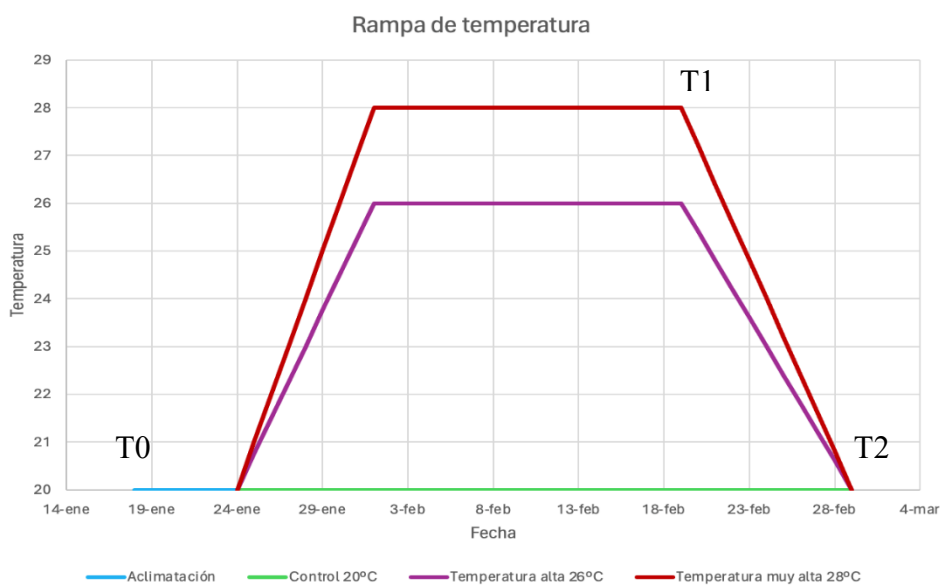


Figura 3. Ilustración gráfica de las rampas de temperatura del presente experimento

Durante el experimento, las colonias fueron alimentadas tres veces por semana con una mezcla de fitoplancton y zooplancton seco triturado, cuyo el perfil de AG se puede ver en la tabla 1.

Tabla 1. Contenido lipídico (% DW) y perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del alimento de *Oculina* sp.

Ácido graso	
LT	5,14 ± 0,19
14:0	4,23 ± 0,02
15:0	4,29 ± 0,04
16:0	23,78 ± 0,16
17:0	4,35 ± 0,08
18:0	10,19 ± 0,13
19:0	0,62 ± 0,01
20:0	0,68 ± 0,00
22:0	0,54 ± 0,00
24:0	0,29 ± 0,01
Σ SFA	48,97 ± 0,45
16:1n-9	0,30 ± 0,01
16:1n-7	6,16 ± 0,06
16:1n-5	0,13 ± 0,19
17:1n-7	4,65 ± 0,05
18:1n-9	12,50 ± 0,15
18:1n-7	6,89 ± 0,08
18:1n-5	0,31 ± 0,00
20:1n-9	0,63 ± 0,00
20:1n-7	1,33 ± 0,10
Σ MUFA	32,9 ± 0,69
16:4n-1	1,33 ± 0,02
16:2n-4	0,47 ± 0,01
18:2n-6 (LA)	6,69 ± 0,17
20:2n-6	0,14 ± 0,20
20:4n-6 (ARA)	0,67 ± 0,04
Σ n-6 PUFA	7,50 ± 0,41
18:3n-3 (ALA)	0,46 ± 0,01
18:4n-3	0,40 ± 0,03
20:5n-3 (EPA)	3,48 ± 0,24
22:6n-3 (DHA)	1,06 ± 0,13
Σ n-3 PUFA	5,39 ± 0,40
Σ PUFA	14,69 ± 0,90
Desconocido	3,43 ± 0,01

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (n=2). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; n-6, serie Omega-6; n-3, serie Omega-3.

4.2 Extracción lipídica

Todas las determinaciones analíticas del presente estudio fueron llevadas a cabo en los laboratorios del grupo de investigación NUTRAHLIPIDS (Fisiología de los lípidos y sus derivados en la nutrición animal y humana).

Debido al esqueleto calcáreo sólido que recubre el pólipo del género *Oculina* sp., se propusieron dos métodos de extracción lipídica, ambos basados en la metodología de Folch et al. (1957), descrita en Christie (2003).

- **Método 1:** en este procedimiento, el fragmento de coral (pólipos + estructura de carbonato cálcico) previamente limpio raspando la parte inferior del mismo con un objeto afilado para eliminar la presencia de otros organismos, fue molido en un mortero hasta obtener trozos muy pequeños, con aspecto arenoso (ver Figura 4). Se pesó 1 g de muestra triturada en un tubo de ensayo esmerilado (Tubo 1) al cual se añadió 10 ml de cloroformo:metanol (CL:MET, 2:1 v/v) y se homogeneizó en un homogeneizador (Virtishear homogenizer, Virtis Company, NY, USA). El solvente se vertió a un nuevo tubo esmerilado (Tubo 2) a través de un filtro (Filter-Lab, Barcelona, España) previamente lavado con 1 ml de CL:MET, para eliminar la parte sólida de la muestra. Se añadió 2,5 ml de cloruro potásico (KCl) al 0,88% (p/v) y se agitó fuertemente en vórtex, de forma que el CL:MET pudiera extraer las sustancias liposolubles y el KCl aumentara la tensión superficial entre las fases a separar, arrastrando a la fracción acuosa, parte del metanol y la materia hidrosoluble. Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fase inferior (fase orgánica que contiene el extracto lipídico) con una pipeta Pasteur pasándola a un tercer tubo (Tubo 3). A continuación, se evaporó el solvente orgánico bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez totalmente evaporado el solvente, el extracto fue trasvasado a un vial previamente pesado mediante 1 ml de CL:MET (de tres lavados), evaporando una vez más el solvente bajo atmósfera de nitrógeno, hasta que solo quedara el extracto de lípido. Una vez evaporado, se mantuvo el vial en un desecador, en vacío y en oscuridad durante 12 horas. Pasado este tiempo, se pesó el vial, y por diferencia de pesada se calculó el valor de lípido total de cada muestra. Finalmente, el extracto de lípido (LT, lípido total) se resuspendió en CL:MET (2:1, v/v) a una concentración de 10 mg/ml con 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, y se guardó en atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su posterior análisis.

- **Método 2:** este procedimiento se diseñó para simplificar el proceso de extracción de los lípidos, en base a la alta capacidad del cloroformo como solvente orgánico. Una vez limpios los fragmentos de *Oculina* sp. de la posible contaminación por otros organismos en la parte

posterior, se trocearon los mismos de manera que los trozos se pudieron introducir en los tubos de ensayo esmerilados usados para el proceso de extracción lipídica (Figura 4). Se pesó aproximadamente 1 g de muestra a la cual se añadieron 8 ml de CL:MET (v/v 2:1) y se dejó durante 24 horas en nevera. Al día siguiente se sacó el tubo de la nevera y se trasvasó el solvente a un nuevo tubo esmerilado (Tubo 2) a través de un filtro previamente lavado con CL:MET para eliminar impurezas. Posteriormente, se añadió 2 ml de CL:MET (v/v 2:1) al tubo inicial, se agitó fuertemente y se trasvasó al Tubo 2. Una vez obtenido todo el filtrado, se continuó de igual manera que en el proceso anteriormente descrito.



