



# Proyecto Para El Desarrollo De Técnicas Aplicables Al Cultivo De Gusanos Marinos Para Su Producción Intensiva.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

La captura de cebo vivo es una actividad tradicional ligada a los estuarios cántabros desde tiempos históricos. En las últimas décadas, los cambios en la sociedad cántabra unido a la aparición de la pesca recreativa ha modificado el carácter tradicional de esta actividad. Cada vez son menos los pescadores que acuden al estuario para capturar el cebo que necesitan, produciéndose un importante incremento de pescadores que prefieren comprarlo. Estos cambios en la forma de capturar el cebo han dado lugar a un gran incremento en la demanda de cebo vivo que no puede ser suplida por los mariscadores profesionales y que obliga a la importación de grandes cantidades de cebo alóctono, con los problemas tanto económicos como ecológicos que esto provoca. La importación de anélidos poliquetos para su venta como cebo vivo puede llegar a alcanzar hasta los 12.000.000 €, especialmente de las especies de *gusana Coreana (Paranereis acrata)* y *gusana Americana (Glycera dibranchiata)*. Además, la importación masiva de especies alóctonas puede provocar graves problemas de invasión y suplantación del hábitat por parte de las gusanas importadas que consiguen escapar del anzuelo o que son directamente liberadas por los pescadores al terminar su jornada de pesca.

Además, de su uso como cebo vivo para la pesca deportiva, en los últimos años se han desarrollado nuevos usos para los gusanos poliquetos que han aumentado la demanda e incrementado más aún el interés del producto. Concretamente, el uso de gusanos como complemento de la dieta de numerosas especies de peces se ha revelado como un estupendo aporte extra de nutrientes, muy conveniente para el buen desarrollo de estas especies en piscicultura.

Todo esto ha generado un gran interés por el desarrollo de técnicas que permitan cultivar especies de gusanos poliquetos para abastecer un mercado con una demanda creciente. La realización de estudios para el cultivo de gusanos marinos comenzó a finales de la década de



los años 70. Previamente se habían realizado estudios en cuanto a su hábitat, preferencia de alimentos, ciclo reproductor, etc., si bien los poliquetos no habían sido identificados como posibles organismos a cultivar en condiciones intensivas.

Actualmente, la acuicultura intensiva comercial de poliquetos se realiza con éxito en países como Reino Unido, Irlanda, Holanda y Australia entre otros.

En España se han realizado intentos de cultivo de gusanos marinos, si bien no han fructificado y en consecuencia la importación de gusanos es la única solución actual ante los problemas que genera su demanda por parte del pescador aficionado.

El Grupo de Ecología de la Universidad de Cantabria y la empresa TEICAN Medioambiental S.L. iniciaron en el año 2004 un proyecto financiado por la **Fundación Alfonso Martín Escudero**, cuyo objeto era estudiar la viabilidad técnica y financiera del cultivo intensivo de anélidos poliquetos (gusanos marinos), así como desarrollar las técnicas necesaria para llevarlo a cabo.

El estudio se centró inicialmente en el cultivo de las especies *Nereis diversicolor* por ser esta especie muy similar a *Nereis virens*, ya cultivada con éxito en varios países de Europa, si bien no se descarta ampliar el estudio a la especie *Diopatra neapolitana*.

## 1.2. ESTRUCTURA DEL DOCUMENTO

El presente documento es un resumen de la principales experiencias realizadas así como de los resultados más relevantes obtenidos durante los cuatro años que ha durado este proyecto. Se ha dividido en siete capítulos, en el que se presentan las distintas experiencias, tanto de campo como de laboratorio, más interesantes desde el punto de vista del aporte científico y de su aplicación para el cultivo de gusanos poliquetos. No obstante y debido al carácter de síntesis de este documento, ha sido necesario dejar fuera importantes partes del trabajo original, como el proyecto técnico-financiero de la granja de cultivo, gran parte de la recopilación de datos sobre el marisqueo en Cantabria o numerosas experiencias de laboratorio, especialmente relativas al engorde de los gusanos. Aún así, este documento refleja los principales avances obtenidos por el equipo investigador, así como las principales dificultades observadas para el desarrollo de una granja de gusanos poliquetos.

## 1.3. AGRADECIMIENTOS

Los investigadores del Grupo de Ecología de la Universidad de Cantabria y de la empresa TEICAN agradecen a la Fundación Martín Escudero la financiación para el desarrollo de las



investigaciones realizadas, así como el interés en el fomento de la acuicultura. Además, también queremos agradecer su colaboración y comprensión del trabajo realizado a los mariscadores cántabros, que han enriquecido con sus aportaciones este proyecto de investigación.

#### 1.4. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de este proyecto de investigación han permitido desarrollar varias publicaciones que se nombran a continuación:

- Título:** Datos preliminares sobre el ciclo oogénico de *Nereis diversicolor* en el estuario del río Pas (Cantabria: España).
- Autores:** García del real, J.M., Canteras, J.C., Valcarce, A. Ansorena, F.J., Laso, I. Pardo, J. González, J.M.
- Congreso:** III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Marina.
- Organismo:** FOMAR
- Lugar:** Cádiz
- Fecha:** 7-10 de Junio del 2005
- 
- Título:** El papel del fotoperiodo y la temperatura en la maduración de *Nereis diversicolor*. ¿Un factor clave para su reproducción intensiva?
- Autores:** García del Real J.M., Bedía J., Valcarce A., González J.M., Gautier A., Canteras J.C.
- Congreso:** XIV Simposio Ibérico de Estudios en Biología Marina
- Lugar:** Barcelona
- Fecha:** 12-15 de Septiembre del 2006
- 
- Título:** Proyecto para el desarrollo de técnicas aplicables al cultivo de gusanos marinos para su producción intensiva.
- Revista:** Locustella. Anuario de la naturaleza de Cantabria. 2007. N°4. Pp 66-75.



**Autores:** García Del Real, J.M., Canteras J.C., Bedía, J., Valcarce, A. González J.M., Ansorena, F.J., Laso I., Angela

## 1.5 EQUIPO DE TRABAJO

Las distintas tareas del Proyecto “Desarrollo de técnicas aplicables al cultivo de gusanos marinos” han sido desarrolladas por el siguiente equipo de trabajo:

- Dirección:
  - Juan Carlos Canteras Jordana. Doctor en Biología. Profesor Titular de Ecología. Universidad de Cantabria
  - Agustín Valcarce Polanco. Ingeniero de Caminos, Canales y Puertos. Gerente y Director Técnico de Teican Medioambiental S.L..
- Investigadores:
  - José Manuel García del Real Carrillo. Licenciado en Ciencias del Mar. Master en Ciencias y Tecnologías Marinas.
  - José Manuel González Irusta. Licenciado en Biología Marina.
  - Ángela Gautier Casuso. Licenciada en Biología.
  - Joaquín Bedía. Licenciado en Ciencias Ambientales.
  - Isabel Laso. Licenciada en Ciencias Biológicas
  - Francisco Javier Ansorena. Licenciado en Ciencias Biológicas.



## 2. LAS ARTES DE MARISQUEO EN CANTABRIA

Las artes de marisqueo y los mariscadores han evolucionado, junto con el resto de la sociedad Cántabra adaptándose a las nuevas realidades socio-económicas de su entorno. Tradicionalmente, Cantabria ha dependido de la agricultura y de la pesca como actividad económica fundamental. Sin embargo, con la aparición del sector turístico, el espectro económico de la comunidad autónoma ha cambiado radicalmente, convirtiéndose en una sociedad dependiente del sector servicios.

Las mejoras de las comunicaciones, el aumento del bienestar social y los nuevos hábitos de vida, han producido en Cantabria un cambio social de gran calado, especialmente en la franja costera, donde se concentra la mayor parte de la actividad turística. Este desarrollo diferenciado ha producido una migración, desde las zonas de interior hasta la costa. Actualmente, el 86% de la población de Cantabria se concentra en la costa así como gran parte de la actividad industrial (Canteras, J.C. *et al*, 2004).

Como consecuencia de este desarrollo, concentrado en el litoral Cántabro, la costa ha padecido importantes agresiones antrópicas, que han afectado a los estuarios Cantabros repercutiendo en la actividad de los mariscadores.

El número de mariscadores en Cantabria se ha reducido de manera drástica en los últimos 30 años. Según los datos recopilados en la primera parte de este proyecto, en 1978 había alrededor de 3000 mariscadores. Actualmente, los datos de la Consejería de Pesca cifran el número de mariscadores con licencia en poco más de cien.

El aumento de la contaminación, la reducción de superficie de estuario o la sobreexplotación, han reducido las capturas haciendo que cada vez menos personas puedan explotar el recurso. Un ejemplo del problema es la extinción del muergo en la bahía de Santander a finales de los 90, que se cree pudo estar relacionada con la contaminación y que supuso el final de la actividad profesional de muchísimos mariscadores.

No solo el número de mariscadores ha evolucionado, también lo ha hecho la especie capturada. Tradicionalmente, los mariscadores cántabros han capturado almeja, muergo y otras especies de la marisma para su uso como alimento, pero muy pocos capturaban especies de cebo, puesto que los pescadores preferían capturarlas ellos mismos.



Los nuevos hábitos de vida, la llegada del turismo y la creciente dificultad para capturar el cebo debido a la sobreexplotación y a la contaminación ha hecho que cada vez sean más las personas que prefieren comprar el cebo a capturarlo.

Esto es especialmente cierto en los meses de verano, donde el número de turistas es muy elevado. Por ello, cada vez son más los mariscadores profesionales que deciden incluir el cebo entre sus capturas.

En Cantabria, se capturan en los principales estuarios diversas especies de invertebrados bentónicos. Además, también existen numerosos mariscadores que capturan otras especies en zonas rocosas del litoral cántabro como percebes o centollos. Las principales zonas de captura para las especies de estuario son: San Vicente de la Barquera, Santander y Santoña, si bien este último destaca sobre los demás por su importancia tanto ecológica, (es reserva natural desde 1992) como comercial. La bahía de Santander no obstante también mantiene buenas poblaciones de *almeja* o *cangrejillo*, entre otras, por lo que es muy habitual ver mariscadores faenando en el estuario. Dentro de las especies capturadas en los estuarios cántabros destacan:

**La Almeja:** Bajo este nombre se engloban tres especies diferentes de bivalvos, que son capturadas por los mariscadores utilizando diversas artes. La almeja fina, “Amayuela” o *Ruditapes decussatus* y la almeja babosa, “señorita” o *Venepuros pullastra*, son especies autóctonas. La almeja japonesa o *Ruditapes philippinarum* sin embargo es una especie alóctona (Navedo y Romero, 2003).

**El Muergo:** Por este nombre se conocen a varias especies diferentes. La “Morguera” o “Muergo de cuchillo”, nombre que reciben las especies del género *Ensis*, fue una especie muy abundante en los estuarios cántabros, pero por causas desconocidas desapareció hasta su casi total extinción. La otra especie de Muergo es la “navaja” o *Solen Marginatus*. Marca sus sifones dejando dos puntos bien definidos, lo que es aprovechado por el mariscador para capturarlo mediante una varilla o “morguera” (Navedo y Romero, 2003).

**El cangrejillo:** Este invertebrado es en realidad otro tipo de cebo. Se trata de crustáceos del género *Upogebia*, que viven en túneles excavados en el sustrato. Son capturados por pescadores aficionados y por mariscadores profesionales para su venta como cebo vivo.

Por último, en los estuarios cántabros se capturan varios tipos de especies de gusanos poliquetos para su uso como cebo vivo. *La gusana*, que es así como se les conoce a todas estas especies, se describe con mayor detalle a continuación.



