



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Establecimiento del rango de respuestas basales del  
biomarcador LMS en *Donax trunculus*

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Evaluación y Seguimiento Ambiental de  
Ecosistemas Marinos y Costeros

AUTOR/A: Valles Vidal, Javier

Tutor/a: Falco Giaccaglia, Silvia Laura

Cotutor/a externo: Martínez Gómez, Concepción

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITÈCNICA SUPERIOR DE GANDIA

## “Establecimiento del rango de respuestas basales del biomarcador LMS en *Donax trunculus*”

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Evaluación y Seguimiento Ambiental de Ecosistemas Marinos y Costeros

*Autor/a:*

**Javier Vallés Vidal**

*Tutor/a:*

**Silvia Laura Falco Giaccaglia**

*Cotutor/a externo/a:*

**Concepción Martínez Gómez**

**GANDÍA, 2023/24**

## **Resumen:**

La tellina o coquina (*Donax trunculus*, Linnaeus, 1758) es un molusco bivalvo de la familia Donacidae que habita las zonas del submareal somero de los fondos arenosos del Mar Mediterráneo. A lo largo de estos años se ha producido un declive en las poblaciones de *Donax trunculus* en las costas mediterráneas españolas y se ha propuesto que las causas de este declive son debidas al calentamiento global, la contaminación ambiental y la sobrepesca.

La estabilidad de la membrana lisosomal (EML) es un indicador sensible al estado de salud de los organismos. Este TFM tiene como objetivo el establecimiento del rango de respuestas basales del biomarcador EML en una especie bentónica como *D. trunculus* mediante el ensayo de retención de rojo neutro (RNN) que es un método citoquímico in vivo basado en la permeabilidad de la membrana lisosomal.

Se investigó la EML en *D. trunculus* después de la exposición durante 21 días a nueve condiciones combinadas de temperatura del agua (12, 20 y 28°C) y rangos de salinidad (27-28, 32-33, 37-38), propia del Mar Mediterráneo. Para evaluar los resultados de EML de los organismos ensayados se usaron los criterios de evaluación de antecedentes (BAC) y ambientales (EAC).

Los resultados indican un bajo rango de tolerancia de la especie a temperaturas de 28°C, con un TRRN < 50 min y una mortalidad del 100% a un rango de salinidad bajo (27-28). Además, se han encontrado diferencias significativas tanto en la estabilidad de la membrana lisosomal como en el índice de condición en función de los grupos de salinidad.

**Palabras clave:** *D. trunculus*, rojo neutro, biomarcador, salinidad, temperatura

**Abstract:**

The wedge clam (*Donax trunculus*, Linnaeus, 1758) is a bivalve mollusk of the Donacidae family that inhabits the shallow subtidal zones of sandy bottoms. Throughout these years there has been a decline in the populations of *Donax trunculus* on the Spanish Mediterranean coasts and it has been proposed that the causes of this decline are due to global warming, environmental pollution and overfishing.

Lysosomal membrane stability (LMS) is a sensitive indicator of the health status of organisms. This TFM aims to establish the range of basal responses of the EML biomarker in a benthic species such as *D. trunculus* using the neutral red retention (RNN) assay, which is an in vivo cytochemical method based on the permeability of the lysosomal membrane.

LMS was investigated in *D. trunculus* after exposure for 21 days to nine combined conditions of water temperature (12, 20 and 28°C) and salinity ranges (27-28, 32-33, 37-38), typical of the Mediterranean Sea. To evaluate the LMS results of the tested organisms, the background evaluation criteria (BAC) and environmental evaluation criteria (EAC) were used.

The results indicate a low tolerance range of the species at temperatures of 28°C, with a TRRN < 50 min and a mortality of 100% at a low salinity range (27-28). Furthermore, significant differences have been found both in the lysosomal membrane stability and in the condition index depending on the salinity groups.

**Key words:** *D. trunculus*, neutral red, biomarker, salinity, temperature.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 ECOLOGÍA DE LA ESPECIE .....	1
1.2 CICLO REPRODUCTIVO .....	3
1.3 SISTEMA INMUNITARIO .....	5
1.4 SITUACIÓN ACTUAL .....	6
1.5 BIOINDICADORES Y BIOMARCADORES .....	8
1.5.1 <i>Rojo neutro y estabilidad de la membrana lisosomal</i> .....	9
1.6 ÍNDICE DE CONDICIÓN .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1 MUESTREO Y DISEÑO DEL EXPERIMENTO .....	14
3.2 MANTENIMIENTO Y CONTROL DE LOS INDIVIDUOS EN LOS ACUARIOS. ....	17
3.2.1 <i>Determinación de las variables ambientales.</i> .....	17
3.2.2 <i>Alimentación</i> .....	18
3.3 ENSAYO DE RETENCIÓN DE ROJO NEUTRO.....	19
3.3.1 <i>Equipos, reactivos y soluciones.</i> .....	20
3.3.2 <i>Extracción de hemolinfa e incubación de rojo neutro.</i> .....	21
3.3.3 <i>Determinación del tiempo de retención de rojo neutro</i> .....	27
3.3.4 <i>Determinación del porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal.</i> ...	27
3.4 CÁLCULO DEL ÍNDICE DE CONDICIÓN.....	28
3.5 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y ESTADÍSTICA .....	31
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
4.1 VARIABLES AMBIENTALES.....	33
4.2 ENSAYO DE RETENCIÓN DE ROJO NEUTRO .....	35
4.3 ÍNDICE DE CONDICIÓN.....	40
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>44</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

*Figura 1.1 Distribución de D. trunculus. Fuente: Google earth y edición propia*

*Figura 1.2 Detalle del exterior e interior de las valvas. Fuente: Jorge C. Tamayo Goya*

*Figura 1.3 Anatomía interna. Fuente: Jorge C. Tamayo Goya*

*Figura 1.4 Ciclo reproductivo de bivalvos. Fuente: SEMARNAT (2022).*

*Figura 1.5 Hemocitos granulares de D. trunculus, con lisosomas teñidos de Rojo Neutro. Fuente propia*

*Figura 3.1 Localización del punto de muestro de la playa del Ahuir en Gandía (Valencia). Fuente: Visor cartogràfic valencià.*

*Figura 3.2 Muestreo de D. trunculus en la playa de l'Ahuir (Gandía) con el rastrillo.*

*Figura 3.3 Representación del experimento a una temperatura. Los números representan el acuario, y las letras la salinidad a la que se encuentran, N: normal, I: intermedia, B: baja. En la figura se observa los filtros de color verde para cada uno de los acuarios.*

*Figura 3.4 Filtro exterior de la marca EHEIM*

*Figura 3.5 Instrumentos de medida usados para evaluar las variables ambientales. A la izquierda, la sonda óptica proODO YSI, a la derecha la sonda WTW 3320*

*Figura 3.6 Cultivo de la microalga I. galbana a distintas salinidades para la alimentación de D. trunculus dependiendo del tratamiento.*

*Figura 3.7 Equipos utilizados. Izquierda: cámara de incubación. Derecha: microscopio OLYMPUS.*

*Figura 3.8. Se muestra el lugar por donde se separaron las valvas para realizar la extracción de hemolinfa*

*Figura 3.9. Preparación de los portaobjetos rotulados.*

*Figura 3.10. Extracción de hemolinfa con la jeringa.*

*Figura 3.11. Pipeteo de la muestra de hemolinfa en los portaobjetos que se encuentran en las cámaras de incubación.*

*Figura 3.12. Drenaje del exceso de la muestra antes y después de la adición de la solución de trabajo de RN.*

*Figura 3.13. Ilustración de granulocitos de tellina que muestran diferentes patologías asociadas a una puntuación. SCORE 0: sin patología; SCORE 1: agrandamiento lisosomal; SCORE 2: difusión del RN del lisosoma al citosol; SCORE 3: agrandamiento lisosomal y difusión.*

*Figura 3.14. Tellinas abiertas y escurriendo en papel.*

*Figura 3.15. Báscula de precisión con bandeja donde se pesaban los organismos*

*Figura 3.16. Carne húmeda de las tellinas en los crisoles*

*Figura 3.17. Crisoles con carne seca de las tellinas en el desecador*

Figura 3.18. La estabilidad de la membrana lisosomal (medida como tiempo de retención de rojo neutro) disminuye a medida que el organismo está estresado (Martínez-Gómez y col., 2015).

Figura 4.1. Ensayo de RRN expresado gráficamente como media junto a su error estándar. En el gráfico (a) se observa el TRRN en minutos junto con los criterios BAC y EAC establecidos a 120' y 50' respectivamente. En el gráfico (b) se observa el porcentaje de EML para los distintos grupos de salinidad y temperatura.

Figura 4.2. Índice de condición expresado gráficamente como media  $\pm$  EE.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Ciclo gonádico de bivalvos. Fuente: adaptación propia de SEMARNAT, 2022.

Tabla 1.2. Ciclo gonádico de la especie *D. trunculus*. Fuente: adaptación propia de Gaspar y col., 1999.

Tabla 1.3. Fórmulas planteadas para el cálculo del Índice de condición para bivalvos. Fuente: Zeng y Yang, 2020.

Tabla 3.1. Relación entre las fechas de muestreo y el tratamiento que se va a llevar a cabo.

Tabla 3.2. Planteamiento del experimento en nueve tratamientos

Tabla 3.3. Ejemplo de hoja informativa sobre los resultados del ensayo de retención de rojo neutro (Martínez-Gómez col., 2015)

Tabla 3.4. Descripción de las patologías asociadas a la puntuación usada

Tabla 4.1. Resultados de las variables ambientales de los acuarios durante los 21 días de experimento expresado en media  $\pm$  error estándar (EE) T: temperatura, S: salinidad, OD: oxígeno disuelto (mg/L), OD sat: saturación de oxígeno, M: tasa de mortalidad (%).

Tabla 4.2. Ensayo de RRN expresado como media  $\pm$  error estándar. N: número de individuos. Talla: talla media  $\pm$  EE (milímetros). TRRN: tiempo de retención de rojo neutro (minutos). %EML: porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (%).

Tabla 4.3. Ensayo de RRN y diferencias significativas entre grupos de salinidades.

Tabla 4.4. Análisis del IC de los organismos de *D. trunculus* expresado como media  $\pm$  EE y las diferencias significativas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Ecología de la especie

*Donax trunculus* Linnaeus, 1758 es una especie de molusco bivalvo de la familia Donacidae típico de los climas templados cálidos del Atlántico y Mediterráneo (Tebble, 1966) (figura 1.1), se distribuye por todo el mar Mediterráneo, el mar Negro (Bayed y Guillou, 1985), el mar de Mármara (Deval, 2009) y en el océano Atlántico se encuentra desde las costas de Francia hasta Senegal (Bayed y Guillou 1985, Reyes-Martínez y col., 2015).



Figura 1.1. Distribución de *D. trunculus*. Fuente: Google earth y edición propia

Esta especie habita en las zonas de alta energía de las playas arenosas desde la orilla hasta los 20 metros de profundidad, siendo entre 0 y 6 metros de profundidad en el Atlántico y entre 0 a 2 metros de profundidad en el Mediterráneo su aparición más común (Gaspar y col., 1999, La Valle y col., 2011). Esta especie presenta una distribución batimétrica diferenciada en la que los juveniles aparecen en áreas menos profundas y los especímenes adultos se encuentran a mayores profundidades (Gaspar y col., 2002, Reyes-Martínez y col., 2020). Las posibles explicaciones de esta variación en la distribución se refieren a estrategias para evitar la competencia intraespecífica (Ansell y Lagardère, 1980), así como a las influencias actuales e hidrodinámicas, ya que las larvas se desplazan pasivamente a áreas menos profundas (Gaspar et al., 2002).

*D. trunculus* (conocida también como tellina en la Comunidad Valenciana) es un componente importante de la macrofauna de las zonas someras de playas arenosas (Ansell, 1983) donde viven enterradas filtrando fitoplancton y materia orgánica particulada en suspensión (Wade, 1967). La tellina es una buena filtradora que puede alimentarse de fitoplancton, detritos de plantas y materiales resultantes de la muerte de fitoplancton y bacterias, si bien tiene una mayor eficacia de asimilación con una dieta basada en microalgas (McLachlan y Defeo, 2018). Este comportamiento alimentario determina la distribución vertical de este taxón, que normalmente vive en la zona de lavado de playas y fondos arenosos poco profundos, donde las condiciones eutróficas resultan en altos niveles de producción de fitoplancton (Ansell, 1983).

En cuanto a su anatomía externa (figura 1.2) es una especie inequilátera y ligeramente inequivalva siendo la valva derecha un poco más pequeña. Son sólidas y cuneiformes. Presenta una superficie brillante y lisa con coloración exterior variable con bandas concéntricas de diversos colores y tonalidades; el interior es de color blanco con áreas violáceas (Tamayo, 2016).

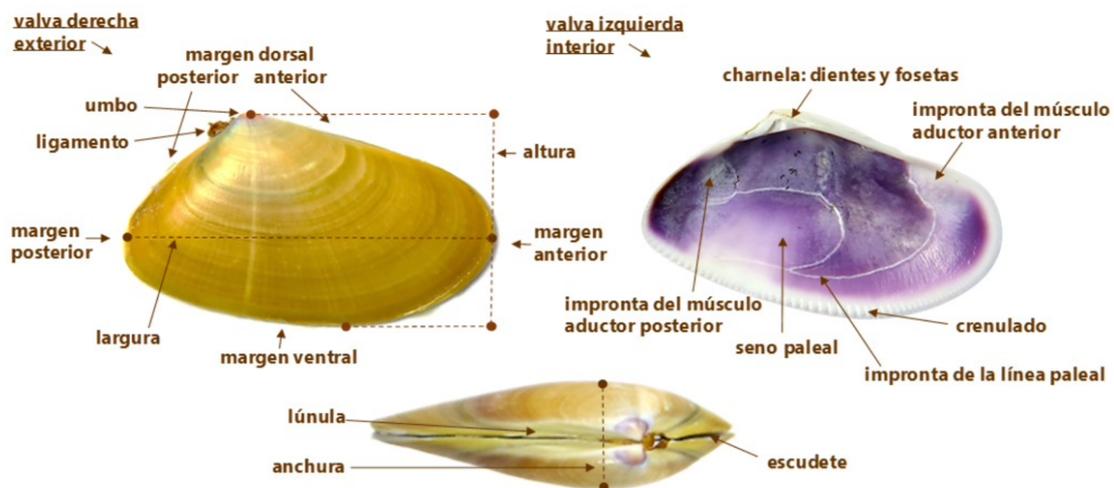


Figura 1.2. Detalle del exterior e interior de las valvas. Fuente: Jorge C. Tamayo Goya

La concha es una estructura de una importancia adaptativa esencial para la defensa del animal que además sirve como anclaje y soporte de las partes blandas. Está compuesta principalmente por carbonato cálcico, que en el manto es transformado en cristales en forma de aragonito y calcita y depositado en las valvas de manera concéntrica formando capas (Tamayo, 2016).