Figura 4. Comparativas del aspectos de las muestras con ambos métodos de extracción lipídica. Método 1 (derecha) y Método 2 (izquierda).

Se calculó el porcentaje de lípido obtenido por ambos métodos, para comparar su eficacia. Para determinar el porcentaje de lípido en peso fresco se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípido peso fresco} = \left(\frac{\text{Lípido total (mg)}}{\text{masa peso fresco muestra}} \right) \times 100$$

En ambos métodos se obtuvo un porcentaje lipídico similar, por lo que se optó por utilizar el Método 2 en las siguientes muestras, de cara a optimizar el trabajo de laboratorio.

4.3 Determinación de humedad y ceniza

Para la determinación del contenido de humedad y ceniza total de las colonias de *Oculina* sp., se pesaron cerca de 3 mg de muestra en un crisol de porcelana, para determinar su porcentaje de humedad. Para ello, se determinó el peso del crisol junto con la muestra el cual se introdujo durante 24 horas en una estufa a 100°C. Transcurrido este tiempo, se pesó

nuevamente el crisol con la muestra seca y por diferencia de pesadas se determinó el porcentaje de humedad:

$$\% \text{Humedad} = \frac{(\text{peso crisol} + \text{muestra fresca}) - (\text{peso crisol} + \text{muestra seca})}{(\text{peso crisol} + \text{muestra}) - (\text{peso crisol})} \times 100$$

A partir de este porcentaje se obtiene el porcentaje de lípidos en peso seco, que permite medir la cantidad de lípido en las muestras tras eliminar el contenido de agua.

$$\% \text{Lípido peso seco} = \frac{\text{lípido peso fresco}}{100 - \text{humedad}} \times 100$$

Para determinar el contenido total de minerales, se introdujo seguidamente el crisol con la muestra seca en el horno MUFLA (J.P. SELECTA, Barcelona, España), a 200°C durante 1 hora. Luego, la temperatura se incrementó a 300°C durante 45 minutos, seguido de otro aumento a 400°C durante 30 minutos. Finalmente, se elevó a 450°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, las muestras se retiraron del horno y se dejaron en un desecador hasta que alcanzaran la temperatura ambiente, procediendo a tomar su peso para determinar así el contenido de ceniza mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Ceniza en peso fresco} = \frac{(\text{peso crisol} + \text{cenizas}) - (\text{peso crisol})}{(\text{peso muestra fresca})}$$

$$\% \text{Ceniza en peso seco} = \frac{(\text{peso crisol} + \text{cenizas}) - (\text{peso crisol})}{(\text{peso muestra seca})}$$

En este estudio, el extracto lipídico fue obtenido de la masa total de la colonia (esqueleto calcáreo + pólipos + zooxantelas), debido a la dificultad de retirar los pólipos de su estructura, antes de iniciar el procedimiento de extracción de los lípidos. Por ello y para normalizar los datos, se ha tenido en cuenta el valor de materia inorgánica existente en cada muestra, determinando el porcentaje de lípido de los pólipos aplicando las siguientes ecuaciones:

$$1^a \rightarrow \text{Masa peso fresco del pólipo} = \frac{(\text{masa peso fresco muestra}) \times (100 - \% \text{ ceniza en peso fresco})}{100}$$

$$2^a \rightarrow \% \text{Lípido pólipo peso fresco} = \left(\frac{\text{Lípido total (mg)}}{\text{masa peso fresco del pólipo}} \right) \times 100$$

$$3^a \rightarrow \% \text{Lípido pólipo peso seco} = \frac{\% \text{ lípido peso fresco}}{100 - \text{humedad}} \times 100$$

4.4 Determinación del perfil de ácidos grasos

Posteriormente a la extracción, se realizó el proceso de transmetilación de los lípidos. Este proceso consiste en la rotura de los enlaces éster entre los esqueletos hidrocarbonados y los AG, produciendo ácidos grasos libres (AGL) que posteriormente se unen a un grupo metilo (-CH₃), obteniéndose así ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, del inglés *Fatty Acid Methyl Esters*) que les confiere la propiedad de ser volátiles, y así poder ser identificados y cuantificados por cromatografía de gases. De cada muestra se transmetiló 1 mg de extracto lipídico, al cual se le añadió 5% de estándar interno (19:0). Se evaporó el solvente bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico al 1% en metanol (v/v) al extracto seco. Los tubos se mantuvieron durante 16 horas a 50°C en una manta calefactora, con atmósfera de nitrógeno y en oscuridad. Trascurrido ese tiempo, se retiraron las muestras de la manta y se dejaron enfriar. Seguidamente, se les añadió 2 ml de bicarbonato potásico (KHCO₃) al 2% (p/v) y 5 ml de hexano:éter (1:1 v/v) (con BHT al 0,01%), se agitó en el vortex y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C obteniéndose finalmente dos fases. Se transfirió la fase superior, donde se encontraban los FAMEs a un segundo tubo y se añadieron 5 ml de hexano:éter 1:1 (v/v) (sin BHT) al primer tubo. Se volvió a agitar y centrifugar, y a transvasar una vez más la fase superior al tubo 2. De esta manera se recuperan los FAMEs que pudieran haberse quedado sin transvasar en el primer lavado. Se evaporó el solvente del tubo 2 (las dos fases superiores) con nitrógeno y una vez seco el extracto, se llevó a cabo una cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) para la purificación de los FAMEs. Para ello, se emplearon placas de TLC de gel de sílice de 20 cm x 20 cm x 0,25 cm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) las cuales se marcaron previamente con sus correspondientes márgenes y zonas de carga de muestra. Además, en cada placa se cargó 50 µl de estándar externo de FAME para así poder determinar su posición en las muestras. Las placas se desarrollaron en una cubeta que contenía hexano/éter/ácido acético (90:10:1 v/v). Una vez que el solvente llegó a la marca situada a 1 cm del borde superior, se retiraron las placas de la cubeta y se secaron bajo campana extractora. A continuación, se pulverizaron con iodina (1% iodo en cloroformo) las zonas donde se encontraba el estándar externo, protegiendo la zona de las muestras con una placa de vidrio. Además, también se pulverizaron las manchas de BHT para utilizarlas como límite al rascar la sílice. Una vez localizadas las zonas donde se encontraban los ésteres metílicos de cada muestra, se raspó la sílice de dicha zona recogiéndola y vertiéndola a un nuevo tubo esmerilado. A estos tubos se les añadió hexano:éter (2 ml con 0,01% BHT y 8 ml sin BHT) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se

obtuvieron dos fases, de las cuales se recuperó la fase superior en un nuevo tubo que contenía los FAMES. El contenido de este nuevo tubo se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno y se resuspendió con 900 µl de hexano, transfiriéndose a viales para ser almacenados en nevera hasta la realización de la cromatografía de gases.

Finalmente, la determinación del perfil de ácidos grasos de cada muestra se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases (Thermo Scientific TRACE-GC Ultra, Milán, Italia) con inyección en columna y detector de ionización de llama (FID), en una columna de sílice fundida y empleando helio como gas portador. Los resultados obtenidos en estas cromatografías se identificaron con ayuda de un patrón (aceite de pescado) y un multiestándar comercial con composición y tiempos de retención conocidos.