## 2.1. LA GUSANA

Por *gusana* se entiende a una gran variedad de especies de gusanos poliquetos. En total más de cinco especies diferentes de gusanos son utilizados como cebo de manera habitual en los estuarios cántabros. Algunas de ellas son alóctonas (como la gusana Coreana, *Paranereis acrata* o la Americana *Glycera dibranchiata*), pero la mayoría se capturan en los estuarios Cántabros.

La “**gusana de tubo**”, es muy utilizada y apreciada por los pescadores. Por este nombre se conoce a las “gusanas” que viven dentro de un tubo rígido. La más común es *Diopatra neapolitana*, aunque también se conoce con este nombre a *Myxicola infundibulum*. La *gusana* de tubo *Diopatra neapolitana* es la especie más capturada en Cantabria, pero la información existente en la bibliografía es muy escasa. Se captura mediante el método de la sal. Este método que también se usa para capturar otras especies como el “muergo” consiste en echar sal en la “llave” de la *gusana* para obligarla a salir del tubo. Cuando la *gusana* sale es atrapada bien a mano o ayudándose de algún utensilio para pincharlas como el “peine” que es un cepillo de púas afiladas.

La “**gusana de coco**”, *Arenicola marina*, es también capturada en países como Reino Unido y Holanda. En este último incluso se usan grandes dragas mecánicas para su extracción. Su valor comercial en gran número de países ha permitido que se desarrolle una amplia bibliografía sobre la extracción de la *gusana* de coco (Mclusky D.S. *et al.*, 1983; Cryer M. *et al.*, 1987; Flach, E.C. y Beukema J.J., 1994; etc.) En España, sin embargo no se han encontrado estudios específicos que analicen la problemática de la captura de esta especie para el resto de los organismos bentónicos y para las propias poblaciones de la especie objetivo. En Cantabria, esta especie se captura de manera similar a como lo hacen los Ingleses y los Holandeses (exceptuando, por supuesto el uso de dragas). Se utilizan palas y se excavan hoyos de más de 20 cm de profundidad

La “**gusana fina**”, *Nereis diversicolor*, también se captura cavando pero no es necesario profundizar tanto como en el caso de la “coco”. En Reino Unido también es capturada y se cultiva un congénere de diversicolor, *Nereis Virens*.

La “**gusana de Tita**”, *Sipunculus nudus*, resulta muy escasa y apreciada por los pescadores, se captura también cavando pero su captura requiere de gran habilidad por ser una especie muy escurridiza.



Tanto la *gusana fina* (*Nereis diversicolor*) como la *gusana de tubo* (*Diopatra neapolitana*), fueron estudiadas para su posible uso en el cultivo intensivo, objeto de este estudio. No obstante, la gran mayoría de las experiencias realizadas han tenido como objeto a la gusana fina *Nereis diversicolor* por ser una especie mucho más conocida, además de pertenecer al mismo género que *Nereis virens*, que ya se cultiva con notable éxito en el Reino Unido





### 3. CICLO OOGÉNICO DE DIOPATRA NEAPOLITANA

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

El gusano tubícula *Diopatra neapolitana* es un anélido poliqueto que pertenece al Orden Eunicida, Familia Onuphidae. Su distribución no está clara fuera del Mediterráneo (Day, 1967) ya que existen dudas sobre la veracidad de muchas de sus citas. Así, Paxton (1993) advierte de que algunas de las citas de esta especie en Japón podrían tratarse en realidad de ejemplares de *Diopatra sugokai* (Izuka 1907). Por lo tanto, a pesar de las numerosas citas por todo el mundo, no es posible hablar de una especie cosmopolita, ya que la distribución real de la especie requiere de una revisión (Dagli *et al* 2005).

No obstante, lo que si está claro es su alto valor económico, ya que esta especie es explotada comercialmente en numerosos países europeos para su venta como cebo vivo. España, Italia o Portugal son algunos de los países donde este anélido tubícola es capturado, con cifras de hasta tres millones y medio de gusanos capturados al año en Italia (Gambi *et al* 1994).

En España y Portugal, además, la demanda se ha visto fuertemente incrementada por la utilización por parte de las piscifactorías de ambos países de gusanos como suplemento en las dietas suministradas a los peces de cultivo (Sarda *et al* 2006).

El incremento en la demanda y el aumento del valor comercial del anélido poliqueto *Diopatra neapolitana* ha venido acompañada de un incremento en el conocimiento de la especie, que no obstante continúa siendo muy desconocida para la comunidad científica. De hecho, hasta la fecha, el actual trabajo sobre el ciclo biológico de la especie es el primero que se realiza en una población atlántica habiendo muy pocos estudios previos en otras zonas de su área de distribución.

Esta falta de información sobre esta especie es expresada muy claramente por Cunha *et al* (2005) que en un trabajo sobre la captura de esta especie en un estuario portugués dice textualmente:

*It is difficult to estimate the real impact of this activity (N.A. Refiriéndose a la captura de este gusano) on the Diopatra neapolitana population due to insufficient data concerning its breeding period, age at maturity and longevity.*

La falta de información es aún más acusada a nivel regional, ya que no existen estudios previos de ningún tipo sobre esta especie o sobre su captura en los estuarios cántabros.



El objetivo de esta experiencia era incrementar el conocimiento de esta especie para su posible cultivo intensivo, a la vez que se aportan conocimientos que puedan servir para desarrollar una explotación más racional y sostenible de las poblaciones naturales de *Diopatra neapolitana* en los estuarios cántabros.

### 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos propuestos, se realizaron contactos con mariscadores profesionales a los que se les compraban 24 *gusanos* de tubo una vez al mes. Aunque se establecieron contactos con un único mariscador con objeto de que las variaciones en la población explotada fuesen mínimas, la forma de explotar la especie de los mariscadores cántabros les obliga a desplazarse con mucha frecuencia entre distintos estuarios, por lo no siempre los gusanos analizados pertenecieron a la misma población o al mismo estuario. No obstante la información adicional sobre tamaños capturados obtenida al comprar la captura a mariscadores, justifica la adquisición del cebo a los mismos en lugar de capturarlo *in situ*.

Una vez adquiridos, los gusanos eran llevados al laboratorio donde se procedía a su manipulación, bien en el mismo día de ser adquiridos o bien al día siguiente. Cuando fue necesario esperar un día, los individuos eran conservados en bandejas de plástico con agua de mar a diecisiete partes por mil de salinidad y a temperatura ambiente.

Tras esto se procedía a separar los veinte individuos con mejor aspecto, es decir aquellos que no presentaban partes del cuerpo seccionadas, los cuales una vez seleccionados se dejaban escurrir durante 5 minutos en papel secante. Por último, los gusanos eran pesados en una balanza de precisión *Sartorius BP221S*

De los veinte individuos analizados se escogían diez al azar para su sexado. Para determinar el sexo de los individuos se procedía a abrir la cavidad celómica de los mismos con ayuda de un bisturí sobre una placa Petri con agua de mar a una salinidad de diecisiete partes por mil.

Cuando los individuos estaban maduros, el sexado podía realizarse a simple vista ya que los machos soltaban un denso esperma blanco y las hembras masas abundantes de óvulos negros muy visibles. Sin embargo, cuando los individuos eran inmaduros, esto no era posible y era necesario realizar un examen con la ayuda de un estereomicroscopio *Lan optics*. Si se observaban oocitos de pequeño tamaño se sexaba como hembra, sino se observaba nada, su sexo permanecía indeterminado. Aunque probablemente la gran mayoría de los individuos indeterminados eran machos inmaduros, no sería correcto realizar un sexado basado en la



ausencia de gametos femeninos, ya que en ocasiones las hembras no tienen gametos visibles, por ser estos demasiado pequeños.

Por esta razón en los análisis de las diferencias entre machos y hembras sólo se utilizaron los datos de los meses con individuos maduros.

Una vez realizada la determinación del sexo, se seleccionaban cinco hembras de entre los 10 individuos sexados para la medición de sus oocitos. Si entre los 10 gusanos elegidos no había suficientes hembras se recurría a buscar las hembras restantes entre los otros 10 gusanos seleccionados y pesados.

Una vez seleccionadas las 5 hembras, se procedía a aspirar el agua de las placas Petri con los óvulos soltados tras la apertura del celoma.

El agua con los gametos femeninos se depositaba en un portaobjetos con pocillo y se colocaba en el microscopio *Letiz Labarlux D*, donde con la ayuda de un ocular graduado se procedía a la medición de los 50 primeros oocitos observados.

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

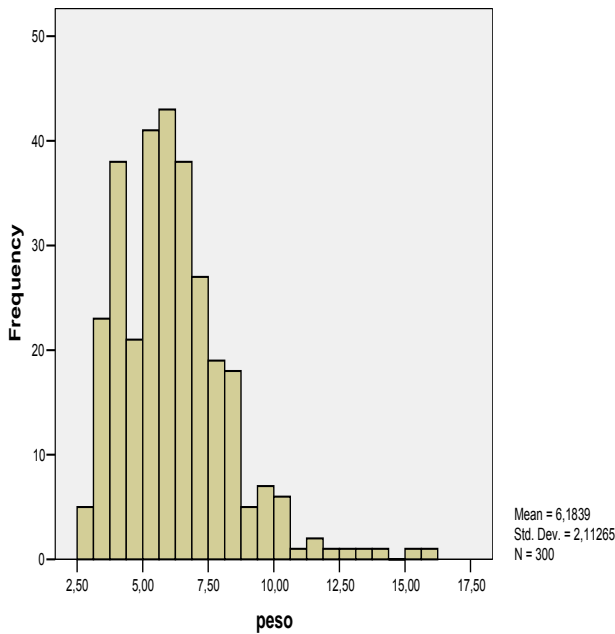
Durante los 17 meses que duró el estudio se analizaron 300 gusanos de la especie *Diopatra neapolitana* capturados por mariscadores profesionales en un total de 15 meses distintos. El valor medio del peso húmedo de los individuos analizados fue de 6,18 g con una desviación típica de 2,11. El valor mínimo fue de 2,78 g y el valor máximo de 16,15 g. Entre estos dos extremos se observó toda una gama de valores, con su centro bastante desplazado hacia la izquierda, (**Fig. 3.1.**). Así, el 80% de los gusanos analizados tenía pesos comprendidos entre 3,81 y 8,6 gramos. Además, un 50% del total tenían pesos comprendidos entre los 5 y los 7,5 gramos, (**Tabla 3.1.**).

La influencia del mes sobre el peso fue analizada mediante la prueba para muestras no paramétricas de *Krustall-Wallis* obteniéndose diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ).

El mes con valores mínimos fue agosto del 2006 y el mes con valores máximos febrero del 2007, seguido de cerca por abril. El caso de agosto es especial porque muestra grandes diferencias (aproximadamente un gramo) con respecto al segundo mes con menor valor medio que es noviembre del 2006 y por lo tanto con el resto de meses analizados. Esto es especialmente significativo si se tiene en cuenta que es precisamente en agosto cuando más



cebo se captura en los estuarios cántabros al coincidir con el periodo estival y por lo tanto con la época de mayor afluencia turística en la región, (Fig. 3.2.).



N	Válidos	300
	Perdidos	0
Media		6,1839
Mediana		5,9175
Desv. típ.		2,11265
Varianza		4,463
Mínimo		2,78
Máximo		16,15
Percentiles	10	3,8041
	20	4,2700
	30	5,0236
	40	5,5120
	50	5,9175
	60	6,4302
	70	6,8800
	80	7,5448
	90	8,6175

Fig.3.1. Histograma de frecuencias de pesos de los 300 gusanos analizados.

