



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Efectos de la salinidad y temperatura sobre el biomarcador
Acetilcolinesterasa en el bivalvo *Donax trunculus*

Trabajo Fin de Máster

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

AUTOR/A: Avila Peralta, Miguel Edmundo

Tutor/a: Falco Giaccaglia, Silvia Laura

Cotutor/a externo: Soms Molina, Paula

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Efectos de la salinidad y temperatura sobre el biomarcador
Acetilcolinesterasa en el bivalvo *Donax trunculus***

MIGUEL EDMUNDO ÁVILA PERALTA

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

Curso Académico 2023/2024

Tutora: Silvia Falco Giaccaglia

Cotutora externa: Paula Soms Molina



This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.11) and by Generalitat Valenciana (THINKINAZUL/2021/005; principle investigator: Miguel Rodilla Alamá).



Resumen

La medición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de descomponer el neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis colinérgicas, se utiliza como biomarcador en diversas especies animales. La inhibición de esta enzima está relacionada con la presencia de compuestos como organofosforados y carbamatos, así como metales pesados e hidrocarburos policíclicos. En este estudio, se evaluó el efecto de los cambios en temperatura y salinidad sobre la actividad de acetilcolinesterasa en el bivalvo *Donax trunculus*.

Tras la recolección y análisis control de individuos, estos fueron llevados al laboratorio, que, tras periodos de aclimatación, fueron expuestos a 9 condiciones diferentes de temperatura-salinidad. Los resultados concretaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los organismos de control y los expuestos a algunas condiciones de temperatura-salinidad. Obteniendo a temperatura 12 °C con rango de salinidad 27-28 y 37-38 valores bajos de actividad AChE.

Palabras clave: ***tellina, coquina, bivalvo, bioindicador, mediterráneo.***

Abstract

Measuring the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which is responsible for breaking down the neurotransmitter acetylcholine in cholinergic synapses, is used as a biomarker in various animal species. The inhibition of this enzyme is related to the presence of compounds such as organophosphates and carbamates, as well as heavy metals and polycyclic hydrocarbons. In this study, the effect of changes in temperature and salinity on acetylcholinesterase activity in the bivalve *Donax trunculus* was evaluated. After the collection and control analysis of individuals, they were taken to the laboratory, which, after periods of acclimatization, were exposed to 9 different temperature-salinity conditions. The results specified the existence of statistically significant differences between the control organisms and those exposed to temperature-salinity conditions. At a temperature of 12 °C with a salinity range of 27-28 and 37-38 low values of AChE activity, was obtained.

Key words: *tellina, coquina, bivalve, bioindicator, mediterranean.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a mi tutora Silvia Falcó por darme la oportunidad de realizar este proyecto y sobre todo por su atención y trato durante este tiempo. También quería agradecer a mi co-tutora Paula Soms, por todas las horas que ha invertido en mí y en este trabajo y por su paciencia y dedicación. En este trabajo debo agradecer también al resto de profesores y compañeros que han participado en la recolección de muestras ya que sin su ayuda no hubiera sido posible realizar el experimento. Así como al apoyo de mi familia, amigos y pareja, cuya motivación y aliento fue una fuente de inspiración y fortaleza.

Agradecer a Miguel Rodilla investigador principal del programa ThinkinAzul del cual forma parte este estudio y al resto de instituciones involucradas directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ECOLOGÍA DE LA ESPECIE	1
1.2. SITUACIÓN DE LA PESCA EN EL GOLFO DE VALENCIA	3
1.3. BIOMARCADORES	4
1.3.a. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ACETILCOLINESTERASA	5
1.3.b. ÍNDICE DE CONDICIÓN.....	6
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. MUESTREO DE INDIVIDUOS	9
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	10
3.3. ANÁLISIS DE ACETILCOLINESTERASA.....	12
3.3.a. Materiales y equipos utilizados	13
3.3.b. Preparación de la muestra	13
3.3.c. Homogenización de la muestra.....	13
3.3.d. Determinación enzimática	14
3.3.e. Determinación de la concentración de proteína por el Método de Lowry	14
3.3.f. Cálculo de resultados	16
3.4. ÍNDICE DE CONDICIÓN	17
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	20
4. RESULTADOS	21
4.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	21
4.2. SUPERVIVENCIA	21
4.3. ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA (AChE)	24
4.4. ÍNDICE DE CONDICIÓN	26
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIÓN	33
7. BIBLIOGRAFÍA	35
8. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030	42

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Especímenes y morfología del organismo <i>Donax trunculus</i> . Fuente: Arias, 2002. [Fotografía e Ilustración].....	2
Ilustración 2. Rastrillo utilizado en el muestreo de individuos. Fuente: Elaboración propia.	9
Ilustración 3. Clasificación en el laboratorio de los organismos. Fuente: Elaboración propia.	10
Ilustración 4. Diseño experimental de las diferentes condiciones de Temperatura-Salinidad con sistema aislado de aireación y filtrado. Fuente: Elaboración propia.	11
Ilustración 5. Preparación de muestras para análisis de absorbancia. Fuente: Elaboración propia.	16
Ilustración 6. Peso de carne húmeda de un individuo. Fuente: Elaboración propia.	19
Ilustración 7. Separación de la carne para ser llevada a la estufa durante 24 h. Fuente: Elaboración propia.	19
Ilustración 8. Supervivencia exposición a 12 °C a tres rangos de salinidad (27-28, 32-33, 37-38). (A): aclimatación y (E): exposición. (Valores representados $\bar{x} \pm e.e.$).	22
Ilustración 9. Supervivencia exposición a 20 °C a tres rangos de salinidad (27-28, 32-33, 37-38). (A): aclimatación y (E): exposición. (valores representados con $\bar{x} \pm e.e.$).	23
Ilustración 10. Supervivencia exposición a 27,5 °C a tres rangos de salinidad (27-28, 32-33, 37-38). (A): aclimatación y (E): exposición. (Valores representados con $\bar{x} \pm e.e.$).	24
Ilustración 11. Gráfico de resultados de AChE (nmol/min*mg) a diferentes condiciones de Temperatura-Salinidad. (N): Número de individuos = 15. (Valores representados con $\bar{x} \pm e.e.$). (A), (B), (C): Grupos homogéneos indicadores de medias sin diferencias significativas.....	26

Ilustración 12. Gráfico de resultados de I.C. (%) a diferentes condiciones de Temperatura–Salinidad. (valores representados con $\bar{x} \pm e.e.$). (N): Número de individuos (28, 30, 32, 30, 26,32, 28, 9, 30) correspondientemente. (A), (B), (C, (D), (E)): Kruskal Wallis-Grupos homogéneos sin diferencias significativas. ... 28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales de Temperatura – Salinidad y días de Aclimatación-Exposición.	11
Tabla 2. Preparación de estándares para determinación proteica.....	15
Tabla 3. Media de parámetros analizados diariamente por experimentación ($\bar{x} \pm e.e.$). Condición: Temp. (Sal.); Temperatura (°C); Salinidad; Oxígeno Disuelto (mg/L); Saturación (%).	21
Tabla 4. Variación de la talla de individuos empleados en AChE (mm). (Valores representados $\bar{x} \pm e.e.$). (T): Temperatura, (S): Rango de Salinidad. (N): Número de individuos.	24
Tabla 5. ANOVA de dos factores, temperatura y salinidad para actividad AChE.	25
Tabla 6. Variación de la talla de individuos empleados en IC ($\bar{x} \pm e.e.$). (N): Número de individuos. (T): Temperatura, (S): Rango de Salinidad.	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ECOLOGÍA DE LA ESPECIE

En las zonas de rompiente de las playas arenosas del mundo, se encuentran diversas especies de almejas siendo el género *Donax* el más representativo de ellos (McLachlan & Defeo, 2018). Dentro del mismo género, es a la especie *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 coloquialmente conocida como tellina, la que se le considera la especie más característica de este tipo de playas en las costas europeas (McLachlan & Defeo, 2018).

D. trunculus es considerado un bivalvo colonizador de playas de arena fina de la zona submareal superior (Tlili & Mouneyrac, 2019; Ansell & Lagardère, 1980) cuya distribución se extiende a lo largo de las Costas Atlánticas y Mediterráneas Francesas, la Península Ibérica y el Norte de África (Ibrahim et al. 2015). En el Mediterráneo estos organismos pueden encontrarse hasta los 4 metros, aunque suelen distribuirse preferentemente entre los 0 y 2 metros de profundidad (Ramón et al. 1995; Gaspar et al. 2002) y entre los 0 y 6 metros en la Costa Atlántica (Gaspar et al. 2002).

Su capacidad para residir y colonizar estos entornos altamente energéticos se debe a su capacidad para enterrarse en el sedimento (Ramón, 1993; Gaspar et al. 1999). Su eficacia en los procesos de excavación y enterramiento, se deben al diseño de su concha, que le permite una fácil penetración en el sedimento (Ramón et al. 1995). Al igual que otros bivalvos endobentónicos, es un importante bioturbador, ya que durante estos procesos resuspende partículas finas de la arena en la columna de agua (Tlili & Mouneyrac, 2019).

Presenta una morfología con una concha de forma triangular o cuneiforme, de borde interno dentado y con escultura lisa (Arduino, 1995), sus valvas presentan desigualdad, con finas bandas concéntricas y radiales (Riedl, 1986). Presenta tonalidades de color blanco, con bandas radiales irregulares, violeta pardo; periostraco amarillento; de parte interna blanca a violeta (Ilustración 1) (Riedl, 1986).

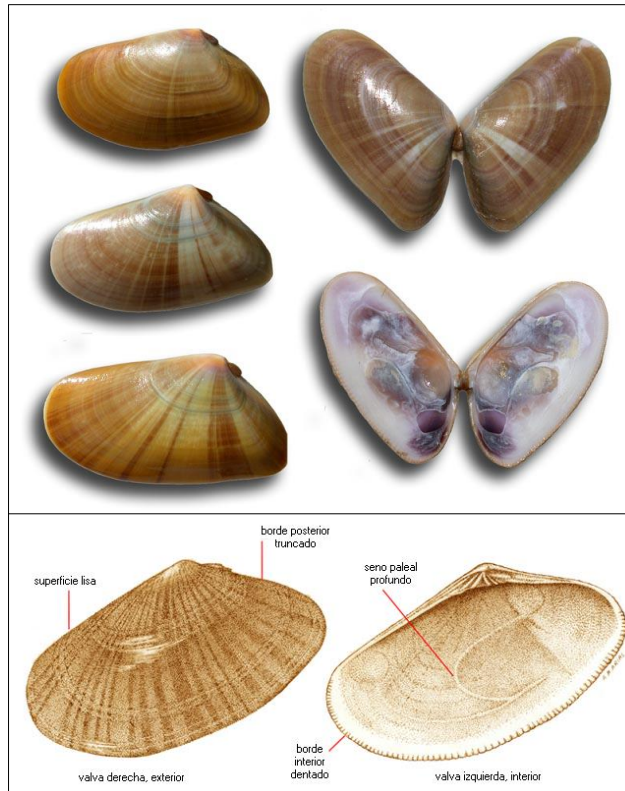


Ilustración 1. Especímenes y morfología del organismo Donax trunculus. Fuente: Arias, 2002. [Fotografía e Ilustración].