4.5 Análisis estadístico

Los datos de contenido lipídico, ceniza y humedad, así como del perfil de ácidos grasos de las colonias de *Oculina* sp. se reflejan como media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software IBM® SPSS Statistics versión 29.0 para Windows. Previamente a las comparaciones estadísticas, se comprobó la distribución normal de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. Los datos que no cumplieren los supuestos de normalidad y homocedasticidad se transformaron a través de la raíz cuadrada del arcoseno, la inversa o bien por el logaritmo en base 10. Se evaluó el efecto de la temperatura y/o el tiempo de exposición sobre la composición proximal y lipídica de las colonias mediante una ANOVA de 2 vías, donde el factor 'temperatura' y 'tiempo' fueron tratados como factores fijos. En el caso del factor 'temperatura' se fijaron tres niveles de variación, nivel 20°C (Temperatura control) vs nivel 26°C (Temperatura alta) vs nivel 28°C (Temperatura muy alta). Mientras que en el factor 'tiempo' se fijaron dos niveles, 19 días de tratamiento (muestras T1, n=3) vs 29 días de tratamiento (19 días de heatwave + 10 días de recuperación progresiva; muestras T2, n=3). Se efectuaron comparaciones por parejas con ajuste de Bonferroni. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

5. Resultados y Discusión

5.1 Perfil lipídico de *Oculina* sp. recogida del medio natural

Debido a la escasa información existente en cuanto a la composición bioquímica de *Oculina* sp., la primera parte de este trabajo se centró en caracterizar el contenido lipídico, de humedad y cenizas (Tabla 2), así como el perfil de AG de los ejemplares capturados del medio natural (Tablas 3).

Tabla 2. Contenido lipídico, de humedad y cenizas (% del peso total) de ejemplares de *Oculina* sp.

Lípido peso fresco (colonia)	0,22 ± 0,11
Lípido peso seco (colonia)	0,27 ± 0,14
Humedad (colonia)	19,58 ± 5,35
Ceniza peso fresco (colonia)	76,60 ± 5,24
Ceniza peso seco (colonia)	95,25 ± 1,76
Lípido peso seco (pólipos)*	6,76 ± 4,44

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (n=9). *, valor normalizado al pólipo y zooxantelas, no a la colonia.

Como se mencionó anteriormente, la *Oculina* sp. se clasifica como un coral escleractinio, que se caracteriza por presentar un esqueleto calcáreo sólido con un contenido lipídico reducido. La ratio entre pólipos y su esqueleto varía según el tamaño de la colonia (Imbs & Dembitsky, 2023). Esta variación puede ser un problema en la determinación del contenido lipídico de la colonia. Por ello, y de cara a normalizar los datos obtenidos, se ha tenido en cuenta el valor de materia inorgánica existente en cada muestra, para poder determinar el LT considerando exclusivamente la biomasa de pólipos + zooxantelas. Observando los datos de ceniza obtenidos en este estudio, verificamos que la estructura inorgánica, representa más del 75% de la composición de la colonia, correspondiendo el 25% restante a los organismos propiamente dichos (Tabla 2). Además, el peso seco de los pólipos corresponde a aproximadamente un 5% del peso de la colonia. En base a lo anterior, los datos de LT en peso seco de los pólipos fueron obtenidos teniendo en cuenta ambas consideraciones para poder establecer su valor en la biomasa de pólipos + zooxantelas (fracción de la colonia donde están acumulados los lípidos).

En el presente estudio, el contenido lipídico en peso seco de la *Oculina* sp. recolectada del medio natural fue de 6,76%. El contenido lipídico de los corales puede diferir enormemente dependiendo no solo de la especie estudiada, sino también por diferentes factores como etapa

del ciclo de desarrollo en el que se encuentre, época del año, profundidad del hábitat, exposición a la luz, temperatura del agua, alimento, etc. (ver Imbs & Dembitsky, 2023). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los individuos recolectados estaban expuestos a condiciones ambientales similares, por lo que la alta variabilidad entre colonias (Tabla 2) no puede atribuirse al factor ambiental.

Los tejidos de *Oculina* sp. están rellenos de simbiontes del grupo dinooxanthellae, que aportan hasta el 95% de sus productos fotosintéticos (incluidos los lípidos) al huésped (Muscatine et al., 1981). En este sentido, el perfil lipídico de estos organismos, deriva tanto del tejido de los pólipos (huéspedes) como de las zooxantelas (simbionte). Debido a la metodología aplicada para la extracción de los lípidos, en este estudio no fue posible diferenciar el perfil del tejido de los pólipos, del perfil de las zooxantelas. Sería interesante para estudios futuros, poder separar la biomasa de zooxantelas de las de los pólipos para poder caracterizarlas lipídicamente de forma independiente.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de *Oculina* sp.

% Ácidos grasos	
14:0	1,62 ± 0,89
15:0	0,08 ± 0,13
16:0	16,07 ± 2,88
17:0	0,62 ± 0,25
18:0	8,83 ± 1,00
20:0	0,99 ± 0,18
∑ SFA	28,46 ± 2,64
16:1n-5	1,60 ± 0,68
18:1n-9	6,36 ± 1,82
18:1n-7	2,40 ± 0,56
20:1n-11	1,90 ± 0,66
20:1n-9	1,54 ± 0,30
20:1n-7	1,88 ± 0,33
∑ MUFA	18,66 ± 2,68
18:2n-6 (LA)	2,72 ± 0,31
18:3n-6	0,84 ± 0,58
20:2n-6	1,06 ± 0,39
20:3n-6	1,42 ± 0,93
20:4n-6 (ARA)	8,33 ± 1,22
22:4n-6	5,91 ± 1,34
∑ n-6 PUFA	20,28 ± 2,43
18:3n-3 (ALA)	0,37 ± 0,20
18:4n-3	3,83 ± 1,29
20:5n-3 (EPA)	4,50 ± 1,25
22:5n-3	9,28 ± 2,07
22:6n-3 (DHA)	3,12 ± 0,61
∑n-3 PUFA	21,83 ± 3,46
∑ n-3 LC-PUFA	17,63 ± 2,59
∑ PUFA	42,79 ± 3,92
n-3/n-6	1,10 ± 0,17
ARA/EPA	2,19 ± 1,07
DHA/EPA	0,83 ± 0,41
16:0 DMA	1,51 ± 0,49
18:0 DMA	5,46 ± 1,36
∑ DMA	6,97 ± 1,12
∑ Desconocidos	3,07 ± 1,26

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (n=9). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados (3 o más dobles enlaces); n-6, serie Omega-6; n-3, serie Omega-3; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (20 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces); DMA, dimetilacetales.

