



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

CAMPUS DE **GANDIA**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Evaluación de biomarcadores en *Donax trunculus* en
playas del sur del Golfo de Valencia

Trabajo Fin de Máster

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

AUTOR/A: Castaño Roldán, Gabriela

Tutor/a: Falco Giaccaglia, Silvia Laura

Cotutor/a externo: Soms Molina, Paula

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

Resumen— *Donax trunculus* es un bivalvo bentónico de gran valor ecológico y socioeconómico en las playas arenosas del Mediterráneo, utilizado como organismo centinela en programas de monitoreo ambiental. En el sur del Golfo de Valencia, sus poblaciones han sufrido un drástico colapso sin evidencias de recuperación desde la prohibición de su pesca en 2015. En el presente trabajo se evalúa la respuesta de dos biomarcadores, la estabilidad de la membrana lisosomal (LMS) y la actividad de acetilcolinesterasa (AChE), junto con el índice de condición (IC), en poblaciones de *D. trunculus* de cinco playas del sur del Golfo de Valencia, en invierno y en primavera. Los resultados evidenciaron una marcada variabilidad espacio-temporal, con valores más elevados de LMS e IC en invierno y un deterioro generalizado en primavera, coincidiendo con el vaciamiento gonadal. La AChE no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos, aunque se observó una tendencia a valores más altos en primavera, probablemente modulada por la temperatura. El análisis factorial reveló un gradiente térmico-fisiológico que relaciona el aumento de temperatura con mayor actividad enzimática pero menor estabilidad celular y condición fisiológica. Estos hallazgos confirman el potencial de *D. trunculus* como especie centinela y subrayan la necesidad de establecer valores de referencia específicos para su aplicación en programas de monitoreo ambiental.

Palabras clave— *bivalvos, monitoreo ambiental, estabilidad de la membrana lisosomal, acetilcolinesterasa, índice de condición.*

Abstract— *Donax trunculus* is a benthic bivalve of high ecological and socio-economic value in the sandy beaches of the Mediterranean, used as a sentinel organism in environmental monitoring programs. In the southern Gulf of Valencia, its populations have undergone a drastic collapse with no evidence of recovery since the fishing ban established in 2015. In this study, the response of two biomarkers, lysosomal membrane stability (LMS) and acetylcholinesterase (AChE) activity, together with the condition index (CI), is evaluated in *D. trunculus* populations from five beaches in the southern Gulf of Valencia during winter and spring. The results show a marked spatio-temporal variability, with higher LMS and CI values in winter and a generalized deterioration in spring, coinciding with gonadal depletion. AChE does not show statistically significant differences among groups, although a trend toward higher values in spring is observed, probably modulated by temperature. Factorial analysis reveals a thermo-physiological gradient linking the increase in temperature with higher enzymatic activity but lower cellular stability and physiological condition. These findings confirm the potential of *D. trunculus* as a sentinel species and highlight the need to establish species-specific reference values for its application in environmental monitoring programs.

Key words— *bivalves, enviromental monitoring, lisosomal membrane stability, acetylcholinesterase, condition index.*

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora, Silvia Falco, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto y por todo su apoyo a lo largo del proceso. Extiendo también mi gratitud a todas aquellas personas que colaboraron en los muestreos, en especial a Miguel Rodilla, por su esfuerzo, dedicación y compromiso constantes. Finalmente, quiero agradecer de manera muy especial a mi co-tutora, Paula Soms, por sus valiosas enseñanzas, su implicación y su guía cercana durante todo el desarrollo del proyecto. Su esfuerzo y apoyo han sido fundamentales, y sin ellos no habría sido posible.

This study forms part of the ThinkInAzul programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Generalitat Valenciana (THINKINAZUL/2021/005).



Contenido

1. Introducción	1
1.1. <i>Donax trunculus</i>	2
1.2. Biomarcadores	6
1.2.1. Estabilidad de la membrana lisosomal	7
1.2.2. Actividad de la acetilcolinesterasa	9
1.3. Índice de condición.....	10
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1. Área de estudio	12
3.2. Muestreo	13
3.3. Análisis de la estabilidad de la membrana lisosomal	14
3.3.1. Equipo, reactivos y soluciones	14
3.3.2. Extracción de hemolinfa e incubación con NR	15
3.3.3. Lectura de las muestras.....	17
3.3.4. Determinación del NRRT	19
3.3.5. Cálculo del porcentaje de LMS	19
3.3.6. Interpretación del NRRT	20
3.4. Análisis de la actividad de la AChE	21
3.4.1. Equipo.....	21
3.4.2. Obtención de la muestra y del extracto	22
3.4.3. Determinación de la actividad enzimática	23
3.4.4. Determinación de la concentración proteica	24
3.4.5. Cálculo de la actividad específica de la AChE.....	26
3.4.6. Interpretación de la actividad de la AChE.....	27
3.5. Análisis del índice de condición	27
3.6. Análisis de los datos	28
4. Resultados	30
4.1. Biometría	32
4.2. Estabilidad de la membrana lisosomal	33
4.3. Actividad de la acetilcolinesterasa	35
4.4. Índice de condición.....	37
4.5. Análisis factorial.....	38
5. Discusión de los resultados	39
6. Conclusiones	43
7. Referencias	44
Anexo I. Relación con los ODS	49

Figuras

Figura 1: Ejemplares de <i>Donax trunculus</i> . Nótese la proyección de un sifón inhalante (si), un sifón exhalante (se) y el pie (p). (Barra de escala: 1 cm).....	1
Figura 2: Distribución geográfica de <i>Donax trunculus</i> (rojo). Aunque la especie presenta una amplia distribución, muchas de sus poblaciones se encuentran en alarmante regresión.....	2
Figura 3: Morfología externa e interna de <i>Donax trunculus</i> . Concha cuneiforme, comprimida, equivalva, inequilátera, de superficie lisa y borde interno dentado. a) Vista externa de la concha; b) vista interna de una hembra madura, con gónada de coloración azul oscuro; c) vista interna de un macho maduro, con gónada blanco-amarillenta; amarillo: inserción del músculo aductor; m.p.: margen posterior; m.a.: margen anterior; m.v.: margen ventral; m.d.: margen dorsal. (Barra de escala $\equiv$ 1 cm).....	3
Figura 4: Recolección de ejemplares de <i>Donax trunculus</i> a pie con rastrillo tipo draga manual en playa arenosa del sur del Golfo de Valencia. La técnica consiste en avanzar lentamente en la zona de rompiente (a), removiendo el sustrato con el rastrillo metálico provisto de una malla colectora (b). Fotografías tomadas durante el muestreo realizado en la campaña de invierno.	4
Figura 5: Recolección de ejemplares de <i>Donax trunculus</i> mediante dragas mecanizadas tipo tellinera, remolcadas desde embarcación. La técnica consiste en arrastrar lentamente cuatro jaulas recolectoras (a) desde un barco tellinero (b), dispuestas en forma de abanico (c). Durante el remolque, las jaulas penetran en el sedimento, permiten la salida del sustrato arenoso y retienen los organismos en su interior (d).	5
Figura 6: Hemocitos de <i>Donax trunculus</i> teñidos con rojo neutro, observados mediante microscopía óptica. Imagen tomada a 400 $\times$	8
Figura 7: Localización de las cinco playas de muestreo en el sur del Golfo de Valencia: Tavernes, Gandía, Daimús, Piles y Les Deveses. Ortoimágenes satelitales de Here WeGo Satellite.....	12
Figura 8: Proceso de selección manual de ejemplares vivos de <i>Donax trunculus</i> en campo (a) y distribución por rangos de talla para su posterior agrupación en pools experimentales (b). Los individuos seleccionados se agruparon en pools de cinco ejemplares, procurando incluir en cada pool un representante de cada clase de talla.....	14
Figura 9: Puntos de extracción de hemolinfa en <i>Donax trunculus</i> . (1) Zona de extracción principal, localizada en el margen posterior-dorsal de la valva; (2) zona de extracción secundaria en caso de dificultad de obtención. Se indica también la zona de apretura de las valvas para el acceso al interior del organismo y el lugar de colocación de la punta de pipeta para evitar el cierre completo durante la manipulación.....	16
Figura 10: Clasificación del estado fisiológico de los organismos en función del tiempo de retención del rojo neutro (NRRT), según los valores umbral del criterio de fondo (BAC = 120 min) y del criterio de evaluación ambiental (EAC = 50 min). NRRT decrecen conforme aumenta el nivel de estrés. Adaptado de Martínez-Gómez et al. (2015).....	20
Figura 11: Guía visual para la disección de <i>Donax trunculus</i> , con indicación de la línea de corte (línea discontinua) para la extracción del tejido del pie.	22

Figura 12: Tubos de ensayo correspondientes a la curva de calibración proteica, preparados con soluciones estándar de albúmina en concentraciones decrecientes (de izquierda a derecha): 2, 1, 0,5, 0,1 y 0 mg/mL. La intensidad del color azul generado refleja la concentración relativa de proteínas en cada estándar...25	25
Figura 13: Tejidos blandos húmedos y valvas de <i>Donax trunculus</i> dispuestos sobre bandeja de albal para su introducción en la estufa. Muestra de la playa de Daimús en la campaña de primavera de 2025.28	28
Figura 14: Talla media de los individuos empleados en el análisis del índice de condición (IC) y en los análisis de biomarcadores (BM). Campañas de invierno (azul) y primavera (verde). Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras indican inclusión en grupos homogéneos (ANOVA); no se observaron diferencias significativas entre grupos (p -valor > 0.05). Los valores numéricos exactos se presentan en las Tablas 8 y 10.....32	32
Figura 15: Tiempo de retención del rojo neutro (NRRT) y porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (% LMS). Campaña de invierno (azul) y primavera (verde). Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Los valores numéricos exactos se presentan en la Tabla 8. Las letras indican inclusión en grupos homogéneos (Kruskal-Wallis; Wilcoxon-Bonferroni; p -valor < 0,05). Se indican el criterio de fondo (BAC) y criterio de evaluación ambiental (EAC) para <i>Mitylus</i> sp.33	33
Figura 16: Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). Campaña de invierno (azul) y primavera (verde). Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Las letras indican inclusión en grupos homogéneos (Kruskal-Wallis). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p -valor > 0.05). Los valores numéricos exactos se presentan en la Tabla 9. Se representa el rango del criterio de fondo (BAC) en amarillo y del criterio de evaluación ambiental (EAC) en naranja, ambos establecidos para <i>Mitylus galloprovincialis</i>35	35
Figura 17: Índice de condición IC_1 e IC_2 de <i>Donax trunculus</i> durante las campañas de invierno (azul) y primavera (verde), calculado para individuos con tallas comprendidas entre los 20 y 25 mm. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Las letras indican inclusión en grupos homogéneos: ANOVA (LSD de Fisher; p < 0,05) para IC_1 , y Kruskal-Wallis (Wilcoxon-Bonferroni; p < 0,05) para IC_2 . Los valores numéricos exactos se presentan en la Tabla 10.37	37

Tablas

Tabla 1: Fechas y localidades correspondientes a las campañas de invierno y primavera de 2025.	13
Tabla 2: Ejemplo de tabla de resultados del ensayo de retención del rojo neutro siguiendo el método de Martínez-Gómez et al. (2015). Se muestran los datos obtenidos para los organismos procedentes de la playa de Daimús durante la campaña de primavera de 2025. La tabla recoge la valoración cualitativa de retención de rojo neutro (NRR), la puntuación fisiológica de cada muestra según la categoría mayoritaria observada (P), su correspondiente puntuación ponderada (PP), el sumatorio total de puntuaciones ponderadas (ΣPP), el cálculo del porcentaje de estabilidad lisosomal (%LMS) y el tiempo de retención del rojo neutro (NRRT).....	18
Tabla 3: Volúmenes empleados para la preparación de los estándares de proteína (albúmina) para la curva de calibración.	25
Tabla 4: Criterios de interpretación del índice de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) para evaluar la idoneidad del análisis factorial. Adaptado de Sharma (1996).	29
Tabla 5: Parámetros abióticos del agua registrados en las cinco playas del sur del Golfo de Valencia durante las campañas de invierno y primavera de 2025. Tª: temperatura (°C), S: salinidad.	30
Tabla 6: Resultados del ANOVA unifactorial para las variables IC ₁ , talla de los individuos empleados para el índice de condición (IC) y talla de los individuos empleados en el análisis de biomarcadores (BM). Se consideran diferencias estadísticamente significativas p-valor < 0,05.....	31
Tabla 7: Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para las variables tiempo de retención del rojo neutro (NRRT), porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (% LMS), IC ₂ , y actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). Se consideran diferencias estadísticamente significativas p-valor < 0,05.	31
Tabla 8: Talla de los individuos y resultados del ensayo de retención del rojo neutro, expresados como tiempo de retención del rojo neutro (NRRT) y porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (% LMS). Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar, n = 15.....	34
Tabla 9: Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), expresados como mU de AChE/mg de proteína. Los datos corresponden a la media de tres y se presentan como media $\pm$ desviación estándar, n = 3.	36
Tabla 10: Talla de los individuos y resultados del índice de condición (IC). Se muestran los valores de IC ₁ y de IC ₂ ajustados para tallas de 20 a 25 mm. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar, n = 15.....	38

1. Introducción

Los ecosistemas costeros del Mediterráneo español están sometidos a una creciente presión derivada de actividades antrópicas como el turismo, la urbanización, la agricultura intensiva y la contaminación marina (Tlili & Mouneyrac, 2019). Estos impactos pueden alterar profundamente la integridad ecológica de las playas, afectando tanto a la biodiversidad como a los servicios ecosistémicos que estos entornos proporcionan. En este contexto, el uso de biomarcadores en organismos bioindicadores ofrece una herramienta eficaz para la evaluación del estado ecológico de los ecosistemas costeros, permitiendo detectar efectos de estrés ambiental (Viarengo et al., 2007).

Entre las especies más utilizadas en el biomonitoreo marino se encuentra el bivalvo *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 (Figura 1), un organismo bentónico característico de playas arenosas cuya ecología, distribución y sensibilidad fisiológica lo convierten en un modelo idóneo para el seguimiento ambiental (Tlili & Mouneyrac, 2019). Esta especie ha sido ampliamente reconocida como especie centinela en programas de monitoreo ambiental debido a su sensibilidad a contaminantes químicos y alteraciones físicoquímicas del hábitat (Ben-Haddad et al., 2022; Lamine et al., 2023; Tlili & Mouneyrac, 2019).

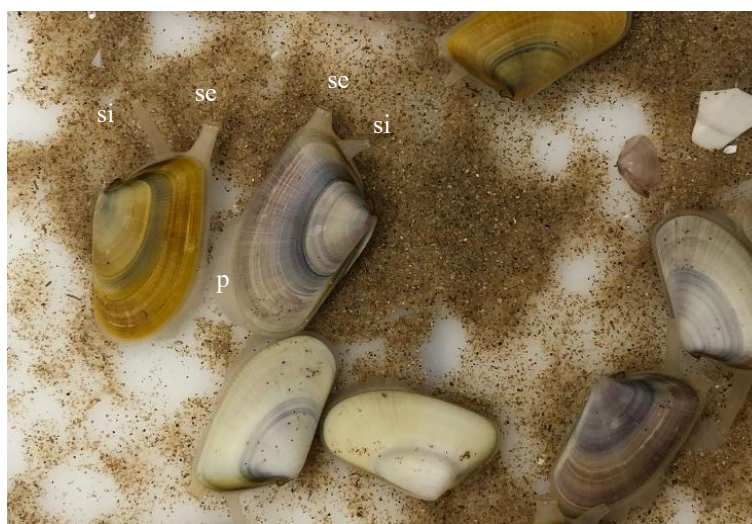


Figura 1: Ejemplares de *Donax trunculus*. Nótese la proyección de un sifón inhalante (si), un sifón exhalante (se) y el pie (p). (Barra de escala: 1 cm).