Tabla 3.1. Estadísticos descriptivos.

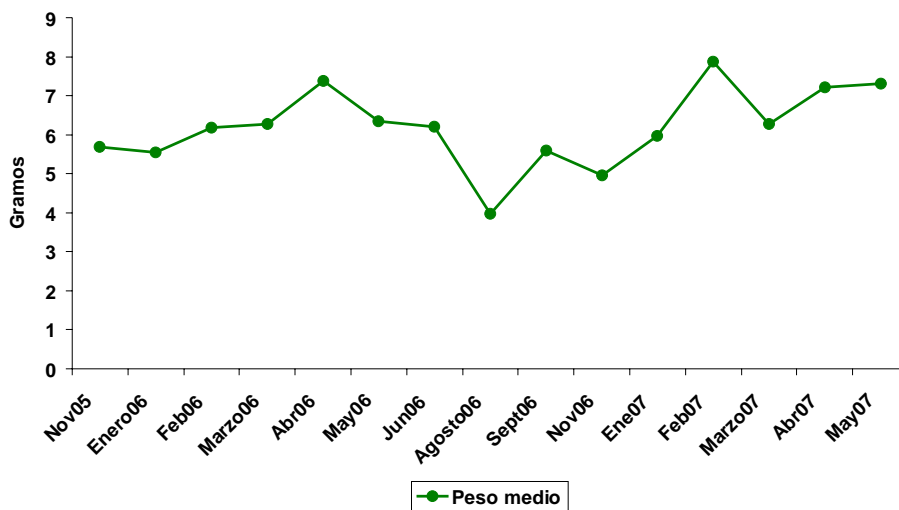


Fig. 3.2. Evolución mensual en el peso medio de las capturas de *Diopatra neapolitana*.

Aunque es necesario un estudio más prolongado y un mayor número de mediciones para poder sacar conclusiones fiables de la distribución mensual en peso de las capturas, el descenso en el peso medio podría ser una consecuencia de la sobreexplotación durante el mes de agosto



de *Diopatra neapolitana*. El incremento excesivo de mariscadores deportivos en los estuarios durante este mes podría dificultar la captura de nuevos ejemplares a los mariscadores profesionales, recurriendo a ejemplares más pequeños, que normalmente no extraerían.

Otra posible explicación es la coincidencia del mes de agosto con el final de la puesta, lo que según algunos mariscadores profesionales dificulta la captura del cebo al estar este menos accesible durante la puesta.

Además, la ausencia de gusanos de tallas grandes (tan solo el 10% de los gusanos analizados alcanzó tallas comprendidas entre los 8,7 g y los 16,8 de máxima) es otro síntoma evidente de la sobreexplotación del recurso, que si bien no es alarmante, pone de manifiesto la necesidad de realizar trabajos más ambiciosos sobre la extracción de cebo en Cantabria, para determinar el estado actual de la especie, (**Fig. 3.1.** y **Tabla 3.1.**).

La distribución de los pesos en función del sexo también fue analizada para aquellos individuos que mostraban indicios claros de maduración y que por lo tanto podían ser sexados sin lugar a dudas.

Para el análisis de la influencia del sexo en el peso de los individuos capturados se utilizo la prueba K para t muestras independientes. Los resultados pueden verse en la **Tabla 3.2.**

Tabla 3.2. Prueba para t muestras independientes

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
peso	Equal variances assumed	,001	,974	-1,032	88	,305	-,54112	,52426
	Equal variances not assumed			-1,025	83,510	,308	-,54112	,52772

Asumiendo la igualdad de varianzas se puede afirmar que no existen diferencias significativas para la variable dependiente peso en función del sexo. ( $P > 0,05$ ).

El análisis de la distribución de los tamaños de oocitos se realizó mes a mes para poder observar la evolución de los distintos histogramas de tallas.



La **Fig. 3.3.** muestra esta evolución desde abril del 2006 hasta mayo del 2007. Hay que tener en cuenta que el análisis de los oocitos de *Diopatra neapolitana* no se comenzó en abril del 2006 sino en noviembre del 2005, sin embargo no se observaron los primeros gametos con absoluta claridad hasta marzo del 2006 y no se pudieron realizar las primeras mediciones hasta abril de ese mismo año.

Además y por circunstancias relacionadas con la captura del cebo por parte de los mariscadores, no fue posible conseguir individuos para la realización de los estudios del ciclo oogénico durante los meses de Diciembre y Julio del 2006. Por último, los meses de octubre del 2006 y enero del 2007 los oocitos no se midieron por ser estos muy pequeños y escasos.

La época de puesta del gusano tubícola *Diopatra neapolitana* en Cantabria comienza en junio y se extiende hasta septiembre. Durante estos cuatro meses es posible encontrar individuos con óvulos maduros y por lo tanto capaces de desovar. En el año 2006 se muestrearon durante el mes de noviembre gusanos con óvulos maduros, algo bastante extraño si se tiene en cuenta que durante el mes de septiembre la población mostró signos de encontrarse terminando la puesta (hembras maduras con pocos óvulos en el celoma y hembras inmaduras con oocitos muy pequeños) y en octubre todas las hembras analizadas se encontraban en un estado inmaduro.

Es posible que el hecho de que se muestre sobre la captura de un mariscador profesional que realiza la extracción de poblaciones naturales muy diversas pueda ocasionar solapamiento de ciclos reproductivos no simultáneos. No obstante, la perfecta evolución en los diámetros observados, especialmente en el 2007, muestran una gran sincronización en el ciclo reproductivo de las poblaciones explotadas.

El mes de noviembre del 2006 fue un mes especialmente caluroso con abundantes días de viento sur y elevadas temperaturas que pueden haber inducido una segunda época de puesta en algunos de los gusanos analizados.

El único trabajo previo que analizó, aunque de manera superficial, el ciclo de esta especie es el realizado por Dagli *et al* (2005) en una población de Turquía, en el extremo más oriental del Mediterráneo. Esta población, a diferencia de las poblaciones de los estuarios cántabros, mostraba individuos maduros durante todo el año, si bien durante los meses de comprendidos entre abril y agosto ambos inclusive el número de gusanos maduros era máximo.

La maduración de *Diopatra neapolitana* por lo tanto, parece estar relacionada con el incremento de temperatura y horas de luz que se produce con el inicio de la primavera, si bien, en poblaciones con temperaturas elevadas durante todo el año la presencia de individuos



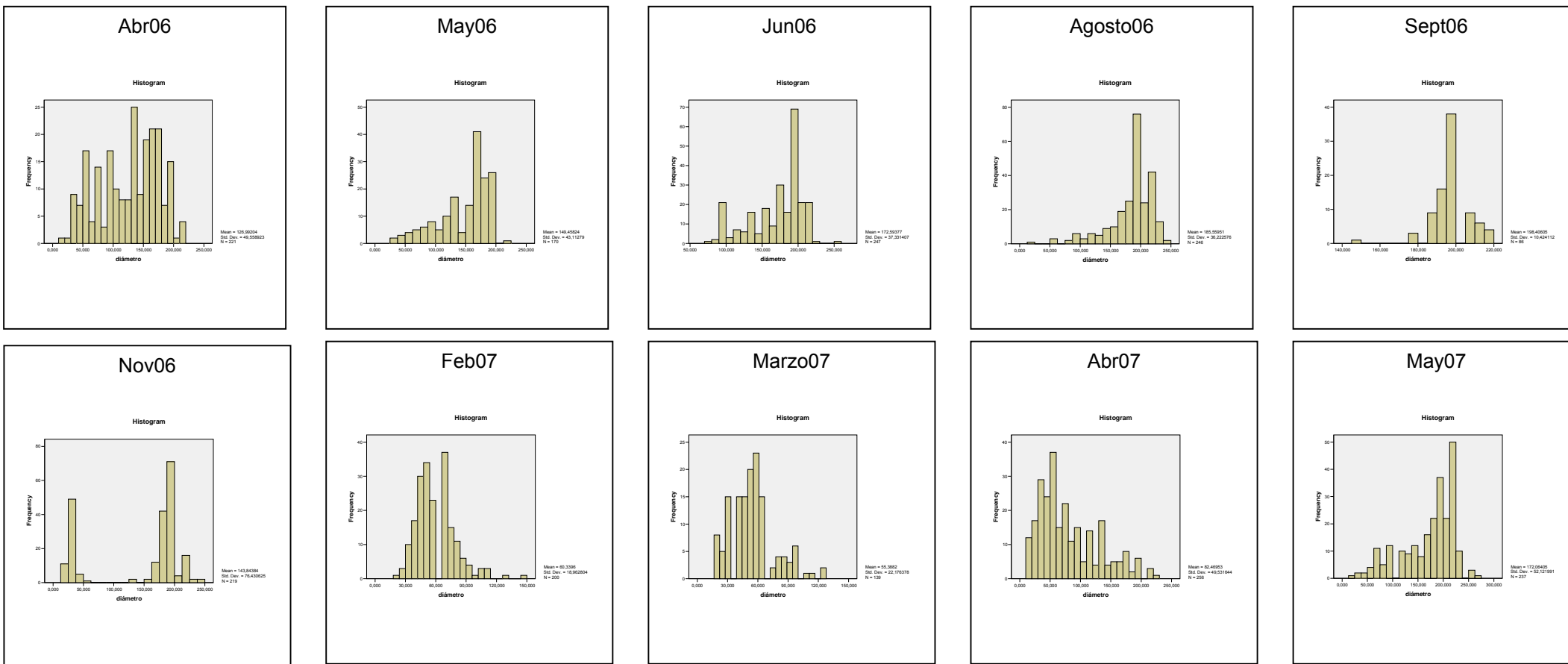
maduros es prácticamente continua. Esta información es de gran interés para el desarrollo de nuevas experiencias encaminadas a diversificar en número de especies cultivadas.

La puesta y el desarrollo de las larvas se produce en las poblaciones naturales de Cantabria a temperaturas que pueden oscilar entre los 13 y los 24 °C, pero que se mantienen normalmente en temperaturas comprendidas entre 15 y 22 °C, que son aproximadamente las temperaturas registradas en los estuarios cántabros durante los meses de mayo a septiembre.

Además de estudiar la distribución de los diámetros de los oocitos mes a mes, también se realizó una comparación de medias, mediante la prueba para variables no paramétricas de *Kruskal-Wallis*, obteniendo resultados altamente significativos ( $p < 0,01$ ), lo cual por otro lado es bastante lógico si se observan las variaciones observadas en el diámetro de los oocitos a lo largo de año.



Fig. 3.3. Evolución del diámetro de los oocitos durante el año 2006. Octubre del 2006 y enero del 2007 tenían oocitos menores de 50 µm.







### 3.4. CONCLUSIONES

- Las poblaciones naturales de *Diopatra neapolitana* muestran indicios de sobreexplotación, como muestra la ausencia de tallas grandes entre las capturas de los mariscadores profesionales, aunque son necesarios estudios específicos para poder determinar con una mayor certidumbre el actual estado de las poblaciones de *gusana de tubo* en Cantabria.
- La época de puesta de *Diopatra neapolitana* en los estuarios del centro y este de Cantabria se inicia en el mes de mayo y se extiende hasta finales de septiembre, principios de octubre, con posibles maduraciones secundarias en función de las condiciones metereológicas.
- La maduración de los individuos de *Diopatra neapolitana* podría estar relacionada con el incremento de la temperatura y el fotoperiodo que se observa durante el inicio de la primavera, como demuestra el comienzo de la época de puesta a finales del mes de Mayo.
- Temperaturas iniciales de entre 16 y 20 °C podrían ser adecuadas como punto de partida en el desarrollo de nuevas experiencias de fertilización larvaria con la especie *Diopatra neapolitana*.