En cuanto a la anatomía interna (figura 1.3) de *D. trunculus*, el cuerpo es de estructura simétrica bilateral, compuesto por el manto y la cavidad paleal. La cavidad o seno paleal es redondeado y profundo, es el lugar de acumulación de agua del organismo, donde se encuentran los músculos retractores y el pie escondido. El manto es una fina membrana carnosa en el interior de ambas valvas que recubre las partes blandas del organismo, los órganos vitales, es una formación tegumentaria (epitelio y tejido conjuntivo) que unida en ciertas partes a la masa visceral juega un papel fundamental en la locomoción y alimentación del organismo (Tamayo, 2016).

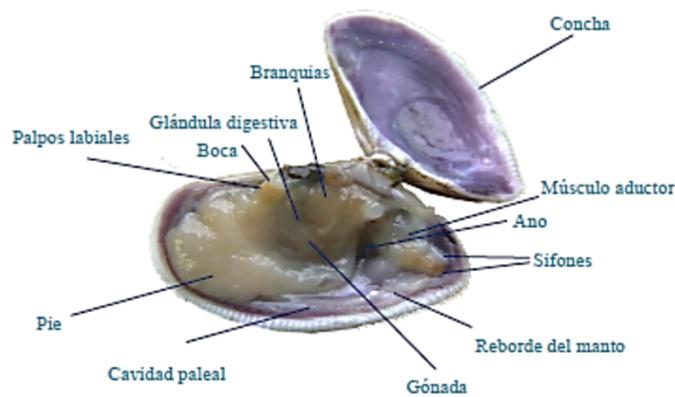


Figura 1.3. Anatomía interna. Fuente: Jorge C. Tamayo Goya

## 1.2 Ciclo reproductivo

Las tellinas presentan sexos separados (machos y hembras) y como son bivalvos se reproducen externa y sexualmente, es decir, que las células sexuales, como son los óvulos y los espermatozoides, son liberados al medio marino para ser fecundados y formar un cigoto, que posteriormente se transformará en una larva velíger (figura 1.4) (SEMARNAT, 2022, García, 2016).

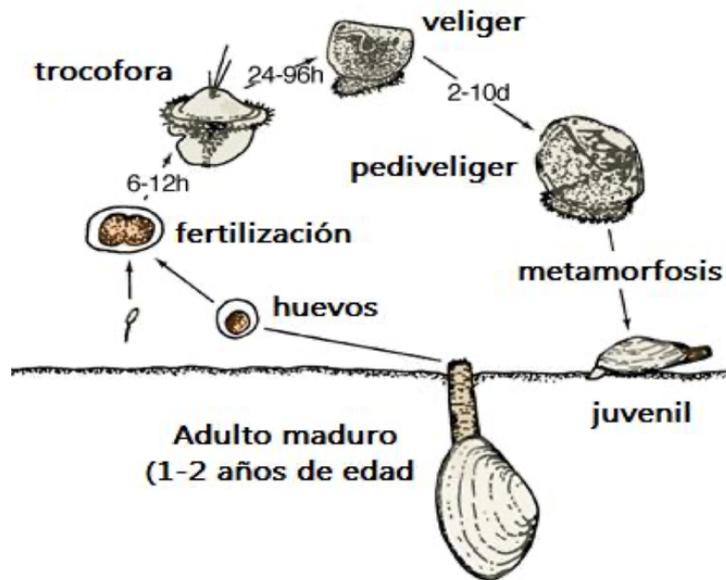


Figura 1.4. Ciclo reproductivo de bivalvos. Fuente: SEMARNAT (2022).

El ciclo gonádico (tabla 1.1) de bivalvos se compone de 5 estadios: la gametogénesis temprana, en la cual se presentan pequeños ovocitos en formación adheridos a la pared del folículo, se inicia en el mes de febrero prologándose hasta mes de junio. Gametogénesis tardía, con ovocitos bien redondeados con núcleo bien definido, pero todavía adherido a las paredes del folículo, presentándose de mayo a junio. Madurez, donde la mayoría de los ovocitos están bien desarrollados y libres de folículo desde junio hasta septiembre. Desove, los folículos vacíos de ovocitos maduros desde septiembre a octubre. Estado inactivo, con folículos vacíos, pero con ovocitos residuales que se reabsorben de diciembre a febrero (SEMARNAT, 2022).

Tabla 1.1 Ciclo gonádico de bivalvos. Fuente: adaptación propia de SEMARNAT, 2022.

Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero
Gametogénesis temprana				Gametogénesis tardía		Madurez		Desove		Estadio inactivo	

Se estima que el desove y la fecundación en todos los bivalvos puede ocurrir en cualquier momento, aunque generalmente se ha observado en los meses de junio a septiembre (SEMARNAT, 2022) y que una vez se ha formado el cigoto, empieza la fase larval, la cual tiene un período de 3 semanas aproximadamente, y según los estudios de Shaw y Hassler (1989) indican que las larvas tienen una alta relación peso/volumen, con flotabilidad negativa, permaneciendo cerca del fondo la mayor parte del tiempo. Luego las larvas sufren metamorfosis, se van al fondo y se adhieren a los granos de arena por medio del biso, dando lugar a un espécimen juvenil.

Sin embargo, en *D. trunculus* el ciclo gonádico (tabla 1.2) no suele variar en la distribución de toda la especie, es decir, que no hay diferencias en el ciclo gonádico entre los individuos que habitan en diferentes partes del mundo, pero sí se observa una diferencia con el ciclo general de bivalvos respecto a la época en la que ocurre el estadio. El ciclo gametogénico en *D. trunculus* comienza a finales de noviembre y el desove ocurre entre finales de marzo y finales de agosto (Gaspar y col., 1999).

Tabla 1.2. Ciclo gonádico de la especie *D. trunculus*. Fuente: adaptación propia de Gaspar y col., 1999.

Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Gametogénesis				Madurez	Desove						Inactivo

El desarrollo gametogénico de esta especie indicó una actividad de desove continua. La presencia de gametos en todas las etapas de madurez indica la ocurrencia de desoves individuales sucesivos. Esto también puede indicar la existencia de un mecanismo endógeno que retrasa el desarrollo de algunos gametos (Gaspar y col., 1999). De este modo, se plantea que existe una estrategia adaptativa en la especie que consiste en alargar la fase de desove con dos periodos masivos de liberación de gametos entre abril y septiembre (Ansell, 1983).

### 1.3 Sistema inmunitario

El sistema inmunitario de los bivalvos es un tema de estudio muy frecuente en los últimos años debido a un aumento de varias epidemias que está causando la muerte y, por tanto, afectando a la supervivencia de las poblaciones de bivalvos (Rodríguez de la Ballina, 2018). Esta pérdida de supervivencia es debido a epidemias causadas por virus, bacterias y parásitos puede llegar a ser preocupante para la acuicultura, causando en ocasiones grandes pérdidas (Gestal y col., 2008).

Sin embargo, los bivalvos son únicos en términos de gestión sanitaria. Existen pocas herramientas para controlar y reducir el impacto de los agentes patógenos. Los moluscos son invertebrados que carecen de una respuesta inmune específica y de memoria inmunológica y, por lo tanto, dependen totalmente de su sistema inmunológico innato para superar las enfermedades (Gestal y col., 2008).

El sistema inmune de los bivalvos es innato basado en un sistema no adquirido de reacciones inmunes, a diferencia de los vertebrados que tienen un sistema inmune adaptativo (Loker y col., 2004). Las barreras externas físico-químicas que poseen estos organismos tales como conchas, mucus con enzimas dotados de actividad bactericida y el epitelio, constituyen la primera línea defensiva contra patógenos y parásitos; y una vez superada esta barrera entra en juego el sistema de defensa interno.

El sistema inmune innato, conservado en el reino animal y característico de los bivalvos, es mediado por componentes celulares llamados hemocitos, los cuales presentan gran cantidad de lisosomas. Los lisosomas son orgánulos citoplasmáticos de membrana única que contienen más de 40 clases diferentes de enzimas hidrolíticas (como proteasas, nucleasas, lipasas, etc.) con actividades óptimas a un pH ácido. Estas enzimas son capaces de hidrolizar esencialmente todas las moléculas biológicas, desde proteínas y ácidos nucleicos y nucleótidos hasta azúcares y lípidos complejos. Las funciones de los lisosomas pueden llegar a ser muy diversas, sin embargo, todos los lisosomas participan en la degradación del material absorbido por la célula mediante endocitosis (Moore, 1985; Viarengo, 1989; Mason, 1996). Además, también participan en la reparación de las valvas, la digestión intracelular, la excreción y la cicatrización de heridas (Matozzo y col., 2007).

Los bivalvos tienen un sistema circulatorio semiabierto, y los hemocitos están presentes en la hemolinfa, la cual es responsable de la defensa del organismo. Se ha demostrado que cambios en las condiciones ambientales afectan a los hemocitos en el número, tipo y capacidad defensiva (Novoa y col., 2007). Los hemocitos encontrados en bivalvos se clasifican en dos tipos: granulocitos y hialinocitos, no obstante, no todas las especies de bivalvos presentan estos dos tipos. Ambos tipos de células presentan enzimas digestivas y actividad fagocítica, sin embargo, los granulocitos cuentan con gran cantidad de gránulos en el citoplasma (lisosomas) y los hialinocitos tienen escasos o inexistentes gránulos (Matozzo y col., 2007).

Dado que el sistema inmune de *D. trunculus* se rige como el de cualquier bivalvo, mediante la funcionalidad y actividad de los hemocitos, estudiar este tipo de células nos puede proporcionar gran información sobre el bienestar y la capacidad de supervivencia de esta especie (Munari y col., 2019).

#### 1.4 Situación actual

En cuanto a la pesca, las técnicas que se llevaban a cabo se basaban en la utilización de dragas tiradas por mariscadores a pie en las zonas menos profundas debido a su distribución somera, y en aguas más profundas se utilizaban cuatro dragas remolcadas por pequeñas embarcaciones de pesca artesanal (Ramón, 1993). Durante muchos años las tellinas han representado parte de un grupo importante de la alimentación y economía de los habitantes de las zonas costeras de todo el mundo, y de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) para el año 2010 representó el 23.6% del valor total de la producción pesquera mundial.

Aunque la pesca es una actividad estrictamente regulada, está sufriendo una crisis ya que las zonas habilitadas de pesca están sometidas a una fuerte explotación, lo que sugiere que existe una mala gestión (Santos-Martín y col., 2015). La FAO (2016) estimó que, en 2013, el 31,4% de las poblaciones marinas del mundo estaban sobreexplotadas. En el caso del Mediterráneo y el Mar Negro, el 59 % de las poblaciones fueron explotadas de forma insostenible. Asimismo, se estimó que el 60 % de las zonas de pesca españolas han podido llegar a colapsar (Santos-Martín y col., 2015).

En la Comunidad Valenciana, la captura de estos bivalvos está regulada por unas capturas máximas anuales y diarias, así como el tamaño mínimo comercial (14 mm) y también por el establecimiento de zonas de pesca, horarios y características específicas de las artes de pesca (GVA, 2016). Debido a estas limitaciones se produjo una drástica disminución de las capturas que llevó al cierre de este tipo de pesquerías a principios de junio del 2015 (Resolució de la Comunitat Valenciana del 3 de juny, 2015).

Respecto a la contaminación, las zonas costeras y estuarinas están en riesgo debido al estrés creciente causado por actividades antropogénicas como la urbanización, la agricultura intensiva y el turismo de masas. Por lo tanto, las mezclas complejas de contaminantes presentes en estas zonas son a menudo los principales factores responsables de la degradación de la calidad del agua (Tlili y col., 2011).

Un punto importante en la contaminación es la fertilización nitrogenada que se usa en agricultura cítrica que puede contaminar aguas subterráneas que finalmente vierten a las zonas costeras (Ramos y col., 2002). Al igual que cualquier actividad antropogénica que tenga relación con las zonas costeras, como es la urbanización, dragados, los vertidos no tratados o cualquier modificación de esta puede llegar a afectar a la biocenosis y, por tanto, tener consecuencias graves en la red trófica que acaben perjudicando las comunidades de *D. trunculus* (Escrivá, 2020).

Actualmente, según los estudios de Escrivá (2020) de las poblaciones de *D. trunculus* en el 2017 se observó una clara disminución de la población con respecto al 2015, por lo que las limitaciones y el cierre de la pesquería no resolvió la disminución de la población. En cuanto a la variación de las variables ambientales del agua con respecto a la profundidad y distribución, la variable salinidad no afecta a la distribución de la especie, pero variables como la temperatura, los nutrientes, la granulometría y el detritus (partículas en suspensión) afectan a la distribución espacial de la fauna en función de la profundidad. Por lo que es necesario remarcar la necesidad de llevar un seguimiento de las poblaciones naturales de *D. trunculus* para establecer un plan de gestión adaptativa.

### 1.5 Bioindicadores y biomarcadores

La contaminación de origen antropogénico que se está produciendo en nuestro planeta está afectando gravemente a las poblaciones naturales, por lo que es necesario el estudio y seguimiento para detectar los impactos más graves que se producen sobre las especies con el fin de lograr una mejor gestión de los ecosistemas. Por esta razón, en el campo de la toxicología ambiental es muy popular el enfoque de biomarcadores para su uso en el monitoreo y evaluación de riesgos ecológicos.

En ecotoxicología, los bioindicadores son organismos o comunidades de organismos que son sensibles a los cambios que en su medio se presentan y que son capaces de ofrecer información sobre estos, suelen responder a la contaminación ambiental mediante modificaciones en la apariencia o acumulación de contaminantes. Esta capacidad depende de los factores genéticos, del propio desarrollo del organismo y de las condiciones ambientales donde habite (Capó-Martí, 2007, Markert y col., 2013).

En numerosos estudios de toxicología ambiental es común que se utilicen especies bioindicadoras para evaluar la calidad ambiental del hábitat, con un enfoque especial en aquellos hábitats afectados por la actividad antropogénica (Moschino y Da Ros, 2016). Desde la década de los 90, se empiezan a desarrollar numerosas herramientas en especies bioindicadoras para detectar de manera temprana efectos negativos que puedan afectar a niveles superiores de carácter generalmente bioquímico o genético, recibiendo el nombre de biomarcador (Corella y Ordovás, 2015).