En cuanto a su distribución en el medio, la especie presenta una segregación intraespecífica entre individuos juveniles y adultos, donde los juveniles son encontrados en zonas más someras mientras que los adultos son encontrados en zonas más profundas tanto en el Mar Mediterráneo (Manca et al. 2002) como en la Costa Atlántica (Gaspar et al. 2002). Posibles explicaciones para estas variaciones de distribución se basan en estrategias para evitar la competencia intraespecífica (Ansell & Lagardère, 1980), así como la influencia de la hidrodinámica y las corrientes en el desplazamiento de larvas hacia áreas más someras (Gaspar et al. 2002), como también a una mayor disponibilidad de alimento y mayor tolerancia a disminuciones de salinidad para especímenes juveniles en estas áreas más someras (Scheltema, 1971).

Su ciclo gametogénico ha presentado diferencias en el Mediterráneo, dependiendo de las ubicaciones de estudios e investigaciones previas (Tlili & Mouneyrac, 2019). En Camargue, Francia la especie desova entre los meses de abril a septiembre con dos períodos de liberación de gametos (Bodoy & Massé,

1979). En Costas Argelinas el desove se realiza en verano (Mouëza & Frenkiel-Renault, 1973). Mientras que, en el sur de Portugal, el Golfo de Túnez y la Costa Atlántica Marroquí, el período de desove se extiende desde marzo a agosto (Bayed, 1998).

1.2. SITUACIÓN DE LA PESCA EN EL GOLFO DE VALENCIA

Las pesquerías de bivalvos juegan un papel importante en el bienestar social, económico y cultural de muchas comunidades costeras (Gaspar, 2012) siendo un componente significativo de la producción pesquera mundial (Reyes-Martínez et al. 2020).

Dentro de estas pesquerías, la familia Donacidae se considera importante tanto en la pesca artesanal como a pequeña escala (da Costa, 2012), teniendo la especie *D. trunculus* una alta importancia comercial en la cuenca del Mediterráneo (Delgado et al. 2017) principalmente en países como España, Portugal, Francia e Italia (da Costa, 2012). Su alto potencial reproductivo causado por el pequeño tamaño en el que alcanza la madurez sexual y su capacidad para desovar entre decenas de miles y millones de oocitos (Ramón, 1993; Tirado & Salas, 1998) así como la tendencia de estas almejas a formar agregados de altas densidades y ser recolectadas de manera fácil y económica (Castilla & Defeo, 2001) son algunas de las características que hacen tan viable su aprovechamiento.

En el Golfo de Valencia, *D. trunculus* ha sido siempre una especie objetivo debido a su valor comercial. En las últimas dos décadas su pesca ha sido, en mayoría, limitada a las flotas pesqueras de Cullera y Gandía (Escrivá et al. 2021). Entre los años 2004 y 2008, la captura de especímenes en Gandía representaba el 40% del total de capturas del Mediterráneo Español; pero a partir del año 2009 las mismas bajaron hasta un 30%, llegando en el año 2014 al 2% de capturas totales (Escrivá et al. 2021).

La falta de planes de gestión para controlar la presión pesquera contribuyó a una disminución de capturas (Escrivá et al. 2021). La sobreexplotación y gestión inadecuada de las poblaciones llevaron al colapso de la especie en 2015 y tras

el cierre de la pesquería de la zona para aliviar la presión e intentar recuperar la población, no se produjo el aumento esperado de la misma.

El cierre de pesquerías durante periodos de reproducción o reclutamiento ha sido una estrategia utilizada con anterioridad en España y Portugal para evitar comprometer el potencial de reproducción de *D. trunculus* (Lart et al., 2003; Baeta et al. 2018; Orden de la Comunidad de Andalucía de Febrero 22, 2018). En este caso se estimó que tras el cierre de la pesquería se produciría una recuperación de la especie, aunque estudios realizados tras años del cierre de la misma, han demostrado que no se ha producido un crecimiento de su población (Escrivá et al. 2021).

Los resultados actuales, demuestran que los cierres de pesquerías no son siempre efectivos a la hora de incrementar la biomasa comercial, ya que también pueden afectar otras variables como patologías, presencia de contaminantes, cambio climático o el aumento de tasas de depredación (Baeta et al. 2018). Debido a esto, estudios sobre la influencia de variables medioambientales relacionadas con el cambio climático sobre la especie, como la temperatura y salinidad, podrían explicar que no se produzca el crecimiento esperado sobre la misma.

1.3. BIOMARCADORES

Un biomarcador es definido como una variación bio-química, celular, fisiológica o conductual, la cual puede ser medida en el tejido o muestras de fluidos corporales, o a niveles de un organismo completo, que provee evidencia y/o efectos, de uno o más contaminantes (Depledge & Fossi, 1994).

El uso de bivalvos en diversos estudios de biomarcadores o contaminantes se debe a las características que poseen las especies pertenecientes a esta clase; como presentar una amplia distribución geográfica, su movilidad reducida o comportamiento sésil, que les permite reflejar las condiciones locales de su hábitat (Waykar & Deshmukh, 2012). Además de permitir ser manejados tanto en condiciones de laboratorio como en campo, así como en biomonitoreo activo

y/o pasivo (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003). Definiendo biomonitoreo, según Rosenberg (1998), como el uso sistemático de organismos vivos o de sus respuestas para determinar el estado o los cambios en el medio ambiente.

Como fue mencionado con anterioridad, *D. trunculus* es una de las especies bivalvo más importantes de la fauna macrobentónica de zonas someras en las playas arenosas (Ramón et al. 1995; Gaspar et al. 2002). Debido a esto, ha sido utilizado como un bioindicador en multitud de estudios para evaluar toxicidad de una amplia gama de contaminantes ambientales como metales traza o pesticidas, incluso siendo propuesto recientemente, como una especie centinela para el monitoreo del estado ambiental de las playas arenosas por sus características biológicas y fisiológicas (Tlili & Mouneyrac, 2019).

1.3.a. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ACETILCOLINESTERASA

Muchos parámetros biológicos y toxicológicos medidos analizan la toxicidad subletal, incluyendo biomarcadores moleculares y bioquímicos como la neurotoxicidad, la cual puede ser medida analizando los niveles de la actividad enzimática Acetilcolinesterasa (Tlili & Mouneyrac, 2019).

La acetilcolinesterasa (AChE), es la enzima que termina el efecto neurotransmisor de la acetilcolina (ACh). La enzima AChE hidroliza de forma rápida la acetilcolina en acetato y colina, regulando la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008; Massoulié et al. 1993). Su inhibición puede conducir a un control ineficiente de los músculos, reduciendo la capacidad muscular, conllevando a parálisis y en último término la muerte del individuo.

Compuestos químicos como organofosforados y carbamatos, suelen causar inhibiciones de acetilcolinesterasa provocando estimulaciones continuas del sistema nervioso, cambios fisiológicos o conductuales, llevando a la muerte de los organismos (Bautista-Covarrubias et al. 2017). Estudios previos como los realizados por Banaoui et al. (2015) demostraron inhibición de la actividad AChE en *D. trunculus* frente a diferentes biocidas, pero estudios como el de Belabed &

Soltani (2013) o Lamine et al. (2023) demuestran que también se producen alteraciones frente a diferentes metales pesados como el cadmio, plomo, cobre.

Aunque en estudios recientes en diversas especies se ha sugerido que estas respuestas pueden deberse a exposiciones a otros factores. En *D. trunculus* sabemos que diferentes factores naturales pueden afectar su supervivencia y crecimiento, como en el caso de la temperatura (Manca et al. 2012) o la salinidad (Reyes-Martínez et al. 2020). Por lo que se plantea la hipótesis de que la especie puede presentar alteraciones de actividad enzimática (AChE) debido no solamente a la presencia de contaminantes, si no a su vez, a factores abióticos como la temperatura y salinidad.

Para ser capaces de utilizar la actividad enzimática de la AChE como un biomarcador de exposición a neurotoxinas, es crucial entender los diferentes criterios y rangos a los que se considera que en organismo presenta niveles de estrés (Burgeot et al. 2012). En el caso de los bivalvos, sólo se conocen los criterios de evaluación de fondo (BAC) y los criterios de evaluación ambiental (EAC) de la especie *Mytilus edulis*. Resultados de la actividad AChE más altos que el criterio BAC (30 nmol/(min*mg)) indican que los individuos no se encuentran estresados. En el caso de que se encontraran entre los criterios BAC y EAC (21 nmol/(min*mg)) los organismos se consideran con un estrés compensatorio; mientras que, si los resultados se encuentran más bajos que los niveles EAC, estos sugieren que los individuos se encuentran en un nivel de estrés severo.

1.3.b. ÍNDICE DE CONDICIÓN

Según, Zeng & Yang (2021) el Índice de Condición (IC) es un concepto ecológico y fisiológico ampliamente utilizado en animales, para evaluar el estado de salud, el crecimiento, el rendimiento cárnico, la madurez sexual y los efectos del estrés ambiental, basándose su mayoría en la relación de la masa y el tamaño corporal.

En el caso de los moluscos bivalvos, el IC es reconocido por su relevancia en la evaluación de los estados nutricionales, la calidad comercial y la comprensión general de sus ciclos reproductivos (Bodoy et al. 1986; MP, 1990). Siendo la primera descripción encontrada sobre la relación entre la masa corporal, tamaño y rendimiento cárnico de bivalvos desde la primera década de los años 1900, en estudios de ostras cultivadas en acuicultura (Grave, 1912; Zeng & Yang, 2021).

En la actualidad existen diferentes métodos y fórmulas para realizar Índices de condición y estudios como el presentado por Zeng y Yang (2021) que realizan comparativas de diferentes índices, demuestran correlaciones significativas entre variables como tamaño, peso y volumen corporal.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Máster es establecer la respuesta del biomarcador Acetilcolinesterasa en el molusco bivalvo *D. trunculus* bajo condiciones controladas en laboratorio de temperatura y salinidad.

Entre los objetivos específicos establecidos se encuentran:

- Estudiar las alteraciones en los niveles de actividad AChE en las condiciones de temperatura de 12, 20 y 27,5 °C a los diferentes rangos de salinidades 27-28, 32-33 y 37-38.
- Analizar la variación del índice de condición entre las diferentes condiciones de salinidad y temperatura como variable complementaria a los resultados de la actividad AChE.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTREO DE INDIVIDUOS

Los diferentes especímenes de *D. trunculus* fueron recolectados el día 18 de junio, en la Playa dels Marenys de Rafalcaid, localidad de Gandía ($38^{\circ}59'09.6''N$ $0^{\circ}08'55.9''W$).

El muestreo fue realizado mediante el uso de rastrillo con un tamaño de luz de malla de 5 mm (Ilustración 2). Se seleccionaron los especímenes cuya talla fuera superior a 19,5 mm, para alcanzar el peso óptimo para los análisis posteriores de Acetilcolinesterasa. Obteniéndose un total de 522 individuos.