## 4. CICLO OOGÉNICO DE *NEREIS DIVERSICOLOR*.

### 4.1. INTRODUCCIÓN.

El poliqueto *Nereis diversicolor* carece de órganos sexuales o gónadas bien definidas. Tanto en los machos como en las hembras los productos sexuales se desarrollan en el celoma a partir de un epitelio germinal que prolifera en la parte ventral del celoma (Dales, 1950). Las células que forman las células germinales quedan pronto sueltas en el celoma. La madurez sexual de las hembras viene determinada por el desarrollo de los oocitos a partir de este “parénquima” que rellena el celoma.

La maduración de los oocitos se acompaña del aumento de su tamaño, hasta alcanzar el tamaño de madurez que varía según los autores entre los 150  $\mu\text{m}$  y los 275  $\mu\text{m}$ . El estudio de la distribución de tamaños de los oocitos a lo largo de un ciclo anual puede dar información sobre el tipo de ciclo reproductor que presentan las poblaciones de este poliqueto en el área de estudio.

### 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para esta parte del estudio se han considerado dos zonas en el estuario del Pas, en la parte central de Cantabria, denominadas como “Molino” y “Ría” (Ver Fig. 4.1.) El estudio comprendió desde el mes de agosto de 2003 hasta marzo de 2004 con muestreos de ambas estaciones de carácter mensual, existiendo por lo tanto datos de ocho meses consecutivos, tiempo en el que se pueden obtener ciertas conclusiones, si bien lo deseable sería realizar el estudio de un ciclo anual completo al menos. En los muestreos mensuales y en cada una de las dos estaciones de muestreo propuestas se procedió a recoger un número suficiente de gusanos, en edad reproductora de tamaño medio y grande, que permitiera tener al menos diez hembras en las que poder hacer el estudio de sus oocitos. No se tuvo en cuenta ni la superficie de muestreo ni el tiempo empleado en su recolección. Los ejemplares obtenidos, de 30 a 50 en función de la facilidad de encontrarlos, fueron transportados al laboratorio en recipientes de plástico con agua recogida en la misma zona a la que se añadían unos cristales de mentol para favorecer la relajación de los mismos y que no sufrieran lesiones por causas de sus movimientos o actividad. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron fijadas con formalina tamponada en agua de mar con una concentración del 4% para su conservación hasta el momento de su procesado. De cada estación muestreada se tomaron diez hembras de gusanos (determinado por la presencia de oocitos en su interior) que fueron diseccionadas individualmente para extraer su contenido celómico y obtener de cada una, un número de oocitos no inferior a 50.



El sistema empleado consistió en colocar al espécimen fijado en una placa Petri con agua y, practicar una serie de incisiones transversales con un escalpelo con las que se producía la liberación del contenido celómico y los oocitos en él presentes, hasta obtener una cantidad suficiente de oocitos que permitieran hacer las medidas a un mínimo de 50 de ellos.



Fig. 4.1. Localización de las estaciones de muestreo.

El cuerpo del gusano se retiró de la placa y se reservó para la extracción de las mandíbulas.

La placa con los oocitos se llevaba al proyector de perfiles (*Nikon Prolife projector V-12B*) donde eran medidos un mínimo de 50 oocitos por cada ejemplar de gusano. Se realizó la medida de dos diámetros en cada oocito que luego fueron promediados para obtener el diámetro medio de cada oocito.



Posteriormente, y también en el proyector de perfiles, se procedió a la medición de las mandíbulas extraídas en cada gusano (Ver **Fig.4.2.**). Se tomó la longitud mandibular total. Las mandíbulas medidas en cada punto de muestreo y mes fueron conservadas en tubos etiquetados.

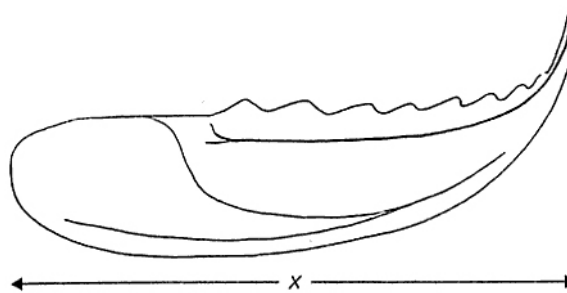


Fig. 4.2. Acotamiento de la medida de la longitud mandibular total de acuerdo con Olive y Garwood (1981).

Los valores de los dos diámetros medidos para cada uno de los oocitos fueron promediados, considerándose este valor como el diámetro medio del oocito. Con estos valores se elaboraron unos histogramas en los que aparece la distribución de tamaños de todos los oocitos pertenecientes a la misma estación y mes, mostrando el conjunto de los oocitos de los 10 individuos analizados en cada caso (un mínimo de 500 oocitos por muestra), agrupados en clases de 10  $\mu\text{m}$  y representando en ordenadas el porcentaje de oocitos de cada tamaño pertenecientes a cada clase respecto al número total de oocitos medidos.

Por último, fue representada la correlación entre la longitud mandibular de los ejemplares analizados y el diámetro medio de sus oocitos para cada mes y estación muestreada.

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la distribución de tamaños de los oocitos encontrados en cada una de las dos estaciones de muestreo y a lo largo de los meses estudiados, aparecen reflejados en los histogramas representados en las **figuras 4.3 y 4.4.** En casi todos los casos, el rango de tamaños es amplio, oscilando los tamaños mínimos en torno a los 20  $\mu\text{m}$  de diámetro (18,0 a 34,5  $\mu\text{m}$ ) y habiendo una mayor variedad entre los tamaños máximos: 186,5 a 288,0  $\mu\text{m}$ .

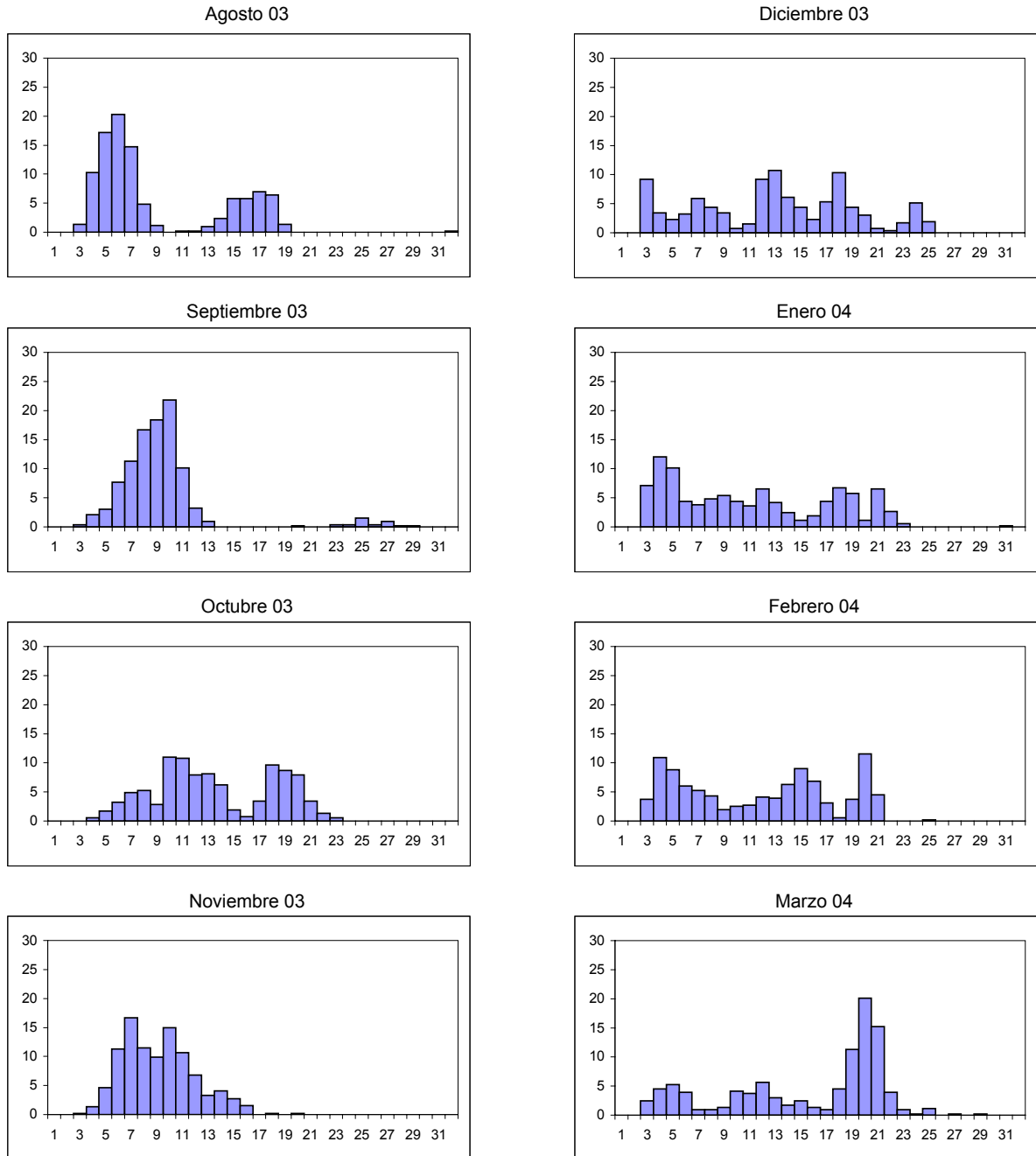


Fig. 4.3. Histogramas de frecuencias de tallas de los oocitos correspondientes a la Estación Molino. En el eje de abscisas se representa el diámetro medio de los oocitos en micrómetros agrupados en clases de 10  $\mu\text{m}$  y en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de los oocitos pertenecientes a cada clase.