Según se refleja en la Tabla 3, en las colonias recolectadas del medio natural, los PUFAs representan más del 40% del total de AG, destacando entre los AG de la serie omega-3, el ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5n-3), representando el 9,28% del total, seguido del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), el ácido estearidónico (SDA, 18:4n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) (4,50, 3,83 y 3,12%, respectivamente). En cuanto a los omega-6 PUFA, destacan el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) y el ácido adrenico (22:4n-6) con valores medios de 8,33% y 5,91% del total de AG, respectivamente. Entre los SFA, resalta la elevada proporción de ácido palmítico (16:0), siendo el AG más abundante en esta especie con un 16,07% del total de AG, y el ácido esteárico (18:0) con un 8,83%. Los resultados obtenidos son consistentes con investigaciones previas en la familia Oculinidae (Imbs & Dembitsky, 2023). Estos estudios han destacado la predominancia del 16:0, así como de los AG 18:4n-3, ARA, EPA, DPA y DHA, de los cuales se ha registrado un alto porcentaje en nuestros resultados. Sin embargo, al estudiar un coral simbiote, es importante considerar que, además de sus propios lípidos tisulares, también presenta lípidos característicos de las zooxantelas, que representan aproximadamente el 19% de los lípidos totales de la colonia.

5.2 Efecto de la temperatura en el contenido lipídico, ceniza y humedad de *Oculina* sp.

En la figura 5 se presenta el contenido lipídico de las colonias de *Oculina* sp. sometidas a diferentes temperaturas, después de “eliminada” la fracción inorgánica de las muestras, es decir, con los datos normalizados. Aunque no se observó un efecto significativo de la temperatura en el contenido lipídico de las colonias, sí es evidente una tendencia de acumulación de lípido después del periodo de exposición a temperaturas superiores al control (26°C o 28°C; T1), seguido de una bajada, una vez alcanzada de nuevo la temperatura inicial de 20°C (final de la ola de calor; T2). La mayoría de los estudios previos relacionados con el efecto de la temperatura en el contenido lipídico de diferentes especies de coral, indican que el estrés térmico tiende a producir una disminución del mismo, resultado de la disminución del número y capacidad fotosintética de las zooxantelas, fuente principal de nutrientes de los corales zooxantelados (Imbs & Dembitsky, 2023). Sin embargo, hay que recordar que *Oculina* sp. es un coral zooxantelado facultativo, capaz de sobrevivir sin zooxantelas ante situaciones de estrés. Siendo capaz, además, de soportar una amplia gama de temperaturas e incluso resistir a la exposición a corto plazo a temperaturas elevadas (Leydet, 2016). Por otro lado, en el presente estudio, las colonias de *Oculina* sp. fueron alimentadas con una mezcla de zooplancton

triturado, aportándoles así una fuente de nutrientes con un contenido lipídico de ~5%, lo que podría contribuir a la preservación del contenido lipídico de las colonias.

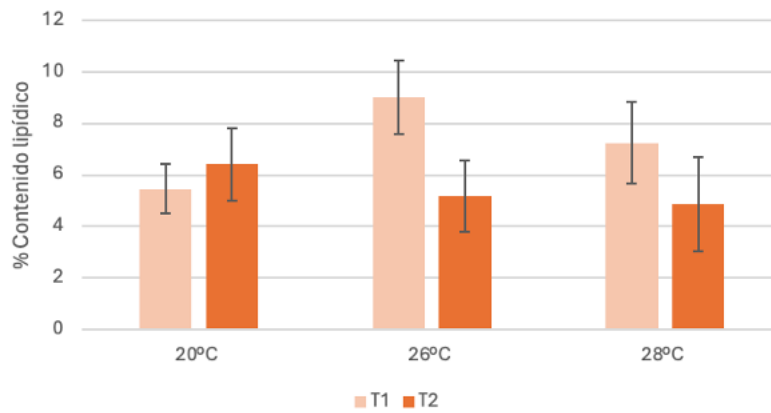


Figura 5. Contenido lipídico (% DW) de pólipos + zooxantelas (datos normalizados) de *Oculina* sp. sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar (n=3).

Por el contrario, la fracción inorgánica (contenido mineral) de las colonias de *Oculina* sp. se vio influenciada por el factor tiempo (Figura 6), observándose una disminución de la misma en el periodo T2 ($p < 0,05$). Esta disminución puede atribuirse a la posible pérdida de zooxantelas, sin las cuales, los corales pierden su capacidad de calcificación, debilitando así su esqueleto calcáreo (Muscatine et al., 1981).

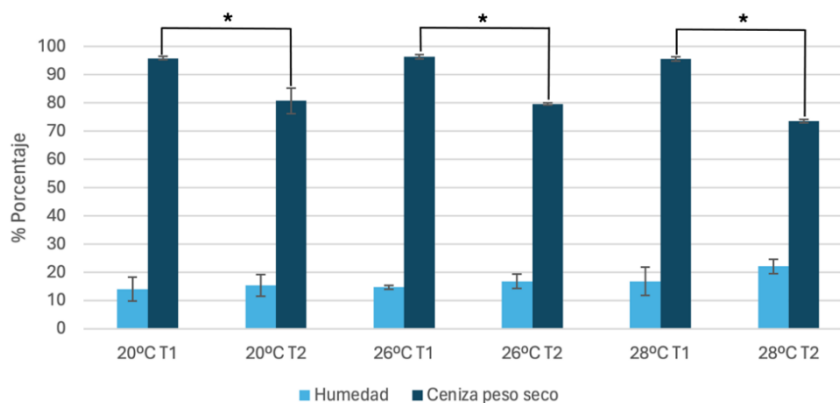


Figura 6. Contenido de humedad y ceniza de las colonias de *Oculina* sp. sometidas a diferentes temperaturas y tiempos. Los resultados se presentan en porcentaje del peso total (%) y se presentan como media \pm desviación estándar (n=3). *, indica diferencias significativas en el factor tiempo.

Sin embargo, esta disminución del esqueleto fue también detectada cuando la temperatura se mantuvo constante (tratamiento control 20°C), por lo que otro factor podría estar afectando a esta menor capacidad de calcificación. En este sentido, una menor disponibilidad de carbonato

cálcico en los acuarios en comparación con su entorno natural, puede haber provocado que el organismo haya ido perdiendo el esqueleto calcáreo desde su introducción en los tanques experimentales.

5.3 Efecto de la temperatura en el perfil de ácidos grasos de *Oculina* sp.

Incrementos excesivos de temperatura podrían provocar un aumento en la fluidez de las membranas de las células, pudiendo dar lugar a la ruptura celular. Ante esta amenaza, las células se adaptan cambiando las proporciones de AG saturados e insaturados en sus membranas para mantener un nivel óptimo de fluidez (Arts & Kohler, 2009; Guschina & Harwood, 2006). Nuestro análisis estadístico puso de manifiesto el efecto significativo del factor 'temperatura' y el factor 'tiempo' en las proporciones de ciertos AG de *Oculina* sp., sin embargo, no mostró interacción de ambos factores (Tabla 4). El aumento de temperatura dio lugar a un incremento del total de AG saturados (Σ SFA), especialmente debido 16:0, 18:0 y araquídico (20:0) ($p < 0,05$; Tabla 4). Este incremento probablemente dio lugar a un aumento de la rigidez de la membrana, evidenciando que las propiedades físico-químicas de las membranas celulares en esta especie pueden ser alteradas ante un aumento de la temperatura ambiental. Esta capacidad adaptativa quedó confirmada con el factor tiempo, ya que hubo una disminución significativa del 14:0 y 16:0 ($p < 0,05$) cuando se recuperó la temperatura ambiental habitual. Por otro lado, se observó la tendencia inversa en AG monoinsaturados como el ácido oleico (18:1n-9) y del ácido gadoleico (20:1n-7), que disminuyeron con el aumento de la temperatura ($p < 0,05$). A pesar de que la temperatura no afectó significativamente al total de PUFA, determinados AG de cadena larga de la serie omega-3 como el EPA y el DHA mostraron una clara tendencia a ser más bajos a mayor temperatura (3,11, 2,34 y 2,47%, y 5,21, 4,28 y 4,48%, respectivamente). En la vuelta a la temperatura inicial, se produjo un aumento significativo de 18:3n-4, 20:2n-6, 22:4n-6 y EPA, y un descenso significativo de DHA entre T1 y T2. Como consecuencia de lo anterior, hay una tendencia desfavorable desde el punto de vista fisiológico a reducir la relación n-3/n-6 tanto con el incremento de la temperatura como con el tiempo (Simopoulos, 2011).