El presente trabajo busca aportar datos relevantes para el diagnóstico del estado ecológico de las playas arenosas del sur del Golfo de Valencia. Para ello, se propone evaluar la respuesta de los biomarcadores de estabilidad de la membrana lisosomal (LMS) y actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en *D. trunculus* a lo largo de cinco playas representativas (Tavernes, Gandía, Daimús, Piles y Les Deveses), considerando además la influencia de la temperatura mediante la comparación de dos épocas del año: invierno y primavera. Adicionalmente, se integra el análisis del índice de condición (IC) como indicador complementario del estado fisiológico general de los organismos.

1.1. *Donax trunculus*

D. trunculus, también conocido como tellina o coquina, es un bivalvo bentónico que habita fondos arenosos en zonas de rompiente del infralitoral superior, típicamente entre los 0 y 2 m con un máximo de hasta 4 m de profundidad en el Mediterráneo y hasta los 6 m en el Atlántico oriental (Gaspar et al., 2002; Tlili & Mouneyrac, 2019). Se distribuye ampliamente desde las costas de Bélgica, Gran Bretaña y Francia hasta Senegal, incluyendo el mar Mediterráneo, el mar Negro y el mar de Mármara (Figura 2) (Ben-Haddad et al., 2022; Tlili & Mouneyrac, 2019).

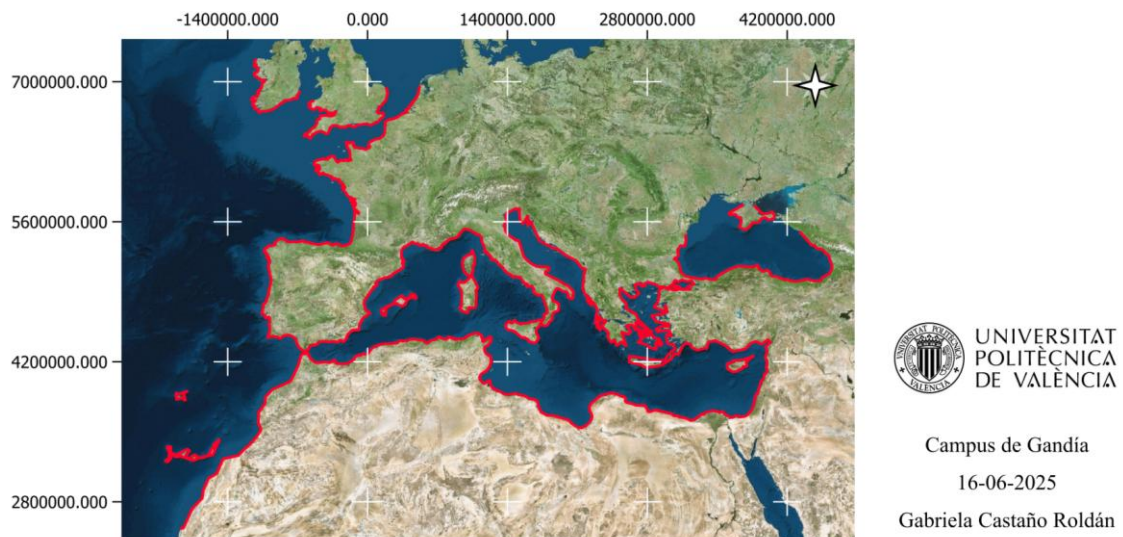


Figura 2: Distribución geográfica de *Donax trunculus* (rojo). Aunque la especie presenta una amplia distribución, muchas de sus poblaciones se encuentran en alarmante regresión.

Se trata de un organismo suspensívoro cuya dieta se basa principalmente en la filtración de fitoplancton, complementada con detritos orgánicos (Ansell, 1983; McLachlan &

Defeo, 2018). Las tallas más comunes en el Mediterráneo oscilan entre 25 – 35 mm de longitud, con máximos de 44 mm y excepcionalmente 50 mm (Ramón et al. 1995). Presenta una morfología adaptada a su entorno, caracterizada por una concha cuneiforme y comprimida que le permite enterrarse rápidamente en sustratos arenosos finos por extensión y posterior contracción del pie (Figura 3) (Gaspar et al., 1999; La Valle et al., 2011; McLachlan & Defeo, 2018).

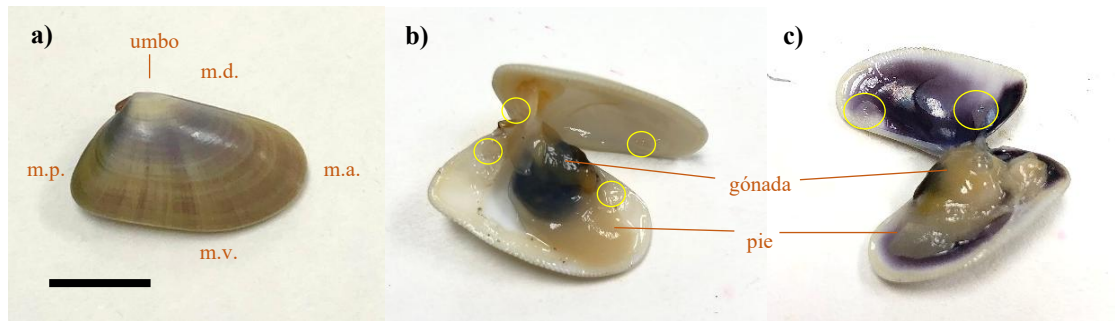


Figura 3: Morfología externa e interna de *Donax trunculus*. Concha cuneiforme, comprimida, equivalva, inequilateral, de superficie lisa y borde interno dentado. a) Vista externa de la concha; b) vista interna de una hembra madura, con gónada de coloración azul oscuro; c) vista interna de un macho maduro, con gónada blanco-amarillenta; amarillo: inserción del músculo aductor; m.p.: margen posterior; m.a.: margen anterior; m.v.: margen ventral; m.d.: margen dorsal. (Barra de escala $\equiv$ 1 cm).

Esta notable capacidad de enterramiento constituye no solo una ventaja adaptativa frente a condiciones hidrodinámicas intensas, altas temperaturas y a la presión ejercida por los depredadores (Gaspar et al., 1999; Gaspar et al., 2002; La Valle et al., 2011), sino que también influye directamente en su distribución a lo largo del gradiente batimétrico (Manca-Zeichen et al., 2002). Los ejemplares juveniles, de menor tamaño y eficiencia en el enterramiento, se localizan preferentemente en zonas someras, mientras que los adultos, más eficaces en la penetración del sedimento, se desplazan hacia áreas más profundas (Escrivá et al., 2021; Gaspar et al., 2002; Manca-Zeichen et al., 2002).

Esta movilidad vertical en el sedimento, combinada con su modo de alimentación como filtrador endobentónico, confiere a *D. trunculus* el papel de ingeniero ecosistémico. Su actividad bioturbadora modifica la estructura física del hábitat, promoviendo la resuspensión de partículas y afectando la disponibilidad de nutrientes y contaminantes en el sistema (Tlili & Mouneyrac, 2019).

La reproducción de la especie es sexual con carácter gonocórico, sin evidencia de hermafroditismo ni reversión sexual (Tlili & Mouneyrac, 2019). Aunque carece de

dimorfismo sexual externo, los sexos pueden diferenciarse en individuos maduros por la coloración de las gónadas, observándose tonalidades azul oscuro en las hembras y blanco-amarillentas en los machos (Figura 3 b y c) (Manca-Zeichen et al., 2002). Su ciclo vital es corto, con una longevidad estimada de 2 a 3 años, y alcanza la madurez sexual durante el primer año de vida. La especie presenta una reproducción estacional, con una gametogénesis activa desde finales de otoño y eventos de desove que se extienden entre marzo y agosto, registrándose los picos de actividad reproductiva en primavera y verano (Gaspar et al., 1999).

Históricamente, esta especie ha representado un recurso pesquero de gran valor para las comunidades costeras en numerosos países del Mediterráneo y Atlántico, como España, Portugal, Italia y Marruecos (Baeta et al., 2023; Gaspar et al., 1999; Tlili & Mouneyrac, 2019). Con gran relevancia económica en particular en las pequeñas comunidades costeras, siendo explotado desde la orilla mediante el uso de dragas manuales o mecánicas desde embarcación (Figuras 4 y 5) (Escrivá et al., 2021; Tlili & Mouneyrac, 2019). No obstante, la elevada presión pesquera ha llevado al colapso de las poblaciones locales (Escrivá et al., 2021; Patiño et al., 2021).



Figura 4: Recolección de ejemplares de *Donax trunculus* a pie con rastrillo tipo draga manual en playa arenosa del sur del Golfo de Valencia. La técnica consiste en avanzar lentamente en la zona de rompiente (a), removiendo el sustrato con el rastrillo metálico provisto de una malla colectora (b). Fotografías tomadas durante el muestreo realizado en la campaña de invierno.

En el sur del golfo de Valencia, la explotación intensiva derivó en una drástica disminución poblacional, lo que motivó la prohibición de su captura en 2015 (Escrivá et al., 2021). A pesar de las restricciones, no se ha observado una recuperación de las poblaciones. Estudios de seguimiento han documentado una persistente baja densidad de ejemplares y una estructura de tallas fragmentada, señalando la existencia de factores

adicionales que deben estar afectando a su recuperación, como la degradación del hábitat, la contaminación, el cambio climático, la reducción de reclutamiento larval y las alteraciones hidromorfológicas en el litoral (Escrivá et al., 2021; Soms-Molina et al., 2024).

Además de su importancia socioeconómica, *D. trunculus* ha sido ampliamente reconocido como organismo centinela en estudios de ecotoxicología marina, gracias a su papel clave como bivalvo filtrador y bioacumulador, y a su elevada sensibilidad frente a factores ambientales adversos (Tlili & Mouneyrac, 2019; Viarengo et al., 2007). Su capacidad para reflejar la contaminación ambiental ha sido aprovechada en numerosos estudios para detectar la exposición a metales pesados como plomo, cadmio, cobre y zinc (Frías-Espéricueta et al., 2008; Lamine et al., 2023; Tlili & Mouneyrac, 2019; Waykar & Deshmukh 2012), así como a plaguicidas organofosforados y carbamatos (Chahouri et al., 2022; Tlili & Mouneyrac, 2019) y a contaminantes emergentes como los microplásticos (Ben-Haddad et al., 2022).

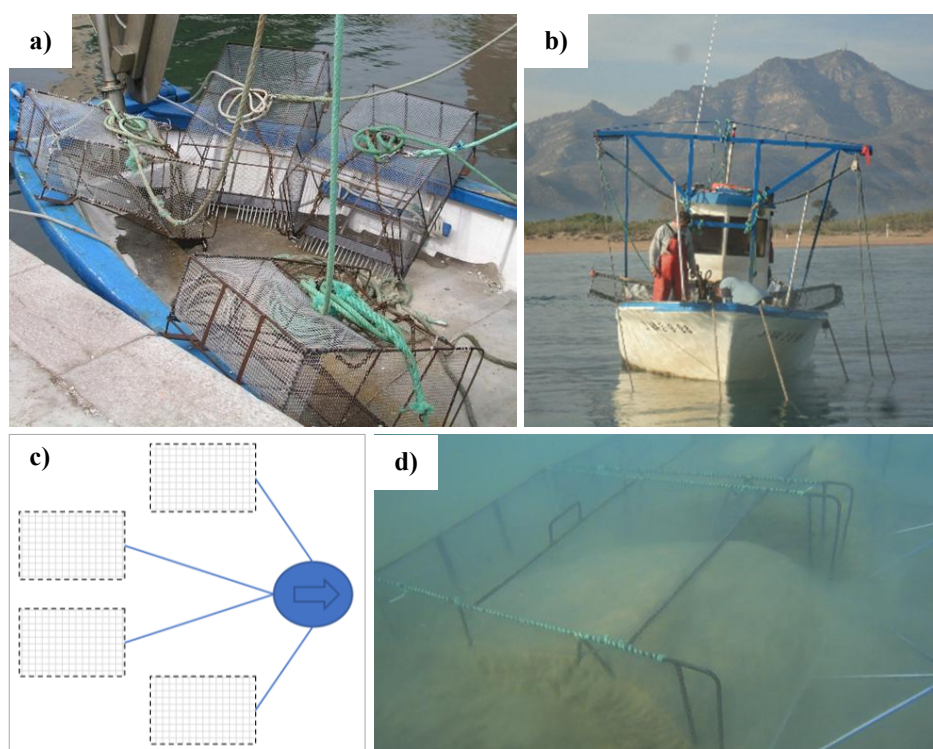


Figura 5: Recolección de ejemplares de *Donax trunculus* mediante dragas mecanizadas tipo tellinera, remolcadas desde embarcación. La técnica consiste en arrastrar lentamente cuatro jaulas recolectoras (a) desde un barco tellinero (b), dispuestas en forma de abanico (c). Durante el remolque, las jaulas penetran en el sedimento, permiten la salida del sustrato arenoso y retienen los organismos en su interior (d).

1.2. Biomarcadores

Los biomarcadores son respuestas biológicas medibles que reflejan cambios bioquímicos, celulares, fisiológicos o de comportamiento en bioindicadores, inducidos por la exposición a contaminantes químicos u otros factores de estrés ambiental (Aguirre-Martínez, 2021; Viarengo et al., 2007). Estas respuestas pueden manifestarse a diferentes niveles de organización biológica: molecular, celular, tisular, de organismo, poblacional y de comunidades (Chahouri et al., 2023; Viarengo et al., 2007).

Existe una amplia diversidad de biomarcadores según su grado de especificidad, que abarca desde aquellos altamente sensibles a la presencia de determinados contaminantes y que permiten detectar mecanismos de acción concretos, hasta otros de carácter más inespecífico que responden a una amplia gama de estresores ambientales, incluyendo variaciones de temperatura o salinidad en el medio (Chahouri et al., 2022; Dimitriadis et al., 2012; Viarengo et al., 2007; Soms-Molina et al., 2024). Esta diversidad funcional permite adaptar su uso en función de los objetivos del estudio, siendo recomendable la aplicación conjunta de biomarcadores con distintos niveles de especificidad para obtener una evaluación integral de la exposición y del estado fisiológico de los organismos (Elazzaoui et al., 2019, Soms-Molina et al., 2024).

Constituyen herramientas clave en la evaluación del estado ecológico de ecosistemas marinos al ser indicadores sensibles de deterioro ambiental (Aguirre-Martínez, 2021; Soms-Molina et al., 2024). Permiten detectar efectos subletales y tempranos de exposición a factores nocivos, previos a impactos más severos a nivel poblacional o ecosistémico (Aguirre-Martínez, 2021; Chahouri et al., 2023). Y su utilidad se potencia cuando se emplean en organismos bioindicadores como los bivalvos que, debido a su modo de vida sésil y hábitos filtradores, acumulan contaminantes de forma representativa del ambiente circundante (Aguirre-Martínez, 2021; Waykar & Deshmukh 2012).

En *D. trunculus* en concreto, se han aplicado diversos biomarcadores para evaluar su respuesta fisiológica y celular frente a distintos factores de estrés. Entre los más utilizados se encuentran la estabilidad de la membrana lisosomal (*Lysosomal membrane stability*, LMS), biomarcador genérico de contaminación y estrés celular (Soms-Molina et al., 2024), y la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), indicador de neurotoxicidad relacionado con la presencia de pesticidas y fármacos (Chahouri et al., 2022; Lamine et al., 2023).

1.2.1. Estabilidad de la membrana lisosomal

La LMS es un biomarcador genérico de estrés celular ampliamente reconocido en estudios de ecotoxicología marina como indicador patofisiológico integrado del estado de salud de los organismos (Chahouri et al., 2023; Martínez-Gómez et al., 2015; Martínez-Gómez et al., 2017). Y su alta sensibilidad lo posiciona como una herramienta fundamental en los programas de monitoreo ambiental (Martínez-Gómez et al., 2017; Soms-Molina et al., 2024).