Un biomarcador, por tanto, es una variación inducida xenobióticamente en componentes o procesos, estructuras o funciones celulares o bioquímicos que se puede medir en un sistema o en una muestra biológica (McCarty y col., 2002), pero definiciones más recientes explican que un biomarcador es una característica que se puede medir objetivamente en distintas muestras biológicas y que puede evaluarse como indicador de exposiciones, de procesos biológicos normales o patogénicos (Corella y Ordovás, 2015). Sin embargo, como indicadores cualitativos de la exposición, los biomarcadores tienen una utilidad limitada porque la exposición a menudo puede inferirse de fuentes de información distintas de las costosas fuentes científicas (Galdies y col., 1999).

Siguiendo este contexto, es importante la utilidad de los moluscos bivalvos como especies bioindicadoras (Tili y col., 2011; Reyes-Martínez y col., 2020; Escrivá, 2020) para evaluar la calidad de las aguas de las zonas someras, encontrando como principal especie de bivalvo, la ostra, siendo la más utilizada, y el mejillón como segundo más usado debido a la distribución geográfica y sus características ecológicas y fisiológicas (bioacumuladores, suspensívoros y sésiles) lo que les permite acumular de manera significativa pequeñas cantidades de partículas de la columna de agua en sus tejidos (Brock, 1993).

En el presente trabajo se usa *D. trunculus* al igual que en otros trabajos, como especie centinela para la contaminación en ecosistemas de playas arenosas (Tili y col., 2011; Tili y col., 2019), y dadas sus características vitales (suspensívoro, bioacumulador y sedentario) se le considera un buen bioindicador de la contaminación (Julián, 2015), ya que es una especie que se encuentra expuesta a condiciones ambientales cambiantes debido a las fluctuaciones del ambiente en la que se encuentra (Escrivá, 2020).

#### 1.5.1 Rojo neutro y estabilidad de la membrana lisosomal

La rápida acción de las sustancias químicas tóxicas a nivel molecular y celular hace que los biomarcadores sean capaces de proporcionar una alerta temprana sobre efectos contaminantes a largo plazo. Por lo tanto, las respuestas tempranas y las alteraciones prepatológicas pueden detectarse antes de que se produzcan otras perturbaciones, como enfermedades, mortalidad o cambios poblacionales (Koukouzika y Dimitriadis, 2005).

En moluscos marinos, la prueba de estabilidad de la membrana lisosomal (EML) del inglés Lysosomal Membrane Stability (LMS) estima diferencias en la permeabilidad de

la membrana lisosomal, este biomarcador ha sido bien establecido como uno de los más confiables de los biomarcadores recomendados en la evaluación de la calidad del agua (UNEP, 1997). La EML se ha aplicado en numerosos estudios de campo y laboratorio aplicados a poblaciones de mejillones (Domouhtsidou y Dimitriadis, 2001, Harrison y Berger, 1982). Se ha desarrollado un método citoquímico in vivo para evaluar la EML avalado para mejillones que tiene en cuenta los lisosomas debido a que son orgánulos citoplasmáticos de membrana única cuya condición es sensible al estrés, ya sea debido a condiciones ambientales o a la exposición a una amplia gama de contaminantes (Martínez-Gómez y col., 2015).

En el presente trabajo se pretende estudiar la estabilidad de la membrana lisosomal en hemocitos granulares de *D. trunculus*, ya que son células ricas en lisosomas (figura 5), y para ello se utiliza el ensayo de retención de rojo neutro (Neutral Red Retention, NRR) que es una técnica aplicada para monitorear las alteraciones en la permeabilidad de la membrana lisosomal causadas por contaminantes ambientales (Hauton y col., 1998). La retención, por parte de la bomba de protones, del color rojo neutro dentro del compartimento lisosomal a lo largo del tiempo se determina como una medida del daño a la membrana lisosomal (Hauton y col., 1998). La utilidad de la prueba NRR para el monitoreo ambiental es evidente a partir de estudios previos (Fernley y col., 2000) y la técnica se ha establecido como un indicador sensible para simplificar el período de exposición a contaminantes (Koukouzika y Dimitriadis, 2005).

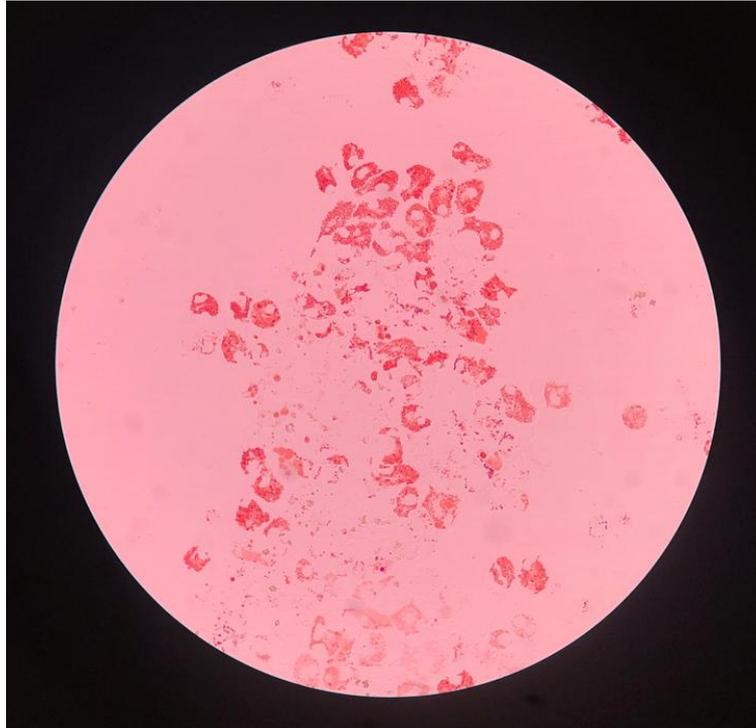


Figura 1.5. Hemocitos granulares de *D. trunculus*, con lisosomas teñidos de Rojo Neutro. Fuente propia

Sin embargo, la utilidad de este biomarcador en *D. trunculus* tiene que apoyarse en el conocimiento de cómo responde a factores bióticos extrínsecos, abióticos e intrínsecos. Esto se debe al hecho de que la EML es un indicador diagnóstico robusto del estado de salud individual en bivalvos, pero también se ve afectado por factores no contaminantes, como la temperatura, la hipoxia prolongada, la salinidad, la privación de alimento o la fase final de la gametogénesis (Moore, 2012). Por lo tanto, el uso del EML para monitorizar los impactos de la contaminación química ambiental en esta especie debe implicar conocer la respuesta del biomarcador EML a la variabilidad de temperatura y salinidad a la que esta especie pueden estar sometida en su hábitat, ya que pueden actuar como factores confundidores (“confounding factors”) en la evaluación de la respuesta del biomarcador.

#### 1.6 Índice de condición

Para todas las mediciones de efectos biológicos dentro del Programa de Monitoreo de la Comisión Oslo-París (OSPAR), existe el requisito de informar los parámetros biológicos de respaldo (Hansson y col., 2017). Estos parámetros se usarán para demostrar que el material investigado es homogéneo y no se ve confundido por más variación de la necesaria. En este trabajo, para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos con el biomarcador, se utiliza otro tipo de ensayo que evalúe los

efectos biológicos como es el índice de condición. Los índices de condición (IC) utilizados en acuicultura pueden servir para dos propósitos, el primero, de carácter económico el cual designa la calidad del producto; y el segundo, de carácter ecofisiológico, el cual resume el estado fisiológico del animal (Lucas y Beninger, 1985) y es el que se utiliza en el presente trabajo.

El IC es una relación matemática que tiene en cuenta la alometría del individuo y se asocia generalmente a la madurez sexual, buena calidad de vida y buena alimentación. Existen diferentes formas de calcular el IC en bivalvos utilizando datos biométricos de cada tellina, como son el peso del ejemplar, el peso seco de la carne sin valva, el peso húmedo de la carne sin valva, el tamaño de la valva y el peso de la valva sin carne. En la bibliografía se han descrito varias funciones para calcular el índice de condición en bivalvos, como los que se muestran en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Fórmulas planteadas para el cálculo del Índice de condición para bivalvos. Fuente: Zeng y Yang, 2020.

<b>IC_1</b>	$IC_1 = \frac{\text{Peso tejido blando seco (g)}}{\text{Longitud de las valvas (cm)}} \cdot 100$
<b>IC_2</b>	$IC_2 = \frac{\text{Peso tejido blando seco (g)}}{\text{Peso valvas (g)}} \cdot 100$
<b>IC_3</b>	$IC_3 = \frac{\text{Peso tejido blando seco (g)}}{\text{Peso total (g)} - \text{Peso valvas (g)}} \cdot 100$
<b>IC_4</b>	$IC_4 = \frac{\text{Peso tejido blando húmedo (g)}}{\text{Peso total (g)}} \cdot 100$
<b>IC_5</b>	$IC_5 = \frac{\text{Peso tejido blando húmedo (g)}}{\text{Peso total (g)} - \text{Peso valvas (g)}} \cdot 100$
<b>IC_6</b>	$IC_6 = \frac{\text{Peso tejido blando seco (g)}}{\text{Peso tejido blando húmedo (g)}} \cdot 100$
<b>IC_7</b>	$IC_7 = \frac{\text{Peso tejido blando húmedo (g)}}{\text{Peso valvas (g)}} \cdot 100$

## 2. OBJETIVOS

Se han realizado numerosos estudios que tratan diferentes aspectos de *D. trunculus* tanto en el Mediterráneo como en el Atlántico. Como la mayoría de los bivalvos filtradores, *D. trunculus* tiene un papel importante en la bioacumulación de contaminantes por estar en contacto directo con el agua, sedimentos y partículas de alimentos contaminados (Gunther y col., 1999; Miller y col., 2000) de ahí su uso como especie bioindicadora en la evaluación del estado de salud de las aguas marinas (Escrivá, 2020).

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Máster es establecer la respuesta basal del biomarcador EML en hemocitos granulares del molusco bivalvo *D. trunculus* bajo condiciones de salinidad y temperatura controladas en laboratorio, utilizando la técnica de retención de rojo neutro (RNN).

Para conseguir el objetivo general, se parte de la hipótesis de que la estabilidad de la membrana lisosomal de los hemocitos de *D. trunculus* se ve afectada por diferentes condiciones de temperatura y salinidad. Los objetivos específicos que se plantean a fin de lograr el objetivo general se detallan a continuación:

- **Objetivo s1:** Estudiar el cambio en la estabilidad de la membrana lisosomal a tres rangos de salinidades consideradas normales (37-38‰), intermedias (32-33‰) y bajas (27-28‰) a tres temperaturas distintas 12°C, 20°C y 28°C.
- **Objetivo s2:** Determinar el rango óptimo de respuesta de las condiciones de temperatura y salinidad para la especie *D. trunculus* usando el biomarcador EML.
- **Objetivo s3:** Estudiar el cambio del índice de condición entre los distintos tratamientos de salinidad y temperatura como variable de apoyo al resultado del biomarcador.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo tres experimentos con diferentes condiciones de salinidad y temperatura. Los organismos fueron recogidos en el medio natural, se aclimataron en el laboratorio y fueron expuestos durante un período mínimo de tres semanas (21 días) a las condiciones experimentales en cámaras termostalizadas, con salinidad controlada y temperatura constante, alimentación diaria del cultivo de la microalga *Isochrysis galbana* y un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. Cada experimento se realizó a una temperatura dentro del rango de las que se dan en el mar Mediterráneo: el primero a 12°C, el segundo a 20°C y el tercero a 28°C (SiteTemperature.info, s.f.).

#### 3.1 Muestreo y diseño del experimento

Los individuos de *D. trunculus* se recogieron en la playa del Ahuir al norte de la playa de Gandía, en la provincia de Valencia (figura 3.1).



Figura 3.1. Localización del punto de muestro de la playa del Ahuir en Gandía (Valencia). Fuente: Visor cartogràfic valencià.

Para el muestreo se utilizó un rastrillo con red (figura 3.2) cuya luz de malla era de 0,5 cm, aproximadamente. Seguidamente, se separó las tellinas del resto de especies y conchas vacías y se seleccionó aquellas que presentaban una longitud de la valva superior a 14 milímetros. En el mismo punto de recogida se registró la salinidad y temperatura ambiental.

Se realizaron un total de tres muestreos en el mismo lugar, pero distinta fecha, con el objetivo de recoger las tellinas cuando las condiciones del ambiente fueran similares a las del experimento, por ello el primer muestreo corresponde las tellinas del tratamiento a 12°C, el segundo al tratamiento a 20°C y el último al tratamiento a 28°C (tabla 3.1).

*Tabla 3.1. Relación entre las fechas de muestreo y el tratamiento que se va a llevar a cabo.*

Fecha de muestreo	Tratamiento
16 de marzo de 2023	12°C
31 de mayo de 2023	20°C
5 de julio de 2023	28°C



*Figura 3.2. Muestreo de D. trunculus en la playa de l'Ahuir (Gandia) con el rastrillo.*

Para investigar el efecto de la salinidad y la temperatura sobre la estabilidad de la membrana lisosomal de los hemocitos, en este estudio ambas variables se consideraron factores fijos. Cada nivel de tratamiento se ensayó por duplicado (n=25 individuos por acuario), siendo cada acuario una unidad experimental, los cuales se ubicaron dentro de una cámara termostaticada a temperatura constante. A cada nivel de temperatura se

ensayaron tres niveles de salinidad, considerada normal (38‰), intermedia (32,5‰) y baja (27‰), sabiendo que en este rango de salinidades la supervivencia de la especie no está comprometida (Reyes-Martínez y col., 2020) (figura 3.3; tabla 3.2).

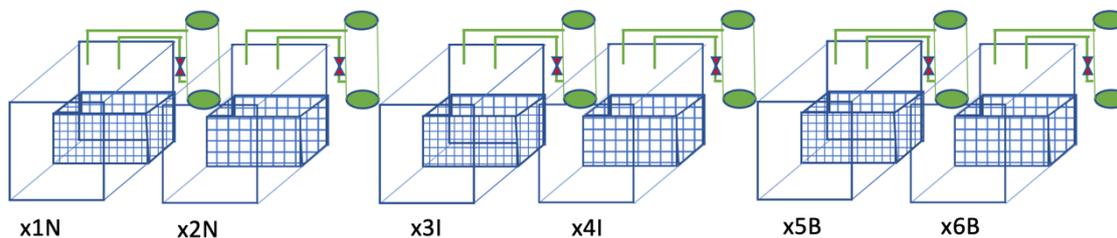


Figura 3.3. Representación del experimento a una temperatura. Los números representan el acuario, y las letras la salinidad a la que se encuentran, N: normal, I: intermedia, B: baja. En la figura se observa los filtros de color verde para cada uno de los acuarios.