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de *Oculina* sp. sometida a 3 temperaturas ambientales diferentes durante 2 tiempos

	20°C		26°C		28°C		Temperatura	ANOVA 2 vías	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2		Tiempo	Interacc
14:0	1,39 ± 0,30	0,92 ± 0,03	1,48 ± 0,06	1,09 ± 0,22	1,44 ± 0,56	1,12 ± 0,30		*	
15:0	nd	0,35 ± 0,03	0,09 ± 0,16	0,16 ± 0,28	nd	0,29 ± 0,26			
16:0	16,31 ± 1,51	16,13 ± 0,90	19,26 ± 1,42	17,26 ± 0,69	20,94 ± 1,28	18,42 ± 1,26	b,a,a	*	
17:0	0,59 ± 0,06	0,85 ± 0,01	0,53 ± 0,20	0,85 ± 0,22	0,51 ± 0,11	0,79 ± 0,10		*	
18:0	7,31 ± 0,22	8,06 ± 0,66	8,71 ± 0,54	8,73 ± 0,69	10,56 ± 0,71	9,97 ± 0,81	c,b,a		
20:0	0,72 ± 0,08	0,85 ± 0,09	0,93 ± 0,10	1,14 ± 0,10	1,28 ± 0,25	1,44 ± 0,28	b,b,a		
22:0	nd	nd	0,20 ± 0,17	0,13 ± 0,22	0,28 ± 0,25	0,40 ± 0,06	b,ab,a		
24:0	nd	nd	0,13 ± 0,23	0,13 ± 0,22	0,21 ± 0,18	0,12 ± 0,21			
∑ SFA	26,32 ± 1,56	27,15 ± 1,22	31,32 ± 1,22	29,49 ± 0,67	35,22 ± 1,98	32,56 ± 2,07	c,b,a		
16:1n-9	0,91 ± 0,45	0,79 ± 0,18	1,02 ± 0,06	0,88 ± 0,25	0,93 ± 0,40	0,83 ± 0,30			
16:1n-5	2,65 ± 0,05	2,21 ± 0,13	2,32 ± 0,12	1,71 ± 0,13	2,19 ± 0,68	1,93 ± 0,40		*	
17:1n-7	0,38 ± 0,06	0,55 ± 0,05	0,14 ± 0,25	0,54 ± 0,16	0,14 ± 0,25	0,32 ± 0,28		*	
18:1n-9	7,55 ± 0,98	7,66 ± 1,06	8,37 ± 1,34	6,60 ± 0,28	5,94 ± 1,05	6,10 ± 1,02	a,ab,b		
18:1n-7	3,05 ± 0,67	3,49 ± 0,55	2,69 ± 0,16	2,90 ± 0,31	2,44 ± 0,31	2,99 ± 0,45			
20:1n-11	2,69 ± 0,74	1,94 ± 0,59	2,30 ± 0,54	2,17 ± 0,20	2,05 ± 0,77	1,83 ± 0,29			
20:1n-9	1,29 ± 0,35	1,70 ± 0,29	1,02 ± 0,13	1,23 ± 0,15	0,90 ± 0,18	1,25 ± 0,28		*	
20:1n-7	2,39 ± 0,36	3,04 ± 0,03	1,65 ± 0,11	2,39 ± 0,21	1,37 ± 0,40	2,20 ± 0,53	a,b,b	*	
22:1n-9	0,29 ± 0,27	0,38 ± 0,10	0,39 ± 0,07	0,48 ± 0,07	0,41 ± 0,11	0,47 ± 0,11			
∑ MUFA	21,49 ± 2,38	22,40 ± 1,97	20,01 ± 1,01	18,89 ± 0,97	16,38 ± 3,71	18,15 ± 2,95	a,ab,b		
16:2n-4	0,43 ± 0,11	0,33 ± 0,08	0,52 ± 0,01	0,33 ± 0,03	0,36 ± 0,14	0,56 ± 0,49			*
18:3n-4	0,36 ± 0,10	0,68 ± 0,02	0,34 ± 0,12	0,62 ± 0,15	0,28 ± 0,08	0,42 ± 0,16		*	
18:2n-6	2,09 ± 0,64	1,95 ± 0,17	2,25 ± 0,53	2,61 ± 0,96	2,31 ± 1,24	2,33 ± 0,87		*	
18:3n-6	2,27 ± 0,84	1,00 ± 0,24	2,42 ± 0,21	1,69 ± 0,35	2,49 ± 0,44	1,43 ± 0,30		*	
20:2n-6	0,95 ± 0,15	1,40 ± 0,27	0,96 ± 0,18	1,30 ± 0,04	0,94 ± 0,05	1,32 ± 0,20		*	
20:3n-6	1,63 ± 0,65	1,21 ± 0,22	1,80 ± 0,76	1,55 ± 0,70	2,57 ± 1,93	1,91 ± 1,21			
20:4n-6 (ARA)	7,92 ± 1,33	8,39 ± 1,59	8,05 ± 0,78	9,39 ± 1,19	7,59 ± 0,54	8,16 ± 0,41			
22:4n-6	5,56 ± 0,78	6,28 ± 0,93	4,74 ± 0,53	5,98 ± 0,33	4,41 ± 0,93	5,01 ± 0,08		*	
∑ n-6 PUFA	20,41 ± 3,93	20,22 ± 2,84	20,22 ± 1,80	22,52 ± 1,78	20,32 ± 0,41	20,16 ± 1,33			

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de *Oculina* sp. sometida a 3 temperaturas ambientales diferentes durante 2 tiempos (**continuación**)