Ilustración 2. Rastrillo utilizado en el muestreo de individuos. Fuente: Elaboración propia.

Tras el muestreo, los individuos fueron preparados para ser llevados al laboratorio para su posterior clasificación y aclimatación. De estos individuos, fueron a su vez separados de forma aleatoria los utilizados para la obtención de valores de referencia de campo para AChE e Índice de condición (Ilustración 3).



Ilustración 3. Clasificación en el laboratorio de los organismos. Fuente: Elaboración propia.

Se recolectó agua a su vez del mismo punto de muestreo a la que fueron realizadas mediciones de temperatura y salinidad, obteniendo como valores de referencia una temperatura de 25,2 °C y salinidad de 37,5.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tanto el diseño del experimento, como las condiciones de aclimatación para los organismos, fueron realizados teniendo en cuenta los factores ecológicos de la especie, así como las condiciones de salinidad y temperatura del Mar Mediterráneo. En este mar, temperaturas entre 13 y 16 °C se alcanzan durante el invierno, y en verano, entre 22 y 27 °C; así como salinidades variables en el rango de 36-38 (Nacef et al. 2016), las cuales pueden presentar valores inferiores en lugares cercanos a desembocaduras de los ríos (Escrivá et al. 2020)

El diseño de este estudio estableció nueve condiciones para las diferentes combinaciones establecidas de salinidad y temperatura visualizados en la tabla 1. Cada una de estas condiciones fue realizada por triplicado, obteniendo tres unidades experimentales para cada combinación de factores.

Tabla 1. Condiciones experimentales de Temperatura – Salinidad y días de Aclimatación-Exposición.

TEMPERATURA	SALINIDAD	Aclimatación (d)	Exposición (d)
12 °C	27 – 28	10	9
	32 – 33	8	9
	37 – 38	7	8
20 °C	27 – 28	12	7
	32 – 33	5	9
	37 – 38	10	8
27,5 °C	27 – 28	9	8
	32 – 33	7	8
	37 – 38	3	7

Las unidades experimentales consistieron en acuarios de unos 20 Litros llenados con agua recolectada en muestreos previos de zonas mar adentro presuntamente no contaminadas, próximas a la Reserva Natural y Marina del Cabo San Antonio. Posteriormente el agua fue filtrada mediante una red de fitoplancton con un tamaño de malla de 50 µm para favorecer la eliminación de microorganismos presentes. Cada unidad experimental contó con un tamaño de muestra de 16 individuos y con su propio sistema aislado de aireación y filtrado, con recirculación del agua. Exceptuando, los acuarios exposición de 27,5 °C, que contaron con 19 individuos en cada unidad, debido a la observación previa de una elevada mortalidad a temperaturas cercanas a 28 °C (Ilustración 4).

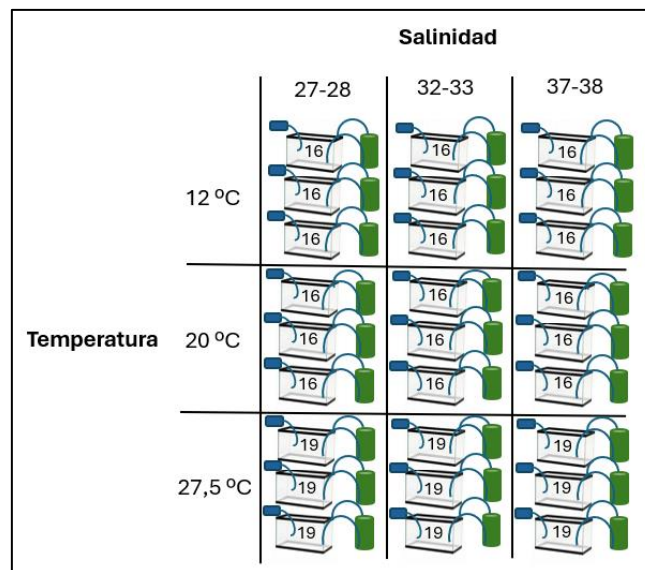


Ilustración 4. Diseño experimental de las diferentes condiciones de Temperatura-Salinidad con sistema aislado de aireación y filtrado. Fuente: Elaboración propia.

Previo al tiempo de exposición para cada tratamiento, fue requerido un período de aclimatación de los individuos en función de las condiciones de referencia de temperatura y salinidad, y las condiciones objetivo de cada tratamiento. Durante este período, la temperatura y la salinidad fue aumentada o disminuida diariamente entre 1-2 (°C), hasta alcanzar los valores objetivos (tabla 1). Para facilitar este proceso y mantener un mayor control de las variables, tanto en la aclimatación de los organismos, como en el tiempo de exposición, se utilizaron calentadores para los tratamientos de mayor temperatura y el uso de cámaras termostatzadas para los de temperaturas de 12 y 20 °C. En ambos casos, se contaba con un fotoperíodo alternando cada 12 horas, luz y oscuridad. Los individuos fueron alimentados diariamente, con el cultivo de microalgas *Isochrysis galbana* presente en el laboratorio de organismos (E-001) de la Universidad Politécnica de Valencia, campus de Gandía.

Durante los periodos de aclimatación, como exposición se recolectaron datos de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, saturación y mortalidad para cada acuario de forma diaria. La temperatura y la salinidad fueron medidos utilizando la sonda WTW Model 340i (WTW GmbH, Weilheim, Germany) y los parámetros de oxígeno disuelto y saturación mediante proODO YSI (YSI Inc. Yellow Springs, OH, USA). Se consideró la mortalidad de los individuos, cuando se encontraran los mismos con las valvas abiertas y sin responder ante estímulos mecánicos (Soms-Molina et al. 2024).

3.3. ANÁLISIS DE ACETILCOLINESTERASA

Los análisis para la determinación de los niveles de Acetilcolinesterasa fueron basados en la metodología empleada por Bocquené & Galgani (1998) y Ellman et al. (1961). Los análisis se dividen en la determinación enzimática y de concentración de proteínas por el método de Lowry.

3.3.a. Materiales y equipos utilizados

Tanto para la preparación de la muestra, como para el análisis de las mismas, se emplearon materiales de laboratorio como balanza, instrumentos de disección, agitadores magnéticos, tubos criogénicos, vasos de precipitado, tubos graduados, homogenizadores mecánicos, tanque de almacenaje para nitrógeno líquido y pipetas Pasteur y automáticas. Entre los equipos utilizados fue necesario el uso de un ultracongelador, centrifugadora con procesos de refrigeración y un espectrofotómetro para realizar las mediciones de absorbancia necesarias.

3.3.b. Preparación de la muestra

Cada una de las muestras de tejidos analizadas consistió en la toma del músculo del pie de 5 organismos de una misma unidad experimental tras el período de exposición. Anotando el peso y la talla de cada individuo. Por lo tanto, cada determinación de AChE se realizó a partir de un pool compuesto por 5 organismos de una misma unidad experimental

Tras la extracción de las muestras, estas fueron congeladas por medio de nitrógeno líquido y llevadas al ultracongelador, para mantenerse viables hasta su análisis.

3.3.c. Homogenización de la muestra

- 1) Se pesó entre 0,1 y 1 g de músculo del ejemplar congelado (Bocquené & Galgani, 1998).
- 2) Se homogenizaron las muestras de músculo compuesta por 5 ejemplares de la misma unidad experimental en 2 volúmenes de solución tampón (1:2) en un homogeneizador mecánico sumergido en hielo.
- 3) La muestra fue traspasada a tubos de rosca para utilizarse en la centrifugadora en un programa de 30 minutos a 11000 r.p.m. a temperatura de 4 °C.
- 4) El sobrenadante fue extraído con una pipeta y transferirlo a un vial ámbar para su análisis.

3.3.d. Determinación enzimática

Reactivos utilizados:

- Solución A: Buffer de TRIS a 0,1M con pH 7,5 mezclado con HCl al 35%.
- Solución B: DTNB a 0,01M. Su preparación consistió en la mezcla de 5 mL de solución A por cada 0,0198 g de DTNB.
- Solución C: Acetilcolina a 0,1M ACTC. Por cada ml de solución B, 0,0289 g de Acetilcolina.

Procedimiento

La reacción fue preparada directamente en la cubeta del espectrofotómetro de la siguiente manera:

- Blanco: 80 μ L de DTNB + 50 μ L de muestra + 1190 μ L de TRIS (agitar).
- Reacción: 80 μ L de DTNB + 50 μ L de muestra + 1190 μ L de TRIS + 40 μ L de Acetilcolina (agitar).

Finalmente, las muestras fueron medidas en el espectrofotómetro a una absorbancia de 405 nm a diferentes tiempos de 30, 60, 90 y 120 segundos.

3.3.e. Determinación de la concentración de proteína por el Método de Lowry

Reactivos utilizados:

- Solución A: 2% relación Peso/Volumen de Na_2CO_3 en agua destilada. Se preparó 5 g de Na_2CO_3 en 250 mL de H_2O destilada.
- Solución B: 1% relación Peso/Volumen de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada. Preparación de 0,1 g de CuSO_4 en 10 mL.
- Solución C: 2% relación Peso/Volumen de Tartrato de Sodio y Potasio en agua destilada. Preparación de 0,2 g en 10 mL.
- Reactivo Mixto: Solución A + Solución B + Solución C a proporción 100:1:1 respectivamente. Se preparó antes de su utilización.

- Solución Hidróxido de Sodio 2N
- Reactivo Folin: Se realizó una disolución del reactivo comercial (1/2) del reactivo comercial.
- Estándares: Solución madre de proteína estándar. 100 mg de proteína en 50 mL de H₂O destilada.

Preparación de estándares:

Se trabajó por duplicado para mayor exactitud en la curva de calibrado (tabla 2).

Tabla 2. Preparación de estándares para determinación proteica.

Concentración (mg/mL)	0	0,1	0,5	1	2
Volumen H ₂ O (mL)	25	23,75	18,75	12,5	0
Volumen solución madre (mL)	0	1,25	6,25	12,5	25

Procedimiento:

- Se añadió 0,1 mL de muestra o solución estándar a 0,1 mL de solución de NaOH 2N. Se dejó calentar a 100°C durante 10 minutos en baño maría hirviendo para hidrolizar la muestra.
- Permitir que la muestra se enfríe a temperatura ambiente y añadir 1 mL de reactivo mixto recién preparado, volver a dejar reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadió 0,1 mL de reactivo de Folin, se mezcló con un vórtex y dejó reposar 40 minutos a temperatura ambiente. Es importante mezclar rápidamente después de añadir el reactivo de Folin para asegurar reproducibilidad.
- La absorbancia fue medida a longitud de onda de 550 nm (Ilustración 5).
- Se elaboró una curva estándar de absorbancias en función de la concentración de proteína inicial y se utilizó para determinar el contenido proteico en la muestra.



Ilustración 5. Preparación de muestras para análisis de absorbancia. Fuente: Elaboración propia.