Los lisosomas son orgánulos esenciales encargados de procesos de degradación intracelular. Su membrana resulta altamente sensible y se ve comprometida bajo condiciones de estrés ambiental, dando lugar a la liberación de enzimas hidrolíticas al citosol (Camus et al., 2000; Koukouzika & Dimitriadis, 2005). Esta pérdida de integridad estructural y funcional constituye una respuesta temprana al estrés, previa a efectos patológicos detectables a niveles superiores de organización biológica (Martínez-Gómez et al., 2015).

Una de las metodologías más empleadas para su evaluación es el ensayo de retención del rojo neutro (*Neutral Red Retention Assay*, NRR). Se trata de un método citoquímico in vivo que mide la capacidad de los lisosomas para retener un colorante anfifílico y catiónico débil fotosensible, capaz de penetrar libremente la membrana celular (Martínez-Gómez et al., 2015). El colorante queda atrapado dentro de los lisosomas por protonación, y su retención varía en función del pH interno, de la estabilidad de la membrana y de la actividad de las bombas de protones (Seglen, 1983).

La exposición de los organismos a condiciones de estrés ambiental puede comprometer estas funciones, facilitando la difusión del colorante hacia el citoplasma y acelerando la degradación celular (Camus et al., 2000; Koukouzika & Dimitriadis, 2005; Lowe et al., 1992). Esta pérdida de retención por parte de los lisosomas puede ser cuantificada y utilizada como un indicador sensible del daño celular (Lowe et al., 1992; Martínez-Gómez et al., 2015).

No obstante, debe considerarse que el rojo neutro (*Neutral Red*, NR) presenta toxicidad intrínseca. Tras periodos prolongados de exposición, puede inducir la desestabilización lisosomal incluso en células inicialmente sanas, lo que eventualmente puede desencadenar procesos de apoptosis o necrosis celular (Lowe et al., 1992). Por esta razón, el ensayo se limita a un máximo de 180 minutos de incubación, ya que, superado ese

intervalo, el propio colorante se convierte en un factor estresante que compromete la interpretación de los resultados, independientemente del historial de exposición ambiental de los organismos analizados (Martínez-Gómez et al., 2015).

Este método ha sido ampliamente validado en bivalvos y es reconocido por su simplicidad, sensibilidad y bajo impacto en los organismos evaluados (Camus et al., 2000; Koukouzika & Dimitriadis, 2005). En el caso de *D. trunculus*, la técnica puede aplicarse eficazmente sobre los hemocitos presentes en la hemolinfa (Figura 6), facilitando una evaluación directa y poco invasiva del estado celular del organismo (Soms-Molina et al., 2024).

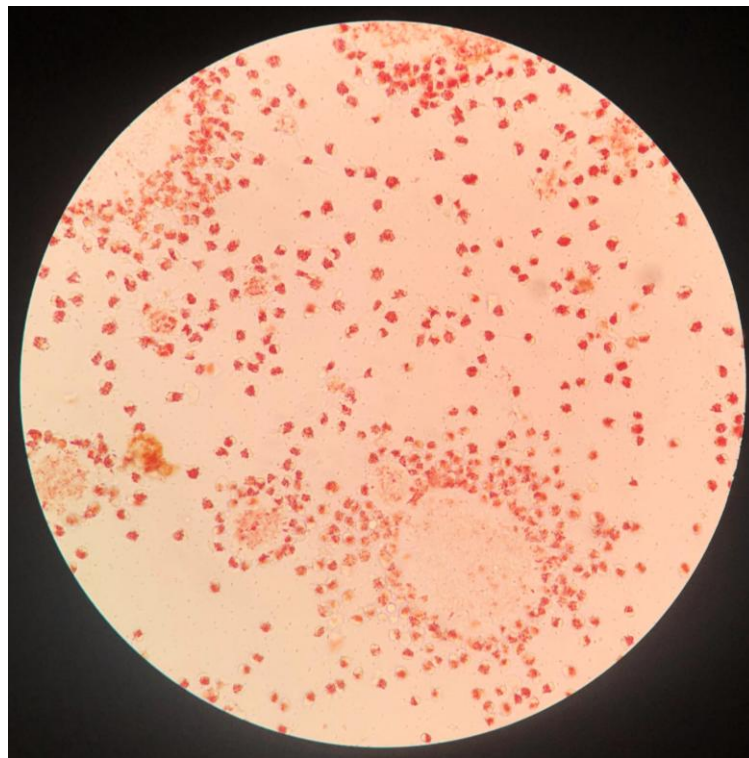


Figura 6: Hemocitos de *Donax trunculus* teñidos con rojo neutro, observados mediante microscopía óptica. Imagen tomada a 400×.

Estudios recientes confirman que este enfoque permite detectar alteraciones asociadas tanto a contaminantes como a cambios de temperatura y salinidad, por lo que variabilidad estacional debe tenerse en cuenta en el diseño e interpretación de los estudios de monitoreo ambiental (Chahouri et al., 2023; Soms-Molina et al., 2024; Tlili & Mouneyrac, 2019).

1.2.2. Actividad de la acetilcolinesterasa

La AChE es una enzima clave en la neurotransmisión encargada de catalizar la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, en colina y ácido acético, lo que permite la terminación del impulso nervioso y el correcto funcionamiento de la señalización neuronal (Lionetto et al., 2003; Umar & Aisami, 2020). Para cuantificar su actividad se emplean métodos colorimétricos como el desarrollado por Ellman et al. (1961), en los que la enzima cataliza la hidrólisis de acetiltiocolina, liberando un grupo tiol que reacciona con el reactivo de Ellman (DTNB), dando lugar a la formación de un compuesto coloreado, el 5-tio-2-nitrobenzoato, cuya intensidad se mide espectrofotométricamente.

Debido a su papel central en la función neuronal, la AChE se ha consolidado como un biomarcador funcional de neurotoxicidad (Lionetto et al., 2003; Viarengo et al. 2007). Su inhibición constituye un indicador temprano y específico de exposición a contaminantes neuroactivos, como pesticidas organofosforados y carbamatos, que interfieren directamente con su actividad catalítica (Aguirre-Martínez, 2021; Nassar et al., 2016; Umar & Aisami, 2020). No obstante, su actividad también puede verse alterada por otros factores, como la presencia de metales pesados o por condiciones ambientales extremas de salinidad y temperatura, lo que resalta la importancia de considerar estos parámetros al interpretar su respuesta (Ávila, 2024; Belabed & Soltani, 2013; Lamine et al., 2023; Lionetto et al., 2003).

En bivalvos, la AChE ha sido ampliamente empleada para evaluar la presencia de compuestos neurotóxicos en ambientes costeros y estuarinos, dada su alta sensibilidad y la posibilidad de cuantificar su actividad en diferentes tejidos como la glándula digestiva, branquias o pie (Aguirre-Martínez, 2021; Ávila, 2024; Chahouri et al., 2023). Su uso ha permitido establecer relaciones claras entre los niveles de inhibición enzimática y la exposición a metales pesados, pesticidas, fármacos y otros contaminantes emergentes (Elazzaoui et al., 2019; Lionetto et al., 2003).

En *D. trunculus*, la actividad de la AChE ha sido evaluada como biomarcador de neurotoxicidad en diversos contextos ambientales (Chahouri et al., 2023; Lamine et al., 2023; Moukrim et al., 2004). Su integración en estudios con múltiples biomarcadores ha aportado información valiosa sobre el estado fisiológico de las poblaciones y su respuesta frente a estresores ambientales complejos, reforzando su validez como especie centinela (Georgieva et al., 2021).

1.3. Índice de condición

El IC es un parámetro morfométrico calculado habitualmente como la relación entre el peso de los tejidos blandos y el tamaño o peso de la concha (Zeng & Yang, 2020). Se emplea como descriptor complementario a biomarcadores bioquímicos y celulares, permitiendo estimar el estado nutricional y fisiológico general de los organismos, así como la inversión energética en procesos de reproducción o crecimiento (Cataldo et al., 2001). Dado que el IC varía en función de la edad y el estado fisiológico de los organismos, se recomienda trabajar con tallas estandarizadas (Soms-Molina et al., 2024).

En el caso de *D. trunculus*, estudios realizados en Portugal han documentado una marcada variación estacional del IC vinculada al ciclo reproductivo, con valores máximos registrados en los periodos previos a la puesta (Gaspar et al., 1999). En el contexto del sur del Golfo de Valencia, Soms-Molina et al. (2024) aplicaron el IC como complemento del biomarcador LMS, destacando su utilidad como indicador adicional sensible a factores ambientales como la temperatura y la salinidad. Por su parte, Ávila (2024) integró el IC con la evaluación de la actividad de la AChE, fortaleciendo la interpretación de las respuestas fisiológicas frente al estrés ambiental inducido experimentalmente.

2. Objetivos

El objetivo general de este estudio es evaluar la respuesta de dos biomarcadores, LMS y la actividad de la AChE, como indicadores de estrés ambiental en poblaciones naturales de *D. trunculus* en el sur del Golfo de Valencia.

Para su realización, y considerando el estado actual del tema, se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Analizar la variación espacial de la respuesta de los biomarcadores LMS y AChE en *D. trunculus* recolectados en cinco playas de la zona de estudio: Tavernes, Gandía, Daimús, Piles y Les Deveses.

Objetivo específico 2: Evaluar la influencia de la temperatura sobre la actividad de ambos biomarcadores mediante la comparación de muestras obtenidas en dos épocas del año: invierno y primavera.

Objetivo específico 3: Determinar el índice de condición de los organismos como descriptor complementario del estado fisiológico general.

3. Materiales y métodos

3.1. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en cinco playas arenosas del sector meridional del Golfo de Valencia (España): Tavernes de la Valldigna, Gandía, Daimús, Piles y Les Deveses. Estas playas se localizan en la costa oriental de la península ibérica, dentro de la provincia de Valencia, y forman parte del litoral comprendido entre el cabo de Cullera y el límite sur del término municipal de Dénia (Figura 7).

Todas las playas presentan una morfología característica de sistemas de alta energía, con pendientes suaves, sedimentos de granulometría fina a media. Se trata de entornos típicamente micro-mareales influenciados por forzamientos estacionales y eventos meteorológicos mediterráneos. Además, estas zonas se encuentran sometidas a distintos grados de presión antropogénica, incluyendo actividad turística, pesquera y urbanización costera, factores que pueden influir en la calidad ambiental y la salud biológica de los organismos bentónicos.

La elección de estas cinco playas responde a su representatividad ecológica dentro del golfo, su accesibilidad logística y la existencia previa de registros de presencia de *D. trunculus*.



Figura 7: Localización de las cinco playas de muestreo en el sur del Golfo de Valencia: Tavernes, Gandía, Daimús, Piles y Les Deveses. Ortoimágenes satelitales de Here WeGo Satellite.

3.2. Muestreo

Las campañas de muestreo se realizaron en dos épocas del año representativas de condiciones ambientales contrastantes: invierno y primavera (Tabla 1), coincidiendo con períodos relevantes para la actividad fisiológica de la especie.

Tabla 1: Fechas y localidades correspondientes a las campañas de invierno y primavera de 2025.

Muestreo	Fecha	Campaña	Playa
1	10-03-25	Invierno	Tavernes
2	11-03-25	Invierno	Gandía
3	14-03-25	Invierno	Daimús
4	17-03-25	Invierno	Piles
5	19-03-25	Invierno	Les Deveses
6	26-05-25	Primavera	Tavernes
7	26-05-25	Primavera	Gandía
8	27-05-25	Primavera	Daimús
9	28-05-25	Primavera	Piles
10	28-05-25	Primavera	Les Deveses

En cada playa, los ejemplares fueron recolectados en la zona de rompiente mediante dragas manuales tipo rastrillo, utilizadas a pie (Figura 4). El contenido de cada lance fue cribado manualmente para separar los individuos vivos de otros elementos del sedimento, como conchas vacías, fragmentos vegetales y otros invertebrados (Figura 8 a). Posteriormente, los organismos vivos fueron seleccionados en función de su talla, conservando únicamente aquellos con longitudes comprendidas entre 20 y 25 mm. Se procuró recoger aproximadamente seis individuos por cada milímetro de longitud dentro de ese rango, con el objetivo de cubrir de forma representativa la variabilidad intra-poblacional y minimizar el efecto del tamaño sobre los análisis posteriores.

En cada muestreo se obtuvo un total de 30 individuos por playa: 15 destinados a la evaluación del índice de condición y 15 para a los análisis de biomarcadores celulares, LMS y AChE (Figura 8 b). Paralelamente, se realizaron mediciones *in situ* de temperatura y salinidad del agua en el área de recolección, mediante una sonda multiparamétrica portátil (WTW ProfiLine Cond 3310), a fin de caracterizar las condiciones ambientales del hábitat en el momento del muestreo.

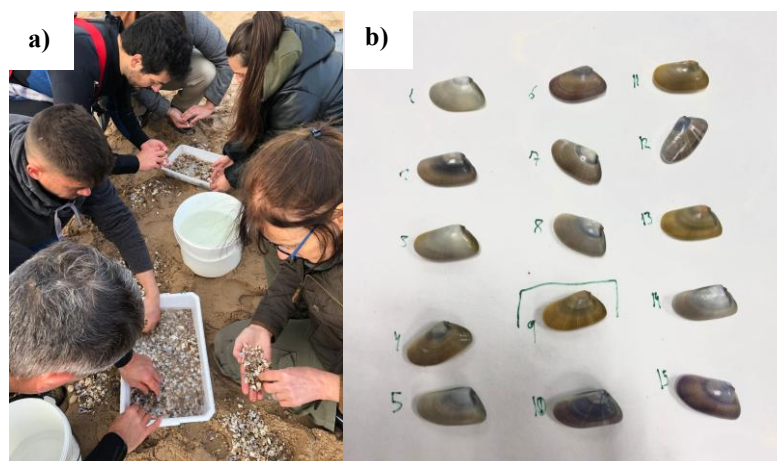


Figura 8: Proceso de selección manual de ejemplares vivos de *Donax trunculus* en campo (a) y distribución por rangos de talla para su posterior agrupación en pools experimentales (b). Los individuos seleccionados se agruparon en pools de cinco ejemplares, procurando incluir en cada pool un representante de cada clase de talla.

La evaluación y caracterización de los organismos se llevó a cabo el mismo día del muestreo, con el propósito de evitar alteraciones fisiológicas derivadas del mantenimiento *ex situ* y minimizar posibles interferencias en los resultados de los análisis.

3.3. Análisis de la estabilidad de la membrana lisosomal

Para el análisis del biomarcador LSM se realizaron ensayos NRR siguiendo la metodología descrita por Martínez-Gómez et al. (2015) para mejillones (*Mytilus* spp. y *Perna* sp.), y empleada por Soms-Molina et al. (2024) en *D. trunculus*. Los ensayos se realizaron a ciegas, sin conocimientos previos de las muestras, y se analizaron dos parámetros: el tiempo de retención del NR (NRRT) y el porcentaje de LMS.

3.3.1. Equipo, reactivos y soluciones

Para el ensayo NRR se empleó el siguiente equipo:

- Microscopio óptico: microscopio binocular de campo claro Olympus CX21, equipado con objetivos de 10× y 40× y oculares de 10×;
- Portaobjetos de vidrio: rotulados en el reverso con círculos de 1,5 cm de diámetro para delimitar el área de observación;
- Cubreobjetos de 22 × 22 mm;
- Jeringas hipodérmicas de 1 mL con agujas del calibre 25, empleadas para la extracción de hemolinfa;

- Bisturí quirúrgico utilizado para la apertura de las valvas y aislamiento de tejidos;
- Cámara de incubación: caja opaca de poliestireno expandido con tapa, acondicionada como sistema pasivo de refrigeración. Contenía placas eutécticas frías en el fondo y una rejilla de plástico elevada para evitar el contacto directo de las muestras con las placas;
- Pipetas automáticas: volumen variable de 10–100 μL y 0,5–5 mL;
- Puntas para pipeta universales: sin cortar y con la punta cortada según el tipo de aplicación;
- Tubos Eppendorf de 1 mL para el almacenamiento individual de muestras, organizados en gradillas numeradas;
- Tubo recubierto de papel de aluminio para la solución de trabajo.