Para cada temperatura encontramos tres salinidades por lo que hay un total de nueve tratamientos a lo largo de todo el experimento (tabla 3.2).

Tabla 3.2. Planteamiento del experimento en nueve tratamientos

Temperatura (°C)	12						20						28					
Salinidad (‰)	37-38		32-33		27-28		37-38		32-33		27-28		37-38		32-33		27-28	
Organismos en acuario (N)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Se realizó un período de aclimatación (5 días) donde los individuos introducidos en los acuarios partían de unos valores de salinidad y temperatura iguales a los ambientalmente existentes en el momento de su recogida. Durante el periodo de aclimatación, se fue disminuyendo o aumentando diariamente dos puntos la salinidad (con agua destilada) y dos grados la temperatura hasta conseguir los valores de la tabla 3.2. Una vez aclimatados los individuos fueron expuestos a condiciones de salinidad y temperatura en los acuarios durante tres semanas (21 días). Pasado este tiempo se analizó la estabilidad de la membrana lisosomal mediante el ensayo de retención de rojo neutro (RRN).

### 3.2 Mantenimiento y control de los individuos en los acuarios.

Para garantizar una correcta calidad del agua, se instaló un sistema de filtración de 440 litros/hora, con sacos de carbón activo en su interior y perlón marca Eheim (figura 3.4). Cada acuario disponía de su propio filtro. Los filtros se apagaban durante 4-5 horas al día, durante el período de alimentación para permitir la máxima eficiencia durante la filtración de comida por parte de las tellinas.



Figura 3.4. Filtro exterior de la marca EHEIM

Además del filtro, también presentaban aireador para que el oxígeno no limitara el desarrollo de las tellinas. Por otro lado, se mantenían limpias las paredes de los acuarios y las valvas de los individuos, eliminando la acumulación de las algas con un pincel cuando se consideraba necesario.

#### 3.2.1 Determinación de las variables ambientales.

Para llevar un control de la calidad del agua de los acuarios se utilizaban distintos instrumentos de medida como son la sonda óptica proODO YSI para el oxígeno y la sonda WTW 3320 para la medida de la salinidad (figura 3.5).



Figura 3.5. Instrumentos de medida usados para evaluar las variables ambientales. A la izquierda, la sonda óptica proODO YSI, a la derecha la sonda WTW 3320

La sonda óptica proODO YSI permitía determinar el oxígeno disuelto (mg/L), porcentaje de saturación de oxígeno (%) y temperatura (°C), valores que eran anotados diariamente. Por otro lado, la sonda WTW 3320 permitía medir la salinidad, la cual se corregía diariamente añadiendo pequeños volúmenes de agua destilada.

### 3.2.2 Alimentación

En cuanto a la alimentación de las tellinas se elaboró un cultivo de la microalga *Isochrysis galbana* (figura 3.6). El cultivo se realizó con agua de mar a distintas salinidades, correspondientes a las salinidades de los acuarios y el volumen usado para alimentar las tellinas era remplazado por volumen de agua salada autoclavada con nutrientes para permitir el crecimiento del dicho cultivo.



Figura 3.6. Cultivo de la microalga *I. galbana* a distintas salinidades para la alimentación de *D. trunculus* dependiendo del tratamiento.

La ración necesaria para alimentar las tellinas se basó en el peso seco de la carne de los adultos. Para ello se tuvo que determinar el peso seco en el laboratorio y mediante la ecuación detallada, de este modo se obtuvo el peso seco de algas necesario para una ración diaria por ejemplar adulto.

$$g \text{ de ración por día por adulto} = 3 \times \text{peso seco medio de la carne (g)} / 100$$

A la hora de tomar un volumen del cultivo de *I. galbana* para alimentar a *D. trunculus* se tuvo la precaución de invertir las botellas con delicadeza tras cubrirlas con Parafilm con el fin de resuspender las células que pudieran haber sedimentado.

### 3.3 Ensayo de Retención de Rojo Neutro

La estabilidad de la membrana lisosomal (EML) se midió mediante el ensayo de retención de rojo neutro (RRN) en hemocitos de *D. trunculus* siguiendo el procedimiento descrito por Moore y col. (2004) con modificaciones como se describe en Martínez-Gómez y col. (2015). El ensayo de RRN es un método citoquímico *in vivo* basado en la retención de un tinte anfifílico y catiónico débil, que penetra libremente la membrana celular. Una vez dentro de las células, este tinte queda unido por protonación en los lisosomas y secuestrado por la matriz lisosomal acumulándose en estos orgánulos, lo cual permite su visualización mediante microscopía de luz directa.

Las membranas de los lisosomas disponen de bombas de protones que transportan de manera activa  $H^+$  hacia el lisosoma, manteniendo así un pH de 5. Este ensayo refleja la potencial salida del rojo neutro hacia el citosol, debido al daño en la membrana lisosomal

y, posiblemente, al deterioro de la bomba de protones de dicha membrana. Cualquier deterioro en ésta última resultará en una reducción del tiempo de retención de rojo neutro dentro de los lisosomas. Es por ello, que el grado de captura de este marcador depende del pH del lisosoma y de la eficiencia de la bomba de protones asociada a la membrana.

Los resultados del ensayo de RRN se expresa de dos maneras:

- TRRN: tiempo de retención de rojo neutro (expresado en minutos), que corresponde al último período de tiempo registrado cuando no hubo evidencia de pérdida de tinte o anomalías lisosomales en más del 50% de los hemocitos.
- %EML: porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal, que se utilizó para mejorar la sensibilidad de los resultados aplicando el procedimiento de puntuación descrito en Martínez y col. (2015).

### 3.3.1 Equipos, reactivos y soluciones

Los equipos principales utilizados (figura 3.7) en el ensayo de RRN fueron una cámara de incubación y un microscopio binocular, además de todo el material básico de laboratorio como son las pipetas, probetas y vasos de precipitados.

Se utilizaron bandejas de incubación opacas (disponen de una tapa que cierra perfectamente con la base) con capacidad para albergar 16 portaobjetos. En esas bandejas se introducía un poco de hielo picado y agua para mantener la temperatura (<18°C) y humedad ambiental. El microscopio binocular utilizado fue de campo claro, y las observaciones fueron realizadas utilizando x200 y x400 aumentos (OLYMPUS CX21).



Figura 3.7. Equipos utilizados. Izquierda: cámara de incubación. Derecha: microscopio OLYMPUS

Por otro lado, en cuanto a los reactivos y soluciones que se utilizaron fueron:

- Rojo neutro (RN) con una concentración/pureza  $\geq 90\%$  (CAS 553-24-2)
- Agua de mar filtrada (SW, del inglés Sea Water) con la misma salinidad que la del tratamiento. El filtro utilizado fue de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Solución madre de rojo neutro (SS, del inglés Stock Solution) partiendo de 28,8 mg de RN disuelto en 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solución era guardada en el congelador ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) para preparar posteriores soluciones de trabajo.
- Solución de trabajo de rojo neutro (WS, del inglés Working Solution) preparada a partir de 5 mL de agua de mar filtrada (FSW, del inglés Filtered Sea Water) y 10  $\mu\text{L}$  de la solución madre de rojo neutro (SS). Esta solución empieza a precipitar a partir de las 4 horas, por lo que para cada ensayo se preparó una nueva WS.
- Reactivo de silicona para vidrio y otras superficies (Sigmacote® from SIGMA-ALDRICH®): para evitar la adhesión celular en las paredes de los microtubos donde se depositó temporalmente las muestras de hemolinfa.

### 3.3.2 Extracción de hemolinfa e incubación de rojo neutro.

Siguiendo el protocolo descrito en Martínez-Gómez y col. (2015) se llevaron a cabo una serie de pasos para la extracción de hemolinfa y la incubación con rojo neutro validado para la especie *Mytilus* sp y puesto en práctica en este experimento para la especie *D. trunculus*.

La realización del ensayo de retención rojo neutro (RNN) se realiza *in vivo*, mediante la extracción de hemolinfa desde el musculo abductor del individuo. En la figura 3.8 se muestra por donde abrir el individuo para la realización del pinchazo en el músculo abductor, siendo el margen dorsal posterior el idóneo para visibilizar el músculo, aunque también se puede realizar el pinchazo por el margen dorsal anterior, pero con menor visibilidad.

A continuación, se detalla paso a paso el procedimiento del ensayo del Rojo Neutro:



Figura 3.8. Se muestra el lugar por donde se separaron las valvas para realizar la extracción de hemolinfa

- a. En primer lugar, se preparan los portaobjetos, se rotulan y se dibuja un círculo en el reverso para identificar fácilmente el área en la que se observarán los hemocitos granulocitos (figura 3.9). Luego se llenan los microtubos con reactivo de silicona, se dejan 10-30 min y se devuelven al recipiente de reactivo. Se marcan portaobjetos donde se van a depositar las muestras. Cada muestra de hemolinfa se preparó por duplicado.

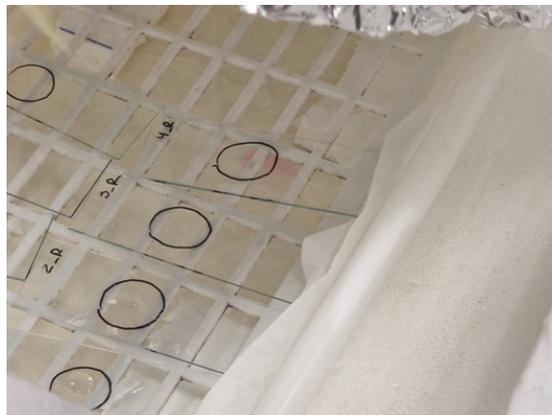


Figura 3.9. Preparación de los portaobjetos rotulados

- b. Se separan las valvas con un bisturí por la zona central y se drenó el agua del interior del organismo antes de extraer la hemolinfa. En los casos en los que fue posible, se insertó una punta de pipeta amarilla para mantener las valvas abiertas (no más de 1 mm de apertura) durante el proceso de drenaje y extracción (figura 3.10).

- c. Con una jeringa y una aguja nueva para cada muestra, se extrajeron 0,1 mL de hemolinfa del músculo aductor posterior (figura 3.10) con una jeringa hipodérmica de 1 mL precargada con 0,1 mL de SW filtrada (para diluir la hemolinfa 1:1 y evitar la aglutinación celular) equipada con una aguja de calibre 25.



Figura 3.10. Extracción de hemolinfa con la jeringa.

- d. La muestra de hemolinfa extraída con la jeringa se expulsó suavemente en microtubos siliconados de 1,5-2 mL, habiendo retirado previamente la aguja. Se homogeneizó suavemente el contenido de los microtubos y se dispensó 20  $\mu$ L de mezcla de hemolinfa/FSW en cada portaobjetos, utilizando una punta de pipeta limpia para cada muestra y su réplica (figura 3.11).

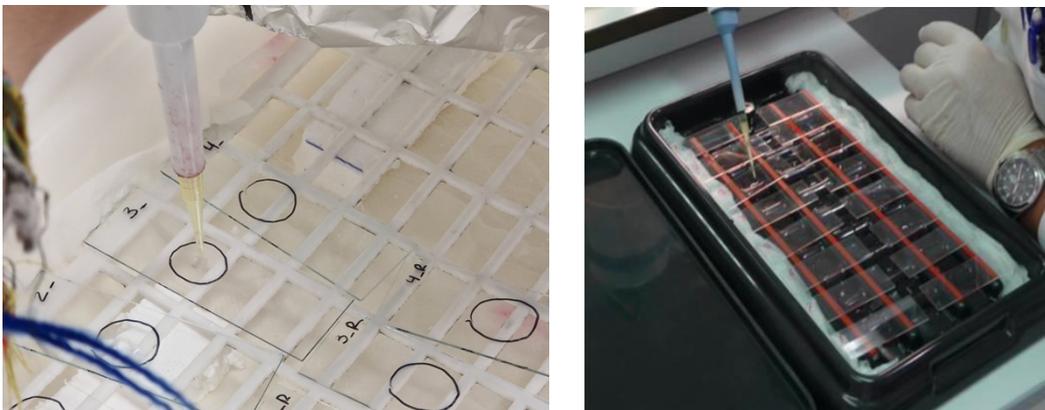
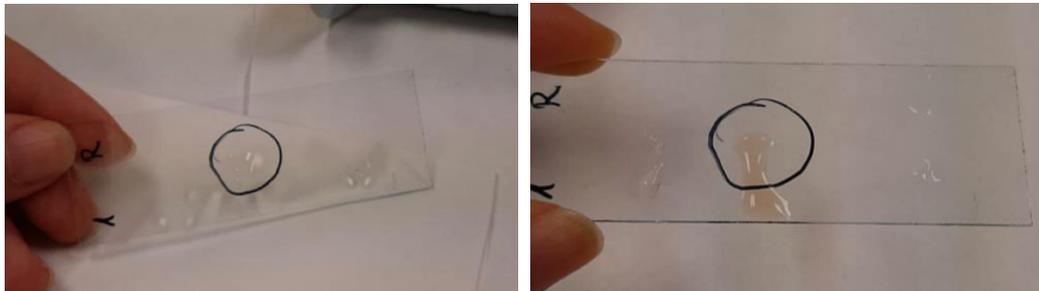


Figura 3.11. Pipeteo de la muestra de hemolinfa en los portaobjetos que se encuentran en las cámaras de incubación.

- e. Tras una incubación de 30 minutos en oscuridad, se drenó el exceso de agua en la suspensión de los portaobjetos, poniéndolos sobre uno de sus lados y escurriendo el contenido en exceso. A continuación, se le añadieron 40  $\mu$ L de solución de trabajo de rojo neutro (WS) sobre los hemocitos, siendo este el tiempo 0 del ensayo de RRN. Cada 2' se añadía WS a la siguiente muestra y a su replicado. En cada ensayo se evaluaron muestras de 8 individuos (16 portaobjetos) ya que es la capacidad máxima de las bandejas de incubación utilizadas.

- f. Tras 15' se drena con cuidado el exceso de la solución de trabajo de RN del portaobjetos (figura 3.12), seguidamente se le añadía un cubreobjetos y se colocaba la muestra al microscopio para su observación. Se repitió el proceso cada 2' para las siguientes muestras.