3.3.f. Cálculo de resultados

Se calculó el valor de los niveles de Acetilcolinesterasa (AChE) para cada muestra analizada en base a las siguientes fórmulas:

$$A = \varepsilon * C * l$$

Donde:

A (o D.O.) = absorbancia

ε = Coeficiente de extinción molar (L/M*cm): absorbancia de una sustancia 1 M a un pH y λ determinados cuando se mide en una cubeta de 1 cm de paso de luz.

C = Concentración de soluto (mol/l)

l = Longitud de paso de luz o paso óptico (suele ser 1 cm).

AChE = D.O. / ($\varepsilon * l$).

Var D.O./min: es la D.O./min Reacción menos D.O./min Blanco menos 0.012. Este último valor (0.012) es el cambio en la densidad óptica por minuto de acetiltiocolina sola, en ausencia de la muestra. La acetiltiocolina tiene una degradación espontánea que se corresponde con el valor de 0.012

El Coeficiente de extinción molar posee un valor de $1,36 \times 10^4$. Lo que correspondería a resultados de la actividad en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Pero al buscar

expresar los resultados de la actividad en $\mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, simplificamos multiplicando el coeficiente por 1000.

El valor de proteínas es igual a la cantidad de mg/mL resultante de los pasos anteriores y tras obtenerse la actividad enzimática en una disolución de 50 μL de muestra dentro de un Volumen final de 1360 μL , ajustamos la dilución.

Al buscar explicar los resultados en miliunidades o nanomoles, estos se multiplican por 1000, obteniendo la fórmula:

$$\frac{\text{mU AChE}}{\text{mg prot}} = \left(\frac{\Delta D.O./\text{min} * \text{vol final Reacción det enz}}{13.6 * \text{vol muestra det enz} * [\text{proteína}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \right) * 1000$$

Donde:

$$\frac{\Delta D.O.}{\text{min}} = \text{Variación de Absorbancia/ min de cada muestra}$$

$$\text{vol final Reacción det enz} = 1360 \mu\text{L}$$

$$\text{Coeficiente de extracción molar} = 13,6$$

$$\text{vol muestra det enz} = 50 \mu\text{L}$$

$$[\text{proteína}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) = \text{Valor de proteínas obtenido del extracto de músculo}$$

Que corresponde a:

$$\frac{\text{mU AChE}}{\text{mg prot}} = \frac{\text{nmol}}{\text{min} * \text{mg prot}}$$

3.4. ÍNDICE DE CONDICIÓN

Para realizar el cálculo del Índice de Condición en bivalvos, como fue mencionado, pueden emplearse diversas ecuaciones. En el presente trabajo se empleó el IC basado en la ecuación de Shaw et al. (1967):

$$IC (\%) = \frac{\text{Peso carne seca (g)}}{\text{Peso de carne húmeda (g)}} \times 100$$

Donde:

Peso de carne seca = Peso total de la carne del individuo tras eliminar su humedad.

Peso de carne húmeda = Peso total de la carne del individuo sin ningún tratamiento previo.

El IC fue realizado en los organismos recién recolectados, utilizándolo como el IC de referencia de campo (el estado de salud de los organismos recién recolectados), este fue utilizado para comparar el estado de los mismos con el de los organismos tras la exposición.

Procedimiento:

- Se seleccionaron al azar entre 8 y 11 individuos de cada acuario o unidad experimental. Anotándose la talla de cada uno.
- Por medio del uso del bisturí, los individuos fueron abiertos, dejándose escurrir valvas abiertas boca abajo, sobre papel absorbente para eliminar el agua intervalvar.
- Transcurrido el tiempo, se procedió al peso de los individuos uno a uno mediante el uso de una báscula de precisión.
- Se extrajo el tejido blando, la carne del individuo y fue colocada sobre crisoles, previamente clasificados y pesados; para su posterior peso en la báscula (Ilustración 6).
- Las valvas de los individuos y su tejido blando, fueron llevados a la estufa a una temperatura de 100 °C durante 24 h para eliminar la humedad.

- Tras el periodo de 24 h, las muestras fueron extraídas de la estufa y colocadas en un desecador durante 30 min (Ilustración 7).
- Se procedió a realizar el peso de las muestras, para obtener los valores de peso en seco de las mismas.

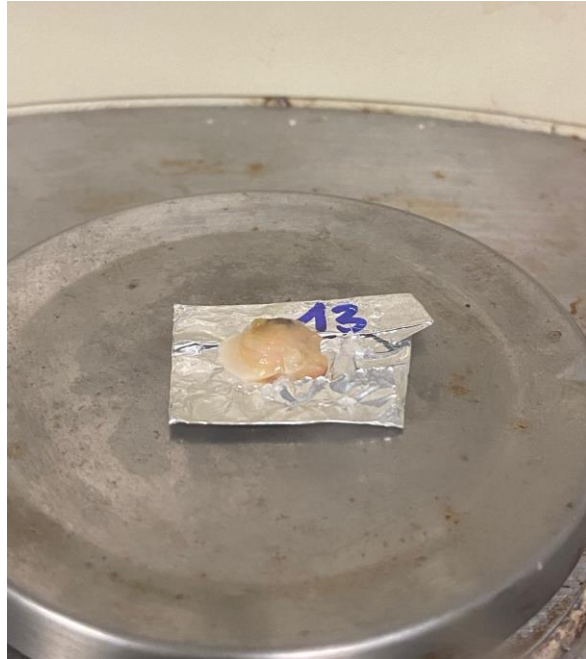


Ilustración 6. Peso de carne húmeda de un individuo. Fuente: Elaboración propia.

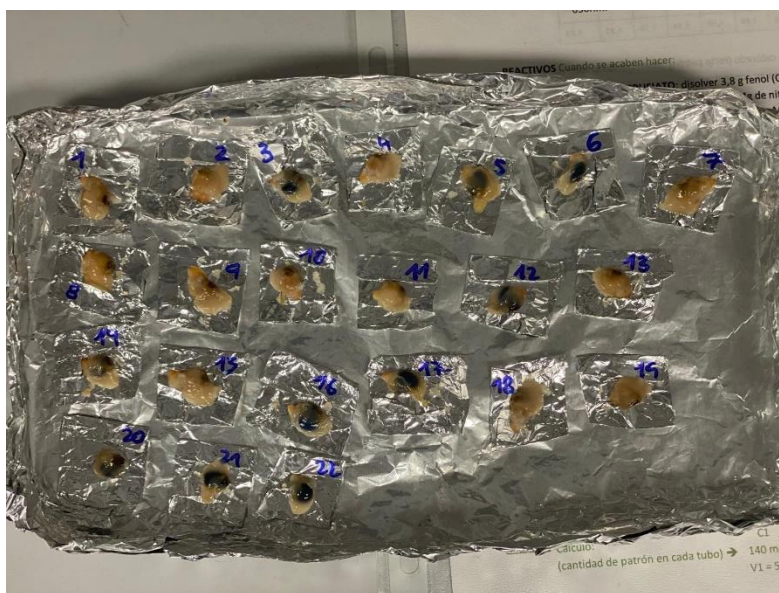


Ilustración 7. Separación de la carne para ser llevada a la estufa durante 24 h. Fuente: Elaboración propia.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos son expresados como media \pm error estándar ($\bar{x} \pm e.e.$). El tratamiento de los mismos empleó el uso de los softwares Microsoft Excel y Statgraphic v. 19.

Antes de realizar el análisis estadístico, tanto para los datos de AChE e IC, se analizaron las condiciones de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene's). Los datos de AChE cumplieron dichas condiciones por lo que se realizó un ANOVA de dos factores (temperatura y salinidad) para observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas debidas a dichos factores. Para identificar cuáles condiciones diferían significativamente entre sí, se llevó a cabo una la prueba de Rangos Múltiples con un nivel de confianza del 95%. El método utilizado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher.

Por otro lado, los datos de IC cumplieron las condiciones de normalidad, pero no las de homocedasticidad. Por ello, se realizó un ANOVA de Kruskal-Wallis con el ajuste de Bonferroni para observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

4. RESULTADOS

4.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES

En la tabla 3 se resumen los datos de los diferentes parámetros y condiciones experimentales. Los valores observados son resultado de la media de las 3 unidades experimentales de cada condición de temperatura-salinidad a lo largo de 7-9 días del período de exposición.

Todas las unidades experimentales demostraron valores cercanos a la temperatura objetivo para cada condición, así como las salinidades medias se mantuvieron dentro del rango establecido. En el caso del oxígeno disuelto, los valores analizados para las condiciones de temperaturas a 12 °C demostraron ser los más elevados, mientras que las condiciones a 27,5 °C obtuvieron los valores más bajos; encontrándose todas por encima de una saturación del 100%.

Tabla 3. Media de parámetros analizados diariamente por experimentación ($\bar{x} \pm e.e.$). Condición: Temp. (Sal.); Temperatura (°C); Salinidad; Oxígeno Disuelto (mg/L); Saturación (%).

Condición	Temperatura	Salinidad	Oxígeno Disuelto	Saturación
12 °C (27-28)	12,35 ± 0,11	27,50 ± 0,05	8,66 ± 0,03	101,37 ± 0,04
12 °C (32-33)	12,49 ± 0,15	32,64 ± 0,07	8,67 ± 0,03	101,32 ± 0,08
12 °C (37-38)	12,36 ± 0,15	37,68 ± 0,06	8,68 ± 0,03	101,31 ± 0,10
20 °C (27-28)	20,27 ± 0,11	27,56 ± 0,04	7,48 ± 0,02	101,40 ± 0,14
20 °C (32-33)	19,69 ± 0,12	32,81 ± 0,07	7,49 ± 0,02	100,80 ± 0,09
20 °C (37-38)	20,48 ± 0,22	37,80 ± 0,06	7,40 ± 0,04	100,92 ± 0,19
27,5 °C (27-28)	27,74 ± 0,07	27,72 ± 0,08	6,49 ± 0,02	100,02 ± 0,23
27,5 °C (32-33)	27,87 ± 0,06	32,92 ± 0,06	6,47 ± 0,01	100,24 ± 0,18
27,5 °C (37-38)	27,78 ± 0,08	37,86 ± 0,07	6,51 ± 0,02	100,50 ± 0,16

4.2. SUPERVIVENCIA

Temperatura 12 °C

Los resultados de supervivencia demostraron que durante el periodo de aclimatación no hubo mortalidad en ningún individuo a las diferentes salinidades (Ilustración 8).

Durante el periodo de exposición en cambio, sí se produjo una leve mortalidad de individuos. Concretamente, a condiciones de salinidad de 27–28 la supervivencia de los individuos fue del 95,83%, en el rango de salinidad de 32–33 el porcentaje fue de 97,92% y para el rango de 37-38 fue del 100%.

Por lo que apreciamos que a temperatura 12 °C tanto en el periodo de aclimatación como de exposición la supervivencia de los individuos es muy alta.