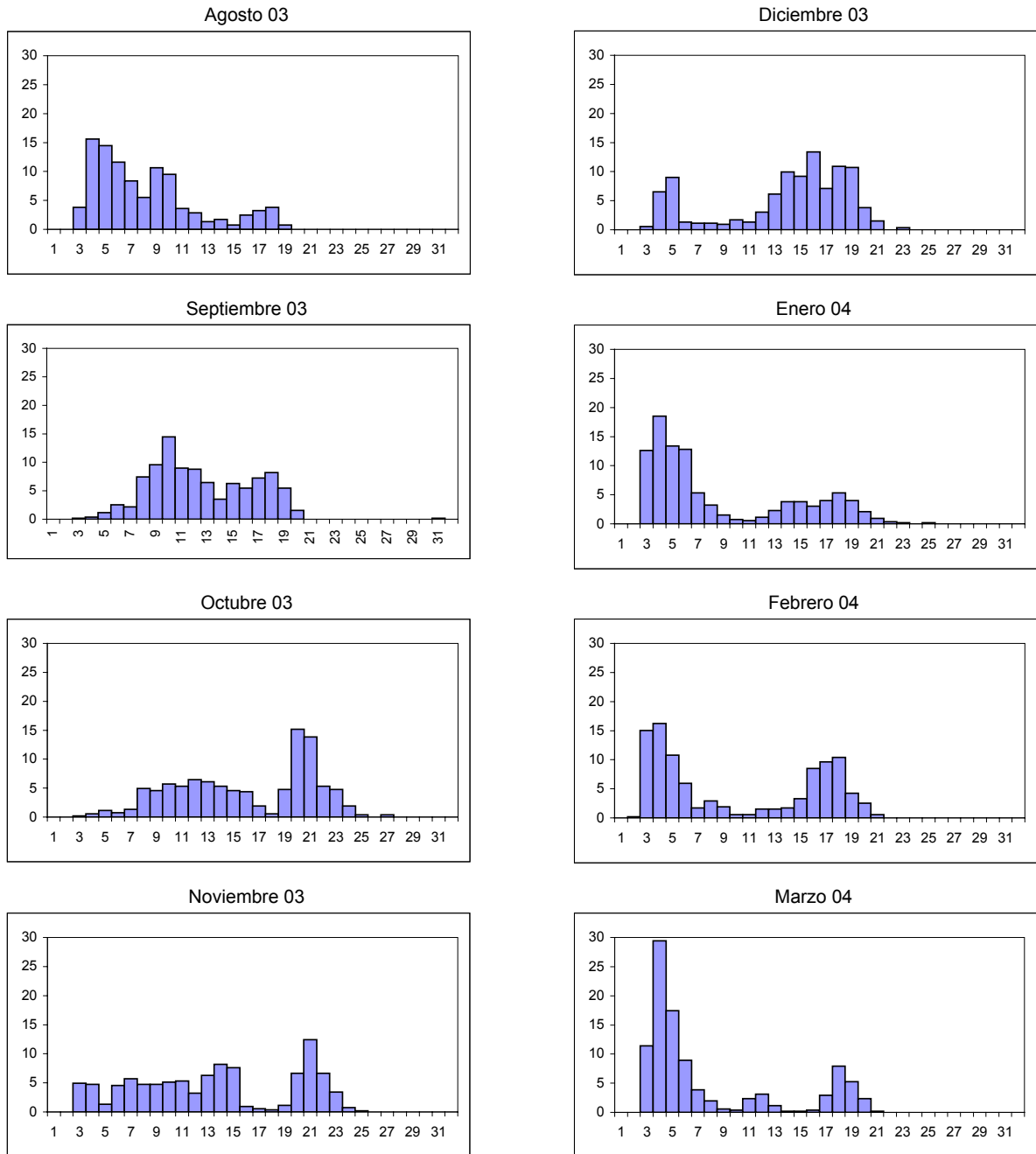


Fig. 4.4. Histogramas de frecuencias de tallas de los oocitos correspondientes a la Estación Ría. En el eje de abscisas se representa el diámetro medio de los oocitos en micrómetros agrupados en clases de 10  $\mu\text{m}$  y en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de los oocitos pertenecientes a cada clase.



En las **figuras 4.5 y 4.6** se representan el tamaño medio de los oocitos en cada una de las estaciones a lo largo del tiempo.

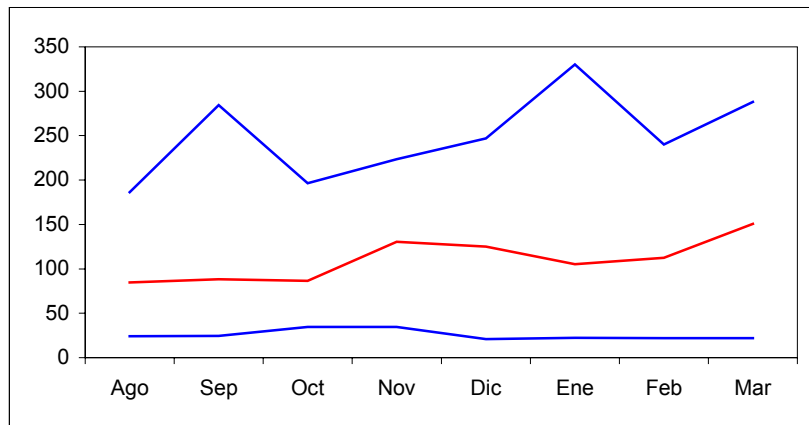


Fig. 4.5. Tamaños máximos, medios y mínimos de los oocitos en la Estación Molino.

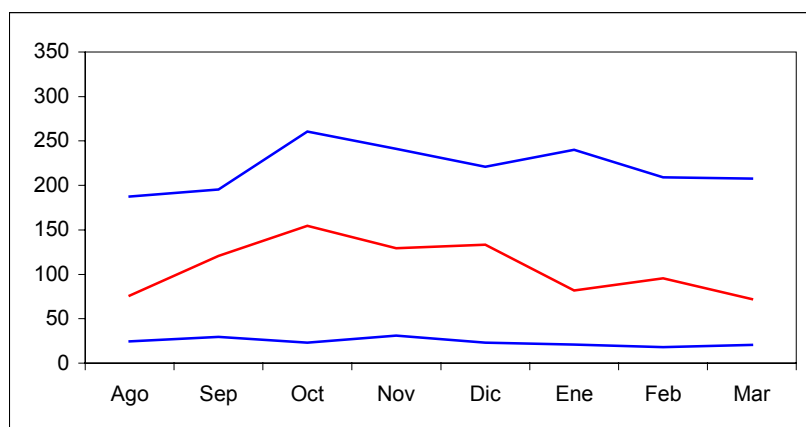


Fig. 4.6. Tamaños máximos, medios y mínimos de los oocitos en la Estación Ría.

El análisis de la evolución de los diámetros medios, así como los histogramas de frecuencia, muestra dos tendencias diferenciadas para ambas estaciones. Mientras que en la estación del Molino se observa un moderado incremento del diámetro medio de los oocitos a lo largo del periodo de estudio, con un incremento acusado durante los meses de octubre noviembre y marzo, en la estación de la ría la evolución es muy distinta, con un incremento prolongado en el diámetro de los gametos durante el final del verano al que sigue un prolongado descenso hasta el mes de marzo. El análisis de los histogramas mes a mes muestra la presencia de óvulos entorno a los tamaños fértiles en la estación del Molino en los meses de agosto septiembre y octubre.



Probablemente, durante estos meses se producen puestas de gusanos maduros, como muestra la desaparición de los óvulos más grandes, a la vez que se desarrollan los oocitos de gusanos inmaduros, manteniendo el diámetro medio estable. En la estación de la Ría sin embargo, se observa durante los primeros meses un crecimiento sostenido del diámetro medio, que también se observa en las cohortes de óvulos, que se desplazan hacia la derecha en el histograma durante los meses de agosto septiembre, octubre y noviembre, para después desaparecer en los meses de diciembre y enero probablemente debido a puestas invernales.

En resumen, las dos poblaciones muestran evoluciones distintas y poco sincronizadas, con presencia de hembras maduras durante todo el año coincidiendo con otras hembras inmaduras.

Ya que *Nereis diversicolor* es una especie semélpara y por lo tanto se reproduce una vez en la vida y después muere, si fuera anual y la reproducción tuviera lugar en un momento determinado del año, cabría esperar una mayor sincronización del grado de madurez sexual de los gusanos de manera que en los histogramas se observaría un incremento del tamaño de los oocitos conforme se aproximara ese momento, descendiendo drásticamente en el momento de la freza.

Para García-Arberas y Rallo (2002), el ciclo vital de la especie dura dos años en el Cantábrico. Esto podría explicar la aparición simultánea de individuos presunta o hipotéticamente maduros junto a individuos inmaduros.

El estudio de la correlación entre el tamaño medio de los oocitos y el tamaño del gusano (tomado como longitud mandibular) aparece reflejado en las **figuras 4.7. y 4.8.** para las Estaciones Molino y Ría respectivamente.



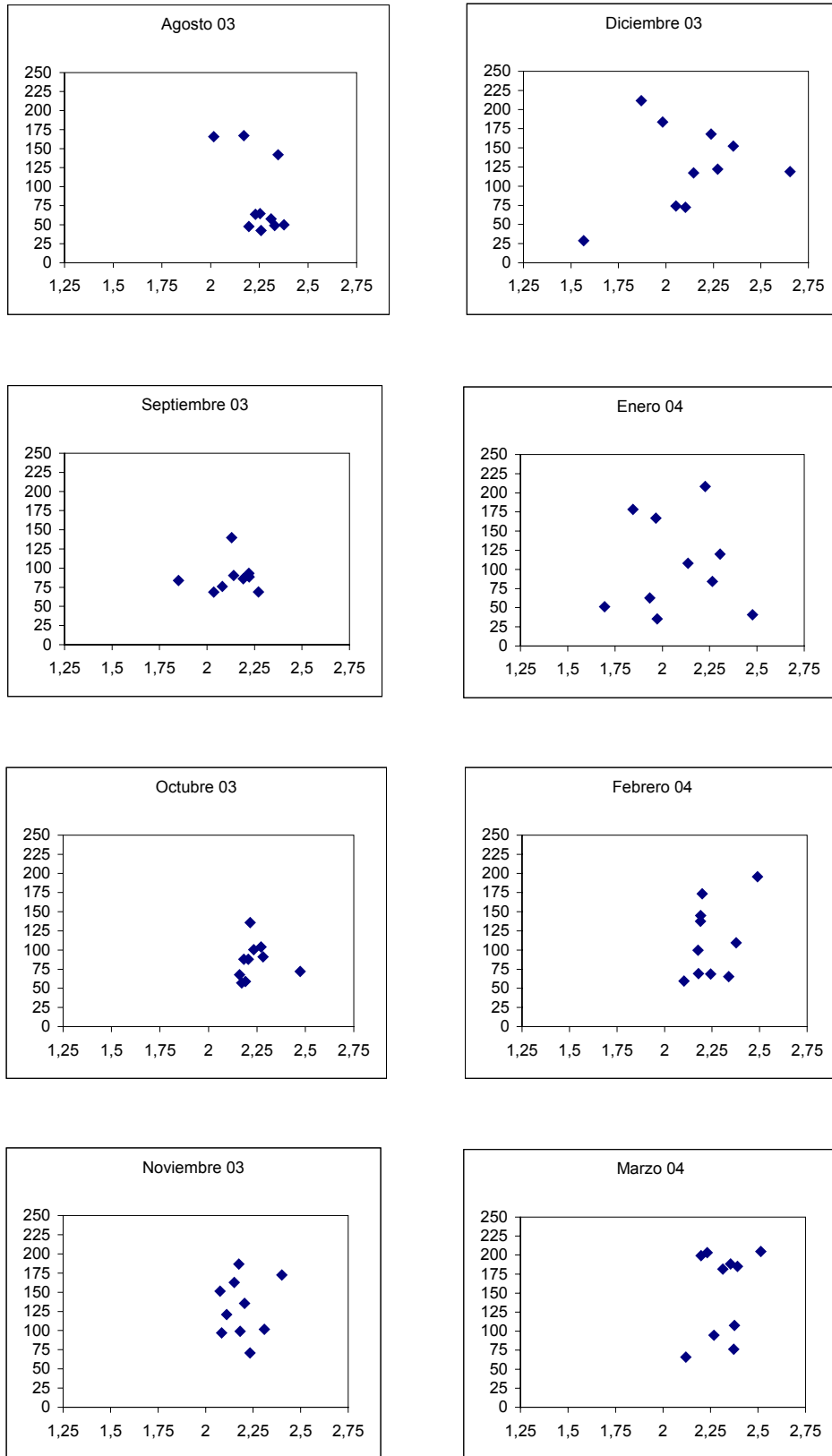


Fig. 4.7. Relación entre las longitudes mandibulares (mm, en abcisas) y el tamaño medio de los oocitos ( $\mu\text{m}$ , en ordenadas) de los gusanos en la Estación Molino.