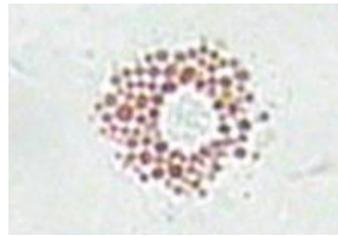
*Figura 3.12. Drenaje del exceso de la muestra antes y después de la adición de la solución de trabajo de RN*

- g. Una de las réplicas de la muestra se revisaba sistemáticamente al microscopio después de 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de incubación con rojo neutro. Debido a la fotosensibilidad del rojo neutro, todos los portaobjetos debían de mantenerse en oscuridad o baja intensidad lumínica. Se examinaban todas las células del interior del círculo dibujado en el portaobjeto no sobrepasando nunca los 2 minutos de exposición a la luz. Las condiciones observadas o anomalías encontradas en los lisosomas de las células se registraban en una tabla (tabla 3.3).

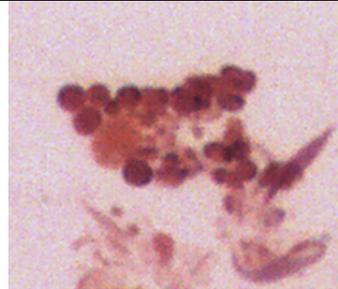
Tabla 3.3. Ejemplo de hoja informativa sobre los resultados del ensayo de retención de rojo neutro (Martínez-Gómez col., 2015)

Time period	15	30	60	90	120	150	180	Sum of weighted scores	%LMS	NRRT
Weighting factor	1	2	3	4	5					
Slide nº	NRR Score Wtd score	NRR NRR		$(1-(WS/75))*100$						
1	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	- -	- -	0	100	120
2	+ 0 0	- 2 4	- 2 6	- 5 20	- 5 25	- -	- -	55	27	15
3	+ 0 0	+ 0 0	- 1 3	- 1 4	- 3 15	- -	- -	22	71	30
4	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	- 2 8	- 5 25	- -	- -	33	56	60
5	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ -	- -	0	100	150
6	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	- 2 10	- -	- -	10	87	90
7	- 4 4	- 4 8	- 5 12	- 5 16	- 5 20	- -	- -	60	20	0
8	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	- 3 12	- 5 25	- -	- -	37	51	60
9	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ +	+ +	0	100	180
10	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	+ 0 0	- -	- -	0	100	120

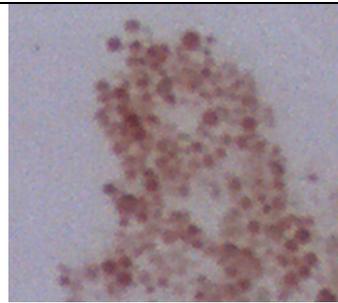
- h. El tiempo de retención de rojo neutro se registraba estimando la proporción de células que mostraban fugas del rojo neutro desde los lisosomas al citosol o mostraban anomalías en el tamaño y/o color de los lisosomas (figura 3.13). La réplica de la muestra se observaba una vez determinado el tiempo de retención del rojo neutro en la primera réplica. En caso de no observarse pérdida de colorante en más del 50% de las células en la réplica, se continuaba el ensayo de RN utilizando la muestra réplica. Con este procedimiento se intentó minimizar el potencial error causado por sobreexposición a la luz de las muestras.



SCORE 0



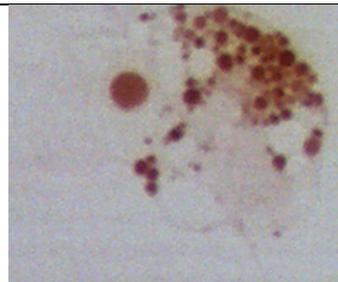
SCORE 1



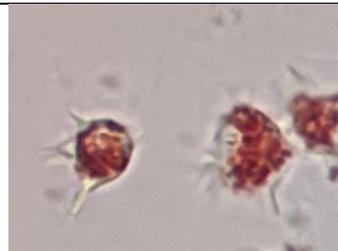
SCORE 2



SCORE 3



SCORE 4



SCORE 5

*Figura 3.13. Ilustración de granulocitos de tellina que muestran diferentes patologías asociadas a una puntuación. SCORE 0: sin patología; SCORE 1: agrandamiento lisosomal; SCORE 2: difusión del RN del lisosoma al citosol; SCORE 3: agrandamiento lisosomal y difusión*

### 3.3.3 Determinación del tiempo de retención de rojo neutro

El tiempo de retención de rojo neutro (TRRN) correspondía al último periodo de tiempo donde no se encontraron más del 50% de los hemocitos con anomalías en los lisosomas o pérdida del colorante basándose en una determinación visual.

Si en la muestra, más del 50% de los hemocitos presentaban el citosol claro sin evidencia de pérdida de colorante y sin agrandamiento lisosomal, entonces el individuo se consideraba sano (puntuación 0) y se registraba un signo más (+) en el cuadro correspondiente de la tabla 3.3. En el caso de que existiera evidencia de pérdida de colorante o anomalías lisosomales (agrandamientos) en más del 50% de las células de la muestra, se consideraba que el individuo estaba estresado (puntuación >0) y se registraba un signo menos (-) en el cuadro correspondiente de la tabla 3.3.

De este modo, el tiempo de retención de rojo neutro (TRRN) es considerado el último período de tiempo en donde el individuo es considerado sano (+) y el estado lisosomal de la mayoría de las células no tiene efectos considerados negativos.

La prueba de RN se acotó a un máximo de 180 minutos (Martínez-Gómez y col. 2015) ya que el rojo neutro puede causar toxicidad celular “per se” cuando los tiempos de exposición a este son superiores a 3 horas.

Las células de interés son los hemocitos granulocitos de la hemolinfa de los individuos de *D. trunculus* (figura 3.13). Estas presentan gran cantidad de lisosomas y son consideradas sanas en términos del ensayo de retención de rojo neutro cuando son capaces de retener el colorante en el interior de los lisosomas.

### 3.3.4 Determinación del porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal.

Para el cálculo del porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (%EML) se utilizó el sistema de puntuación descrito en Martínez-Gómez y col. (2015) y validado para *Mytilus sp.* el cual se basa en alteraciones lisosomales observada a los diferentes tiempos.

La puntuación de las distintas alteraciones lisosomales se muestra en la tabla 3.4. Las muestras fueron calificadas visualmente al microscopio a la vez que eran observadas para la determinación del tiempo de TRRN. Se les asignaba una puntuación ponderada

en función de si el 50% o más de las células de la muestra presentaba alguna de las patologías (tabla 3.4) a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de incubación.

Tabla 3.4. Descripción de las patologías asociadas a la puntuación usada

Patología	Score
Sin efecto	0
Agrandamiento lisosomal sin difusión del colorante	1
Difusión del colorante sin agrandamiento lisosomal	2
Agrandamiento y difusión	3
Agrandamiento, difusión y pérdida de colorante	4
Células redondeadas por apoptosis	5

Cuando la evidencia del 50% o más de las células no presentaba efecto o alguna de las 5 condiciones patológicas (tabla 3.4) se registraba el puntaje correspondiente. En consecuencia, la puntuación ponderada se calculó multiplicando la puntuación por el factor de ponderación para este período de tiempo la puntuación es truncada a los 120 min. La puntuación final total para la condición lisosomal se calculó:

$$\% \text{ EML} = (1 - (\text{sumatorio de la puntuación ponderada} / 75)) * 100$$

### 3.4 Cálculo del índice de condición.

El índice de condición (IC) se utilizó como prueba de soporte ante los resultados obtenidos del biomarcador rojo neutro. Los ejemplares usados para realizar el IC fueron los sobrantes de los acuarios de cada tratamiento. Para el tratamiento a 20°C y 28°C se recogieron suficientes individuos de *D. trunculus* como para calcular el IC al inicio del experimento, considerado el IC de referencia. Luego, tras las condiciones de exposición, se realizaba el IC a los individuos sobrantes. EL IC de referencia se determinó el mismo día del muestreo de campo, a excepción del primer experimento a 12°C, donde no fue posible debido a que no se recogieron los suficientes ejemplares.

Tras recoger todos los datos necesarios para aplicar cualquiera de las fórmulas presentadas en la tabla 1.3. En el presente trabajo se empleó el IC que tenía en cuenta el peso seco y el peso húmedo de la carne de los individuos usados para el análisis (Zeng y Yang, 2020).

$$\text{IC} = (\text{peso seco de la carne} / \text{peso húmedo de la carne}) * 100$$

A continuación, se muestra paso a paso el protocolo que se siguió para el análisis del índice de condición:

- Después de realizar el ensayo de RN, los individuos restantes de los acuarios eran usado para el análisis del IC, para ello se midió la longitud de cada uno de ellos, seguidamente se abrían con la ayuda de un bisturí y se escurrían en papel de filtro durante 10' para eliminar el agua en exceso (figura 3.14).



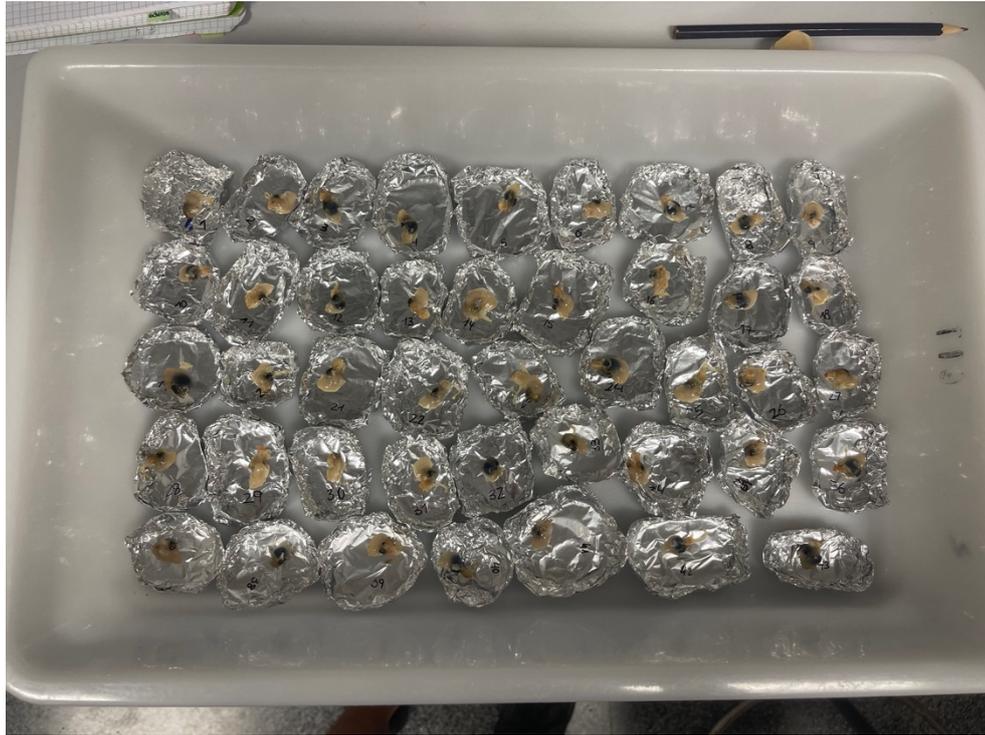
*Figura 3.14. Tellinas abiertas y escurriendo en papel*

- El siguiente paso era pesar los organismos en una báscula de precisión ( $\pm 0,0001\text{g}$ ) (figura 3.15).



*Figura 3.15. Báscula de precisión con bandeja donde se pesaban los organismos*

- A continuación, se colocaba la carne de las tellinas en crisoles previamente pesados para obtener el peso húmedo del organismo (figura 3.16).



*Figura 3.16. Carne húmeda de las tellinas en los crisoles*

- Una vez pesada la carne de las tellinas, se introducía tanto la carne en los crisoles como las valvas vacías en el horno a 100°C durante 24 para eliminar la humedad. Transcurridas las 24 horas se sacaban las muestras horno, las valvas se pesaban y la carne con los crisoles se mantuvieron durante 30 min antes de ser pesadas (figura 3.17).



*Figura 3.17. Crisoles con carne seca de las tellinas en el desecador*

### 3.5 Interpretación de los resultados y estadística

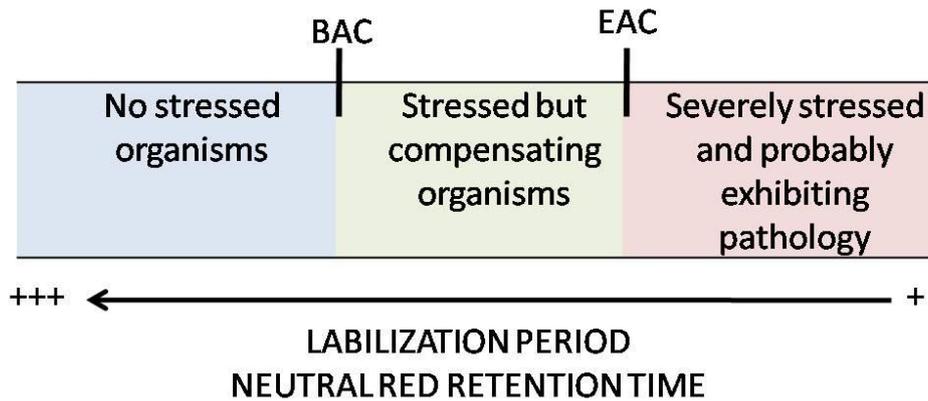
Una vez obtenidos los resultados del ensayo de TRRN se evaluó el potencial efecto de la temperatura y de la salinidad del agua sobre la estabilidad de la membrana lisosomal. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron utilizando métodos paramétricos (ANOVA de una vía y prueba de rangos múltiples) siempre que fue posible con previa comprobación del cumplimiento de la normalidad (mediante la comprobación de la curtosis estandarizada) y de la homogeneidad en las varianzas (test de Levene) usando la herramienta estadística Statgraphics centurion 18.

En primer lugar, se evaluó la normalidad mediante la curtosis estandarizada donde los valores deben encontrarse en el rango de -2 a 2. Luego se verifica la homocedasticidad en las varianzas, mediante el test de Levene. En caso de que no se cumplieren estas dos condiciones, los datos eran transformados usando  $\arcsen\sqrt{LMS/100}$  y  $\log(TRRN+1)$  para cumplir con los supuestos requeridos.

En caso de que tampoco se cumplieren las condiciones de normalidad con los datos transformados, se recurría a pruebas no paramétricas, como el test de Kruskal-Wallis que mediante intervalos al 95% de confianza se asignaban o no diferencias significativas entre salinidades.

Para saber entre que grupos de salinidades se encuentran las diferencias se emplearon pruebas post-hoc. Cuando se realizó un ANOVA, se empleó un procedimiento de comparación múltiple mediante la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher el cual determinaba qué medias eran significativamente distintas de otras. Por otro lado, y con el mismo objetivo, cuando se realizó un Kruskal-Wallis, se empleó la prueba de Bonferroni.