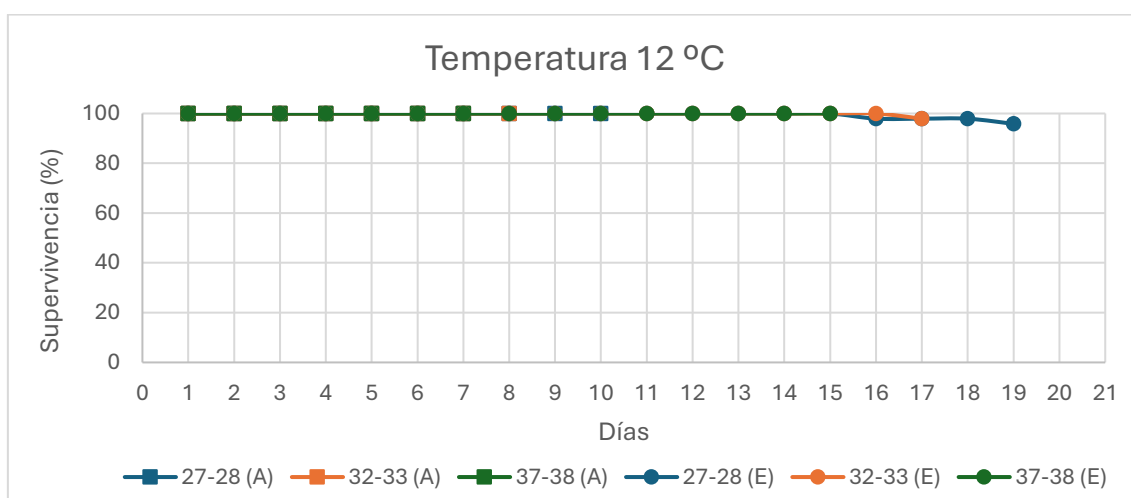


Ilustración 8. Supervivencia exposición a 12 °C a tres rangos de salinidad (27-28, 32-33, 37-38). (A): aclimatación y (E): exposición. (Valores representados $\bar{x} \pm e.e.$).

Temperatura 20 °C

A temperatura 20 °C para el rango de salinidad de 27-28 se produjo la supervivencia del 93,75% de los individuos (Ilustración 9). Produciéndose la mortalidad de individuos durante el periodo de exposición.

En la exposición a salinidad 32-33, el porcentaje de supervivencia fue de 97,92% La mortalidad del individuo que se produjo resultó durante el último día de exposición.

En el rango de salinidad de 37-38, la supervivencia fue de 89,58%, disminuyendo la misma, desde el periodo de aclimatación de los organismos.

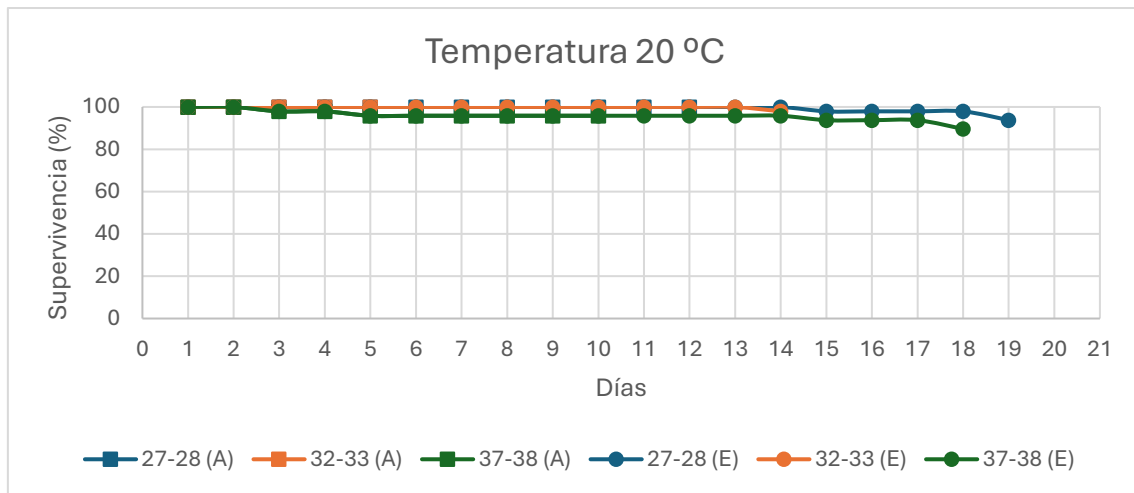


Ilustración 9. Supervivencia exposición a 20 °C a tres rangos de salinidad (27-28, 32-33, 37-38). (A): aclimatación y (E): exposición. (valores representados con $\bar{x} \pm e.e.$).

Temperatura 27,5 °C

En los diferentes rangos de salinidades a las exposiciones de temperatura de 27,5 °C, la supervivencia de los individuos se vio fuertemente afectada desde el periodo de aclimatación de los individuos (Ilustración 10).

En el rango de salinidad de 27-28 no se produjo supervivencia de individuos. El porcentaje de supervivencia disminuyó, como fue mencionado, desde el periodo de aclimatación, impidiendo que se culminara el periodo de exposición e impidiendo los análisis de los organismos expuestos a esas salinidades.

Para la exposición a salinidad de 32-33, el porcentaje de supervivencia de individuos fue igual al 42,11%. Mientras que para el rango de 37-38 se produjo un porcentaje más alto de individuos igual a 78,95%.

Los resultados denotan que las exposiciones de temperatura a 27,5 °C representan un mayor riesgo para la supervivencia de los individuos de la especie *D. trunculus*. Indicando como a esta temperatura y con una exposición a un rango de salinidad de 27-28 se produjo la mortalidad de todos los individuos.

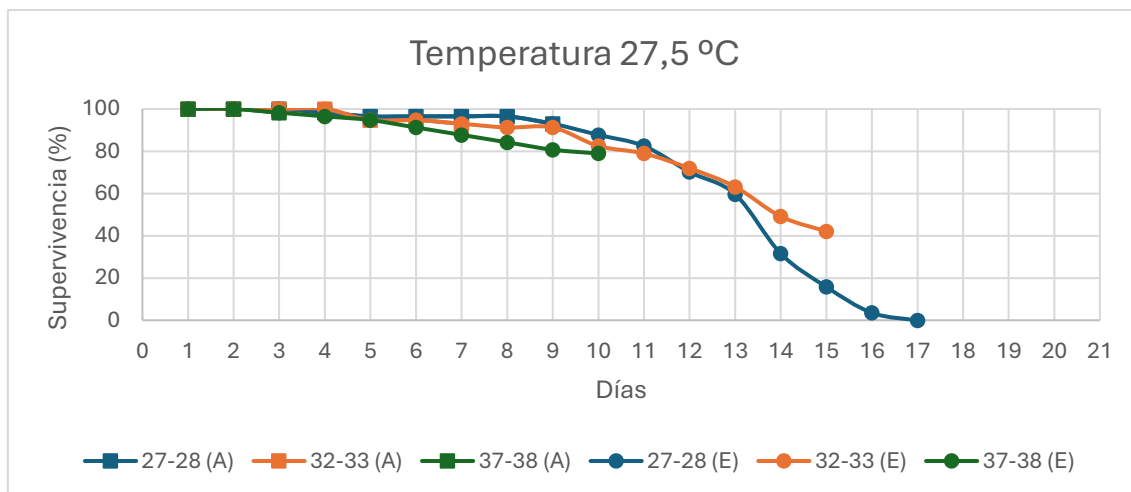


Ilustración 10. Supervivencia exposición a 27,5 °C a tres rangos de salinidad (27-28, 32-33, 37-38). (A): aclimatación y (E): exposición. (Valores representados con $\bar{x} \pm e.e.$).

4.3. ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA (AChE)

Las tallas de los organismos utilizados para análisis de AChE son presentados en la tabla 4, para cada condición se emplearon de muestra 15 organismos (5 de cada unidad experimental). Para los individuos de referencia de campo, los valores fueron de $21,22 \pm 0,46$ (mm). Mientras que los individuos empleados a las diferentes condiciones presentaron valores medios mayores, en caso de la exposición a 27,5 °C con rango de salinidad 37-38 su valor fue ligeramente inferior a las demás condiciones con $22,98 \pm 0,42$.

Tabla 4. Variación de la talla de individuos empleados en AChE (mm). (Valores representados $\bar{x} \pm e.e.$). (T): Temperatura, (S): Rango de Salinidad. (N): Número de individuos.

Valores	N	Talla (mm)
Referencia de campo	15	$21,22 \pm 0,46$
T (12° C)	S (27-28)	$23,49 \pm 0,48$
	S (32-33)	$23,66 \pm 0,46$
	S (37-38)	$23,25 \pm 0,44$
T (20 °C)	S (27-28)	$23,35 \pm 0,39$
	S (32-33)	$23,38 \pm 0,48$
	S (37-38)	$22,81 \pm 0,39$
T (27,5 °C)	S (32-33)	$23,37 \pm 0,40$
	S (37-38)	$22,98 \pm 0,42$

Los datos de AChE cumplieron las condiciones de normalidad (Shapiro-Wilk = 0,616) y homocedasticidad (Levene's = 0,3372) de los datos. El ANOVA de dos factores (temperatura y salinidad) obtuvo que ambos factores tuvieron un efecto estadísticamente significativo (p -valor $<0,05$) sobre la AChE con un 95% de nivel de confianza (Tabla.5).

Tabla 5. ANOVA de dos factores, temperatura y salinidad para actividad AChE.

Factor	GI	Razón F	P-valor
Temperatura	3	3,23	0,0431
Salinidad	3	3,48	0,0341

Los resultados de los análisis para la actividad AChE realizados permitieron comprobar los niveles tanto en los individuos de referencia de campo, muestreados en condiciones de temperatura de 25,2 °C y salinidad de 37,5; así como en los expuestos a las diferentes condiciones experimentales. Se observaron diferencias estadísticamente significativas de la AChE entre las diferentes condiciones (p -valor = 0,0398) y la prueba de Rangos Múltiples reveló tres grupos homogéneos (ilustración 11). Cabe destacar que para las temperaturas de 27,5 °C la nula supervivencia de individuos ante el rango de salinidad de 27-28, imposibilitó una comparativa con los demás valores a otras condiciones.

Realizando una comparativa con los valores de referencia de campo ($21,23 \pm 2,61$ nmol/(min*mg)), los resultados demostraron una diferencia estadísticamente significativa con los individuos de las condiciones a 12 °C con salinidades de 27–28 y 37–38 ($11,53 \pm 1,77$ y $13,37 \pm 1,20$, respectivamente).

A temperatura 12 °C los rangos de salinidades de 27–28 y 37–38 poseen diferencias significativas con el rango de 32–33 ($22,40 \pm 3,74$), el cual la AChE fue significativamente mayor. En el caso de los valores de 20 °C los diferentes rangos de salinidad no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($16,33 \pm 2,34$; $21,77 \pm 2,56$ y $22,27 \pm 3,47$). Lo mismo ocurrió con los resultados a temperatura de 27,5 °C (salinidades 32-33 y 37-38), que fueron estadísticamente iguales ($14,20 \pm 1,19$ y $15,90 \pm 3,24$, respectivamente).