También se emplearon los siguientes reactivos y soluciones:

- Colorante NR con una pureza del $\geq 90\%$ (CAS: 553-24-2);
- Solución madre de NR (*Stock Solution*, SS): Preparada mediante la disolución de 28,8 mg de NR en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obteniendo una concentración final de 100 mM. Esta solución se mantuvo refrigerada en un congelador comercial a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la duración del estudio y se extraía minutos antes de su uso para evitar su degradación y exposición a la luz;
- Agua de mar filtrada (*Filtered Seawater*, FSW): filtrada con filtros Whatman de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ para eliminar partículas en suspensión y recogida en la misma playa y durante el mismo muestreo que los organismos correspondientes, con el objetivo de mantener constante la salinidad y demás condiciones fisicoquímicas específicas de su ambiente;
- Solución de trabajo de NR (*Working Solution*, WS): Preparada inmediatamente antes de cada ensayo (aproximadamente 30 minutos antes de su uso), mediante la dilución de 10 μL de SS en 5 mL de FSW y conservada en total oscuridad.

3.3.2. Extracción de hemolinfa e incubación con NR

Los análisis se realizaron sobre 15 individuos por playa, trabajando por duplicado mediante la preparación de dos portaobjetos por organismo (muestra y réplica). Cada

portaobjetos fue numerado para su correcta identificación y los individuos fueron medidos longitudinalmente con calibre digital (pie de rey) para registrar su talla.

Para la extracción de hemolinfa, se cargaron previamente 15 jeringas hipodérmicas (una para cada organismo) con 0,1 mL de FSW correspondiente a la localidad y campaña de muestreo. Asimismo, los portaobjetos fueron introducidos en la cámara de incubación aproximadamente 15 minutos antes de la preparación de las muestras, con el objetivo de aclimatarlos a la temperatura de trabajo y asegurar condiciones térmicas homogéneas durante la incubación celular.

Se realizó la apertura de las valvas con un bisturí quirúrgico, introducido cuidadosamente por la zona indicada en la Figura 9, procurando no dañar al organismo y separando las valvas solo lo necesario para la extracción (no más de 1 mm). A continuación, se introdujo una punta de pipeta amarilla en la región central del margen ventral, actuando como separador pasivo para evitar la oclusión de las valvas durante la manipulación. Seguidamente, los organismos se colocaron brevemente de forma lateral, con la apertura hacia abajo sobre papel absorbente, a fin de eliminar el exceso de agua retenido en el interior de la cavidad antes de proceder a la extracción.

Se extrajo 0,1 mL de hemolinfa insertando la aguja en el músculo aductor posterior, correspondiente al punto de extracción principal (Figura 9). En los casos en que no se obtuvo volumen suficiente, se recurrió a un segundo punto de punción localizado en la región anterior (zona de extracción secundaria). Se mantuvo una relación 50:50 de hemolinfa y FSW para evitar la aglutinación de los hemocitos.

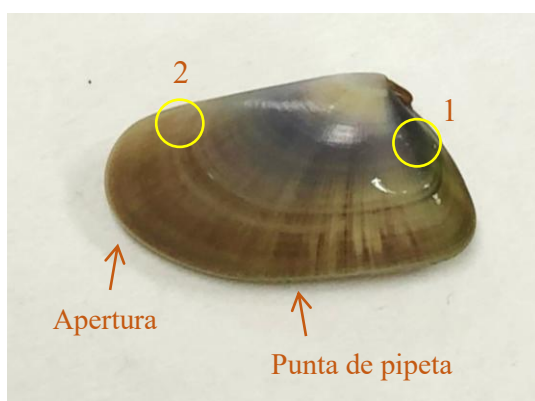


Figura 9: Puntos de extracción de hemolinfa en *Donax trunculus*. (1) Zona de extracción principal, localizada en el margen posterior-dorsal de la valva; (2) zona de extracción secundaria en caso de dificultad de obtención. Se indica también la zona de apertura de las valvas para el acceso al interior del organismo y el lugar de colocación de la punta de pipeta para evitar el cierre completo durante la manipulación.

Tras la extracción, se retiró la aguja hipodérmica y se expulsó suavemente la hemolinfa en un tubo Eppendorf estéril. Inmediatamente después, la muestra fue homogeneizada utilizando una pipeta automática de 10–100 μL equipada con una punta limpia, cuyo extremo había sido previamente cortado aproximadamente 3 mm para reducir la fuerza de succión y preservar la integridad celular. Con la misma punta utilizada para la mezcla, se dispensaron 20 μL de la muestra en el área circular delimitada en cada uno de los dos portaobjetos correspondientes (muestra y réplica), procurando el contacto directo de la punta con la superficie del vidrio. Una vez inoculados, los portaobjetos se devolvieron inmediatamente a la cámara de incubación.

Tras un periodo de 30 minutos de incubación, necesario para permitir la fijación celular sobre la superficie del portaobjetos, se drenó con cuidado el exceso de agua en suspensión colocando el portaobjetos de lado sobre papel absorbente. Acto seguido, en condiciones de mínima luz ambiental, se aplicaron 40 μL de WS sobre la misma área delimitada, y los portaobjetos se devolvieron a la cámara de incubación. Finalizado el tiempo de incubación con NR (15 minutos), se repitió el proceso de drenaje en la misma dirección y se colocó un cubreobjetos sobre cada preparación para su observación microscópica.

3.3.3. Lectura de las muestras

El análisis se realizó mediante microscopía óptica de campo claro, a 100 y 400 aumentos, evaluando sistemáticamente uno de los dos portaobjetos correspondientes a cada muestra tras 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos del inicio de la incubación con RN. Dado el carácter fotosensible del colorante, se procuró minimizar su exposición de las muestras a la luz ambiental del laboratorio y a la iluminación del microscopio, asegurando condiciones de observación equivalentes para todas las muestras. Las réplicas se mantuvieron en todo momento en la cámara de incubación en oscuridad total, con el fin de disponer de material alternativo en caso de degradación del colorante o cualquier otra incidencia técnica durante la evaluación.

La lectura de cada muestra se realizó durante aproximadamente un minuto, tras lo cual, el portaobjetos era devuelto a la cámara de incubación para minimizar la exposición a la luz y conservar las condiciones térmicas. En cada observación se analizaron al menos 100 hemocitos, registrando para cada período de tiempo la valoración cualitativa de la NRR hasta los 180' y el estado fisiológico de la muestra hasta los 120' (Tabla 2).

La valoración cualitativa de la NRR se realizó mediante una evaluación visual de la proporción de hemocitos que presentaban fuga del colorante hacia el citosol o alteraciones lisosomales evidentes. Las muestras fueron clasificadas como positivas o negativas en función de la retención o liberación del colorante al citosol por parte de los lisosomas, en al menos el 50 % de los hemocitos observados.

Tabla 2: Ejemplo de tabla de resultados del ensayo de retención del rojo neutro siguiendo el método de Martínez-Gómez et al. (2015). Se muestran los datos obtenidos para los organismos procedentes de la playa de Daimús durante la campaña de primavera de 2025. La tabla recoge la valoración cualitativa de retención de rojo neutro (NRR), la puntuación fisiológica de cada muestra según la categoría mayoritaria observada (P), su correspondiente puntuación ponderada (PP), el sumatorio total de puntuaciones ponderadas (ΣPP), el cálculo del porcentaje de estabilidad lisosomal (%LMS) y el tiempo de retención del rojo neutro (NRRT).

Periodo de tiempo (')	15			30			60			90			120			150	180	ΣPP	%LMS	TRRN
Factor de ponderación	1			2			3			4			5							
Portaobjeto	RRN	P	PP	RRN	P	PP	RRN	P	PP	RRN	P	PP	RRN	P	PP				($1 - \Sigma PP / 75$) * 100	
1	+	0	0	+	0	0	+	2	6	-	2	8	-	2	10	-	-	24	68	60
2	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	2	8	+	2	10	+	-	18	76	150
3	+	0	0	+	2	4	+	2	6	+	2	8	+	2	10	+	-	28	63	150
4	+	0	0	+	0	0	+	2	6	-	2	8	-	2	10	-	-	24	68	60
5	+	0	0	+	1	2	-	1	3	-	1	4	-	3	15	-	-	24	68	30
6	+	0	0	+	1	2	+	1	3	-	1	4	-	1	5	-	-	14	81	60
7	+	0	0	+	2	4	-	2	6	-	2	8	-	2	10	-	-	28	63	30
8	+	1	1	-	1	2	-	1	3	-	1	4	-	3	15	-	-	25	67	15
9	+	2	2	+	2	4	-	2	6	-	2	8	-	2	10	-	-	30	60	30
10	+	0	0	+	2	4	-	2	6	-	2	8	-	5	25	-	-	43	43	30
11	+	0	0	+	2	4	-	2	6	-	2	8	-	2	10	-	-	28	63	30
12	+	1	1	+	3	6	-	3	9	-	3	12	-	4	20	-	-	48	36	30
13	+	2	2	-	2	4	-	2	6	-	2	8	-	2	10	-	-	30	60	15
14	+	2	2	-	2	4	-	2	6	-	2	8	-	5	25	-	-	45	40	15
15	+	0	0	+	1	2	-	3	9	-	3	12	-	3	15	-	-	38	49	30

Adicionalmente, se determinó el estado fisiológico de las muestras en base a la identificación de alteraciones estructurales a nivel celular y lisosomal. En función de las patologías detectadas en al menos el 50 % de las células, se asignó una puntuación de acuerdo con el sistema de categorías propuesto por Martínez-Gómez et al. (2015):

- Puntuación 0: sin efecto patológico, células sin alteraciones visibles.
- Puntuación 1: agrandamiento lisosomal sin pérdida de retención del colorante
- Puntuación 2: pérdida de retención sin agrandamiento lisosomal
- Puntuación 3: agrandamiento lisosomal y pérdida de retención del colorante

- Puntuación 4: pérdida de retención y de coloración general de la célula.
- Puntuación 5: células severamente dañadas, fragmentadas y redondeadas.

Para una referencia visual representativa de cada categoría, se recomienda consultar las microfotografías incluidas en dicho estudio.

3.3.4. *Determinación del NRRT*

El tiempo de retención del NRse define como el período máximo de incubación, expresado en minutos, hasta el cual al menos el 50 % de las células analizadas mantienen un estado fisiológicamente estable (Martínez-Gómez et al., 2015). Esto implica la conservación de la integridad lisosomal, sin una pérdida significativa en la retención del colorante ni otras alteraciones estructurales o funcionales de los lisosomas

El NRRT corresponde al último intervalo de tiempo en el que se observa una respuesta positiva en la prueba de NRR (Tabla 2). Valores elevados indican una mayor estabilidad y funcionalidad lisosomal, lo que refleja un mejor estado fisiológico de los organismos evaluados.

3.3.5. *Cálculo del porcentaje de LMS*

El cálculo del porcentaje de LMS se realizó a partir del procedimiento de puntuación basado en el estado fisiológico celular, descrito previamente. Para cada período de tiempo, se asignó un factor de ponderación (Tabla 2). La puntuación ponderada se obtuvo multiplicando la puntuación correspondiente a cada periodo por su factor de ponderación.

El cálculo final del porcentaje se realizó con la fórmula empleada por Martínez-Gómez et al. (2015):

$$LMS = \left(1 - \frac{\Sigma PP}{75}\right) * 100$$

Donde:

LMS: estabilidad de la membrana lisosomal, expresado como porcentaje (%).

ΣPP: sumatorio de las puntuaciones ponderadas asignadas a cada período de tiempo.

75: valor máximo teórico del sumatorio de puntuaciones ponderadas, considerando una puntuación de 5 en cada uno de los intervalos.

Este cálculo permite cuantificar el grado de integridad lisosomal y actúa como un indicador sensible del estado fisiológico celular. Valores elevados de % LMS reflejan una alta estabilidad de las membranas lisosomales, lo que se interpreta como una baja exposición a estrés celular y, en consecuencia, un mejor estado de salud del organismo.

3.3.6. Interpretación del NRRT

A falta de criterios específicos para *D. trunculus*, en la interpretación de los resultados del NRRT se empleó de forma orientativa los criterios establecidos para *Mitylus* sp. (Davies et al., 2012; Martínez-Gómez et al., 2015), y aplicados posteriormente por Soms-Molina et al. (2024) en su estudio con *D. trunculus*. Estos valores de referencia incluyen:

- Criterio de fondo (*Background Assessment Criteria*, BAC): 120 minutos
- Criterio de evaluación ambiental (*Enviromental Assessment Criteria*, EAC): 50 minutos

Según estos criterios, un NRRT superior al BAC indica que los organismos no han experimentado estrés significativo. Valores comprendidos entre el BAC y el EAC sugieren exposición a condiciones estresantes, aunque los individuos han sido capaces de compensar fisiológicamente el efecto, manteniéndose funcionalmente viables. Por el contrario, valores por debajo del EAC indican un estado de estrés severo, con alta probabilidad de alteraciones patológicas asociadas (Figura 10).

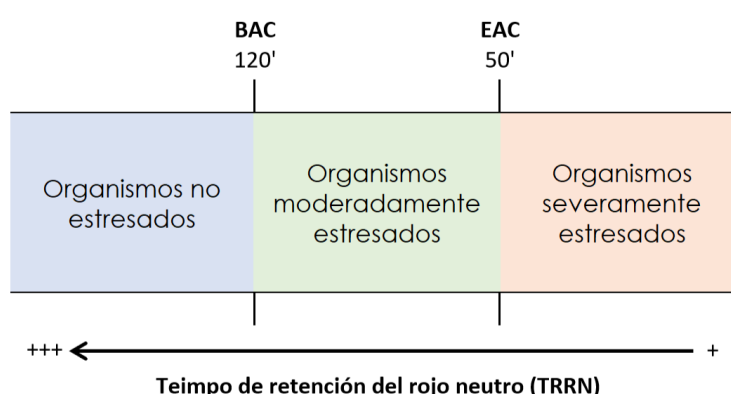


Figura 10: Clasificación del estado fisiológico de los organismos en función del tiempo de retención del rojo neutro (NRRT), según los valores umbral del criterio de fondo (BAC = 120 min) y del criterio de evaluación ambiental (EAC = 50 min). NRRT decrecen conforme aumenta el nivel de estrés. Adaptado de Martínez-Gómez et al. (2015).

3.4. Análisis de la actividad de la AChE

El análisis de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se llevó a cabo siguiendo un protocolo basado en la metodología de Ellman et al. (1961) y Bocquené & Galgani (1998), adaptado para *D. trunculus* por Soms-Molina (comunicación personal, 11 de junio de 2025). Para ello se utilizaron los mismos individuos empleados en el ensayo de NRR (15 por muestreo), extrayéndose el músculo del pie y conformando pools de cinco individuos por muestra.

La determinación de la actividad enzimática se realizó mediante un ensayo colorimétrico, complementado con la cuantificación de la concentración total de proteínas en cada muestra, utilizando el método de Lowry.

3.4.1. Equipo

Para el estudio de la actividad de la AChE se empleó el siguiente equipo:

- Equipo de disección: bisturí y pinzas;
- Tubos criogénicos con rosca;
- Tanque de nitrógeno líquido;
- Ultracongelador a - 80°C;
- Balanza digital;
- Vasos de precipitado equipados con agitador magnético;
- Probeta graduada de 100 mL;
- Pipetas automáticas: volumen variable de 10–100 µL, 100–1000 µL y 0,5–5 mL;
- Homogeneizador mecánico tipo Potter-Elvehjem y varilla con punta de teflón;
- Contenedor con hielo picado;
- Espátulas de laboratorio;
- Pipetas Pasteur;
- Centrífuga refrigerada;
- Tubos de centrífuga de 5 mL;
- Viales ámbar de 5 mL;

- Tubos de 10 mL y 30 mL;
- Espectrofotómetro y cubetas de 1 cm.