Con fin de evaluar los resultados, se realizó la comparación con los criterios de evaluación de fondo (BAC) y los criterios de evaluación ambiental (EAC) (Davies y col., 2012). Resultados de TRRN más bajos que el nivel de EAC (50 min) sugieren que los individuos de *D. trunculus* usados en el experimento presentaban un nivel de estrés severo y probablemente exhibían una patología en los hemocitos. Sin embargo, resultados más bajos que el nivel de BAC (120 min), pero más altos que el nivel de EAC sugiere que los individuos presentan un estrés compensatorio (figura 3.18).



*Figura 3.18. La estabilidad de la membrana lisosomal (medida como tiempo de retención de rojo neutro) disminuye a medida que el organismo está estresado (Martínez-Gómez y col., 2015).*

Según el estudio de Martínez-Gómez y col., (2015) no se han establecido los criterios BAC y EAC para los resultados de %EML debido a la falta de la cantidad necesaria de datos de diferentes estudios de campo para validarlos de manera efectiva.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan y discuten los resultados los resultados obtenidos de las variables ambientales de los acuarios, los resultados del ensayo de RRN expresado en TRRN y %EML y los resultados relacionados con el índice de condición como prueba de soporte.

### 4.1 Variables ambientales

Tabla 4.1. Resultados de las variables ambientales de los acuarios durante los 21 días de experimento expresado en media  $\pm$  error estándar (EE) T: temperatura, S: salinidad, OD: oxígeno disuelto (mg/L), OD sat: saturación de oxígeno, M: tasa de mortalidad (%).

Tratamiento		Temperatura	Salinidad	OD	OD sat.	M
T	S	(°C)	PSU	(mg/L)	(%)	(%)
12°C	37-38	12,26 $\pm$ 0,04	37,93 $\pm$ 0,04	9,10 $\pm$ 0,01	114,19 $\pm$ 0,09	26,00
	32-33	12,02 $\pm$ 0,04	32,65 $\pm$ 0,04	9,14 $\pm$ 0,01	106,16 $\pm$ 0,06	10,00
	27-28	12,13 $\pm$ 0,03	27,32 $\pm$ 0,04	9,12 $\pm$ 0,01	106,20 $\pm$ 0,05	16,00
20°C	37-38	20,07 $\pm$ 0,06	37,47 $\pm$ 0,04	7,78 $\pm$ 0,01	105,70 $\pm$ 0,13	14,00
	32-33	20,16 $\pm$ 0,06	32,78 $\pm$ 0,04	7,77 $\pm$ 0,01	105,79 $\pm$ 0,10	10,00
	27-28	20,23 $\pm$ 0,06	27,33 $\pm$ 0,03	7,76 $\pm$ 0,01	105,82 $\pm$ 0,13	16,00
28°C	37-38	27,44 $\pm$ 0,13	37,57 $\pm$ 0,07	6,82 $\pm$ 0,02	105,03 $\pm$ 0,11	66,67
	32-33	27,40 $\pm$ 0,10	32,56 $\pm$ 0,06	6,86 $\pm$ 0,01	105,70 $\pm$ 0,05	35,00
	27-28	27,58 $\pm$ 0,08	27,55 $\pm$ 0,12	6,79 $\pm$ 0,01	104,77 $\pm$ 0,16	100,00

En la tabla 4.1 encontramos la información de las condiciones experimentales para cada tratamiento junto con su error estándar. Estos resultados hacen referencia a las condiciones reales en las que se han mantenido los individuos de *D. trunculus* de temperatura (°C), salinidad (PSU), oxígeno disuelto (OD, mg/L) y saturación (%).

#### Temperatura.

El efecto de la temperatura se observó en los valores de OD mostrados en la tabla 4.1, donde a temperaturas de 12°C se obtuvo valores de 9 mg/L de OD y a temperaturas de

28°C se obtuvo valores de 7 mg/L. Esto es debido a que el oxígeno disuelto en agua disminuye su solubilidad cuando aumenta la temperatura (Baumgarten y col., 2010). No obstante, el OD no fue una variable que afectase al experimento, ya que los acuarios se mantuvieron con oxigenadores.

Al ser animales ectotermos, no son capaces de regular internamente la temperatura y su mantenimiento depende de la temperatura del entorno (Pörtner, 2002), es por ello por lo que esta variable tiene un papel importante en el experimento, ya que el objetivo principal es observar cómo afecta a la estabilidad de la membrana lisosomal de *D. trunculus*.

### *Salinidad*

La salinidad es otra de las variables importantes a la que se sometieron los organismos de *D. trunculus*, especie eurihalina cuya tolerancia a bajas salinidades varía según las clases de tamaño (Reyes-Martínez y col., 2020). Durante la realización del experimento se procuró ser lo más realista con el medio natural, se estableció un rango normal de salinidad, habitual del Mar Mediterráneo, de entre 37-38 PSU y los otros dos grupos de salinidades que corresponderían a zonas donde la salinidad es menor, como zonas influenciadas por la desembocadura de un río.

El efecto de la salinidad no llegó a producir ningún cambio brusco observable en las otras variables como son el OD, sin embargo, la tasa de mortalidad tuvo resultados severos a altas temperaturas y bajas salinidades.

### *Oxígeno disuelto*

Esta variable se midió tanto en mg/L como en saturación (%) y como se observa en la tabla 4.1, el OD (mg/L) disminuyó conforme aumentó la temperatura. Sin embargo, el oxígeno disuelto permaneció dentro del rango apropiado (~100% de saturación de oxígeno) en todas las condiciones experimentales.

Se sabe que la interacción entre dos o más variables ambientales puede provocar cambios en otras variables (Soon y Ransangan, 2019), como una disminución del oxígeno disuelto en el agua, lo que puede provocar estrés en los organismos (Andreyeva y col., 2022). En este trabajo, la concentración de OD se mantuvo bajo control (>7 mg/L

y 100% de saturación de oxígeno), y los efectos observados no pueden atribuirse a cambios significativos en esta variable (tabla 4.1).

#### *Tasa de mortalidad*

En el tratamiento a 12°C se obtuvo como media una tasa de mortalidad del 17,33%; en el tratamiento a 20°C se obtuvieron las tasas de mortalidad más bajas del experimento con un 13,33% de media; y en el tratamiento a 28°C fue donde la tasa de mortalidad obtuvo los valores más altos (tabla 4.1).

En el tratamiento a 28°C la tasa de mortalidad media fue del 67%, es decir, que más de la mitad de los individuos del acuario fallecieron. A salinidad de 37-38 PSU la tasa fue de 66,7%, a 32-33 PSU la tasa fue del 35% y a 27-28 PSU la tasa fue del 100%, por lo que a temperaturas altas y salinidades bajas los individuos se vieron bastante afectados.

#### 4.2 Ensayo de Retención de Rojo Neutro

El ensayo de RRN se expresó como TRRN (minutos) y %EML (%) cuyos resultados tuvieron un mismo patrón de respuesta a los distintos tratamientos como se observa en la figura 4.1, tabla 4.2 y tabla 4.3. Se evaluó el potencial efecto de la temperatura y de la salinidad del agua sobre la estabilidad de la membrana lisosomal (tabla 3.2, tabla 3.3).

El ensayo de RRN es muy usado en la determinación de la estabilidad de la membrana lisosomal en hemocitos de invertebrados, con especial referencia a bivalvos (Lowe y col., 1995, Zhao y col., 2011, Vethaak y col., 2017).

Los valores umbral utilizados como criterios de evaluación para la estabilidad de la membrana lisosomal se han determinado a partir de *Mytilus sp.* sobre la base de numerosos estudios realizados en el Reino Unido y otras aguas europeas, incluidas las aguas del Mar Mediterráneo (Martínez-Gómez y col., 2015, Vethaak y col., 2017).

Hasta el momento, no hay datos para *D. trunculus* ni de %EML ni de TRRN en la literatura obtenidos mediante el uso del ensayo de RRN. En ausencia de criterios de evaluación específicos para esta especie, los valores de TRRN para *Mytilus sp.* se emplearon para interpretar los resultados obtenidos de los hemocitos de *D. trunculus*. En este sentido, un TRRN más corto que el nivel de EAC supone que el organismo estaba severamente estresado.

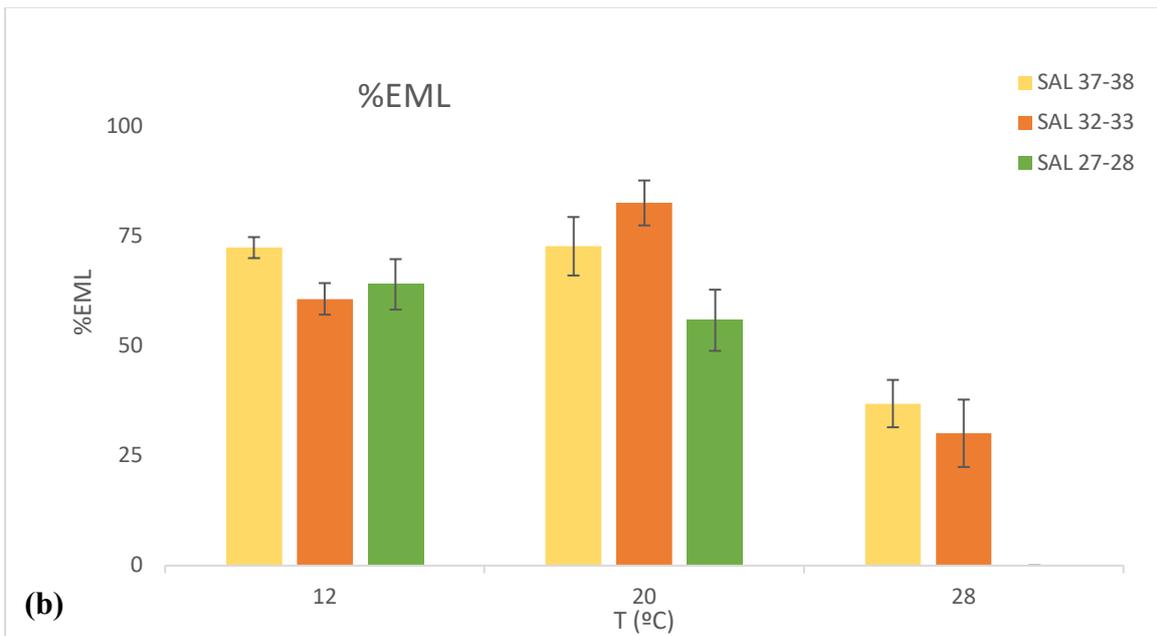
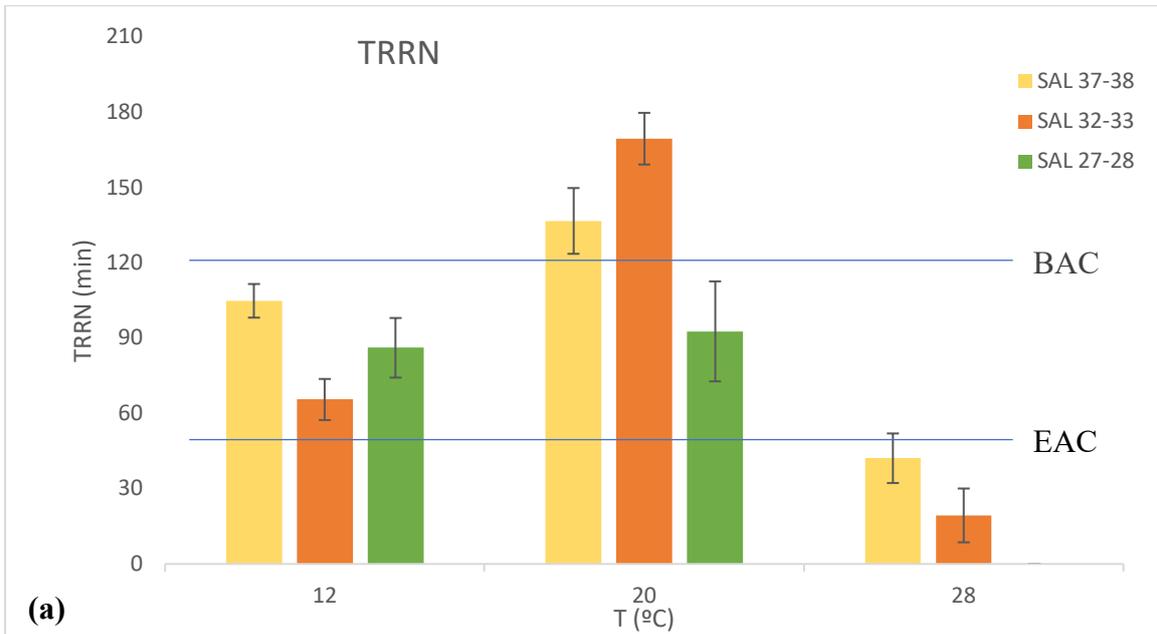


Figura 4.1. Ensayo de RRN expresado gráficamente como media junto a su error estándar. En el gráfico (a) se observa el TRRN en minutos junto con los criterios BAC y EAC establecidos a 120' y 50' respectivamente. En el gráfico (b) se observa el porcentaje de EML para los distintos grupos de salinidad y temperatura.

Tabla 4.2. Ensayo de RRN expresado como media  $\pm$  error estándar. N: número de individuos. Talla: talla media  $\pm$  EE (milímetros). TRRN: tiempo de retención de rojo neutro (minutos). %EML: porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (%).

Tratamiento		N	Talla (mm)	TRRN (min)	%EML (%)
Temperatura	Salinidad				
12°C	37-38	16	22,90 $\pm$ 0,33	105,00 $\pm$ 6,71	72,50 $\pm$ 2,40
	32-33	16	22,90 $\pm$ 0,29	65,63 $\pm$ 8,20	60,81 $\pm$ 3,60
	27-28	16	23,37 $\pm$ 0,49	86,25 $\pm$ 11,90	64,13 $\pm$ 5,75
20°C	37-38	16	23,63 $\pm$ 0,48	136,88 $\pm$ 13,13	75,00 $\pm$ 6,67
	32-33	16	22,25 $\pm$ 0,33	169,69 $\pm$ 10,31	80,18 $\pm$ 5,12
	27-28	16	23,23 $\pm$ 0,38	92,81 $\pm$ 19,95	55,94 $\pm$ 6,98
28°C	37-38	16	20,21 $\pm$ 0,58	42,19 $\pm$ 9,89	36,94 $\pm$ 5,40
	32-33	24	21,68 $\pm$ 0,47	19,38 $\pm$ 10,75	30,17 $\pm$ 7,68
	27-28	-	-	-	-

Tabla 4.3. Ensayo de RRN y diferencias significativas entre grupos de salinidades.