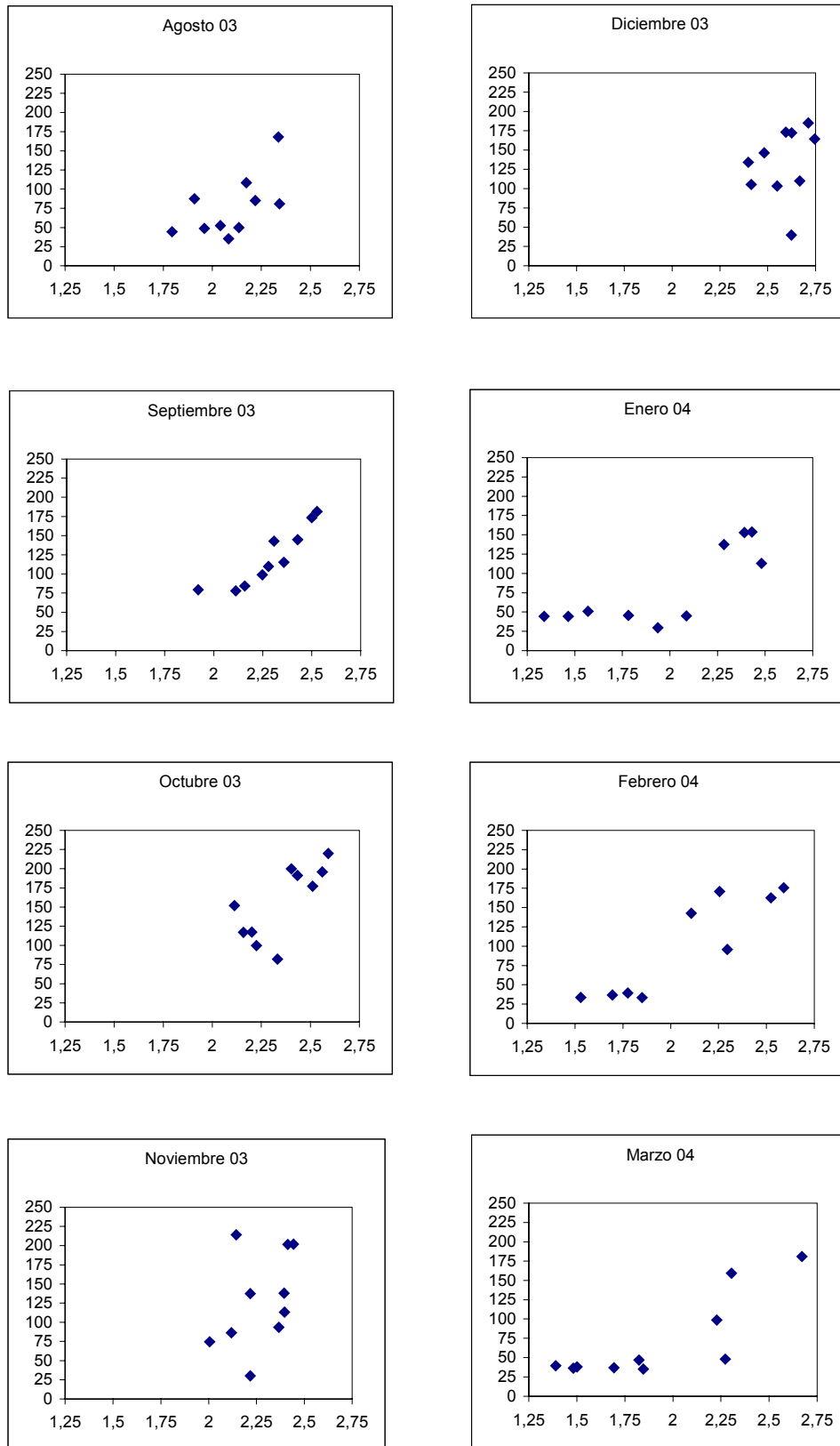


Fig. 4.8. Relación entre las longitudes mandibulares y el tamaño medio de los oocitos en la Estación Ría.



Estas correlaciones ofrecen resultados dispares. En algunos casos es posible encontrar una correlación entre el tamaño del gusano y el grado de maduración (tamaño) de los oocitos, como ocurre en el caso de “Sep03-M”, “Ene04-R”, “Feb04-R”. En la mayor parte de los casos no existe una correlación clara y la distribución es dispersa.

Podría considerarse que hay una mayor correlación en las muestras de “Ría” frente a las de “Molino”. De hecho, los valores  $r^2$  obtenidos en “Molino” son siempre inferiores a 0,1600 (a excepción de Ago03-M con valor 0,3042 en que la correlación es negativa). En las estaciones “Ría” los valores de  $r^2$  oscilan entre 0,6590 a 0,8165 situándose por regla general en valores superiores a las correlaciones obtenidas en “Molino”.

No se observa ninguna tendencia clara de variación de las correlaciones a lo largo del tiempo.

Las diferencias entre ambos puntos de muestreo pueden indicar la existencia de cierta variedad en el tipo de población que mantienen ya que en la estación “Molino” se pueden encontrar hembras potencialmente fértiles con un tamaño inferior a las encontradas en “Ría”.

A partir de estas gráficas y atendiendo al tamaño medio de los oocitos se puede determinar el tamaño del gusano (determinado según su longitud mandibular) a partir del cual se puede reproducir (el diámetro medio de sus oocitos supera los 150  $\mu\text{m}$ ). Los valores obtenidos de este modo varían entre 2,113 y 2,595 mm en las estaciones de “Ría”

#### 4.4. CONCLUSIONES

- A lo largo del periodo de tiempo estudiado existe siempre la posibilidad de hallar oocitos maduros, lo que indica que hay hembras de *Nereis diversicolor* susceptible de reproducirse durante todo el año en la ría del Pas.
- No existe un único momento de reproducción a lo largo del año en la ría del Pas.
- Hay diferencias locales en los tamaños de las hembras potencialmente maduras en la ría del Pas.



## 5. EXPERIENCIAS DE CULTIVO

### 5.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS VARIABLES AMBIENTALES EN LA MADURACIÓN DE NEREIS DIVERSICOLOR

#### 5.1.1. INTRODUCCIÓN

El ciclo reproductivo de *Nereis diversicolor* y su relación con los factores ambientales ha sido estudiado por varios autores tanto en condiciones naturales (Dales, 1950; Chambers y Milne, 1975; Kristensen, 1984; Moller, 1985; Abrantes *et al*, 1999; García-Arberas y Rallo, 2002;) como en experimentos de laboratorio (Dales, 1950; Smith, 1964; Bartels-Hardege y Zeeck, 1990; Batista *et al*, 2003). No obstante, la mayor parte de estos experimentos no se centraban en el papel de las variables ambientales limitándose a describir lo observado en el medio natural. La época de puesta de *Nereis diversicolor* descrita en la bibliografía es muy variable, tanto como las distintas condiciones ambientales de los lugares donde fue estudiada. El amplio margen de temperaturas en las que *Nereis diversicolor* puede encontrarse es probablemente la causa principal de que se hayan descritos periodos concretos de reproducción de menos de un mes, así como épocas de puesta continuas durante todo el año. En general, la época de puesta se alarga conforme se desciende en latitud y los inviernos son más suaves (García-Arberas y Rallo, 2002). En la costa norte española de donde fueron extraídos los gusanos empleados en esta experiencia, la época de reproducción es continua, (Ver Capítulo 4) aunque con distintos periodos de intensidad (García-Arberas y Rallo, 2002; García del Real *et al*, 2005).

Conocer cuales son las variables ambientales que controlan la maduración de *Nereis diversicolor* es clave para poder desarrollar una producción intensiva de este anélido poliqueto. Por un lado, como ocurre en cualquier otra explotación de acuicultura intensiva, es muy deseable tener control sobre la maduración de los reproductores, ya que esto permite renovar el stock con nuevos ejemplares a voluntad, sin depender de los ciclos naturales de la especie, que no siempre coinciden con las necesidades del mercado. Además, en el caso de *Nereis diversicolor* a esta necesidad de tipo comercial, se une una de tipo biológico, ya que al tratarse de un especie semelparea, los individuos mueren tras la puesta. Es necesario controlar la maduración de los individuos durante su engorde para evitar que maduren antes de alcanzar la talla comercial y por lo tanto mueran antes de ser recolectados para su venta. Por esta razón, gran parte de las experiencias de cultivo desarrolladas se han centrado en este aspecto, consiguiendo algunos avances significativos. A continuación se describen algunas de las experiencias realizadas más significativas.



## **5.1.2. EXPERIENCIA 1. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA INTENSIDAD DE LUZ**

### **5.1.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.**

El cambio entre la fase de crecimiento somático y de desarrollo de productos sexuales sólo se expresa en individuos que han alcanzado un cierto grado de desarrollo (Last *et al.*, 1999). Se utilizaron, por tanto, ejemplares adultos (no sexualmente maduros) escogidos en función de la talla. El diseño experimental diseñado se correspondió al de un ensayo bifactorial con las siguientes características:

1. Factores principales o fuentes de variación:

- Temperatura: con dos niveles: 20°C y 25°C.
- Intensidad de luz: con cuatro niveles: 0 lux, 50 lux, 100 lux y 175 lux.
- Tiempo: con tres niveles: contaje de gusanos a los 15, 30 y 45 días tras el cambio de las condiciones de fotoperiodo.

2. Réplicas: dos réplicas.

- Variable dependiente: número de gusanos maduros identificados por la típica coloración verdosa.

Se utilizó agua con salinidad ajustada al 15% o mediante la dilución de agua de mar esterilizada con agua destilada. La alimentación se realizó una vez por semana, utilizando para ello pienso para peces pulverizado de la marca SOLEA, a razón de 6 g por cubeta de ensayo. El sustrato empleado fue arena de playa con las características granulométricas indicadas en la figura 12.1. El contenido en materia orgánica fue rectificado por adición de turba hasta proporcionar un valor del 10%. En cada cubeta se proporcionó aireación por medio de dos difusores de aire, conectados a un aireador. Se renovó el agua semanalmente para evitar la acumulación de metabolitos.

Los ensayos se llevaron a cabo en cubetas de 60x40x41,2 cm, utilizándose un total de 8 cubetas. En cada una de ellas se introdujo un lote de 12 gusanos. Todos los gusanos tenían las mismas características externas y la misma talla, procediendo todos de la misma zona de la ría del Pas. Los lotes se formaron eligiendo los gusanos al azar.



Una vez introducidos los gusanos en las cubetas de ensayo se les dejaba durante una semana de aclimatación. Transcurrido este tiempo se procedió a la manipulación ambiental cambiando el fotoperiodo de ciclo corto al de ciclo largo, al ajuste de las temperaturas y al de las intensidades de luz.

Tras dos semanas de aclimatación a las nuevas condiciones ambientales se iniciaron los recuentos durante un periodo de un mes con una frecuencia quincenal. Se procedió al tamizado de la arena de las cubetas a través de un tamiz de 1 mm de luz de malla. Para ello, se extraía parte del agua de las cubetas de ensayo, la cual era dispuesta en otra cubeta vacía. Sobre esta agua, se tamizaba todo el sedimento de las cubetas que contenían gusanos y se separaban estos para su posterior recuento e identificación del color.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un Análisis de la varianza en tres vías, que permite diferenciar la significación de los efectos de los factores principales individualmente y la de las correspondientes interacciones dos a dos. Los contrastes entre pares de medias fueron analizados mediante la “t” de Tukey.