Desde el punto de vista de las exposiciones desde los rangos de salinidad, 27-28 no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los organismos

expuestos a 12 y 20°C. Por otro lado, a una salinidad de 32-33 y 27,5°C, la AChE fue significativamente menor en comparación con la de 12°C, pero estadísticamente igual que a 20°C. Por último, a una salinidad de 37-38, no se observaron diferencias entre los organismos a 20°C y 27,5 °C, pero sí a 12°C, donde los niveles fueron significativamente menores.

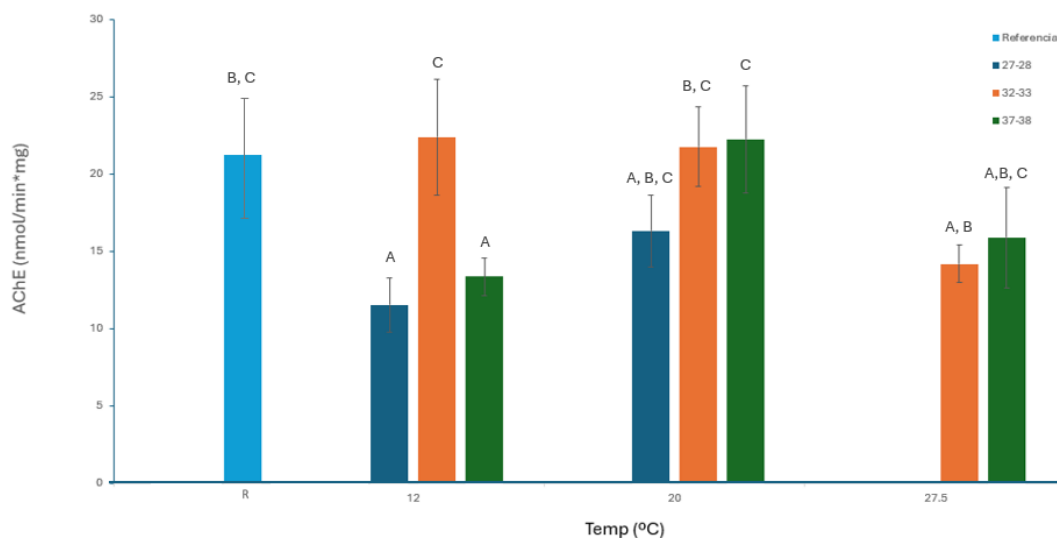


Ilustración 11. Gráfico de resultados de AChE (nmol/min*mg) a diferentes condiciones de Temperatura-Salinidad. (N): Número de individuos = 15. (Valores representados con $\bar{x} \pm e.e.$). (A), (B), (C): Grupos homogéneos indicadores de medias sin diferencias significativas.

4.4. ÍNDICE DE CONDICIÓN

El análisis del Índice de Condición como fue mencionado se realizó en organismos diferentes a los empleados en los análisis de Acetilcolinesterasa, debido a la imposibilidad de realizarse sobre los mismos individuos. Debido a esto, los individuos expuestos a las condiciones de temperatura 27,5 °C y salinidad 27–28 no pudieron contemplarse en la realización del análisis por causa de la alta mortandad de los mismos a esas condiciones.

Los tamaños de los organismos utilizados para el IC se observan en la tabla 6. La talla de los organismos de referencia de campo, a temperatura de 25,2 °C y salinidad de 37,5 fue de $21,06 \pm 0,44$ (mm). Estos individuos presentaron un

menor tamaño, cuyos valores más próximos fueron los de exposiciones a temperatura de 27,5 °C. En cambio, las exposiciones al resto de temperaturas demostraron una talla superior, con resultados similares entre ellas.

Tabla 6. Variación de la talla de individuos empleados en IC ($\bar{x} \pm e.e.$). (N): Número de individuos. (T): Temperatura, (S): Rango de Salinidad.

Valores	N	Talla (mm)
Referencia de campo	28	21,06 ± 0,44
T (12° C)	S (27-28)	23,47 ± 0,30
	S (32-33)	23,47 ± 0,19
	S (37-38)	23,60 ± 0,23
T (20 °C)	S (27-28)	23,35 ± 0,26
	S (32-33)	23,68 ± 2,24
	S (37-38)	23,71 ± 0,29
T (27,5 °C)	S (32-33)	22,60 ± 0,64
	S (37-38)	22,14 ± 0,30

En la ilustración 12 se observan los resultados para los individuos de referencia obtenidos en campo y los expuestos a las diferentes condiciones experimentales (%). El ANOVA de Kruskal-Wallis reveló 5 grupos homogéneos.

Los valores de referencia de campo ($23,54 \pm 0,30$) fueron significativamente mayores en comparación a las diferentes condiciones (p -valor = 0,000), menos a los organismos expuestos a temperatura de 20 °C y rango de salinidad de 27-28 y 37-38.

Los individuos expuestos a temperaturas de 12 °C no mostraron diferencias significativas a pesar de la variación de salinidad ($21,76 \pm 0,31$; $20,53 \pm 0,15$ y $21,16 \pm 0,41$). A diferencia de los de temperaturas superiores de 20 y 27,5 °C que si presentaron diferencia entre ellos con el cambio de salinidad. En el caso de temperatura a 20 °C, y salinidad igual a 32-33 ($20,37 \pm 0,16$), los valores fueron significativamente menores que a las otras dos salinidades ($22,53 \pm 0,35$ y $24,11 \pm 0,38$ respectivamente). Igualmente ocurrió en el caso de los individuos a temperaturas de 27,5 °C, cuyos valores para el rango de salinidad 32-33 ($18,38 \pm 0,28$) resultaron significativamente menores y estadísticamente diferentes a los de salinidad 37-38 ($22,16 \pm 0,35$).

Atendiendo a la salinidad de 27–28 para las temperaturas de 12 y 20 °C no se observaron diferencias significativas. Igualmente, a salinidades de 32-33, los resultados permitieron visualizar que no existen diferencias estadísticas significativas. Por el contrario, en el caso de las salinidades de 37–38 la temperatura de 20 °C los organismos presentaron un IC mayor en comparación a las otras dos temperaturas estudiadas.

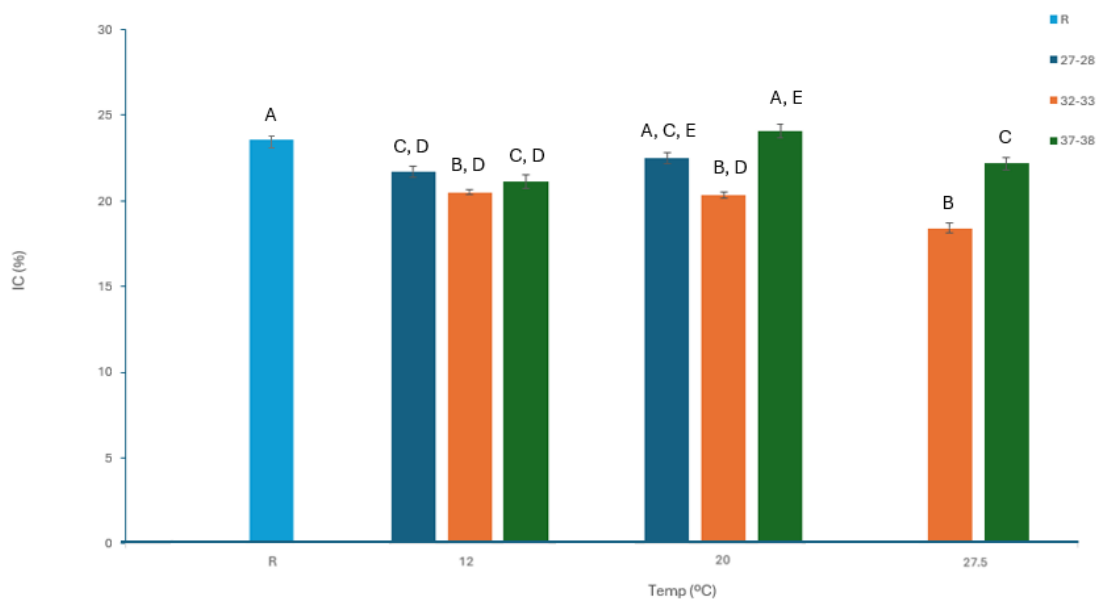


Ilustración 12. Gráfico de resultados de I.C. (%) a diferentes condiciones de Temperatura–Salinidad. (valores representados con $\bar{x} \pm e.e.$). (N): Número de individuos (28, 30, 32, 30, 26, 32, 28, 9, 30) correspondientemente. (A), (B), (C), (D), (E)): Kruskal Wallis-Grupos homogéneos sin diferencias significativas.

5. DISCUSIÓN

Los cambios en condiciones ambientales como temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, disponibilidad de alimentos producen alteraciones en las funciones inmunitarias y fisiológicas en los bivalvos (Kruft Welton et al. 2024; de Almeida et al. 2021; Munari et al. 2019).

Interacciones entre dos o más variables ambientales pueden causar cambios en otras variables (Soon, 1971), como disminución en el oxígeno disuelto (O.D.), llegando a generar estrés en los organismos (Matozzo et al. 2005). En nuestro estudio, estas variables se mantuvieron controladas.

La temperatura y salinidad se mantuvo constante siguiendo los rangos establecidos para cada condición, al igual que los controles de O.D. y saturación permitieron mantener los niveles por encima del 100% de saturación. Las condiciones de temperaturas a 12 °C presentaron los niveles más altos de O.D. y saturación, debido a que, al disminuir la temperatura, aumenta la solubilidad manteniendo mayores niveles de O.D. en el agua.

Ambos factores, temperatura y salinidad, son considerados factores de estrés con efectos individuales (Doney et al. 2009) o sinérgicos (Harvey et al. 2013) sobre los organismos marinos. En el caso de *D. trunculus* la especie demuestra una tolerancia frente a cambios en ambos factores (Reyes-Martínez, 2020; Soms-Molina et al. 2024).

En los organismos marinos se han demostrado diversos efectos adversos debido al estrés térmico, como: reducción de disponibilidad de oxígeno (Sokolova & Pörtner, 2003), daño oxidativo (Taylor & Maher, 2010), reducción de función de biomoléculas, disminución del crecimiento (Múgica et al. 2015), mortalidad (Soria et al. 2007). Igualmente, en el caso de la salinidad, cambios en la misma, pueden producir efectos como cambios de comportamiento, en la reproducción, respiración, osmorregulación y la muerte (Domínguez et al. 2020).

Los resultados experimentales demostraron supervivencia de la especie en todas las exposiciones a excepción de la temperatura 27,5 °C y salinidad de rango 27-28. Existiendo una supervivencia altamente superior en las

temperaturas de 12 °C con respecto a las de 27,5 °C. En experimentos similares como el realizado por Soms-Molina et al. (2024) en la especie *D. trunculus* con exposiciones de temperaturas y salinidades parecidas, la mortalidad de individuos resultó en la mortalidad del 100% de los individuos en las mismas condiciones de exposición temperatura-salinidad. Por lo que se puede indicar una predisposición de mortalidad de la especie bajo estas condiciones.