Tratamiento		TRRN			%EML		
Temperatura	Salinidad	Test	p.valor	post-hoc	Test	p.valor	post-hoc
12°C	37-38	Anova	0,0154	b	Kruskal-Wallis	0,0265	b
	32-33			a			a
	27-28			ab			ab
20°C	37-38	Kruskal-Wallis	0,0147	ab	Anova*	0,0119	b
	32-33			b			b
	27-28			a			a
28°C	37-38	Kruskal-Wallis	0,0055	b	Kruskal-Wallis	0,3267	a
	32-33			a			a
	27-28						

\* No se cumple la normalidad y se transforman los datos (Arcosenv/LMS/100)

Como se puede comprobar en la figura 4.1, los tratamientos de 12°C y 20°C muestran respuestas invertidas, es decir, que a 12°C tanto la EML como el TRRN de los individuos se ven favorecidos a salinidades de 37-38 PSU, mientras que en el tratamiento a 20°C el %EML y el TRRN se ven favorecidos a salinidades intermedias.

Por otro lado, el %EML presenta menos variabilidad en los resultados entre grupos de salinidades, y como se observa en la figura 4.1 (a) la diferencia del TRRN entre grupos de salinidades es mayor. Cabe destacar que en el tratamiento a 20°C los grupos de salinidades de 37-38 PSU y 32-33 PSU tienen los valores más altos de TRRN, es decir que presentan un menor nivel de estrés de entre los tratamientos ensayados y el grupo de salinidad de 27-28 PSU presenta valores de TRRN similares a los del tratamiento a 12°C, por debajo de los 120 minutos.

En otros bivalvos, se ha encontrado que temperaturas cercanas a 20°C son óptimas para mantener la estabilidad lisosomal de los hemocitos, disminuyendo el TRRN tanto al aumentar como al disminuir la temperatura (Yu y col., 2009) y como se observa en la figura 3.1 se encontraron los niveles óptimos de %EML del ensayo de RRN en el tratamiento a 20°C y obteniendo niveles más severos a 28°C.

Los organismos que se expusieron a condiciones de salinidad de 27-28 PSU alcanzaron niveles de estrés celular moderado tanto a 12°C como a 20°C, sin embargo, todos los individuos murieron tras 21 días de exposición a 28°C; los que se expusieron a condiciones de salinidad de 32-33 PSU alcanzaron niveles de estrés celular moderado a 12°C, sin estrés a 20°C y niveles de estrés severo a 28°C; y los organismos expuestos en condiciones de salinidad de 37-38 PSU alcanzaron niveles de estrés moderado a 12°C, sin estrés a 20°C y un elevado estrés a 28°C. Como se observa todos los organismos expuestos a 28°C independientemente de la salinidad se encontraron por debajo del umbral EAC.

En el tratamiento a 12°C (tabla 4.3) el procedimiento estadístico nos confirmó la existencia de diferencias significativas entre grupos de salinidades, se demostró que el **TRRN** en organismos expuestos a salinidades de 37-38 PSU fue significativamente diferente a los organismos expuestos a 32-33 PSU, pero similar a los organismos expuestos a 27-28 PSU. Los datos correspondientes al **%EML** de los organismos expuestos a 12°C tuvieron el mismo patrón de respuesta.

Los datos correspondientes al **TRRN** de los organismos estudiados a 20°C presentaron diferencias entre los grupos de salinidades como muestra la tabla 4.3. El TRRN de los organismos expuestos a salinidades bajas fue significativamente diferente de los organismos expuestos a salinidades intermedias, pero similar a los expuestos a altas salinidades. Por otro lado, en los resultados del **%EML** de los organismos expuestos a 20°C presentaron diferencias entre grupos de salinidades como se observa en la tabla 4.3. Se demostró que la EML en organismos expuestos a salinidades bajas fue significativamente diferente de los expuestos a salinidades intermedias y altas.

Para los datos de 28°C el **TRRN** presentaba diferencias significativas entre los grupos de salinidades, pues solo se pudo evaluar entre los grupos de 32-33 y 37-38 PSU, debido a que tras 21 días de exposición a 27-28 PSU todos los organismos murieron y no llegamos a obtener resultados del ensayo de RRN. Sin embargo, para los resultados del **%EML** de los organismos expuestos a 28°C se comprobó que no existían diferencias significativas entre los grupos de salinidad.

Como se puede observar en la tabla 4.2 en el tratamiento a 28°C y salinidad 32-33 PSU se utilizaron 8 individuos más para el estudio debido a las anomalías en los resultados, ya que durante el ensayo de RRN muchos de los individuos analizados presentaban claramente hemocitos en condiciones de estrés, y para verificar los resultados se analizaron otros 8 individuos que también dio los mismos resultados. Por otro lado, para el ensayo de RRN se seleccionaron los 16 individuos de mayor talla de cada acuario por distintos motivos, en primer lugar, debido a que se quiso obtener un resultado para individuos adultos y, en segundo lugar, para una mejor extracción de la hemolinfa, ya que organismos pequeños complicaban su extracción. Por este motivo las tallas del ensayo de RRN (tabla 4.2) son ligeramente mayores a las tallas de los individuos utilizados para realizar el índice de condición (tabla 4.4).

En la tabla 4.2 y 4.3 el tratamiento a 28°C y 27-28 PSU de salinidad no presenta resultados debido a la ausencia de individuos por muerte, en estas condiciones los organismos iban falleciendo progresivamente y no se recogieron las tallas de los individuos muertos. Por ello es importante que en investigaciones futuras se recojan también las tallas de los organismos que fallezcan para una mayor información del estudio. A temperatura de 28°C se obtienen los peores resultados para %EML e incluso el 100% mortalidad a salinidades de 27-28 PSU, en el ambiente natural las tellinas podrían sufrir un estrés menos severo debido a la capacidad de enterramiento de estos

organismos como estrategia para evitar las altas temperaturas (Kruft Welton y col., 2024).

Se ha comprobado que cambios en la temperatura y salinidad pueden provocar un estrés reflejado en la estabilidad de la membrana lisosomal de los hemocitos de *D. trunculus* y como muestran varios estudios en otros bivalvos, cambios en estos dos factores comprometen los distintos mecanismos de defensa del individuo (Pourmozaffar y col., 2020, Kruft Welton y col., 2024). Además, estudios realizados con *C. gallina*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* y *Mytilus sp* han demostrado que fluctuaciones de temperatura tanto en laboratorio como en medio natural pueden repercutir en la EML (Camus y col., 2020, Hauton y col., 2001, Carducci y col., 2020).

#### 4.3 Índice de Condición

En la tabla 4.4 y figura 4.2 encontramos los resultados del IC para cada tratamiento junto a su error estándar que se estudió como variable de apoyo para la medición de efectos biológicos en *D. trunculus* contribuyendo a la interpretación de los resultados obtenidos del biomarcador empleado en el ensayo de RRN (Hansson y col, 2017).

Tabla 4.4. Análisis del IC de los organismos de *D. trunculus* expresado como media  $\pm$  EE y las diferencias significativas.

Tratamiento		N	Talla (mm)	IC			
T	S			IC (%)	Test	p.valor	post-hoc
12°C	37-38	13	22,39 $\pm$ 0,23	24,52 $\pm$ 0,45	Anova	<0,0001	b
	32-33	21	23,34 $\pm$ 0,42	24,00 $\pm$ 0,18			b
	27-27	18	22,85 $\pm$ 0,31	22,49 $\pm$ 0,14			a
20°C	REF	25	20,66 $\pm$ 0,20	22,58 $\pm$ 0,14	Kruskal-Wallis	<0,0001	b
	37-38	27	22,27 $\pm$ 0,21	24,38 $\pm$ 0,20			c
	32-33	28	22,48 $\pm$ 0,20	21,91 $\pm$ 0,27			b
	27-28	25	22,17 $\pm$ 0,29	20,13 $\pm$ 0,22			a
28°C	REF	25	19,78 $\pm$ 0,21	24,82 $\pm$ 0,36	Kruskal-Wallis	<0,0001	b
	37-38	8	18,53 $\pm$ 0,59	20,72 $\pm$ 1,56			a
	32-33	20	18,40 $\pm$ 0,50	20,93 $\pm$ 0,49			a
	27-28	-	-	-			-

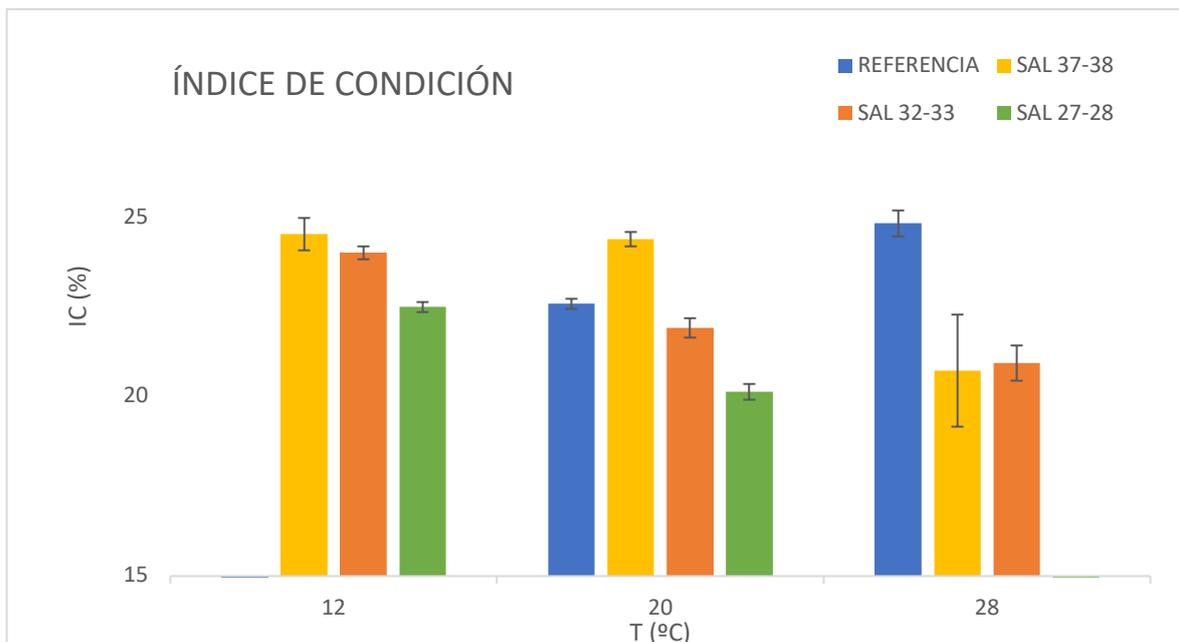


Figura 4.2. Índice de condición expresado gráficamente como media  $\pm$  EE.

Los organismos usados para el cálculo del IC no fueron los mismos que se usaron para el ensayo de RRN, se puede observar que tanto las tallas como el tamaño muestral son distintos. Para el análisis del IC se emplearon los individuos sobrantes del ensayo de RRN, por ello, al igual que en la tabla 4.1, en el tratamiento a 28°C y salinidad de 27-28 PSU no se observan datos ya que el 100% de los organismos de los acuarios fallecieron. No obstante, vemos que los valores de temperatura y salinidad sí son los mismos ya que todas las tellinas usadas para el ensayo de RRN como para el análisis del IC se mantuvieron en los mismos acuarios.

En la tabla 4.4, muestra el IC de referencia para los tratamientos de 20°C y 28°C considerados “tiempo 0”, es decir, el punto de partida ya que los organismos usados en este análisis de referencia no se mantuvieron en ningún acuario, sino que fueron los analizados una vez recogidos del medio natural. Por otra parte, en el tratamiento a 12°C no se realizó ningún análisis referencia debido a la poca cantidad de individuos que se extrajeron del medio natural, por lo que veo importante resaltar que en futuros estudios se recojan los individuos necesarios para realizar el estudio.

Se comprobó la existencia de diferencias significativas entre el IC de los organismos de referencia y los organismos expuestos a condiciones de salinidad y temperatura tras 21 días de exposición (tabla 4.4), a 28°C el IC de referencia ( $24,82 \pm 0,36$ ) fue

marcadamente superior a los valores de los tratamientos a 37-38 y 32-33 PSU de salinidad ( $20,72 \pm 1,56$ ;  $20,93 \pm 0,49$ ; respectivamente) lo que nos informa de que en el medio natural los individuos de *D. trucus* se encontraban en un mejor estado fisiológico que tras 21 días de exposición. Es notable el efecto de elevadas temperaturas, que como se ha demostrado en *C. gallina*, repercuten en las respuestas fisiológicas y resulta en un gran estrés (Moschino y Marin, 2006) como ocurre en el tratamiento a 28°C.

El IC de los tratamientos a salinidades bajas fue siempre significativamente diferente al de los otros grupos de salinidades y al IC de referencia, obteniendo menores valores (tabla 4.4 y figura 4.2) por lo que la salinidad también juega un papel fundamental en el estado general del individuo, como se demuestra en otros estudios, existe poca tolerancia de *D. trucus* adultos a bajas salinidades (Reyes-Martínez y col., 2020).

## 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de fin de máster se ha realizado el estudio de la respuesta basal del biomarcador EML en hemocitos de *D. trunculus*, siguiendo el protocolo establecido para *Mytilus sp.*, bajo determinadas condiciones de salinidad y temperatura.

Los resultados obtenidos demuestran la clara evidencia de cómo afecta la salinidad y la temperatura a la estabilidad de la membrana lisosomal, observándose condiciones de estrés severas a temperaturas de 28°C y llegando incluso a causar la muerte de todos los individuos a salinidades bajas de 27-28 PSU. Además, se han obtenido condiciones de estrés moderado en el tratamiento a 12°C y condiciones de ausencia de estrés para dos tratamientos, correspondientes a 20°C, a 32-33 PSU y a 37-38 PSU, siendo estos los resultados (de %EML y de TRNN) más favorables de todo el experimento superando los criterios de evaluación de fondo (BAC).

Es importante ver la alta mortalidad que aparece en el tratamiento a 28°C, así como los elevados niveles de estrés relacionados con los resultados del %EML y del TRNN. Esto sugiere especial atención dentro del contexto del cambio climático y calentamiento del agua del mar, ya que es probable que los individuos de *D. trunculus* en estas condiciones sufran de un estrés severo perjudicando las poblaciones naturales.