3.4.2. *Obtención de la muestra y del extracto*

Como se mencionó previamente, los individuos fueron agrupados en pools de cinco ejemplares, obteniéndose un total de tres pools por punto de muestreo. Tras la extracción de hemolinfa, se procedió a la disección de cada organismo para obtener la mayor cantidad posible de tejido del pie, evitando cuidadosamente la inclusión de otras estructuras, como el tejido gonadal, que pudieran interferir en la determinación de la actividad enzimática (Figura 11). De forma complementaria, se registró el sexo de cada individuo en función de la coloración de la gónada observada (Figura 3 b y c).

Los tejidos fueron almacenados en tubos criogénicos con rosca, congelados con nitrógeno líquido inmediatamente tras la disección y conservados a -80°C hasta su procesamiento en laboratorio.



Figura 11: Guía visual para la disección de *Donax trunculus*, con indicación de la línea de corte (línea discontinua) para la extracción del tejido del pie.

Para la obtención del extracto enzimático, cada pool fue previamente pesado, y luego homogenizado de forma individual en 1,5 mL de tampón TRIS utilizando un homogeneizador mecánico Potter de vidrio, con 10 pasadas, manteniéndose la muestra en hielo durante el proceso. El homogeneizado se transfirió a tubos de centrifugación y fue sometido a una centrifugación de 30 minutos a 11.000 rpm y 4°C . Finalmente, el sobrenadante fue recogido cuidadosamente con una pipeta Pasteur, diluido en proporción 1:10 con TRIS buffer y transferido a un vial ámbar, para su análisis inmediato.

3.4.3. *Determinación de la actividad enzimática*

La determinación de la actividad enzimática se fundamenta en el método descrito por Ellman et al. (1961), donde el incremento de absorbancia a 405 nm guarda una relación directa con la actividad catalítica de la enzima presente en la muestra.

Reactivos

- Solución A (TRIS buffer 0,1 M, pH 7,5): preparada disolviendo 3,0275 g de TRIS en 250 mL de agua destilada, ajustando el pH a 7,5 mediante la adición de HCl concentrado (35 %).
- Solución B (DTNB 0,01 M): obtenida disolviendo 0,0198 g de DTNB en 5 mL de solución A.
- Solución C (Acetilcolina 0,1 M, ACTC): preparada mediante la disolución de 0,0361 g de acetilcolina (peso molecular: 289 g/mol) en 1,25 mL de solución B.

Las soluciones A y B fueron almacenadas a 4 °C y utilizadas durante varios días, mientras que la solución C se preparó inmediatamente antes de cada sesión analítica con el fin de asegurar la estabilidad del sustrato.

Procedimiento

La determinación de la actividad de la AChE se realizó por duplicado, preparando las mezclas de reacción directamente en la cubeta del espectrofotómetro. Para garantizar la uniformidad de las mediciones, se empleó siempre la misma cubeta, la cual fue lavada dos veces con agua destilada entre cada lectura para minimizar posibles errores por arrastre o contaminación cruzada.

Las condiciones de preparación fueron las siguientes:

- Blanco:
80 µL Solución B + 50 µL muestra + 1190 Solución A
El tiempo se registró a partir de la adición de la solución A.
- Reacción enzimática:
80 µL Solución B + 50 µL muestra + 1190 Solución A + 40 µL Solución C
El tiempo se registró a partir de la adición de la solución C.

Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 405 nm, registrando los valores a los 30, 60, 90 y 120 segundos.

3.4.4. *Determinación de la concentración proteica*

Reactivos

Para la determinación de proteínas totales mediante el método de Lowry, se prepararon los siguientes reactivos:

- Solución A (Na_2CO_3 al 2 % p/v): preparada disolviendo 5 g de carbonato sódico en 250 mL de agua destilada.
- Solución B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1 % p/v): obtenida disolviendo 0,2 g de sulfato cúprico pentahidratado en 20 mL de agua destilada.
- Solución C (tartrato de sodio y potasio al 2 % p/v): preparada disolviendo 0,2 g en 10 mL de agua destilada.
- Reactivo mixto: obtenido mediante la mezcla de las soluciones A, B y C en proporción 100:1:1.
- Solución de NaOH 2 N: obtenido disolviendo 20 g de hidróxido de sodio en 250 mL de agua destilada.
- Reactivo de Folín (1:2): dilución 1:2 del reactivo comercial en agua destilada, también preparada justo antes de su utilización.
- Solución madre de albúmina (2 mg/mL): estándar proteico obtenido disolviendo 0,1 g de albúmina en 50 mL de agua destilada.

Todas las soluciones fueron conservadas a 4 °C para preservar su estabilidad, salvo el reactivo mixto, que fue preparado inmediatamente antes de su uso para garantizar la eficacia de la reacción.

Estándares proteicos

Para cada sesión analítica, se preparó una curva de calibración (Figura 12). Con este fin, se prepararon soluciones estándar de albúmina con concentraciones crecientes, utilizando como base la solución madre (2 mg/mL). Los estándares se prepararon en tubos de ensayo mediante dilución con agua destilada, según los volúmenes indicados en la Tabla 3.

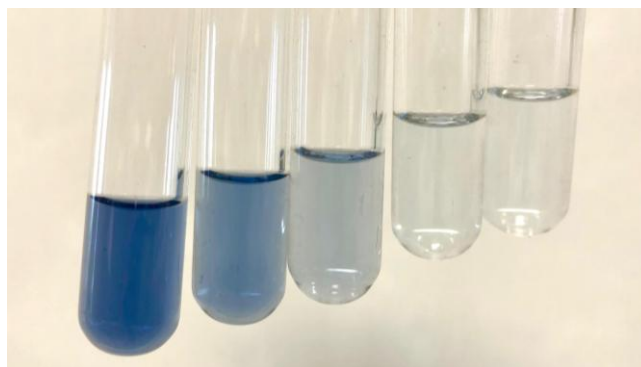


Figura 12: Tubos de ensayo correspondientes a la curva de calibración proteica, preparados con soluciones estándar de albúmina en concentraciones decrecientes (de izquierda a derecha): 2, 1, 0,5, 0,1 y 0 mg/mL. La intensidad del color azul generado refleja la concentración relativa de proteínas en cada estándar.

Tabla 3: Volúmenes empleados para la preparación de los estándares de proteína (albúmina) para la curva de calibración.

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

Procedimiento

La determinación de la concentración proteica se realizó por triplicado, tanto para las muestras como para cada uno de los estándares de la curva de calibración, utilizando tres tubos independientes por condición.

En primer lugar, se añadieron 0,2 mL de muestra o de solución estándar en cada uno de los tres tubos correspondientes. A continuación, se incorporaron 0,2 mL de NaOH 2 N y los tubos se calentaron a 100 °C en baño maría durante 10 minutos, permitiendo la hidrólisis de las proteínas.

Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, se añadieron 2 mL del reactivo mixto y se dejó reaccionar durante 10 minutos. Seguidamente, se incorporaron 0,2 mL de reactivo de Folín y se agitó inmediatamente mediante vortex. La mezcla se dejó reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color.

Finalmente, se midió la absorbancia de todos los tubos a 550 nm. Se trazó una curva estándar de absorbancia como función de concentración inicial de proteína y se usó para determinar el contenido de proteína de cada muestra, teniendo en cuenta la dilución realizada (1:10).

3.4.5. Cálculo de la actividad específica de la AChE

La actividad enzimática se calculó a partir de la pendiente de incremento de absorbancia ($\Delta D.O./min$) en el intervalo lineal de la reacción, utilizando las absorbancias registradas en los tiempos de 30", 60", 90" y 120". Para ello, se calcularon las variaciones de densidad óptica por minuto entre puntos sucesivos tanto en las reacciones como en los blancos, y se obtuvo el promedio de dichos valores para cada caso.

Posteriormente, se calculó la variación corregida de densidad óptica por minuto ($\Delta D.O./min$) restando el promedio de la $D.O./min$ del blanco al de la reacción, y también un valor de corrección adicional de 0,012, que compensa la degradación espontánea del sustrato (acetiltiocolina) en ausencia de enzima.

Los resultados finales se expresaron como miliunidades de AChE por miligramo de proteína (mU AChE/mg prot), permitiendo normalizar la actividad específica en función del contenido proteico total del extracto.

La fórmula empleada fue la siguiente:

$$AChE \left(\frac{nmol}{min * mg \text{ prot}} \right) = \left(\frac{\frac{D.O.}{min} * V_{Final \text{ Reacción}} (\mu L)}{\frac{13,6}{1000} \frac{mL}{nmol \cdot cm} * V_{Muestra} (\mu L) * \left[\text{proteína} \left(\frac{mg}{mL} \right) \right]} \right)$$

$$AChE \left(\frac{nmol}{min * mg \text{ prot}} \right) = \left(\frac{\frac{D.O.}{min} * V_{Final \text{ Reacción}}}{13,6 * V_{Muestra} * [\text{proteína}]} \right) * 1000$$

Donde:

$\Delta D.O./min$: variación de la densidad óptica por minuto, corregida por blanco y por degradación espontánea del sustrato ($D.O./min$);

$V_{Final \text{ Reacción}}$: volumen final de reacción (1360 μL);

13,6/1000: coeficiente de extinción molar del DTNB a 405 nm en $mL/nmol \cdot cm$;

$V_{Muestra}$: volumen de extracto enzimático añadido a la reacción (50 μL);

$[\text{proteína}]$: concentración de proteínas totales en el extracto, determinada mediante el método de Lowry (mg/mL).

La unidad de actividad enzimática (U) corresponde a $\mu\text{mol}/\text{min}$ por lo que nmol/min es 1 mU.

$$\frac{\text{mU AChE}}{\text{mg prot}} = \left(\frac{\frac{\text{D.D.O.}}{\text{min}} * V_{\text{Final Reacción}}}{13,6 * V_{\text{Muestra}} * [\text{proteína}]} \right) * 1000$$

3.4.6. Interpretación de la actividad de la AChE

En el caso de la actividad de la AChE, los valores de referencia disponibles son limitados y presentan una elevada variabilidad interespecífica y geográfica. Además, los niveles de actividad varían significativamente en función del tejido empleado para el análisis, lo que dificulta la comparación directa entre estudios (Burgeot et al., 2012; Lamine et al., 2023; Valbonesi et al., 2003). Ante la falta de valores de referencia validados para *D. trunculus*, en el presente trabajo se han adoptado como marco de referencia los rangos propuestos por Burgeot et al. (2012) para *Mytilus galloprovincialis*, a partir de tejido branquial de ejemplares procedentes de la costa mediterránea española.

Según estos autores, el EAC se sitúa en un rango de 10 a 20 mU de AChE/mg de proteína, mientras que el BAC abarca valores entre 15 y 29 mU de AChE/mg de proteína. Si bien estos valores permiten una aproximación al estado neurofisiológico de los organismos, su aplicación a *D. trunculus* debe considerarse meramente orientativa, ya que no existen umbrales específicos validados para esta especie.

3.5. Análisis del índice de condición

Para el análisis del IC se trabajó con 15 individuos por punto de muestreo. Cada ejemplar fue medido longitudinalmente con calibre digital Dexter, abierto cuidadosamente con bisturí y colocado boca abajo sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua acumulado en su interior. Una vez drenado, se procedió a pesar el organismo entero y a determinar el sexo y el estado gonadal de cada individuo.

El tejido blando fue extraído completamente, colocado sobre cápsulas de peso conocido, y pesado individualmente. Las valvas vacías y las cápsulas con tejido fueron introducidas en una estufa a 100 °C durante 24 horas para su deshidratación (Figura 13). Finalizado el secado, las muestras se colocaron en un desecador para evitar la reabsorción de humedad y, posteriormente, se pesaron nuevamente de forma individual.



Figura 13: Tejidos blandos húmedos y valvas de *Donax trunculus* dispuestos sobre bandeja de albal para su introducción en la estufa. Muestra de la playa de Daimús en la campaña de primavera de 2025.

Para el cálculo del IC se emplearon las ecuaciones revisadas y aplicadas por Zeng y Yang (2020) en bivalvos:

$$IC_1 = \left(\frac{P_{seco}}{L} \right) * 100 \quad ; \quad IC_2 = \left(\frac{P_{seco}}{P_{valva}} \right) * 100$$

Donde:

IC: índice de condición, expresado como porcentaje (%);

P_{seco}: peso seco del tejido blando del individuo (g);

P_{valva}: peso seco de las dos valvas del individuo (g);

L: longitud de la concha (cm).

3.6. Análisis de los datos

El tratamiento estadístico de los datos incluyó análisis descriptivos mediante Microsoft Excel, con el objetivo de explorar la distribución y tendencia central de las variables, así como pruebas inferenciales aplicadas con el software R, seleccionando pruebas paramétricas o no paramétricas en función de la naturaleza de los datos. Adicionalmente, se realizó un análisis factorial con el mismo software, con el fin de identificar patrones multivariantes entre las variables seleccionadas.

En los análisis, se consideró como factor principal el muestreo, definido como la combinación de dos factores: playa y campaña (invierno/primavera). Las variables analizadas incluyeron: porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (%LMS), tiempo de retención del rojo neutro (NRRT), índice de condición (IC₁ e IC₂), actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y tamaño (longitud de la concha) de los individuos.

La normalidad de los datos se evaluó mediante el sesgo y la curtosis estandarizados, considerando que los datos seguían una distribución normal cuando ambos valores se situaban dentro del intervalo comprendido entre -2 y 2. La homocedasticidad se verificó mediante la prueba de Levene, interpretando como no significativas las diferencias entre varianzas con un nivel de confianza del 95 % cuando el p-valor fue igual o superior a 0,05.

En aquellos casos en los que se cumplieron ambos supuestos, se aplicó un ANOVA unifactorial para comparar las medias entre muestreos. Cuando se detectó la violación de uno o ambos supuestos, se recurrió a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, basada en la comparación de medianas. En todos los casos donde se identificaron diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$), se llevaron a cabo análisis post-hoc para determinar la localización de dichas diferencias: la prueba de Fisher LSD tras ANOVA y el procedimiento de comparaciones por pares de Wilcoxon con corrección de Bonferroni tras la prueba de Kruskal-Wallis. En base a estos resultados, se establecieron agrupaciones de grupos homogéneos.

El análisis factorial se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones metodológicas de Sharma (1996). En primer lugar, se seleccionaron las variables a incluir en el análisis en función de la Medida de Adecuación Muestral (MAM) de la matriz anti-imagen, descartando aquellas con valores bajos de adecuación. La calidad del ajuste del modelo se verificó mediante el índice Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), cuyos criterios de interpretación se recogen en la Tabla 4. El método de extracción empleado fue el de componentes principales, y se utilizó una rotación varimax para facilitar la interpretación de los componentes extraídos. Finalmente, se retuvieron aquellos factores cuyo autovalor fue superior a 1.

Tabla 4: Criterios de interpretación del índice de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) para evaluar la idoneidad del análisis factorial. Adaptado de Sharma (1996).

KMO	Recomendación
>0,90	Excelente
0,80	Meritorio
0,70	Mediano
0,60	Mediocre
0,50	Despreciable
<0,50	Inaceptable

4. Resultados

Los resultados de los parámetros abióticos del agua, temperatura y salinidad, registrados durante los muestreos en las cinco playas en las campañas de invierno y primavera de 2025, se presentan en la Tabla 5. La temperatura media del agua en la campaña de invierno fue $14,82\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,55$ (DE), mientras que la temperatura media en la campaña de primavera alcanzó los $22,86\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,73$ (DE). El rango de temperatura entre las dos campañas fue de $14,2 - 23,7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Con respecto a la salinidad, por lo general en ambas campañas los valores oscilaron entre 36 y 37, con un rango de $31 - 37,1$. La principal excepción se observó en la playa de Les Deveses durante la campaña de invierno, donde se registró una salinidad de 31. En esta misma playa, durante la campaña de primavera, se obtuvo también el valor más bajo del conjunto, 35,3. Estos valores atípicos podrían estar relacionados con la proximidad del punto de muestreo a la desembocadura del río Racons (Figura 7) y con una mayor influencia de las precipitaciones y la descarga de agua dulce.