	20°C		26°C		28°C		ANOVA 2 vías	Interact
	T1	T2	T1	T2	T1	T2		
18:3n-3	0,29 ± 0,12	0,46 ± 0,25	0,61 ± 0,28	0,43 ± 0,01	0,28 ± 0,11	0,41 ± 0,36		
18:4n-3	3,88 ± 1,19	2,88 ± 0,94	4,15 ± 0,25	3,75 ± 0,22	4,00 ± 1,24	3,45 ± 0,62		
20:4n-3	0,29 ± 0,04	nd	0,31 ± 0,10	0,26 ± 0,11	0,43 ± 0,17	0,45 ± 0,01		
20:5n-3 (EPA)	3,11 ± 0,38	3,63 ± 0,24	2,34 ± 0,05	2,89 ± 0,45	2,47 ± 0,98	3,39 ± 0,61	*	
21:5n-3	0,38 ± 0,22	0,34 ± 0,07	0,52 ± 0,11	0,44 ± 0,22	0,56 ± 0,31	0,42 ± 0,24		
22:5n-3	9,51 ± 2,53	9,39 ± 1,82	8,52 ± 0,36	8,66 ± 1,01	9,13 ± 3,67	8,88 ± 2,04		
22:6n-3 (DHA)	5,21 ± 0,22	3,32 ± 0,41	4,28 ± 0,72	2,93 ± 0,16	4,48 ± 0,76	3,04 ± 0,67	*	
∑ n-3 PUFA	22,67 ± 2,63	20,02 ± 2,21	20,73 ± 1,16	19,36 ± 1,40	21,35 ± 4,51	20,04 ± 2,83		
∑ n-3 LC-PUFA	18,27 ± 2,83	16,59 ± 1,81	15,80 ± 1,10	14,97 ± 1,33	16,97 ± 5,64	15,84 ± 3,51		
∑ PUFA	43,88 ± 1,87	41,26 ± 1,51	41,81 ± 1,30	42,83 ± 2,85	42,31 ± 4,01	41,18 ± 3,03		
n-3/n-6	1,14 ± 0,35	1,00 ± 0,24	1,03 ± 0,14	0,85 ± 0,04	1,04 ± 0,23	0,97 ± 0,14		
ARA/EPA	2,57 ± 0,54	2,30 ± 0,30	3,44 ± 0,32	3,34 ± 0,89	3,43 ± 1,38	2,48 ± 0,58		
DHA/EPA	1,70 ± 0,27	0,92 ± 0,13	1,83 ± 0,29	1,03 ± 0,21	1,92 ± 0,43	0,89 ± 0,05	*	
16:0 DMA	1,47 ± 0,38	1,63 ± 0,41	1,10 ± 0,11	1,39 ± 0,11	0,73 ± 0,25	0,95 ± 0,20	a,ab,b	
18:0 DMA	4,46 ± 0,25	5,09 ± 0,11	4,01 ± 0,40	5,19 ± 0,21	3,94 ± 0,61	5,39 ± 0,34	*	
∑ DMA	5,93 ± 2,00	6,72 ± 2,91	5,11 ± 0,51	6,58 ± 0,84	4,67 ± 0,29	6,34 ± 0,73	*	
∑ Desconocidos	2,37 ± 0,82	2,50 ± 1,14	1,78 ± 0,96	2,22 ± 0,68	1,41 ± 0,88	1,72 ± 0,98		

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (n=9). Las letras (a,b,c) indican diferencias significativas en el factor temperatura (p<0,05); *, indica diferencias significativas en el factor tiempo (p<0,05). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados (3 o más dobles enlaces); n-6, serie Omega-6; n-3, serie Omega-3; LC-PUFA, ácidos grasos polinsaturados de cadena larga (20 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces); DMA: dimetilacetales.

Es importante destacar las variaciones en los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie omega-3 (n-3 LC-PUFA) ya que participan de manera crítica en funciones fisiológicas como la reproducción, el crecimiento y la función neurológica (Arts et al., 2001; Arts & Kohler, 2009; Brenna et al., 2009; Parrish, 2013; Simopoulos, 2011). En concreto, el DHA y el EPA son sintetizados principalmente por el fitoplancton y consumidos por otros organismos acuáticos situados en eslabones superiores de la cadena alimentaria (Hixson et al., 2015; Kainz et al., 2004). Sin embargo, el fitoplancton, al igual que la mayoría de los organismos marinos, se adaptan a los cambios de temperatura modificando la estructura de sus membranas (D'Amico et al., 2006), disminuyendo los ácidos grasos insaturados como el DHA y EPA ante incrementos de temperatura. Este hecho representa una gran amenaza debido al aumento actual de la temperatura del océano y la prevista para el futuro, que provocará una disminución de la producción global de n-3 LC-PUFA en la cadena trófica marina (Lands, 2009; Hixson & Arts, 2016). La disminución de los niveles de DHA entre T1 y T2 puede que no sean debidos exclusivamente a la variación de la temperatura, ya que también disminuye en el tratamiento control, en el que la temperatura permanece constante (20°C T1-T2). Por tanto, es posible pensar que otros factores como la dieta pudieran estar influyendo en estas variaciones. Sin embargo, esta hipótesis necesita de estudios más detallados ya que los ejemplares recogidos del medio natural, mostraron valores de DHA inferiores a los que presentaron posteriormente los del tratamiento control a lo largo del experimento (3,12 vs. 5,21 y 3,32%) y, además, porque la dieta suministrada aportó escasos niveles de DHA (1,06% del total de AG; Tabla 2).

Otro de los factores a tener en cuenta para justificar las variaciones en las proporciones de DHA puede ser que *Oculina* sp. sea capaz de biosintetizarlo de forma endógena, y que su capacidad de síntesis se vea afectada a lo largo del experimento. Un estudio reciente realizado con invertebrados marinos, destaca la presencia de enzimas desaturasas de extremo metílico en cnidarios, sugiriendo por tanto que parte del contenido en n-3 LC-PUFA podría ser biosintetizado *de novo* (Monroig et al., 2022). Para la formación de DHA, existe una ruta directa por desaturación del 22:5n-3 mediante una $\Delta 4$ desaturasa. A su vez, la $\Delta 4$ desaturasa sería capaz de formar 22:5n-6 mediante la desaturación de 22:4n-6. Sin embargo, en el perfil de *Oculina* sp. encontramos altos valores de 22:4n-6 pero no se ha detectado 22:5n-6, lo que apoyaría la preferencia de esta enzima por la serie n-3 como ha sido descrito previamente para otras especies (Tocher, 2003). Sería interesante, por tanto, llevar a cabo investigaciones

adicionales para clarificar el factor o factores que pueden estar influenciando en las variaciones de DHA de *Oculina* sp.

Hay que resaltar las altas cantidades de ARA (7,5 - 9,4% del total de AG), y de DPA, (8,5 - 9,5%) encontradas en los individuos salvajes. El ARA destaca en la regulación de procesos de inflamación y en la producción y viabilidad de células reproductivas en vertebrados (Zhaolai et al., 2015). Sin embargo, el DPA es un n-3 LC-PUFA que no ha tenido tanto protagonismo en las investigaciones lipídicas como EPA y DHA. Los escasos estudios realizados han evidenciado su funcionalidad biológica única y diferente frente al EPA o DHA. Resaltar su papel en el control de la respuesta de cicatrización de heridas de los vasos sanguíneos o como potente factor antiaterogénico (Kaur et al., 2011). Además, muestra un notable efecto inhibitorio sobre la angiogénesis debido a la supresión de la expresión de ciertos genes. Dado su destacado papel en vertebrados, cabe la posibilidad de que dicho AG cumpla una función relevante también en invertebrados.

Es importante destacar que el 18:4n-3, considerado AG indicador de zooxantelas (Imbs et al., 2010), tiende a disminuir a lo largo del ensayo, independientemente del tratamiento experimental. Esto respalda la hipótesis planteada anteriormente con respecto a la proporción de ceniza de los ejemplares experimentales, sugiriendo que haya podido producirse una pérdida progresiva de zooxantelas, que pudiera haber sido causada por otros factores ambientales distintos de la temperatura como la salinidad o la intensidad lumínica entre otros.