Según Sokolova et al. (2013) el límite superior de tolerancia térmica está determinado por la capacidad del sistema ventilatorio/circulatorio para suministrar suficiente oxígeno y satisfacer sus demandas de oxígeno. En el Mediterráneo, en algunos períodos se alcanzan temperaturas superiores a 27,5 en verano, pero las mismas no se mantienen constantes de forma diaria. Por lo que se debe tener en cuenta que las condiciones de exposición a temperaturas constantes de 27,5 °C, en el periodo de exposición, a las que se produjo la alta mortalidad de individuos podría deberse tanto al efecto acumulativo, como la posibilidad de potenciación de la salinidad a esta temperatura. Considerando que la condición a esta temperatura con rango de salinidad de 37-38 mantuvo un tiempo de aclimatación y exposición más corto, que el rango de 27-28.

En el medio, la especie *D. trunculus* posee la capacidad de enterrarse en el sedimento (Ramón, 1993) y según Kruff Welton et al. (2024) especies infaunales como esta, podrían utilizar su capacidad para excavar, como estrategia para evitar las altas temperaturas. Por lo que se debería considerar el impacto de la ausencia de sedimento en las condiciones experimentales realizadas.

Con respecto a la actividad AChE, los valores de referencia de campo muestreados en condiciones de temperatura de 25,2 °C y salinidad de 37,5 en una zona presuntamente libre de contaminantes, fueron semejantes a los obtenidos en estudios anteriores como el de Banaoui et al. (2015) y Tlili et al. (2010), en este último estudio, los valores para la actividad AChE en el sitio de referencia corresponden a valores entre 15 y 30 nmol/(min*mg) con diferentes análisis mensuales.

Los valores de referencia de campo de nuestro estudio, determinaron valores iguales a $21,23 \pm 2,61$ nmol/(min*mg). Según los criterios BAC establecidos a 30 nmol/(min*mg) y EAC a 21 nmol/(min*mg) para la especie *Mytilus edulis*,

demostraría que los individuos posiblemente se encontraban en un estado de estrés compensatorio, ya que los niveles se sitúan en el intervalo de los criterios. Esto podría deberse ya sea a que la zona de muestreo o el sitio de extracción de agua podría contener algún posible contaminante o que estos criterios para *D. trunculus* podrían ser diferentes a los *M. edulis*.

Los diferentes niveles medidos en los organismos expuestos con respecto a los organismos de referencia de campo, demostraron tener diferencias significativas entre las diferentes condiciones, evidenciando que en la especie *D. trunculus*, este biomarcador es sensible a variaciones en las condiciones de ambos factores (temperatura y salinidad) con resultados estadísticamente significativos. Así como en diversos estudios en invertebrados marinos, como Cailleaud et al. (2007), para la especie *Eurytemora affinis*; Menezes et al. (2006), en el camarón *Crangon crangon* y Scaps & Borot (2000) para el poliqueto *Nereis diversicolor*; que demuestran estas variaciones en los niveles de este biomarcador según variaciones en las condiciones de temperatura y salinidad.

Los valores de referencia de campo obtenidos, fueron ligeramente superados por las exposiciones de 12 °C y 32-33 de salinidad, así como a temperatura 20 °C con salinidades en rango 32-33, 37-38. Según Hochachka and Somero (1984), está establecido que el aumento de temperatura induce de manera significativa la expresión de la actividad AChE. Pero en nuestro estudio, los resultados de actividad más elevados se produjeron a temperaturas de 20 °C y a la condición de 12 °C con rango de salinidad de 32-33, mientras que los más bajos se obtuvieron a temperatura de 27,5 °C y a 12 °C para salinidades de 27-28 y 37-38. Resultados como el estudio de Kamel et al. (2014) en la especie *Mytilus galloprovincialis* demostraron valores de actividad AChE más altos a sus temperaturas establecidas más bajas (18,1 °C) frente a las temperaturas establecidas más altas (29,1 °C).

Entre los valores analizados a las exposiciones de 12 °C los individuos presentaron en el rango de salinidad de 27-28 y 37-38, los valores más bajos. Menezes et al. (2006) sobre la especie *Crangon crangon* también obtuvo resultados semejantes, obteniendo niveles de AChE más bajos en exposiciones a las temperaturas menores de análisis (9 °C frente a 20 y 25 °C). Aunque, denotar que, en esta temperatura, en el rango de salinidad de 32-33 se obtuvo

el valor más alto. Esto evidencia los efectos sinérgicos y la influencia entre los factores de temperatura y salinidad. Mayores estudios sobre las respuestas de este biomarcador son necesarios para comprender su variación frente a las diferentes condiciones.

Analizando los resultados obtenidos con los criterios BAC y EAC, se interpreta que para las condiciones de temperatura a 12 °C con rango de salinidad 32-33 y 20 °C a salinidad de 32-33 y 37-38 se encuentran en un estado de estrés compensatorio. Mientras que las demás condiciones se interpretan como individuos que se encontraban a un nivel de estrés severo. Indicando que estos criterios están determinados para la especie *M. edulis*, lo que podría suponer diferencias con *D. trunculus*.

Por otra parte, el índice de condición demostró que los individuos presentaban valores con diferencias estadísticas entre ellos. Interpretando que se han producido variaciones en el estado de salud y el nivel de estrés de los individuos expuestos. Estos resultados se asemejan en algunos valores observados en las mediciones de los niveles de AChE en las diferentes condiciones, obteniendo la temperatura de 20 °C los valores en más elevados. Así como diferencias, como los altos valores a temperatura 12 °C de actividad AChE obtenidos en el rango de salinidad de 32-33, que en el caso del IC no se demostraron igual de elevados.

Se aprecia como los valores más bajos son los obtenidos a diferentes temperaturas con rangos de salinidad de 32-33. Mientras que rangos de salinidad de 27-28 y 37-38 a temperaturas de 20 °C presentan junto a los valores de referencia de campo, los porcentajes más elevados. La salinidad del Mediterráneo suele encontrarse entre el rango de 36-38, por lo que se intuiría que los valores de 37-38 a diferentes temperaturas presentarían niveles más elevados, pero la posible acción sinérgica de la temperatura podría producir esas alteraciones en los organismos.

Habiendo obtenido resultados que demuestran variaciones significativas entre los organismos expuestos a diferentes condiciones y a sabiendas de la situación actual de *D. trunculus* en el Golfo de Valencia; variaciones en temperatura y salinidad, vinculadas al cambio climático, podrían estar afectando a la supervivencia de la especie, mediante alteraciones de la actividad AChE.

6. CONCLUSIÓN

- Los resultados del estudio de la especie *D. trunculus* frente a las diferentes condiciones de temperatura (12, 20, 27,5 °C) y rangos de salinidad (27-28, 32-33, 37-38) indican que estos factores abióticos juegan un papel crucial en la supervivencia, actividad enzimática y el estado general de los organismos.
- En lo que respecta a la supervivencia, se observó que a temperaturas de 12 °C la mortalidad fue mínima, con supervivencias superiores al 95% de los organismos expuestos. Sin embargo, en temperaturas de 27,5 °C, la supervivencia disminuyó drásticamente, llegando al 0% en los organismos expuestos al rango de salinidad de 27-28. Esto sugiere que *D. trunculus* es más vulnerable a estas temperaturas más elevadas, especialmente cuando se presentan condiciones de salinidades más bajas.
- En cuanto a la actividad AChE, los organismos expuestos a las temperaturas 20 y 27,5 °C no mostraron una actividad estadísticamente diferente a los individuos de referencia de campo; lo que sugiere que estas condiciones resultaron menos estresantes. En cambio, las condiciones más estresantes sugieren ser las temperaturas de 12 °C a rangos de salinidad de 27-28 y 37-38.
- Los resultados sugieren que la actividad AChE en *D. trunculus* además de verse alterada por la presencia de contaminantes como organofosforados o carbamatos, así como metales pesados, como demuestran estudios anteriores; puede verse alterada por la exposición a diferentes condiciones de temperatura-salinidad.
- El Índice de Condición mostró a su vez, diferencias significativas entre las condiciones de exposición. Solamente los individuos expuestos a temperaturas de 20 °C y salinidades de 27-28 y 37-38 presentaron valores estadísticamente similares a los individuos de referencia de campo. Para el resto de las condiciones los rangos de salinidad de 32-33, a las diferentes temperaturas, presentaron los valores más bajos.
- En conjunto, los resultados sugieren que los efectos individuales y sinérgicos de las diferentes condiciones de temperatura y salinidad afectan el estado

fisiológico de *D. trunculus*, lo que podría llegar a influir en la distribución y supervivencia de la especie en el medio natural.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ansell, A. D., & 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.
- Arduino, G. (1995). Catalogo illustrato delle conchiglie marine del Mediterraneo. Amici del Museo "F. Eusebio" Via Paruzza la – 12051. ALBA (CN).
- Arias A. M. Mercado Municipal de Isla Cristina. Fotografía. Ilustración. 2002. http://www.ictioterm.es/nombre_cientifico.php?nc=194
- Baeta, M., Breton, F., Ubach, R., & Ariza, E. (2018). A socio-ecological approach to the declining Catalan clam fisheries. *Ocean & Coastal Management*, 154, 143-154.
- Banaoui A., El Hamidi F., Kaaya A., Bouhaimi A., Zekhnini A., Moukrim A. (2015) Assessment of multimarker responses in *Perna perna*, *Mytilus galloprovincialis* and *Donax trunculus* bivalves exposed to malathion and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticides. *J Mater Environ Sci* 6:1678–1683.
- Bautista-Covarrubias, J. C., Villaseñor, M., Bueno, A., Gutiérrez, D., Voltolina, D., & Frías-Espericueta, M. G. (2017). Cholinesterase activity in *Crassostrea* sp. Of Nayarit (NW Mexico) coastal waters. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33(2), 215-220. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.02.03>
- Bayed, A. (1998). Variabilité de la croissance de *Donax trunculus* sur le littoral marocain. *Dynamique des populations marines. Marine populations dynamics*, 11-23.
- Bodoy, A. & Massé, H. (1979). Quelques paramètres permettant de suivre la production organique d'un Mollusque Bivalve au cours d'un cycle saisonnier. *Colloque national «ECOTRON»-Mécanismes et contrôle de la production biologique marine–Systèmes clos artificiels, écosystèmes littoraux–Brest, France, 3-6 juillet 1978.*
- Bodoy, A., Prou, J., & Berthome, J.-P. (1986). Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). *Haliotis*, 15, 173-182.