Tabla 5: Parámetros abióticos del agua registrados en las cinco playas del sur del Golfo de Valencia durante las campañas de invierno y primavera de 2025. T^a : temperatura ($^{\circ}\text{C}$), S : salinidad.

Playa	Campaña	T^a ($^{\circ}\text{C}$)	S
Tavernes	Invierno	14,2	36,8
Gandía	Invierno	15,7	36,6
Daimús	Invierno	14,8	37,1
Piles	Invierno	14,6	36,9
Les Deveses	Invierno	14,8	31
Tavernes	Primavera	21,8	36,4
Gandía	Primavera	22,5	36,9
Daimús	Primavera	23,1	37,1
Piles	Primavera	23,2	36
Les Deveses	Primavera	23,7	35,3

Las variables IC_1 , talla de los individuos empleados para análisis del IC y talla de los individuos utilizados en el análisis de los biomarcadores cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. En consecuencia, se realizó una comparación estadística

entre grupos según el factor muestreo (combinación de playa y campaña) mediante ANOVA, cuyos resultados se presentan en la Tabla 6. De las tres variables analizadas, únicamente IC₁ mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos, las cuales se detallan en el apartado 4.4.

Tabla 6: Resultados del ANOVA unifactorial para las variables IC₁, talla de los individuos empleados para el índice de condición (IC) y talla de los individuos empleados en el análisis de biomarcadores (BM). Se consideran diferencias estadísticamente significativas $p\text{-valor} < 0,05$.

Variable	Factor	df _{entre}	df _{intra}	F	p-valor
Talla (IC)	Muestreo	9	140	0,11	0,9995
Talla (BM)	Muestreo	9	140	0,07	0,9999
IC ₁	Muestreo	9	140	3,80	0,0003

En contraste, las variables NRRT, %LMS, AChE e IC₂ no cumplieron uno o ambos supuestos de normalidad y homocedasticidad, por lo que la comparación estadística se llevó a cabo mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para las variables tiempo de retención del rojo neutro (NRRT), porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (% LMS), IC₂, y actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). Se consideran diferencias estadísticamente significativas $p\text{-valor} < 0,05$.

Variable	Factor	df	H	p-valor
NRRT	Muestreo	9	80,25	0,0000
% LMS	Muestreo	9	77,81	0,0000
AChE	Muestreo	9	15,06	0,0894
IC ₂	Muestreo	9	49,42	1,3854E-7

Las diferencias observadas en NRRT y % LMS se describen en el apartado 4.2., y las correspondientes al IC₂ en el apartado 4.4. Por su parte, la actividad de la AChE, cuyos resultados se detallan en el apartado 4.3., no mostró diferencias estadísticamente significativas; no obstante, el p-valor (0,0894) se encontró próximo al umbral de significancia.

4.1. Biometría

No se observaron diferencias significativas en la talla de los organismos entre playas ni campañas, por lo que se descarta la influencia del tamaño sobre los biomarcadores e índices analizados (Figura 14).

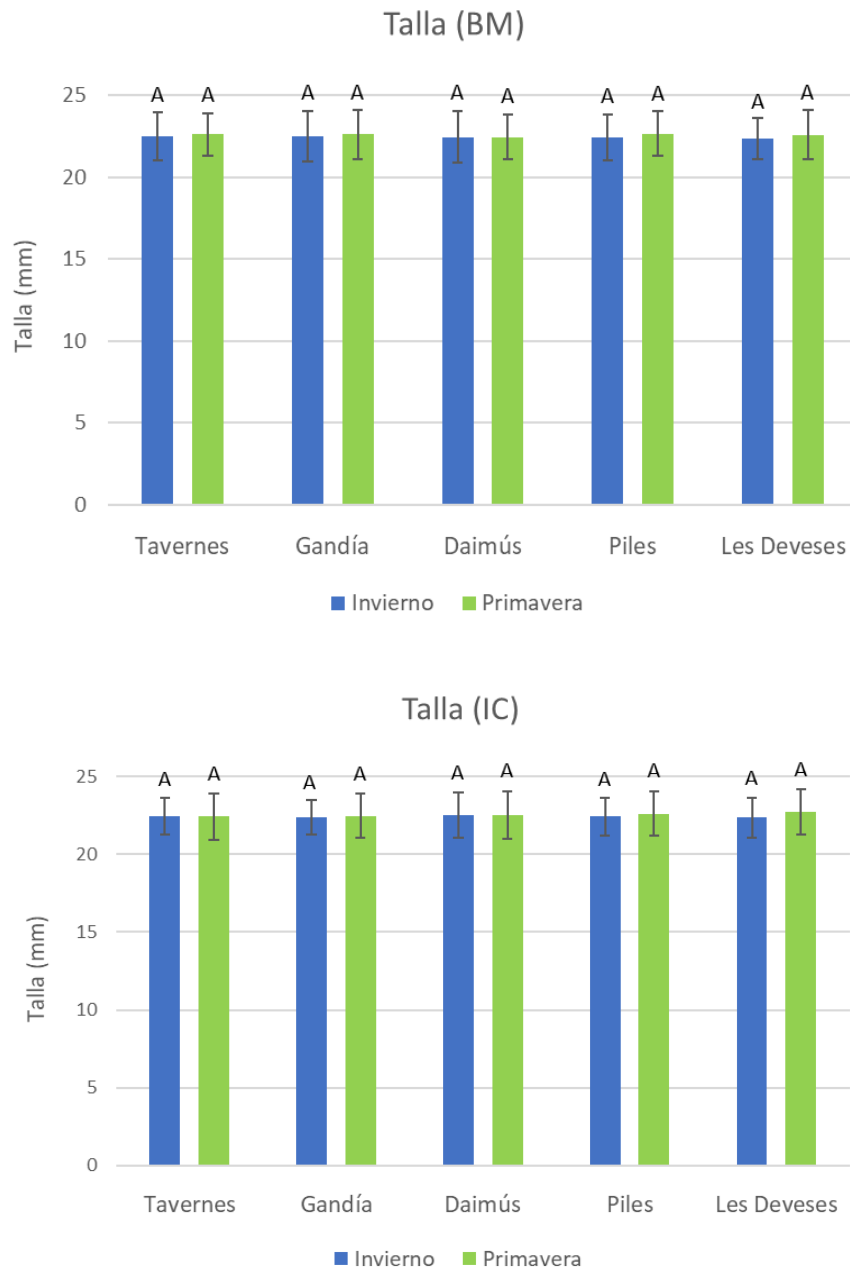


Figura 14: Talla media de los individuos empleados en el análisis del índice de condición (IC) y en los análisis de biomarcadores (BM). Campañas de invierno (azul) y primavera (verde). Las barras de error representan la desviación estándar. Las letras indican inclusión en grupos homogéneos (ANOVA); no se observaron diferencias significativas entre grupos (p -valor > 0.05). Los valores numéricos exactos se presentan en las Tablas 8 y 10.

4.2. Estabilidad de la membrana lisosomal

En Figura 15 y Tabla 8 se presentan los resultados del ensayo de retención del rojo neutro, expresados como tiempo de retención (NRRT) y porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (% LMS).

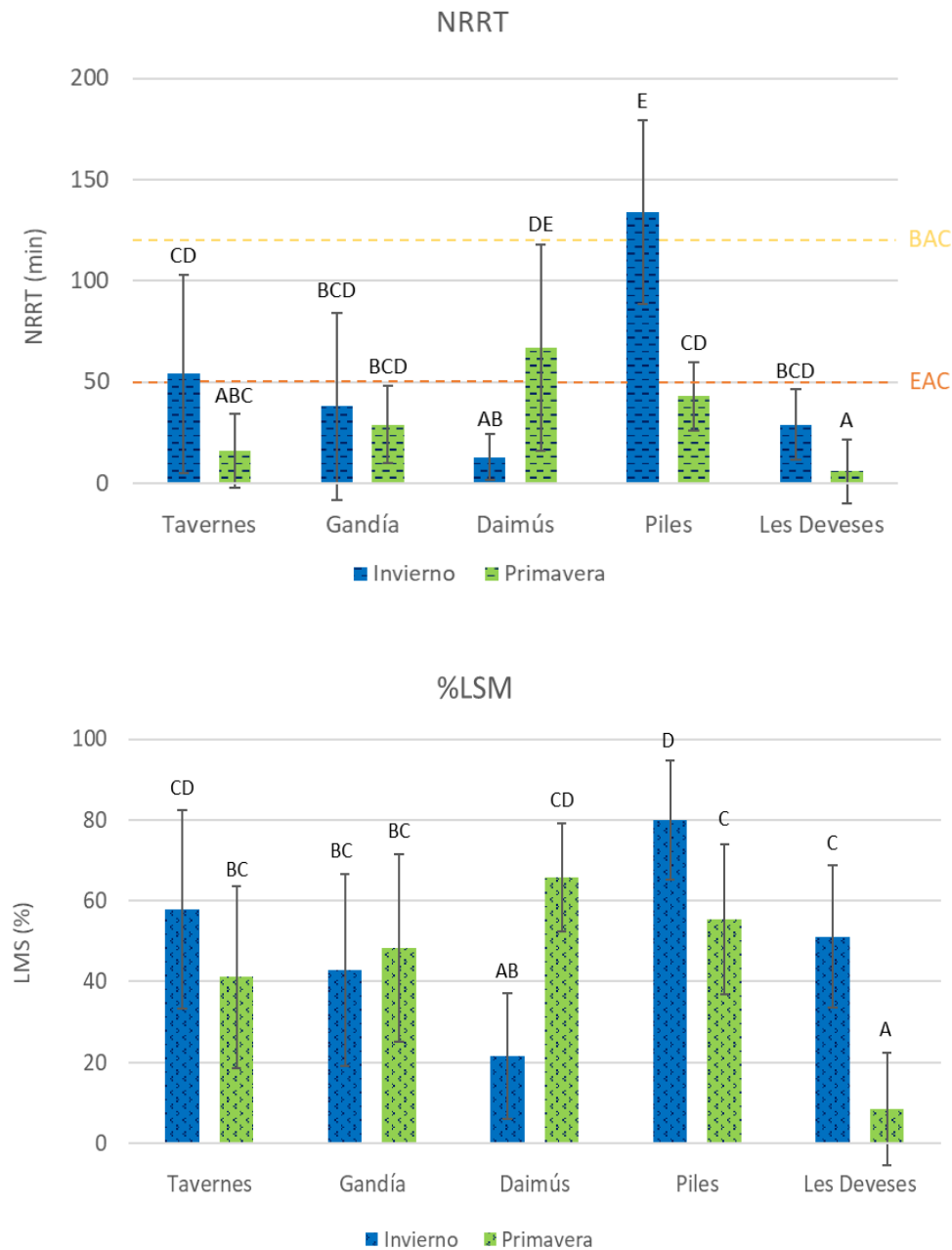


Figura 15: Tiempo de retención del rojo neutro (NRRT) y porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (% LMS). Campaña de invierno (azul) y primavera (verde). Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Los valores numéricos exactos se presentan en la Tabla 8. Las letras indican inclusión en grupos homogéneos (Kruskal-Wallis; Wilcoxon-Bonferroni; p -valor $< 0,05$). Se indican el criterio de fondo (BAC) y criterio de evaluación ambiental (EAC) para *Mitylus* sp.

Tabla 8: Talla de los individuos y resultados del ensayo de retención del rojo neutro, expresados como tiempo de retención del rojo neutro (NRRT) y porcentaje de estabilidad de la membrana lisosomal (% LMS). Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar, $n = 15$.

Playa	Campaña	Talla (mm)	NRRT (min)	% LMS
Tavernes	Invierno	22,50 $\pm$ 1,48	54,00 $\pm$ 49,03	57,87 $\pm$ 24,43
Gandía	Invierno	22,50 $\pm$ 1,52	38,00 $\pm$ 46,36	42,93 $\pm$ 23,77
Daimús	Invierno	22,45 $\pm$ 1,60	13,00 $\pm$ 11,15	21,60 $\pm$ 15,65
Piles	Invierno	22,42 $\pm$ 1,39	134,0 $\pm$ 45,17	79,91 $\pm$ 14,74
Les Deveses	Invierno	22,35 $\pm$ 1,24	29,00 $\pm$ 17,44	51,11 $\pm$ 17,57
Tavernes	Primavera	22,61 $\pm$ 1,30	16,00 $\pm$ 18,34	41,16 $\pm$ 22,45
Gandía	Primavera	22,59 $\pm$ 1,48	29,00 $\pm$ 19,20	48,36 $\pm$ 23,16
Daimús	Primavera	22,45 $\pm$ 1,34	67,00 $\pm$ 50,98	65,78 $\pm$ 13,34
Piles	Primavera	22,64 $\pm$ 1,36	43,00 $\pm$ 16,88	55,29 $\pm$ 18,57
Les Deveses	Primavera	22,58 $\pm$ 1,48	6,00 $\pm$ 15,83	8,44 $\pm$ 13,94

Para el NRRT, se observaron diferencias significativas entre los distintos muestreos (Kruskal-Wallis; Wilcoxon-Bonferroni; $p < 0,05$), con una tendencia general a valores más elevados en la campaña de invierno respecto a la de primavera (Figura 15). El valor máximo se registró en la playa de Piles en invierno (134,0 $\pm$ 45,17 min), siendo el único caso que superó el BAC. Además de este, sólo otras dos playas superaron el EAC: Daimús en primavera (67,0 $\pm$ 50,98 min) y Tavernes en invierno (54,0 $\pm$ 49,03 min). El resto de los valores, particularmente los correspondientes a primavera, se situaron por debajo del EAC, destacando el valor mínimo en Les Deveses en primavera (6,0 $\pm$ 15,83 min), claramente indicativo de un estado celular alterado.

Con respecto al % LMS, se observaron diferencias significativas entre los grupos de muestreo (Kruskal-Wallis; Wilcoxon-Bonferroni; $p < 0,05$), aunque con una menor diferenciación estacional en comparación con el NRRT (Figura 15). El valor más alto se registró en Piles durante el invierno (79,91 $\pm$ 14,74 %), mientras que el valor más bajo correspondió a Les Deveses en primavera (8,44 $\pm$ 13,94 %), en clara concordancia con los resultados del NRRT. También se observaron valores elevados en Tavernes en invierno (57,87 $\pm$ 24,43) y en Piles y Daimús en primavera (55,29 $\pm$ 18,57 % y 65,78 $\pm$ 13,34 %, respectivamente), mientras que en Daimús en invierno se alcanzó uno de los valores más reducidos del conjunto (21,60 $\pm$ 15,65 %).

En este sentido, destaca el caso de la playa de Daimús, que mostró una respuesta contraria a la tendencia general entre campañas para ambos parámetros del rojo neutro. En invierno, se registraron valores bajos tanto de NRRT (inferior al EAC) como de % LMS (inferior al 25 %). Sin embargo, en primavera los valores aumentaron notablemente, alcanzando un NRRT por encima del EAC y un % LMS por encima del 60 %. Este comportamiento sugiere una mejora relativa del estado fisiológico de los organismos en esta playa durante la campaña primaveral, en contraste con la tendencia general de descenso observada en otras localidades.

4.3. Actividad de la acetilcolinesterasa

En la Figura 16 y la Tabla 9 se presentan los resultados de la actividad de la AChE, expresados como mU de AChE/mg de proteína.