Por último, gracias al índice de condición se ha podido demostrar que los individuos adultos de *D. trunculus* se ven claramente afectados fisiológicamente por las bajas salinidades y altas temperaturas. Los resultados a 27-28 PSU son siempre significativamente distintos a los otros grupos de salinidades y los resultados obtenidos del IC a 28°C son menores que los obtenidos a temperaturas de 12°C y 20°C.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, V., Prieto, A., Licett, B., Longart, Y. y Montes, M. (2011). Rendimiento, índice de condición y esfuerzo reproductivo del mejillón verde *Perna viridis* en cultivo de fondo en el Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 29(4), 399-410.

Andreyeva, A. Y., Kladchenko, E. S. y Gost jinkhina, O. L. (2022). Effect of hypoxia on immune system of bivalve molluscs. *Marine Biological Journal*, 7(3), 3-16.

Ansell, A. D. (1983). The biology of the genus *Donax*. In *Sandy beaches as ecosystems: Based on the Proceedings of the First International Symposium on Sandy Beaches, held in Port Elizabeth, South Africa, 17–21 January 1983* (pp. 607-635). Dordrecht: Springer Netherlands.

Ansell, A. D. y Lagardère, F. (1980). Observations on the biology of *Donax trunculus* and *D. vittatus* at Ile d'Oleron (French Atlantic Coast). *Marine Biology*, 57, 287-300.

Baumgarten, M., Wallner-Kersanach, M. y Niencheski, L. (2010). *Manual de Análises em Oceanografia Química*, Rio Grande

Bayed, A. y Guillou, J. (1985). Contribution à l'étude des populations du genre *Donax*: La population de *D. trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdia (Maroc). *Ann. Inst. Oceanogrèanographique*, 61 (2): Paris, 139–147.

Bocquene G. y Galgani, F. (1998). Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 22, 12pp.

Brock, V. (1993) 'Effects of mercury on physiological condition and content of the biomarker ALA in the oyster "*Ostrea edulis*"', *Marine Ecology Progress Series*, vol. (n. o 96), 169-175.

Camus, L., Grøsvik, B. E., Børseth, J. F., Jones, M. B. y Depledge, M. H. (2000). Stability of lysosomal and cell membranes in haemocytes of the common mussel (*Mytilus edulis*): effect of low temperatures. *Marine Environmental Research*, 50(1-5), 325-329.

Capó-Martí, M. (2007). Principios de Ecotoxicología, Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente. Editorial Tebar. Madrid, España, pp. 139-140.

Carducci, F., Biscotti, M. A., Trucchi, E., Giuliani, M. E., Gorbi, S., Coluccelli, A., ... y Canapa, A. (2020). Omics approaches for conservation biology research on the bivalve *Chamelea gallina*. *Scientific reports*, 10(1), 19177.

Corella, D. y Ordovás, J. M. (2015). Biomarcadores: antecedentes, clasificación y guía para su aplicación en epidemiología nutricional. *Rev. esp. nutr. comunitaria*, 21, 176-187.

Davies, I.M., Gubbins, M., Hylland, K., Maes, T., Martínez-Gómez, C., Giltrap, M., Burgeot, T., Wosniok, W., Lang, T. y Vethaak, A.D. (2012). Technical annex: assessment criteria for biological effects measurements, 209-212. In Davies, I.M., and Vethaak, A.D (Eds). 2012. Integrated monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report No. 315. 277 pp.

Domouhtsidou, G.P. y Dimitriadis, V.K (2001). Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ. Poll.* 115, 123–37.

Escrivá, J. (2020). *Estudio de los bancos explotables de Donax trunculus y Chamelea gallina en el sector sur del Golfo de Valencia y factores ambientales que influyen en su abundancia* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Fernley, P.W., Moore, M.N., Lowe, D.M., Donkin, P. y Evans, S. (2000). Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells. *Mar. Environ. Res.* 50, 451–55.

Gaspar, M. B., Ferreira, R. y Monteiro, C. C. (1999). Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research*, 41(3), 309-316.

Gaspar, M., Chicharo, L., Vasconcelos, P., García, A., Santos, A. R. y Monteiro, C. C. (2002). Depth segregation phenomenon in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) populations of the Algarve coast (southern Portugal). *Scientia Marina*, 66(2), 111-121.

Galdies, C., Viarengo, A., Bolognesi, C. y Tambutté, S. (1999). Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme.

García, M. (2016). Cultivo y reproducción de *Donax trunculus* en laboratorio (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Guerrero-Rios, R.J.; Hernández, N.T.; Espinoza-Rodríguez, N.; Barrios-Garrido, H. Montiel, M. y Morales, F. (2015). Composición de tallas e Índice de Condición de la Almeja Estuarina en Curarire, Estado Zulia, Venezuela. *Zootec. Trop.*, 33, 327–336.

Gunther, A.J., Hardin, D.D., Gold, J., Bell, D. y Davis, J.A. (1999). Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 38 (3), 170-181.

GVA. (2016). Valencian Community clam dredge fishing management plan, 2016. Plan de Gestión de la pesca de moluscos bivalvos mediante dragas en la Comunitat Valenciana, 2016. Unpublished report, for Generalitat Valenciana.

Hansson, T., Thain, J. E., Martínez-Gómez, C., Hylland, K., Gubbins, M. J. y Balk, L. (2017). Supporting variables for biological effects measurements in fish and blue mussel. *ICES Techniques in Marine Environmental Science*, 60.

Harrison, F.L. y Berger, R (1982). Effects of copper on the latency of lysosomal hexosaminidase in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 68, 109–16.

Hauton, C., Hawkins, L. E. y Hutchinson, S. (1998). The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 119(4), 619-623.

Hauton, C., Hawkins, L. E. y Hutchinson, S. (2001). Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 11(2), 143-153.

Julián, V. (2015). Estudio del efecto tóxico de dos contaminantes en la especie *Donax trunculus* mediante el ensayo de retención del rojo neutro.

Koukouzika, N. y Dimitriadis, V. K. (2005). Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: "lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress". *Ecotoxicology*, 14, 449-463.

Kruft Welton, R. A., Hoppit, G., Schmidt, D. N., Witts, J. D. y Moon, B. C. (2024). Reviews and syntheses: The clam before the storm—a meta-analysis showing the effect of combined climate change stressors on bivalves. *Biogeosciences*, 21(1), 223-239.

La Valle, P., Nicoletti, L., Finoia, M. G. y Ardizzone, G. D. (2011). *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) as a potential biological indicator of grain-size variations in beach sediment. *Ecological Indicators*, 11(5), 1426-1436.

Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S. M., & Kepler, T. B. (2004). Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological reviews*, 198(1), 10-24.

Lowe, D. M., Soverchia, C. y Moore, M. N. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic toxicology*, 33(2), 105-112.

Lucas, A. y Beninger, P. G. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44(3), 187-200.

MAPA. (2009). Cultivo de Nuevas Especies de Moluscos Bivalvos de Interés en Hatcheries. JACUMAR. Planes nacionales de cultivos marinos, p. 10.

Markert, B., Wünschmann, S., Marcovecchio, J. y De Marco, S. (2013). Bioindicadores y biomonitores: definiciones, estrategias y aplicaciones. *Procesos Químicos en Estuarios*, 1.

Martínez-Gómez, C., Bignell, J. y Lowe, D. (2015). Lysosomal membrane stability in mussels. ICES techniques in marine environmental sciences No. 56, p. 1-41.

Mason, R. W. (Ed.). (1996). *Subcellular Biochemistry: Biology of the Lysosome*. Plenum Press.

Matozzo, V., Rova, G. y Marin, M. G. (2007) 'Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Morphological characterisation and involvement in immune responses', *Fish & Shellfish Immunology*, vol. (n. o 23), 732-746.

McCarty, L. S., Power, M. y Munkittrick, K. R. (2002). Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. *Human and Ecological risk assessment*, 8(1), 159-164.

McLachlan, A. y Defeo, O. (2018). The ecology of sandy shores, 3 ed. Academic Press.

Miller, B.S., Pine, D.J. y Redshaw, C.J. (2000). An assessment of the contamination and toxicity of marina sediments in the Holy Loch, Scotland. *Marine Pollution Bulletin*, 40 (1), 22-35.

Moore, M.N. (1985). Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 134–139.

Moschino, V. y Marin, M. G. (2006). Seasonal changes in physiological responses and evaluation of "well-being" in the Venus clam *Chamelea gallina* from the Northern Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(4), 433-440

Moschino, V. y Da Ros, L. (2016) 'Biochemical and lisosomal biomarkers in the mussel "Mytilus galloprovincialis" from the Mar Piccolo of Tranto (Ionian Sea, Southern Italy)', *Environmental Science and Pollution Research*, vol. (n. o 23), 12770-12776

Munari, M., Marozzo, V., Chemello, G., Riedl, V., Pastore, P., Badocco, D. y Main, M. G. (2019) 'Seawater acidification and emerging contaminants: A dangerous marriage for haemocytes of marine bivalves', *Environmental Research*, vol. (n. o 175), 11-21.

Novoa, B., Santarém, M. M. y Figueras Huerta, A. (2007). Sistema inmune del mejillón. Influencia de factores externos en los mecanismos de defensa.

Pörtner, H. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 739-761.

Pourmozaffar, S., Tamadoni Jahromi, S., Rameshi, H., Sadeghi, A., Bagheri, T., Behzadi, S., ... y Abrari Lazarjani, S. (2020). The role of salinity in physiological responses of bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1548-1566.

Ramón, M. (1993). Estudio de las poblaciones de *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) y *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Bivalvia) en el Golfo de Valencia (Mediterráneo occidental).

Ramos, C., Agut, A. y Lidon, A. (2002). Nitrate leaching in important crops of the Valencian Community region (Spain). *Environmental Pollution*. 118: 215-223.

Reyes-Martínez, M. J., Martínez-Pita, I., Soler-Navarro, D. y García-García, F. J. (2020). The impact of salinity changes associated with size on the wedge clam *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Bivalvia): A laboratory assay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 241, 106838.

Reyes-Martínez, M. J., Ruiz-Delgado, M. C., Sánchez-Moyano, J. E. y García-García, F. J. (2015). Biodiversity and distribution of macroinfauna assemblages on sandy beaches along the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Scientia Marina*, 79(3), 367-377.

Santos-Martín, F., Montes, F., Alcorlo, P., García-Tiscar, S., González, B., Vidal-Abarca, M.R., Suárez, M.L., Royo, L., Ferriz, I., Barragán, J., Chica, J.A., López, C. y Benayas, J. (2015). La aproximación de los servicios de los ecosistemas aplicada a la gestión pesquera. Fondo Europeo de Pesca, Fundación Biodiversidad del Ministerio de Medio Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, Spain.

SEMARNAT. (2022). Plan de manejo tipo para la conservación y aprovechamiento sustentable de *Tivela stultorum* (almeja) en México. *Secretaría de medio ambiente y recursos naturales*. Disponible: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/762986/PMT\\_Tivela\\_stultorum\\_2022.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/762986/PMT_Tivela_stultorum_2022.pdf) [Último acceso: 07 de noviembre de 2023].

Shaw, W. N. y Hassler, T. J. (1989). *Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (Pacific Southwest): Pismo Clam* (No. 4). The Service.

SiteTemperature.info. (s.f.). "Temperatura del agua del mar en el Mar Mediterráneo." SiteTemperature.info, <https://seatemperature.info/es/mar-mediterraneo-temperatura-del-agua-del-mar.html> [Último acceso: 24 de julio de 2024].

Soon, T. K. y Ransangan, J. (2019). Extrinsic factors and marine bivalve mass mortalities: an overview. *Journal of Shellfish Research*, 38(2), 223-232.

Tamayo, J. (2016). Coquina, Tellina... *Donax trunculus* [En línea]. Disponible en: <http://coquina-tellina.net/> [Último acceso: 07 de noviembre de 2023].

Tamayo, D., Azpeitia, K., Markaide, P., Navarro, E. y Ibarrola, I. (2016). Food regime modulates physiological processes underlying size differentiation in juvenile intertidal mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*, 163, 1-13.

Tebble, N. (1966). British bivalve seashells. A Handbook for Identification. British Museum, Edinburgh, p. 212.

Tlili, S., Métails, I., Ayache, N., Boussetta, H. y Mouneyrac, C. (2011). Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination?. *Chemosphere*, 84(10), 1362-1370.

Tlili, S. y Mouneyrac, C. (2019). The wedge clam *Donax trunculus* as sentinel organism for Mediterranean coastal monitoring in a global change context. *Regional environmental change*, 19(4), 995-1007.

UNEP. (1997). Intercomparison Exercise Concerning Lysosomal Membrane Stability and Metallothionein Analysis. UN-EP(OCA)/MED WG. 132/5. Athens, Greece. pp.1-12.

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

Viarengo, A. (1989). Heavy metals on marine invertebrates: mechanism of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquatic Sciences Review*, 1(2): 295-317.

Wade, B. A. (1967). Studies on the biology of the West Indian beach clam, *Donax denticulatus* Linne. 1. Ecology. *Bulletin of Marine Science*, 17(1), 149-174.

Yu, J. H., Song, J. H., Choi, M. C. y Park, S. W. (2009). Effects of water temperature change on immune function in surf clams, *Macraa veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(1), 30-35.

Zhao, C., Li, X., Luo, S. y Chang, Y. (2011). Assessments of lysosomal membrane responses to stresses with neutral red retention assay and its potential application in the improvement of bivalve aquaculture. *African Journal of Biotechnology*, 10(64), 13968-13973.

Zeng, Y. y Yang, H. (2021). Review of molluscan bivalve condition index calculations and application in Northern Quahogs *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture Research*, 52(1), 23-36.

## RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

ODS 13. Acción por el clima (grado de relación medio)

ODS 14. Vida submarina (grado de relación alto)

El ODS 14 es el de mayor grado de relación con el TFM, ya que se ha analizado la situación de estrés de las poblaciones de *D. trunculus* recogidas en la costa del mar Mediterráneo en la actualidad (2023).

Debido al descenso de las poblaciones naturales de *D. trunculus* en las últimas décadas, se ha visto la necesidad de estudiar los motivos de dicho descenso. La sobrepesca, la contaminación del agua del mar y el aumento de la temperatura se han propuesto como causas que afectan a la supervivencia de las poblaciones naturales de *D. trunculus*.

Además, esta especie tiene un alto valor nutricional en el mercado que provee de proteína animal a la ciudadanía de la UE. Queda confirmada la amenaza del cambio climático sobre *D. trunculus*, gracias al estudio de diversos autores y, por tanto, el objetivo del ODS 14 de conservar y/o proteger la biodiversidad en este sector.