6. Conclusiones

1. Las colonias de *Oculina* sp. recolectadas del medio natural, presentaron una fracción inorgánica que representó más del 75% del peso de la colonia. La fracción lipídica, supuso en torno al 6% en peso seco de los pólipos, estando caracterizada por el alto contenido en ácido palmítico (16:0), ácido docosapentaenoico (22:5n-3) y ácido araquidónico (20:4n-6).
2. La fracción inorgánica de la colonia disminuyó a lo largo del experimento. Esta reducción parece no depender directamente de la temperatura de cultivo, sino que puede estar asociada a una pérdida progresiva de zooxantelas y/o a una menor disponibilidad de carbonato cálcico en los acuarios en comparación con el medio natural.
3. El aumento del contenido de SFAs en *Oculina* sp. ante el aumento de temperatura, seguido del aumento de MUFAs una vez restablecidas las condiciones iniciales de temperatura (20°C), evidencian la alta capacidad de adaptación de la membrana celular de esta especie bajo condiciones de estrés térmico.
4. La disminución de los niveles de DHA en T1 a 26°C y 28°C con respecto a los valores del tratamiento control (20°C) y al final del experimento independientemente de la temperatura de cultivo, confirman la esperada reducción de la producción de este importante ácido graso en la cadena trófica marina como consecuencia del calentamiento global.
5. Para próximos estudios se recomienda el registro de otros parámetros ambientales del agua como el pH, para valorar su posible influencia en la pérdida de carbonato cálcico de las colonias. Igualmente, se recomienda añadir tres puntos más de muestreo, uno después del periodo de aclimatación, otro justo después de la subida de temperatura y otro, al menos una semana después de la bajada de temperatura a su valor inicial.

6. Conclusions

1. The colonies of *Oculina* sp. collected from the natural environment, presented an inorganic fraction that represented more than 75% of the colony weight. The lipid fraction accounted for about 6% of the dry weight of the polyps, being characterized by a high content of palmitic acid (16:0), docosapentaenoic acid (22:5n-3) and arachidonic acid (20:4n-6).
2. The inorganic fraction of the colony decreased throughout the experiment. This reduction does not seem not to be directly dependent on the culture temperature, but to be associated

with a progressive loss of zooxanthellae and/or a lower availability of calcium carbonate in the aquaria compared to the natural environment.

3. The increase of SFAs content in *Oculina* sp. upon temperature increase, followed by the increase of MUFAs once the initial temperature conditions (20°C) were restored, evidences the high adaptive capacity of the cell membrane of this species under thermal stress conditions.
4. The decrease in DHA levels in T1 at 26°C and 28°C with respect to the values of the control treatment (20°C) and at the end of the experiment regardless of the culture temperature, confirm the expected reduction in the production of this important fatty acid in the marine trophic chain as a consequence of global warming.
5. For future studies, it is recommended to record other water environmental parameters such as pH, to evaluate their possible influence on the loss of calcium carbonate from the colonies. It is also recommended to add three more sampling points, one after the acclimatization period, another just after the temperature rise and another at least one week after the temperature drop to its initial value.

7. Bibliografía

- Arts, M. T., Ackman, R. G., & Holub, B. J. (2001). "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(1), 122–137. DOI:10.1139/cjfas-58-1-122
- Arts, M. T., & Kohler, C. C. (2009). Health and condition in fish: The influence of lipids on membrane competency and immune response. In *Lipids in Aquatic Ecosystems*. 237–256 pp. Springer New York. DOI:10.1007/978-0-387-89366-2_10
- Banin, E., Ben-Haim, Y., Israely, T., Loya, Y., & Rosenberg, E. (2000). Effect of the environment on the bacterial bleaching of corals. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123(1), 337–352. DOI:10.1023/A:1005274331988
- Banin, E., Khare, S. K., Naider, F., & Rosenberg, E. (2001). Proline-Rich Peptide from the Coral Pathogen *Vibrio shiloi* That Inhibits Photosynthesis of Zooxanthellae. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1536–1541. DOI:10.1128/AEM.67.4.1536-1541.2001
- Brenna, J. T., Salem, N., Sinclair, A. J., & Cunnane, S. C. (2009). α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 80(2–3), 85–91. DOI:10.1016/j.plefa.2009.01.004
- Brito, A., López, C., Ocaña, Ó., Herrera, R., Moro, L., Moterroso, Ó., Rodríguez, A., Clemente, S., & Sánchez, J. J. (2017). Colonización y expansión en Canarias de dos corales potencialmente invasores introducidos por las plataformas petrolíferas. *Vieraea*, 45, 65–82. DOI:10.31939/vieraea.2017.45.04
- Cohen, S., Krueger, T., & Fine, M. (2017). Measuring coral calcification under ocean acidification: methodological considerations for the 45 Ca-uptake and total alkalinity anomaly technique. *PeerJ*, 2017(9). DOI:10.7717/peerj.3749
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichet, T., Friedlingstein, P. U., Gao, X., & Gutowski Jr, W. J. (2013). Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility. *Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, 1(12), 1029-1136.
- Daly, M., Brugler, M. R., & Cartwright, P. (2006). The Phylum Cnidaria: A Review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus*. *Zootaxa*, 1668, 127–182. DOI:10.5281/zenodo.180149
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. *EMBO Reports*, 7(4), 385–389. DOI:10.1038/sj.embor.7400662
- De Angelis, D. G. (1908). Altri Zoantari del Terziario della Patagonia. *Anales del Museo Nacional de Buenos Aires*, 9, 93-102.
- Díaz-Almeyda, E., Thomé, P. E., Hafidi, M. El, & Iglesias-Prieto, R. (2011). Differential stability of photosynthetic membranes and fatty acid composition at elevated temperature in *Symbiodinium*. *Coral Reefs*, 30(1), 217–225. DOI:10.1007/s00338-010-0691-5
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., & Kleypas, J. A. (2009). Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science*, 1, 169–192. DOI:10.1146/annurev.marine.010908.163834
- Feely, R. A., Doney, S. C., & Cooley, S. R. (2009). Ocean acidification: Present conditions and future changes in a high-CO₂ world. *Oceanography Society*, 22(4), 36–47.
- Figueira, A., Paula, D., & Creed, J. C. (2004). Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: A case of accidental introduction. *Bulletin of Marine Science*, 74(1), 175-183. <https://www.researchgate.net/publication/233678013>
- Gattuso, J.-P., & Hansson, L. (2011). Ocean acidification: background and history. *Ocean Acidification*, 1(1) 1–20.
- Goreau, T., McClanahan, T., Hayes, R., & Strong, A. L. (2000). Conservation of coral reefs after the 1998 global bleaching event. *Conservation Biology*, 14(1), 5-15.
- Gravier CJ (1910) Madreporaires des îles San Thome et du Prince (Golfe de Guinée). *Annales de l'Institut Oceanographique*, 1(2),1–27
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. In *FEBS Letters* 580(23), 5477–5483. DOI:10.1016/j.febslet.2006.06.066