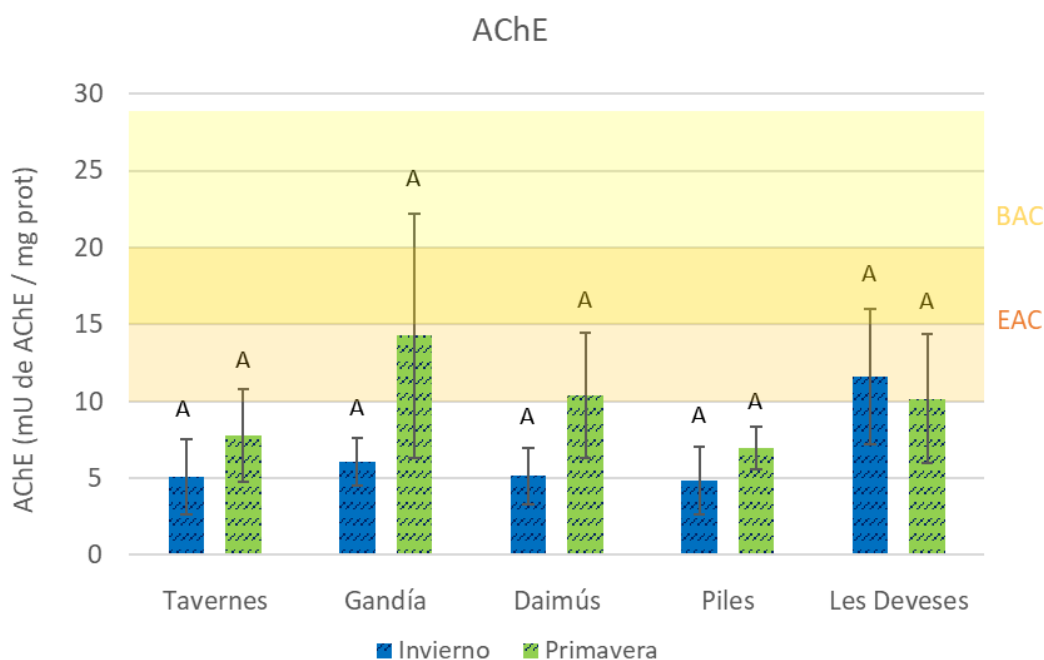


Figura 16: Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). Campaña de invierno (azul) y primavera (verde). Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Las letras indican inclusión en grupos homogéneos (Kruskal-Wallis). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p -valor > 0.05). Los valores numéricos exactos se presentan en la Tabla 9. Se representa el rango del criterio de fondo (BAC) en amarillo y del criterio de evaluación ambiental (EAC) en naranja, ambos establecidos para *Mitylus galloprovincialis*.

En general, durante la campaña de invierno se observó una actividad de la AChE más baja y homogénea, con valores comprendidos entre $4,88 \pm 2,20$ y $6,06 \pm 1,55$ mU /mg, a excepción de Les Deveses, que presentó un valor notablemente superior ($11,61 \pm 4,43$ mU/mg). En primavera, la actividad fue superior y más variable, con un rango entre $6,94 \pm 1,40$ y $14,28 \pm 7,96$ mU/mg. El valor máximo se registró en Gandía, seguido de Daimús y Les Deveses, mientras que Piles presentó la actividad más baja en ambas campañas.

Tabla 9: Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), expresados como mU de AChE/mg de proteína. Los datos corresponden a la media de tres y se presentan como media $\pm$ desviación estándar, $n = 3$.

Playa	Campaña	AChE
Tavernes	Invierno	$5,11 \pm 2,44$
Gandía	Invierno	$6,06 \pm 1,55$
Daimús	Invierno	$5,15 \pm 1,82$
Piles	Invierno	$4,88 \pm 2,20$
Les Deveses	Invierno	$11,61 \pm 4,43$
Tavernes	Primavera	$7,78 \pm 3,01$
Gandía	Primavera	$14,28 \pm 7,96$
Daimús	Primavera	$10,39 \pm 4,07$
Piles	Primavera	$6,94 \pm 1,40$
Les Deveses	Primavera	$10,15 \pm 4,20$

De acuerdo con los valores de referencia propuestos por Burgeot et al. (2012) para *M. galloprovincialis*, todos los resultados obtenidos se situaron por debajo del BAC. Únicamente se alcanzaron los valores del EAC en Gandía y Daimús durante la primavera, así como en Les Deveses en ambas campañas, aunque con valores próximos al límite inferior del rango. Cabe destacar el caso de Gandía en primavera, donde se registró el valor más elevado del conjunto ($14,28 \pm 7,96$ mU/mg), muy próximo al umbral inferior del BAC. No obstante, como ya se ha señalado, estos valores de referencia son meramente orientativos y fueron establecidos para una especie distinta, por lo que su aplicación directa a *D. trunculus* debe interpretarse con precaución.

4.4. Índice de condición

La Figura 17 y la Tabla 10 resumen los resultados de los análisis de los dos índices de condición (IC_1 e IC_2), calculados para individuos con tallas comprendidas entre los 20 y los 25 mm de longitud.

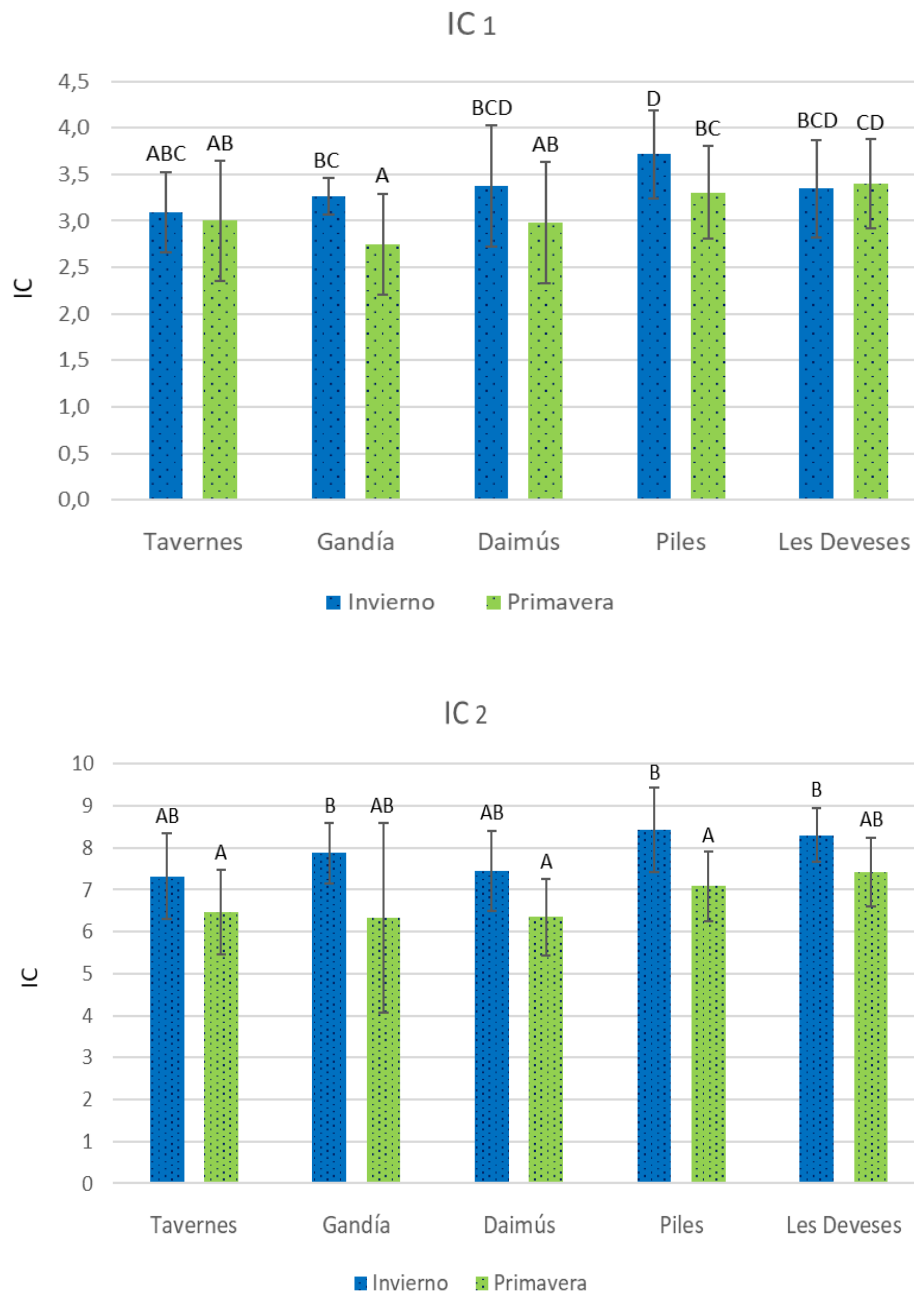


Figura 17: Índice de condición IC_1 e IC_2 de *Donax trunculus* durante las campañas de invierno (azul) y primavera (verde), calculado para individuos con tallas comprendidas entre los 20 y 25 mm. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Las letras indican inclusión en grupos homogéneos: ANOVA (LSD de Fisher; $p < 0,05$) para IC_1 , y Kruskal-Wallis (Wilcoxon-Bonferroni; $p < 0,05$) para IC_2 . Los valores numéricos exactos se presentan en la Tabla 10.

La tendencia general de ambos índices es una disminución de los valores en primavera respecto a los registrados durante la campaña de invierno, evidenciando un patrón estacional en la condición general de los organismos.

Tabla 10: Talla de los individuos y resultados del índice de condición (IC). Se muestran los valores de IC₁ y de IC₂ ajustados para tallas de 20 a 25 mm. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar, n = 15.

Playa	Campaña	Talla (mm)	IC ₁	IC ₂
Tavernes	Invierno	22,45 $\pm$ 1,17	3,09 $\pm$ 0,43	7,32 $\pm$ 1,01
Gandía	Invierno	22,39 $\pm$ 1,09	3,26 $\pm$ 0,20	7,87 $\pm$ 0,73
Daimús	Invierno	22,51 $\pm$ 1,45	3,37 $\pm$ 0,65	7,46 $\pm$ 0,95
Piles	Invierno	22,43 $\pm$ 1,22	3,71 $\pm$ 0,47	8,43 $\pm$ 1,02
Les Deveses	Invierno	22,36 $\pm$ 1,28	3,35 $\pm$ 0,53	8,30 $\pm$ 0,65
Tavernes	Primavera	22,43 $\pm$ 1,49	3,00 $\pm$ 0,65	6,45 $\pm$ 1,01
Gandía	Primavera	22,48 $\pm$ 1,42	2,75 $\pm$ 0,55	6,32 $\pm$ 2,26
Daimús	Primavera	22,53 $\pm$ 1,53	2,98 $\pm$ 0,65	6,35 $\pm$ 0,91
Piles	Primavera	22,63 $\pm$ 1,40	3,31 $\pm$ 0,50	7,08 $\pm$ 0,83
Les Deveses	Primavera	22,74 $\pm$ 1,48	3,40 $\pm$ 0,48	7,42 $\pm$ 0,82

4.5. Análisis factorial

Las variables finalmente seleccionadas para el análisis factorial fueron T^a, NRRT, AChE e IC₁. El KMO global fue de 0,76, lo que indica un ajuste mediano cercano a meritorio para la aplicación del análisis factorial, según los criterios establecidos por Sharma (1996).

Se extrajo un único factor con un autovalor (eigenvalor) de 2,33, que explicó el 58,30 % de la variabilidad total de los datos. La ecuación correspondiente al Factor 1, compuesta por las cargas factoriales obtenidas, fue la siguiente:

$$\text{Factor 1} = 0,771 * T - 0,643 * \text{NRRT} + 0,821 * \text{AChE} - 0,806 * \text{IC}_1$$

En este componente, T^a y la expresión de AChE se asociaron positivamente, mientras que NRRT e IC₁ lo hicieron en sentido negativo, reflejando un gradiente en el que las variables relacionadas con el metabolismo aparecen en oposición a aquellas vinculadas al estrés celular o al estado fisiológico general.

5. Discusión de los resultados

En conjunto, la respuesta fisiológica observada mediante el biomarcador LMS coincide con los resultados del IC: valores más elevados en invierno y una disminución generalizada en primavera. Un aspecto relevante para interpretar este patrón es que los individuos muestreados en primavera presentaban gónadas de menor tamaño en comparación con los de invierno (Soms-Molina, comunicación personal, 30 de mayo de 2025), lo que sugiere que el vaciamiento gonadal tuvo lugar entre ambas campañas. Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura, donde se ha documentado que el IC tiende a alcanzar su valor máximo previo al desove y disminuye posteriormente como consecuencia del vaciamiento gonadal y del consumo de las reservas energéticas durante la reproducción (Soms-Molina et al., 2024).

Los resultados del NRRT revelan una marcada variación espacio-temporal en la estabilidad de la membrana lisosomal, con una tendencia general a valores inferiores en primavera. El único caso que superó el BAC fue Piles en invierno, lo que sugiere un estado fisiológico óptimo y una baja exposición a estresores ambientales. Otros dos casos, Tavernes en invierno y Daimús en primavera, presentaron valores por encima del EAC, lo que indica una integridad lisosomal moderadamente conservada. No obstante, cabe señalar que estos valores de referencia han sido establecidos para mejillones del género *Mytilus* (Martínez-Gómez et al., 2015), y no específicamente para *D. trunculus*, por lo que su aplicación debe considerarse orientativa. En contraste, el resto de las playas mostraron valores por debajo del EAC, especialmente Les Deveses en primavera, donde se registró el valor mínimo, evidenciando un posible deterioro en la estabilidad celular potencialmente asociado a condiciones locales adversas.

Soms-Molina et al. (2024) evaluaron la estabilidad lisosomal en la especie mediante bioensayos en condiciones controladas de laboratorio, trabajando con tres niveles de temperatura (12, 20 y 27,5 °C) y distintos rangos de salinidad (27-28, 32-33 y 37-38). Sus resultados mostraron un incremento en el NRRT entre 12 y 20 °C, con valores por encima del EAC a 12 °C en los tres rangos de salinidad, y valores superiores al BAC a 20 °C cuando la salinidad fue superior a 32,5. En cambio, a 27,5 °C y salinidades superiores a 27, los niveles de NRRT disminuyeron drásticamente, alcanzando valores por debajo del EAC. Cabe señalar que el desove se produjo entre los tratamientos de 20 y 27,5 °C, lo

que podría estar relacionado con dicha disminución. No se dispone de evidencia que indique si existe una relación lineal en los intervalos de temperatura ensayados.

Considerando que en el presente estudio las temperaturas oscilaron entre 14 y 23,7 °C y las salinidades entre 31 y 37,1, cabría esperar una estabilidad lisosomal elevada en ausencia de otros estresores, al menos con valores de NRRT por encima del EAC. El hecho de que la mayoría de las playas no alcanzaran dicho umbral, y que solo una superara el BAC, sugiere la presencia de condiciones ambientales desfavorables adicionales no explicadas únicamente por temperatura y salinidad. En la campaña de primavera, este deterioro podría estar vinculado a la disminución del IC, aunque no se descarta la influencia de otros factores nocivos. En la campaña de invierno, dadas las condiciones ambientales, habría sido razonable esperar valores más elevados.

Los resultados del % LMS confirmaron las tendencias observadas en el NRRT, evidenciando variabilidad espacial y estacional en la estabilidad de la membrana lisosomal. La elevada estabilidad observada en Piles, especialmente en invierno, refuerza la interpretación de que esta playa presentó condiciones ambientales favorables durante dicho periodo. Por el contrario, los valores bajos, y en especial el valor extremo observado en Les Deveses en primavera (8,44 %), confirman al igual que el NRRT un estado celular comprometido. En comparación con los resultados obtenidos por Soms-Molina et al. (2024), para rangos similares de temperatura y salinidad, los valores de % LMS deberían haber superado el 50 % en ambas campañas en ausencia de estresores adicionales, lo que nuevamente apuntaría a la influencia de factores ambientales adversos no directamente relacionados con los parámetros abióticos medidos. No obstante, debe tenerse en cuenta que el estudio de Soms-Molina et al. (2024) se llevó a cabo en condiciones controladas de laboratorio, y que el desove tuvo lugar después de las condiciones equivalentes a la campaña de primavera, y no previamente como en este trabajo.