#### 5.1.2.1. RESULTADOS Y DISCUSION

En función de los resultados de la Anova (Ver **tabla 5.1.**)

- Se rechaza la hipótesis nula de igualdad de efecto de la temperatura sobre la maduración de los gusanos, con una probabilidad de error inferior al 5%. La temperatura de 25°C produce una aceleración en la maduración sexual de los gusanos, resultando más favorable que la temperatura de 20°C.
- Se rechaza la hipótesis nula de igualdad de efecto de la intensidad de luz sobre la maduración de los gusanos con una probabilidad de error inferior al 5%. La prueba “t” de Tukey determina que la intensidad de 175 lux, la máxima utilizada, dio lugar al menor número de gusanos maduros. Las condiciones más favorables se obtuvieron con intensidades entre 0 y 50 lux (tabla 13.3)
- Se rechaza la hipótesis nula de igualdad de efecto del tiempo transcurrido en la maduración sexual. La prueba “t” de Tukey concluye que la probabilidad de encontrar gusanos maduros aumenta con el tiempo, con independencia de los efectos debido a la temperatura y a la intensidad de luz (**tabla 13.4**)



- De las posibles interacciones, sólo se rechaza la hipótesis nula para la interacción tiempo-intensidad, con una probabilidad de error inferior al 5,5%, aceptándose por tanto que se produce un efecto de sinergia entre la temperatura y la intensidad de luz en el tiempo de maduración de los gusanos.

Tabla 5.1. Resultados de la Anova.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial
<b>Modelo corregido</b>	201,667a	23	8,768	6,189	0,000	0,856
<b>Intercept</b>	456,333	1	456,333	322,118	0,000	0,931
<b>INTENSID</b>	21,833	3	7,278	5,137	0,07	0,391
<b>TEMPE</b>	102,083	1	102,083	72,059	0,000	0,750
<b>TIEMPO</b>	50,042	2	25,021	17,662	0,000	0,595
<b>INTENSID*TEMPE</b>	12,417	3	4,139	2,922	0,055	0,268
<b>INTENSID*TIEMPO</b>	9,792	6	1,632	1,152	0,364	0,224
<b>TEMPE * TIEMPO</b>	2,042	2	1,021	0,721	0,497	0,057
<b>INTENSID * TEMPE * TIEMPO</b>	3,458	6	0,576	0,407	0,867	0,092
<b>Error</b>	34,000	24	1,417			
<b>Total</b>	692,000	48				
<b>Total corregida</b>	235,667	47				

R cuadrado = ,856 (R cuadrado corregida = ,717)

Los efectos de la temperatura y la intensidad de luz sobre el número de gusanos considerados maduros por sus caracteres somáticos se muestran en las **Fig. 5.1. y 5.2.**

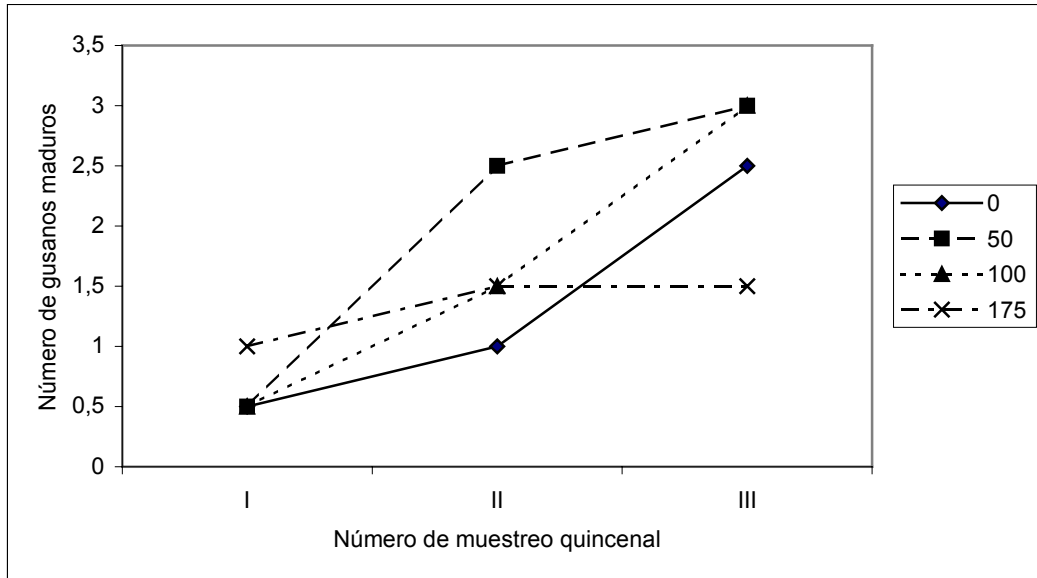


Fig. 5.1. Evolución temporal en el número de gusanos maduros hallados a la temperatura de 20°C.

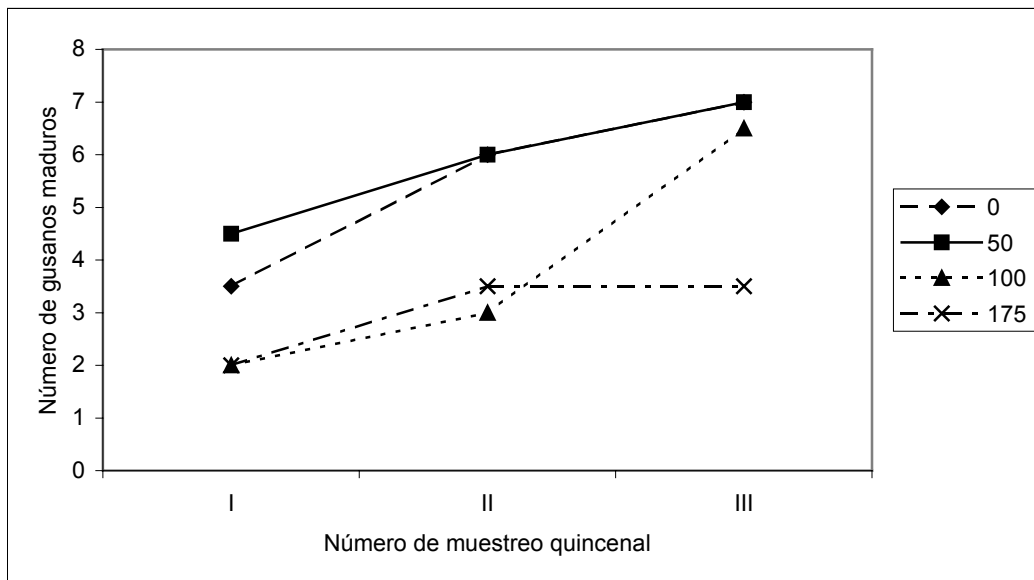


Fig. 5.2. Evolución temporal en el número de gusanos maduros hallados a la temperatura de 25°C.





### **5.1.3. EXPERIENCIA 2. ENSAYO DE OBTENCIÓN DE REPRODUCTORES DE NEREIS DIVERSICOLOR POR ALTERACIÓN DEL FOTOPERIODO.**

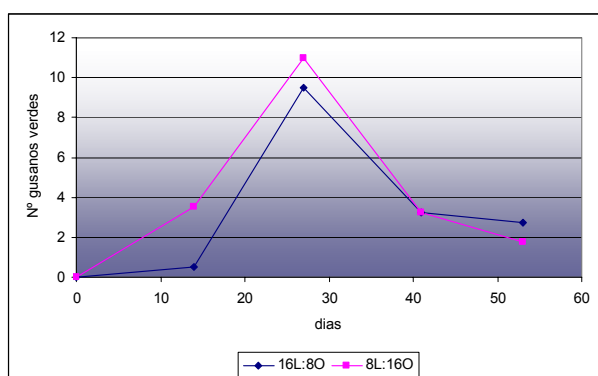
#### **5.1.3.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

Para el cultivo controlado de los gusanos en laboratorio se utilizaron las instalaciones interiores de la planta de cultivo experimental de manera que aseguramos el mantenimiento óptimo de las condiciones del agua, mediante el sistema de recirculación y de refrigeración instalado. Todo el recinto se mantuvo con unas condiciones constantes de temperatura, mediante los equipos de aire acondicionado y refrigeración. La intensidad luminosa y el fotoperiodo se controlaron mediante la instalación de un temporizador automático que regulaba el horario de encendido y apagado de las luces. A fin de comprobar el efecto de dos fotoperiodos simultáneamente, se dispuso una cámara oscura sobre cuatro de las ocho cubetas con las que se realizó el ensayo, de manera, que las condiciones de fotoperiodo fueran independientes en los dos tratamientos. Las condiciones de fotoperiodo ensayadas fueron 16L:8O y 8L:16O, lo que representa condiciones de verano e invierno, respectivamente. La salinidad se fijó en 20 g/L y la temperatura del agua de cultivo a 18°C. Las cubetas de cultivo tenían unas dimensiones de 39.5 x 29.5 x 21.5 cm y una capacidad de 18 l, de los cuales 15 l eran realmente útiles. Las cubetas tenían un rebosadero en la parte superior, de forma que el agua sobrenadante era devuelta por gravedad a la cubeta con el medio filtrante, mientras que la entrada se producía de forma continua mediante bombeo a través de unos tubos de PVC perforados, elevados 15 cm sobre la superficie del agua para favorecer la oxigenación. Se introdujeron 20 individuos por cubeta (equivalente a 100 ind/m<sup>2</sup>). La revisión se realizó con frecuencia quincenal. Como primer análisis básico, se comprobó cada una de las cubetas para verificar la supervivencia de los individuos, calculándose para cada cubeta la tasa de supervivencia. Con los gusanos supervivientes para cada cubeta, se crearon dos grupos, uno de individuos presuntamente maduros, por presentar una coloración verdosa, y otros que no presentaban dicha coloración. Los gusanos que parecían estar más maduros se extrajeron definitivamente de las cubetas y fueron utilizados en las experiencias de fecundación *in vitro* y cría larvaria, así como en la experiencia tres descrita más adelante. Se apuntó para cada cubeta, y cada muestreo, el número de gusanos supervivientes y el número de gusanos presuntamente maduros.

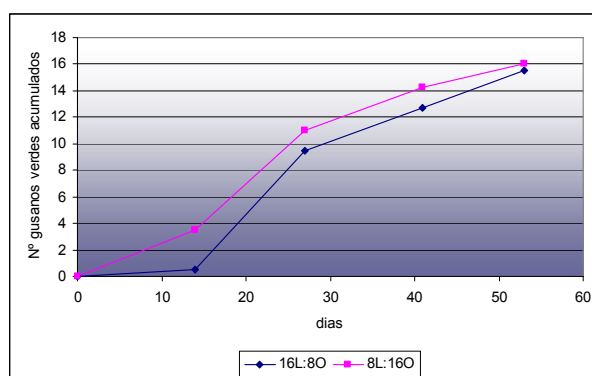


### 5.1.3.2. RESULTADOS

El número de gusanos con caracteres externos de maduración para ambos tratamientos fue muy similar en ambos tratamientos, si bien hay algunas pequeñas diferencias que es importante destacar. Como se observa en la **Fig. 5.3.** el número de gusanos que iniciaron la maduración en los primeros 15 días de experiencia fue superior en el caso de el tratamiento con fotoperiodo corto. Esta tendencia que se iguala pasados los primeros 40 días es relativamente clara especialmente durante los primeros 15 días, en los cuales hubo tres gusanos con síntomas de maduración frente al único gusano del tratamiento con fotoperiodo largo. En la **Fig. 5.4.** además se observa que el número de gusanos verdes acumulados fue superior en el tratamiento de fotoperiodo corto excepto al final de la experiencia cuando el proceso se iguala. El hecho de que la maduración aparezca antes en las cubetas de fotoperiodo corto, es consistente con el cambio en las condiciones de fotoperiodo que citan Olive et al (1999). Sin embargo, esta misma respuesta se produce poco después en las cubetas de los gusanos mantenidos en condiciones de fotoperiodo largo (estos no han sufrido cambio apenas en el fotoperiodo), por lo que se indica la posibilidad de un posible mensajero químico, que es liberado al medio por gusanos maduros y hacen que se sincronice la puesta en los demás gusanos. De ser cierta esta hipótesis, podría generar importantes inconvenientes para la producción intensiva de gusanos poliquetos. Otra posible explicación es la elevada temperatura empleada en ambas experiencias que podría haber actuado como inductor de la maduración en ambas cubetas. Por último es probable que los gusanos, que fueron obtenidos del medio, estuvieran en un avanzado estado de maduración antes de meterles en las cubetas y no hicieran más que terminar de madurar en nuestras instalaciones.