- Hixson, S. M., & Arts, M. T. (2016). Climate warming is predicted to reduce omega-3, long-chain, polyunsaturated fatty acid production in phytoplankton. *Global Change Biology*, 22(8), 2744–2755. DOI:10.1111/gcb.13295
- Hixson, S. M., Sharma, B., Kainz, M. J., Wacker, A., & Arts, M. T. (2015). Production, distribution, and abundance of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids: a fundamental dichotomy between freshwater and terrestrial ecosystems. *Environmental Reviews*, 23(4), 414–424 DOI:10.1139/er-2015-0029
- Imbs, A.B., Dembitsky, V. M. (2023). Coral lipids. *Marine Drugs* 21(10), 539. DOI:10.3390/md21100539
- Imbs, A. B., Ermolenko, E. V., Grigorochuk, V. P., & Dang, L. T. P. (2021). Seasonal variation in the lipidome of two species of *Millepora* hydrocorals from Vietnam coastal waters (the South China Sea). *Coral Reefs*, 40(3), 719–734. DOI:10.1007/s00338-021-02073-2
- Imbs, A. B., Latyshev, N. A., Dautova, T. N., & Latypov, Y. Y. (2010). Distribution of lipids and fatty acids in corals by their taxonomic position and presence of zooxanthellae. *Marine Ecology Progress Series*, 409, 65–75. DOI:10.3354/meps08622
- Kainz, M., Arts, M. T., & Mazumder, A. (2004). Essential fatty acids in the planktonic food web and their ecological role for higher trophic levels. *Limnology and Oceanography*, 49(5), 1784–1793. DOI:10.4319/lo.2004.49.5.1784
- Kaur, G., Cameron-Smith, D., Garg, M., & Sinclair, A. J. (2011). Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 28–34. DOI:10.1016/j.plipres.2010.07.004
- Kushmaro, A., Loya, Y., Fine, M., & Rosenberg, E. (1996). Bacterial infection and coral bleaching. *Nature*, 380, 396. DOI:10.1038/380396a0
- Lesser, M. P. (1997). Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs*, 16, 187–192.
- Leydet, K. E. (2016). Phylogeography of *Oculina* Corals and their Algal Symbionts: Insights into the Origin and Expansion of *Oculina patagonica* in the Mediterranean. [LSU Doctoral Dissertations] 118 pp. https://repository.lsu.edu/gradschool_dissertations
- López, C., Clemente, S., Moreno, S., Ocaña, O., Herrera, R., Moro, L., Monterroso, O., Rodríguez, A., & Brito, A. (2019). Invasive *Tubastraea* spp. and *Oculina patagonica* and other introduced scleractinians corals in the Santa Cruz de Tenerife (Canary Islands) harbor: Ecology and potential risks. *Regional Studies in Marine Science*, 29. DOI:10.1016/j.rsma.2019.100713
- Marshall, A. T., & Clode, P. (2004). Calcification rate and the effect of temperature in a zooxanthellate and an azooxanthellate scleractinian reef coral. *Coral Reefs*, 23(2), 218–224. DOI:10.1007/s00338-004-0369-y
- Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Chen, Y., Goldfarb, L., & Gomis, M. I. (2021). *Working Group, I Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (V. Masson-Delmotte, P. Zhai, Y. Chen, L. Goldfarb, & M. I. Gomis, Eds.).
- Mills, E., Shechtman, K., Loya, Y., & Rosenberg, E. (2013). Bacteria appear to play important roles in both causing and preventing the bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *Marine Ecology Progress Series*, 489, 155–162. DOI:10.3354/meps10391
- Monroig, Shu-Chien, A. C., Kabeya, N., Tocher, D. R., & Castro, L. F. C. (2022). Desaturases and elongases involved in long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic animals: From genes to functions. *Progress in Lipid Research*, 86. DOI:10.1016/j.plipres.2022.101157
- Muscatine, L., R. McCloskey, L., & E. Marian, R. (1981). Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnology and Oceanography*, 26(4), 601–611. DOI:10.4319/lo.1981.26.4.0601
- Oku, H., Yamashiro, H., Onaga, K., Sakai, K., & Iwasaki, H. (2003). Seasonal changes in the content and composition of lipids in the coral *Goniastrea aspera*. *Coral Reefs*, 22, 83–85.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Mearns, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G. K., Rodgers, K. B., Yool, A. (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437(7059), 681–686. DOI:10.1038/nature04095

- Parmesan, C. (2006). Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. In *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 637–669. DOI:10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110100
- Parrish, C. C. (2013). Lipids in Marine Ecosystems. *ISRN Oceanography*, 2013, 1–16. DOI:10.5402/2013/604045
- Roemmich, D., John Gould, W., & Gilson, J. (2012). 135 years of global ocean warming between the Challenger expedition and the Argo Programme. *Nature Climate Change*, 2(6), 425–428. DOI:10.1038/nclimate1461
- Sabine, C., Heimann, M., Artaxo, P., & Bakker, D. C. E. (2004). Current Status and Past Trends of the Global Carbon Cycle. *The Global Carbon Cycle*, 1(2), 17–46. <https://www.researchgate.net/publication/42088533>
- Sabine, C. L., & Feely, R. A. (2007). The Oceanic Sink for Carbon Dioxide, *Science*, 305(5682), 367-371. DOI: 10.1126/science.1097403.
- Schwindt, E., López Gappa, J., Raffo, M. P., Tatián, M., Bortolus, A., Orensanz, J. M., Alonso, G., Diez, M. E., Doti, B., Genzano, G., Lagger, C., Lovrich, G., Piriz, M. L., Mendez, M. M., Savoya, V., & Sueiro, M. C. (2014). Marine fouling invasions in ports of Patagonia (Argentina) with implications for legislation and monitoring programs. *Marine Environmental Research*, 99, 60–68. DOI:10.1016/j.marenvres.2014.06.006
- Serrano, E., Coma, R., Ribes, M., Weitzmann, B., García, M., & Ballesteros, E. (2013). Rapid Northward Spread of a Zooxanthellate Coral Enhanced by Artificial Structures and Sea Warming in the Western Mediterranean. *PLoS ONE*, 8(1). DOI:10.1371/journal.pone.0052739
- Simopoulos, A. P. (2011). Evolutionary aspects of diet: The omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Molecular Neurobiology*, 44(2), 203–215. DOI:10.1007/s12035-010-8162-0
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107–184.
- Veron, J. E. N. (1995). Corals in Space & Time. The Biogeography & Evolution of the Scleractinia. *Geological Magazine*, 133(5), 634–634. DOI:10.1017/s0016756800008050
- Wada, H., Gombos, Z., & Murata, N. (1994). Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4273–4277. DOI:10.1073/pnas.91.10.4273
- Warner, M. E., Fitt, W. K., & Schmidt, G. W. (1999). Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8007-8012.
- Yamashiro, H., Oku, H., & Onaga, K. (2005). Effect of bleaching on lipid content and composition of Okinawan corals. *Fisheries Science*, 71, 448-45.
- Zhaolai Dai, Zhenlong Wu, Suqin Hang, Weiyun Zhu, Guoyao Wu. (2015). Amino acid metabolism in intestinal bacteria and its potential implications for mammalian reproduction, *Molecular Human Reproduction*, 21(5), 389–409, DOI:10.1093/molehr/gav003
- Zibrowius, H. (1980). *Oculina patagonica*, Scléactiniaire hermatypique introduit en Méditerranée. *Les Scléactiniaires de La Méditerranée et de l'Atlantique Nord-Oriental*, 11, 1–284.
- Zibrowius, H. (1992). Ongoing modification of the Mediterranean marine fauna and flora by establishment of exotic species, *Mésogée*, 51, 83-107.