En el caso del biomarcador AChE, aunque las diferencias entre grupos no alcanzaron significación estadística, el p-valor próximo al umbral ($p = 0,0894$) apunta a una posible tendencia que debería corroborarse mediante un mayor tamaño muestral o estudios complementarios. En términos generales, la actividad enzimática fue más baja y homogénea entre playas durante la campaña de invierno, en contraste con la mayor variabilidad y los valores más elevados registrados en primavera. Destacó Gandía en primavera, que alcanzó el valor más elevado de todo el conjunto, así como Les Deveses, que presentó valores dentro del EAC en las dos campañas. Dado que la inhibición de la

AChE constituye un indicador temprano de exposición a contaminantes neuroactivos (como pesticidas organofosforados, carbamatos o determinados metales pesados), los valores más elevados en dichas playas podrían sugerir condiciones ambientales relativamente favorables en términos de menor exposición a inhibidores de la enzima.

El patrón general observado coincide con lo descrito previamente para *D. trunculus*, tanto en condiciones de campo como de laboratorio. Investigaciones recientes han mostrado que la actividad de la AChE se incrementa con la temperatura hasta un cierto umbral fisiológico, destacando el trabajo experimental de Ávila (2024) y los muestreos estacionales realizados por Lamine et al. (2023). Este comportamiento no es exclusivo de *D. trunculus*, ya que también se ha documentado en otras especies de invertebrados (Lionetto et al., 2013). En particular, en *Mytilus* spp. la actividad de la AChE puede llegar a duplicarse entre estaciones, siguiendo estrechamente las variaciones de temperatura, con valores más elevados en los periodos cálidos (Burgeot et al., 2012).

No obstante, al comparar los niveles obtenidos en este estudio con los reportados en la literatura, se observa que los valores aquí medidos resultaron relativamente bajos. Lamine et al. (2023) documentaron actividades comprendidas entre 30–50 mU/mg en invierno y 41–77 mU/mg en primavera; sin embargo, en dicho trabajo se empleó todo el tejido blando del organismo y no sólo el pie, lo que puede conllevar una mayor expresión de la enzima. En el caso del estudio de Ávila (2024), los valores de referencia de campo alcanzaron 21 mU/mg, pero el muestreo se realizó en junio, con temperaturas de 25,2 °C y salinidad de 37,5, condiciones que favorecen una mayor expresión de la AChE en línea con la tendencia térmica previamente señalada. En este contexto, resulta necesario profundizar en la investigación de este biomarcador en *D. trunculus*, de modo que se disponga de una base comparativa más amplia que permita comprender mejor sus variaciones naturales y establecer criterios de valoración sólidos frente a otros estudios.

El análisis factorial permitió identificar un único componente que resume la interrelación entre la temperatura, los biomarcadores y el índice de condición. El factor obtenido explicó más de la mitad de la variabilidad total (58,3 %) y puede interpretarse como un gradiente térmico-fisiológico, en el que confluyen respuestas a distintos niveles de organización biológica. La asociación positiva entre la temperatura y la expresión de la AChE refleja un aumento de la actividad metabólica a nivel molecular con el incremento térmico. Por el contrario, la relación negativa con el NRRT y el IC indica que dicho incremento se produce en detrimento de la integridad celular y del estado fisiológico

general de los organismos. Este patrón resulta coherente con el ciclo biológico de la especie: al aumentar la temperatura se desencadena el desove, lo que conlleva una disminución de las reservas energéticas y, en consecuencia, valores más bajos de IC y una mayor inestabilidad lisosomal. Así, el factor integra la influencia de la temperatura no sólo como modulador metabólico, sino también como desencadenante de procesos reproductivos que repercuten en la condición fisiológica global de los organismos.

6. Conclusiones

El presente estudio constituye una aproximación pionera en la evaluación integrada de biomarcadores de estrés celular y de neurotoxicidad en *D. trunculus* en playas del sur del Golfo de Valencia. Los resultados revelaron una marcada variabilidad espacio-temporal en la respuesta de los biomarcadores, en la que se evidenció un patrón estacional con valores más elevados de LMS durante el invierno, frente a un deterioro generalizado en primavera, que coincide con el vaciamiento gonadal. En el caso de la AChE, si bien las diferencias entre grupos no alcanzaron significación estadística, la tendencia observada con valores más altos en primavera sugiere una modulación de la actividad enzimática asociada a la temperatura.

La comparación con otros estudios y con los valores de referencia desarrollados para *Mytilus* spp. refleja que los valores obtenidos para ambos biomarcadores fueron relativamente bajos. La mayoría de los resultados se situaron por debajo del BAC y del EAC, lo que podría indicar a la influencia de factores ambientales adversos adicionales a la temperatura y la salinidad. No obstante, este resultado también pone de manifiesto la necesidad de establecer valores de referencia específicos para *D. trunculus* en diferentes contextos ambientales, a fin de permitir una mejor valoración e interpretación de los valores obtenidos en futuros estudios.

El análisis factorial permitió integrar de manera conjunta la información procedente de los biomarcadores con la condición fisiológica y la temperatura, lo que evidenció relaciones consistentes entre metabolismo, ciclo reproductivo y estado celular de los organismos. En este sentido, el uso combinado de biomarcadores y parámetros fisiológicos refuerza el valor de *D. trunculus* como especie centinela.

Los resultados del presente trabajo subrayan la necesidad de profundizar en la investigación de biomarcadores en esta especie, ampliando la base comparativa mediante estudios de mayor duración, diferentes escalas espaciales y en combinación con análisis químicos del medio. El desarrollo de criterios específicos para *D. trunculus* permitirá avanzar hacia programas de monitoreo ambiental más precisos y efectivos, donde los biomarcadores puedan consolidarse como herramientas clave para la conservación y gestión sostenible de los ecosistemas costeros.

7. Referencias

- Ansell, A. D. (1983). The biology of the genus *Donax*. In A. McLachlan, T. & Erasmus (Eds.), *Sandy beaches as Ecosystems*, Developments in Hydrobiology, 19, 607–635. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2938-3_46
- Aguirre-Martínez, G. (2021). Effective biomarkers to assess the toxicity of pharmaceutical residues on marine bivalves. In G. Aguirre-Martínez (Ed.), *Pharmaceuticals in Marine and Coastal Environments*, 1, 419–455. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102971-8.00003-2>
- Avila, M. E. (2024). *Efectos de la salinidad y temperatura sobre el biomarcador acetilcolinesterasa en el bivalvo Donax trunculus* [Trabajo Fin de Máster, Universitat Politècnica de València]. Repositorio Institucional UPV.
- Baeta, M., Solís, M. A., Frias-Vidal, S., Claramonte, L., Sepouna, A. & Ballesteros, M. The wedge clam (*Donax trunculus*) hand-operated fishery in the NW Mediterranean Sea: Landings, catch composition, damage rates and impact of fishing activity, *Ocean & Coastal Management*, 237, 106534. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2023.106534>
- Belabed, S., & Soltani, N. (2013). Acute toxicity of Cadmium on *Donax trunculus*: Acetylcholinesterase, Glutathione S-Transferase Activities and Pattern of Recovery. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 54–61.
- Ben-Haddad, M., Abelouah, M. R., Hajji, S., De-la-Torre, G. E., Abou-Oualid, H., Rangel-Buitrago, N., & Ait Alla, A. (2022). The wedge clam *Donax trunculus* L., 1758 as a bioindicator of microplastic pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 178, 113607. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113607>
- Bocquené, G. & Galgani, F. (1998). Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 22. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5048>
- Burgeot, T., Bocquéné, 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. M., & Vethaak, A. D. (Eds), *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects*, ICES Cooperative Research Report, 315, 49–53. Copenhagen (Denmark).
- Camus, L., Grøsvik, B. E., Børseth, J. F., & 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(5), 325–329. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00056-8)

- Cataldo, D. H., Boltovskoy, D., Stripeikis, J. & Pose, M. (2001). Condition index and growth rates of field caged *Corbicula fluminea* (Bivalvia) as biomarkers of pollution gradients in the Paraná river delta (Argentina), *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 4(2), 187–201. <https://doi.org/10.1080/14634980127712>
- Chahouri, A., Agnaou, M., El-Hanaoui, M., Yacoubi, B., Moukrim, A., & Banaoui, A. (2022). Assessment of seasonal and spatial variation responses of integrated biomarkers in two marine sentinel bivalve species: Agadir Bay (Southern of Morocco). *Marine Pollution Bulletin*, 174, 113179. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113179>
- Chahouri, A., Yacoubi, B., Moukrim, A. & Banaoui, A. (2023). Bivalve molluscs as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: Recent advances, *Continental Shelf Research*, 264, 105056. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2023.105056>
- Davies, I. M., Gubbins, M. J., Hylland, K., Thain, J. E., Maes, T., Martínez-Gómez, C., Giltrap, M., Burgeot, T., Wosniok, W., Lang, T. & Vethaak, A. D. (2012). Technical annex: assessment criteria for biological effects measurements. In Davies, I. M., & Vethaak, A. D. (Eds), *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects*, ICES Cooperative Research Report, 315, 209–212. Copenhagen (Denmark).
- Dimitriadis, V. K., Gougoula, C., Anestis, A., Pörtner, H. O., & Michaelidis, B. (2012). Monitoring the biochemical and cellular responses of marine bivalves during thermal stress by using biomarkers. *Marine Environmental Research*, 73, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.11.004>
- Elazzaoui, A., Moukrim, A., & Lefrere, L. (2019). A multibiomarker approach to assess the health state of coastal ecosystem receiving desalination plants in Agadir Bay, Morocco. *The Scientific World Journal*, 5875027. <https://doi.org/10.1155/2019/5875027>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Escrivá, J., Rodilla, M., Llarío, 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>
- Frías-Espéricueta, M. G., Osuna-López, J. I., Voltolina, D., López-López, G., Izaguirre-Fierro, G., & Muy-Rangel, M. D. (2008). The metal content of bivalve molluscs of a coastal lagoon of NW Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 90–92. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9322-4>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(99\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(99)00017-X)

- Gaspar, M. B., Chícharo, L. M., Vasconcelos, P., Garcia, 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. <https://doi.org/10.3989/scimar.2002.66n2111>
- Georgieva, T., Kachman, S. D., & Yankova, M. (2021). State of the Marine Environment along the Bulgarian Black Sea Coast as Indicated by Acetylcholinesterase Activity of Wedge Clam (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758), *Ecologia Balkanica*, Special Edition, 4, 135-143.
- Koukouzika, N., & 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. <https://doi.org/10.1007/s10646-004-1350-9>
- La Valle, P., Rocchetta, I., Vignati, D., & Gaggiotti, M. (2011). *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) as a potential biological indicator of grain-size variations in beach sediment, *Marine Environmental Research*, 11(5), 1426–1436. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.03.005>
- Lamine, I., Elazzaoui, A., Ben-Haddad, M., Agnaou, M. Moukrim, A. & 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, 38465–38479. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24943-0>
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A. & Schettino, T. (2013) Acetylcholinesterase inhibition as relevant biomarker in environmental biomonitoring: new insights and perspectives. *BioMed research International*, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/321213>
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., & Schettino, T. (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, 46(3), 324–330. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00403-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00403-4)
- Lowe, D. M., Moore, M. N., & Evans, B. M. (1992). Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Marine Ecology Progress Series*, 91, 135–140. <https://doi.org/10.3354/meps091135>
- Manca-Zeichen, 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, 971–982. <https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0868>
- Martínez-Gómez, C., Bignell, J. & Lowe, D. (2015). Lysosomal membrane stability in mussels. *ICES Techniques in Marine Environmental Science*, 56, 41 pp. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5084>

- Martínez-Gómez, C., Robinson, C. D., Burgeot, T., Gubbins, M., Halldorsson, H. P., Albentosa, M., Bignell, J. P., Hylland, K. & Vethaak, A. D. (2017). Biomarkers of general stress in mussels as common indicators for marine biomonitoring programmes in Europe: The ICON experience. *Marine Environmental Research*, 124, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.10.012>
- McLachlan, A. & Defeo, O. (2018). *The ecology of sandy shores*, 3, Academic Press, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-04773-6>
- Moukrim, A., Harchay, B., & Hanaoui, M. E. (2004). Study of *Donax trunculus* as a Sentinel Species for Environmental Monitoring of Sandy Beaches on Moroccan Coasts. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(4), 674-681. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0479-9>
- Nassar, A. M., Nasr, R. A., & Saleh, N. A. (2016). ACETYLCHOLINESTERASE: A UNIVERSAL TOXICITY BIOMARKER. *Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 15(1), 136–148.
- Patiño, D.M., Otero, J., Louzán, A. *et al.* (2021). Wedge clam (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758) reproduction: reproductive traits and environmental influence in the NW Iberian coast and contrast across Atlantic and Mediterranean waters. *Hydrobiologia*, 848, 1347–1366. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04532-x>
- Ramón, M., Abelló, P., & Richardson, C. A. (1995). Population structure and growth of *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) in the western Mediterranean. *Marine Biology*, 12, 665–671. <https://doi.org/10.1007/BF00349302>
- Seglen, P. O. (1983). Inhibitors of lysosomal function. *Methods in Enzymology*, 96, 737–764. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(83\)96063-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(83)96063-9)
- Sharma, S. (1996). *Applied Multivariate Techniques*. John Wiley & Sons Inc., New York, 512 p.
- Soms-Molina, S., 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. <https://doi.org/10.3390/app14072712>
- Tlili, S., & Mouneyrac, C. (2019). The wedge clam *Donax trunculus* as sentinel organism for Mediterranean coastal monitoring in a global change context. *Regional Environmental Change*, 19, 995–1007. <https://doi.org/10.1007/s10113-018-1449-9>
- Umar, A. M., & Aisami, A. (2020). Acetylcholinesterase Enzyme (AChE) as a Biosensor and Biomarker for Pesticides: A Mini Review. *Bulletin of Environmental Science and Sustainable Management*, 4, 7–12. <https://doi.org/10.54987/bessm.v4i1.526>

- Valbonesi, P., Sartor, G. and Fabbri, E. (2003). Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Science of The Total Environment*, 312 (1–3), 79–88. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00227-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00227-4)
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>
- Waykar, B. & Deshmukh, G. (2012). Evaluation of Bivalves as Bioindicators of Metal Pollution in Freshwater, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 48–53. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0447-0>
- Zeng, Y., & Yang, H. S. (2020). Review of molluscan bivalve condition index calculations and application in Northern Quahogs *Mercenaria mercenaria*, *Aquaculture Research*, 52(1), 23–36. <https://doi.org/10.1111/are.14866>

Anexo I. Relación con los ODS

Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) de la agenda 2030 de las Naciones Unidas

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 TFM con los ODS con un grado de relación más alto

El presente Trabajo de Fin de Máster se vincula directamente con el Objetivo de Desarrollo Sostenible 14: Vida submarina, que busca conservar y utilizar sosteniblemente los océanos, los mares y los recursos marinos.

La evaluación de biomarcadores de estrés celular (LMS) y neurotoxicidad (AChE) en *Donax trunculus* constituye una herramienta científica que contribuye al seguimiento del estado ecológico de los ecosistemas costeros del Mediterráneo. Estos análisis permiten identificar efectos tempranos de la contaminación y otros factores de estrés ambiental, lo cual es esencial para avanzar hacia una gestión sostenible de los recursos marinos.

Además, *D. trunculus* es un recurso pesquero tradicional de gran valor socioeconómico en comunidades costeras del Mediterráneo. La identificación de factores que limitan su recuperación poblacional aporta información útil para la gestión sostenible de este recurso y para la conservación de los ecosistemas costeros, en consonancia con la meta 14.2, que promueve la gestión sostenible y la resiliencia de los ecosistemas marinos y costeros.

Por otro lado, el uso de esta especie como organismo centinela frente a contaminantes contribuye a las metas 14.1 y 14.a, centradas respectivamente en la reducción de la contaminación marina y en el aumento del conocimiento científico y la transferencia de tecnología marina con el fin de mejorar la salud de los océanos.

En conjunto, este trabajo aporta evidencias científicas necesarias para fortalecer el monitoreo ambiental y avanzar en la conservación de los ecosistemas costeros mediterráneos, alineándose con las metas establecidas en el ODS 14.