- Burgeot, T.; Bocquené, G.; Forget-Leray, J.; Guilhermino, L. Martínez-Gómez, C & Lehtonen, K. (2012). Background document: acetylcholinesterase assay as a method for assessing neurotoxic effects in aquatic organisms. In Davies, I., and Vethaak, A. (Eds). 2012. Integrated monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report No. 315. 277.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., & Forget-Leray, J. (2007). Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(4), 841-849.
- Castilla, J. C., & Defeo, O. (2001). Latin American benthic shellfisheries: emphasis on co-management and experimental practices. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 11, 1-30.
- da Costa, F., 2012. Chapter 1. Introduction to the biology of clams. In: da Costa Gonzalez, F. (Ed.), Clam Fisheries and Aquaculture. Nova Publishers, New York, NY.
- de Almeida, J. M. B., Gaspar, M. B., Castro, M., & Rufino, M. M. (2021). Influence of wind, rainfall, temperature, and primary productivity, on the biomass of the bivalves *Spisula solida*, *Donax trunculus*, *Chamelea gallina* and *Ensis siliqua*. *Fisheries Research*, 242, 106044.
- Delgado, M., Silva, L., Gómez, S., Masferrer, E., Cojan, M., & Gaspar, M. B. (2017). Population and production parameters of the wedge clam *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) in intertidal areas on the southwest Spanish coast: Considerations in relation to protected areas. *Fisheries Research*, 193, 232-241.
- Depledge, M. H., & Fossi, M. C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3, 161-172.
- Domínguez, R., Vázquez, E., Woodin, S. A., Wethey, D. S., Peteiro, L. G., Macho, G., & Olabarria, C. (2020). Sublethal responses of four commercially important bivalves to low salinity. *Ecological Indicators*, 111, 106031.
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., & Kleypas, J. A. (2009). Ocean acidification: the other CO₂ problem. *Annual review of marine science*, 1(1), 169-192.

- Escrivá, J., Rodilla, M., Llario, F., & Falco, S. (2021). The Collapse of a Wedge Clam Fishery in the Spanish Mediterranean Coast and Recovery Problems. *Journal of Shellfish Research*, 40(1), 37-47. <https://doi.org/10.2983/035.040.0105>
- Escrivá, J., Rodilla, M., Martin-Diaz, J. P., Estruch, V. D., Sebastiá-Frasquet, M. T., Llario, F., & Falco, S. (2020). Driving forces that structure sublittoral macrobenthic communities in sandy beaches along environmental gradients. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 233, 106517.
- Gaspar, M. B., Ferreira, R., & 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., & 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.
- Gaspar, M., Barracha, I., Carvalho, S., Vasconcelos, P., 2012. Chapter 12. Clam fisheries worldwide: main species, harvesting methods and fishing impacts. In: da Costa Gonzalez, F. (Ed.), *Clam Fisheries and Aquaculture*. Nova Publishers, New York, NY.
- Grave, C. (1912). A manual of oyster culture in Maryland, The Fourth Report of the Maryland Shellfish Commission. The Fourth Report of the Maryland Shellfish Commission, 1-75.
- Harvey, B. P., Gwynn-Jones, D., & Moore, P. J. (2013). Meta-analysis reveals complex marine biological responses to the interactive effects of ocean acidification and warming. *Ecology and evolution*, 3(4), 1016-1030.
- Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (2002). *Biochemical adaptation*. Princeton University Press, New York.
- Ibrahim, R. M., Mohammad, S. H., Mohamed, S. Z., & Morsy, Z. S. (2015). *Aspects on the reproductive cycle of Donax semistriatus and Donax trunculus (Mollusca: Bivalvia) in Idku, Egypt*. *Indi Journal of Geo-Marine Sciences*, 44, 287-296.

- Kamel, N., Burgeot, T., Banni, M., Chalghaf, M., Devin, S., Minier, C. & Boussetta, H. (2014). Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 6108-6123.
- Lamine, I., Elazzaoui, A., Ben-Haddad, M., Agnaou, M., Moukrim, A., & Ait Alla, A. (2023). Integrated biomarker responses and metal contamination survey in the wedge clam *Donax trunculus* from the Atlantic coast of Morocco. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(13), 38465-38479.
- Lart, W., Jacklin, M., Horton, R., Ward, N., Arkely, K., Misson, T., Allan, P., Savage, T., Lart, G., & Berthou, P. (2003). *Evaluation and improvement of shellfish dredge design and fishing effort in relation to technical conservation measures and environmental impact:[ECODREDGE CT98-4465]*. Seafish Report CR 198-200 - ISBN 0 903941 46 5. Institutionnelle de l'Ifremer.
- Manca, M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A., & Ardizzone, G. D. (2002). Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic coast (Italy). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 54(6), 971-982.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Vallette, F.-M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiology*, 41(1), 31-91.
- Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Papi, T., Cattani, O., & Marin, M. G. (2005). Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*: I. Effects on immune responses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 325(2), 163-174.
- McLachlan, A., & O. Defeo. (2018). *The ecology of sandy shores* (3rd edition). Academic Press. 572.
- Menezes, S., Soares, A. M., Guilhermino, L., & Peck, M. R. (2006). Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335(1), 114-122.

- Mouëza M. & Frenkiel-Renault L (1973) Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche) dans l'Algérois: la reproduction. *Cah Biol Mar*, 14, 261–283.
- Múgica, M., Sokolova, I. M., Izagirre, U., & Marigómez, I. (2015). Season-dependent effects of elevated temperature on stress biomarkers, energy metabolism and gamete development in mussels. *Marine environmental research*, 103, 1-10.
- Munari, M., Matozzo, V., Chemello, G., Riedl, V., Pastore, P., Badocco, D., & Marin, M. G. (2019). Seawater acidification and emerging contaminants: A dangerous marriage for haemocytes of marine bivalves. *Environmental research*, 175, 11-21.
- Nacef, L.; Bachari, N.E.I.; Bouda, A.; Boubnia, R. Variability and Decadal Evolution of Temperature and Salinity in the Mediterranean Sea Surface. *Int. J. Eng. Geosci.* 2016, 1, 24–33.
- Oehlmann, J. & Schulte-Oehlmann, U. (2003). Molluscs as bioindicators. En *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*. (Vol. 6, 577-635). Elsevier.
- Orden de la comunidad de Andalucía de Febrero 22, 2018. Orden de 22 de febrero de 2018, por la que por la que se establecen las tallas mínimas de captura y épocas de veda para los moluscos bivalvos y gasterópodos de la Comunidad Autónoma de Andalucía (BOJA 41, de 27 de febrero de 2018).
- Kruft Welton, R. A., Hoppit, G., Schmidt, D. N., Witts, J. D., & 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.
- 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)*. PhD Thesis, University of Barcelona, Spain.
- Ramón, M., Abelló, P., & Richardson, C. A. (1995). Population structure and growth of *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) in the western Mediterranean. *Marine Biology*, 121, 665-671.

- Reyes-Martínez, M. J., Martínez-Pita, I., Soler-Navarro, D., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106838>.
- Riedl, R. (1986). Flora y fauna del Mar Mediterráneo. Ediciones Omega, Barcelona.
- Rosenberg D.M. (1998) A National Aquatic Ecosystem Health Program for Canada: we should go against the flow. *Bull Entomol Soc Can*, 30, 144–152.
- Sánchez-Chávez, G. & Salceda, R. (2008). Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 44-51.
- Scaps, P., & Borot, O. (2000). Acetylcholinesterase activity of the polychaete *Nereis diversicolor*: effects of temperature and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 125(3), 377-383.
- Scheltema, R.S., (1971). The dispersal of the larvae of shoal-water benthic invertebrate species over long distribution by ocean currents. In: Crisp, D.J. (Ed.), 4th European Marine Biology Symposium. Cambridge Press, 7–28.
- Shaw, W., Tubiash, H., & Barker, A. M. (1967). Freeze-drying for determining total solids in shellfish. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 24(6), 1413-1417.
- Sokolova, I. M., & Pörtner, H. O. (2003). Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *Journal of experimental Biology*, 206(1), 195-207.
- Soms-Molina, P., Martínez-Gómez, C., Zuñiga, E., Rodilla, M., & Falco, S. (2024). Effects of Temperature and Salinity on the LMS (Lysosomal Membrane Stability) Biomarker in Clams *Donax trunculus* and *Chamelea gallina*. *Applied Sciences*, 14(7), 2712.
- Soon, T. K., & Ransangan, J. (2019). Extrinsic factors and marine bivalve mass mortalities: an overview. *Journal of Shellfish Research*, 38(2), 223-232.

- Soria, G., Merino, G., & von Brand, E. (2007). Effect of increasing salinity on physiological response in juvenile scallops *Argopecten purpuratus* at two rearing temperatures. *Aquaculture*, 270(1-4), 451-463.
- Taylor, A. M., & Maher, W. A. (2010). Establishing metal exposure–dose–response relationships in marine organisms: illustrated with a case study of cadmium toxicity in *Tellina deltoidalis*. *New oceanography research developments: marine chemistry, ocean floor analyses and marine phytoplankton*, 1-57.
- Tirado, C., & Salas, C. (1998). Reproduction and fecundity of *Donax trunculus* L., 1758 (Bivalvia: Donacidae) in the littoral of Málaga (southern Spain). *Journal of Shellfish Research*, 17(1), 169-176.
- Tlili, S., Métais, I., Boussetta, H. & Mouneyrac, C. (2010). Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. *Chemosphere*, 81(6), 692-700.
- Tlili, S., & Mouneyrac, C. (2019). The wedge clam *Donax trunculus* as sentinel organism for Mediterranean coastal monitoring in a global change context. En *Regional Environmental Change* (Vol. 19, Número 4, 995-1007). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10113-018-1449-9>
- Waykar, B., & Deshmukh, G. (2012). Evaluation of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88, 48-53.
- Zeng, Y., & Yang, H. (2021). Review of molluscan bivalve condition index calculations and application in Northern Quahogs *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture Research*, 52(1), 23-36.

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

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				x
ODS 2. Hambre cero.				x
ODS 3. Salud y bienestar.				x
ODS 4. Educación de calidad.				x
ODS 5. Igualdad de género.				x
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				x
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				x
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				x
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				x
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				x
ODS 11: Ciudades y comunidades sostenibles.				x
ODS 12. Producción y consumo responsables.				x
ODS 13. Acción por el clima.		x		
ODS 14. Vida submarina.	x			
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				x
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				x
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				x

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto

El presente TFM, titulado “Efectos de la salinidad y temperatura sobre el biomarcador Acetilcolinesterasa en el bivalvo *Donax trunculus*” se encuentra relacionado con los Objetivos de Desarrollo Sostenible 13 y 14.

Objetivo 13: Acción por el clima. El trabajo se relaciona con este ODS al investigar cómo factores abióticos como la temperatura y salinidad, afectarán a la especie *D. trunculus* en condiciones controladas reflejando cambios que podrían suceder debido al cambio climático.

Objetivo 14: Vida submarina; promueve la conservación y uso sostenible de los océanos. Contribuyó en su mayoría a este objetivo, al analizar si los cambios en factores abióticos como temperatura y salinidad, en condiciones controladas, alteraban los niveles de actividad AChE en la especie *D. trunculus*, Sugiriendo la posibilidad de que estas alteraciones lleguen a afectar su supervivencia en el medio natural. Además de analizar y determinar alteraciones en este biomarcador, que ayuda a monitorizar la salud de los ecosistemas marinos, facilitando la detección temprana de problemas ambientales.