**Fig. 5.3.** Número de gusanos verdes observados en cada cubeta en cada muestreo para los dos tratamientos.



**Fig. 5.4.** Numero acumulado de gusanos verdes hallados en cada muestreo para los dos tratamientos (fotoperiodo corto y largo).



#### **5.1.4. EXPERIENCIA 3. SEGUIMIENTO DE LA MADURACIÓN DE DOS POBLACIONES DE REPRODUCTORES SOMETIDOS A DOS CONDICIONES DISTINTAS DE TEMPERATURA Y FOTOPERIODO.**

##### **5.1.4.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

En esta experiencia se emplearon gusanos extraídos de la bahía de Santander por mariscadores profesionales y cultivados en nuestro estanque exterior (Ver capítulo 5) , así como en acuarios cerrados con condiciones de fotoperiodo y temperatura controladas (Ver capítulo 6).

Los gusanos seleccionados para esta experiencia fueron aquellos que mostraban signos de maduración, es decir que habían adquirido una tonalidad verdosa. Se extrajeron 60 gusanos en total, 30 de cada stock. De los 60 gusanos extraídos se encontraron 5 machos y 55 hembras, que se dividieron en 4 grupos de 13 hembras y un macho excepto en el 3º acuario donde se añadió un macho más. Los acuarios 1 y 3 contenían gusanos provenientes del estanque exterior y por lo tanto habían estado sometidos a temperaturas de entre 10 y 13 °C y un fotoperiodo corto. Los grupos 2 y 4 por el contrario provenían de los acuarios cerrados sometidos a fotoperiodo largo y temperaturas de entre 18 y 20 °C. Cada uno de estos dos grupos se sometió a nuevas condiciones de temperatura y fotoperiodo con el fin de observar el efecto de las nuevas condiciones en la reproducción de *Nereis diversicolor*. De esta manera el grupo 1 y 2 se introdujo en un sistema de refrigeración artificial con temperaturas de entre 12 y 14°C y se expuso a fotoperíodos cortos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad. Los grupos 3 y 4 por el contrario estuvieron expuestas a temperaturas de entre 16 a 20 °C con fotoperíodos largos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Los acuario eran revisados diariamente con el objeto de detectar gusanos muertos o con señales de haber iniciado una puesta. Cuando se detectaban gusanos muertos se trataban de sexar y se anotaba. Además, semanalmente se procedía a comprobar el estado de maduración de los gusanos de cada uno de los grupo para lo que se seleccionaban 5 gusanos a los que se les extraían de la manera menos agresiva posible sus gametos. Después se procedía a la medición de los ovocitos, hasta un total de 50 por individuo.

Los datos fueron analizados con la ayuda del programa estadístico SPSS 14.0 para Windows, mediante el estudio de la comparación de medias por pruebas t para muestras independientes.



#### 5.1.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto los gusanos del estanque exterior como los provenientes de los acuarios interiores mostraban óvulos con diámetros cercanos a los considerados adecuados para la fertilización. Según Smith, (1964) un oocito puede considerarse fértil cuando alcanza diámetros entorno a los 195-200  $\mu\text{m}$ . Dales (1950) empleo en sus experiencias de fertilización óvulos con diámetros superiores a los 200  $\mu\text{m}$ , con una media de 225  $\mu\text{m}$ .

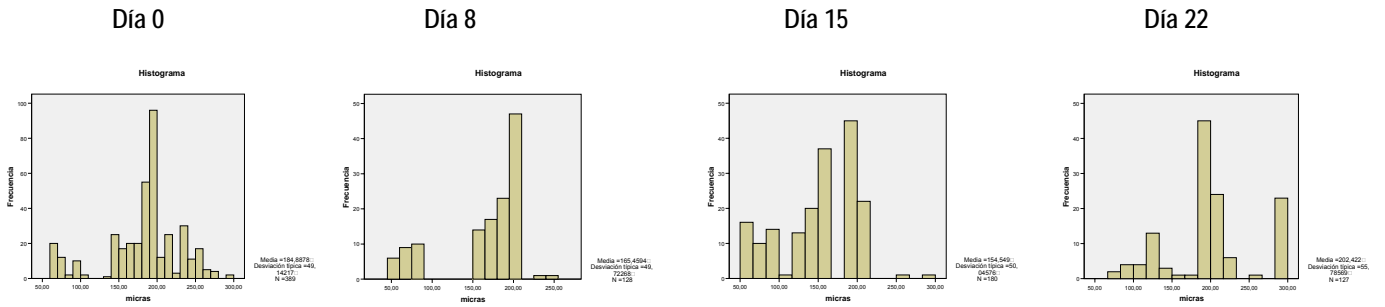
Los oocitos de los gusanos provenientes del estanque exterior mostraron al inicio de la experiencia un diámetro medio de 184,88  $\mu\text{m}$  con una desviación típica de 49,14  $\mu\text{m}$ . En el caso de los gusanos provenientes de los acuarios cerrados los diámetros de los oocitos fueron superiores, 199,73  $\mu\text{m}$  con una desviación típica muy inferior 14,94  $\mu\text{m}$ . Las diferencias iniciales entre ambos grupos fueron analizadas mediante una prueba t de igualdad de medias, los resultados de dicho análisis indican que existen diferencias estadísticamente significativas.

En la **Figura 5.5.** puede observarse el estado inicial de los oocitos de las poblaciones estudiadas así como la variación en el tiempo de las frecuencias de distribución.

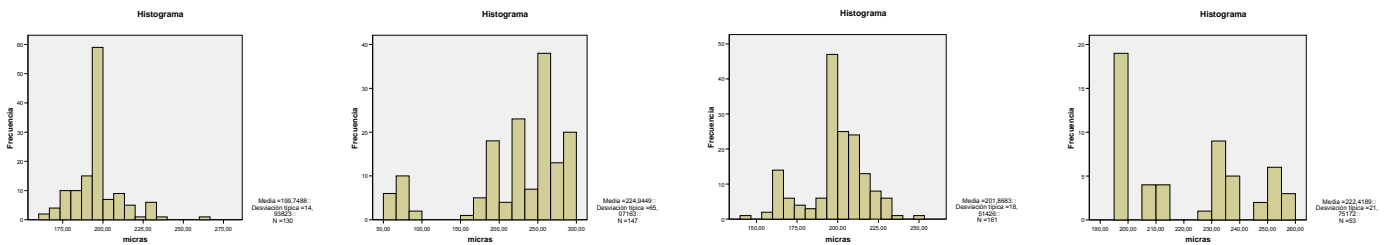
La cubeta 1 y la cubeta 4, fueron sembradas con gusanos provenientes del estanque exterior. Muestran un estado inicial en el que se observan dos grupos de gusanos en estados reproductivos claramente distintos. Una pequeña parte de los gusanos muestran óvulos claramente inmaduros con diámetros comprendidos entre los 50 y los 100  $\mu\text{m}$ , mientras que la mayoría de los gusanos muestra un estado maduro acorde a la coloración por la que fueron escogidos con diámetros comprendidos entre los 150 y los 220  $\mu\text{m}$ . Dentro de los gusanos maduros se observa un tercer grupo o una continuación del segundo con diámetros de más de 220  $\mu\text{m}$ , llegando a alcanzar los 290  $\mu\text{m}$  en algunos casos.

El estado inicial de las cubetas 2 y 3 es diferente al del otro grupo, pese a estar compuesto al igual que en el caso anterior por gusanos con caracteres externos de maduración. En este caso se observa un único grupo de gusanos con diámetros agrupados entorno a los 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Tras los primeros 8 días de experimentación se observan cambios importantes en el diámetro de los oocitos en las 4 cubetas estudiadas. Para comprobar si estas diferencias eran estadísticamente significativas se realizó una prueba t para cada una de las cubetas por separado, obteniéndose diferencias altamente significativas para todos los casos analizados. ( $p < 0.01$ , en todos los casos).

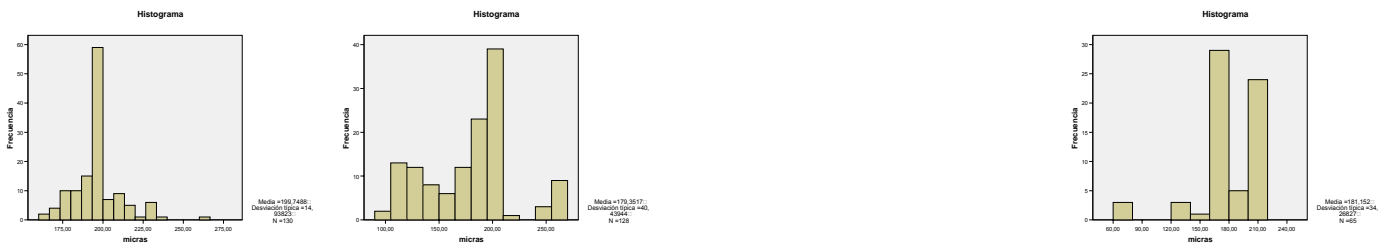
Las cubetas 2 y 4 mostraron un incremento en el diámetro de los oocitos, mientras que en las cubetas 1 y 3 el diámetro medio disminuyó.



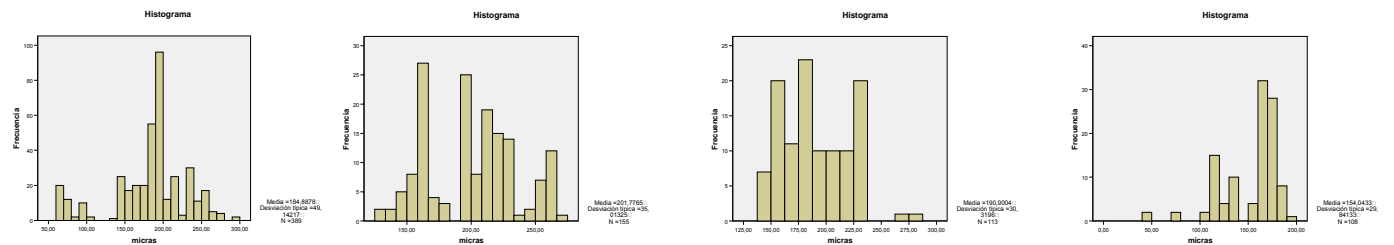
Cubeta 1. Gusanos provenientes de condiciones de invierno cultivados en condiciones de invierno



Cubeta 2. Gusanos provenientes de condiciones de verano cultivados en condiciones de invierno.



Cubeta 3. Gusanos provenientes de condiciones de verano cultivados en condiciones de verano.



Cubeta 4. Gusanos provenientes de condiciones de invierno cultivados en condiciones de verano.

Figura. 5.5. Variación en el tiempo de las frecuencias de distribución de los oocitos de las dos poblaciones.



Es importante señalar que las cubetas 2 y 4 se corresponden con aquellas en las que se produjo el cambio de condiciones ambientales. Las mortalidades observadas son muy importantes a la hora de explicar estas variaciones, ya que si bien no todas las muertes registradas durante la experiencia estuvieron directamente relacionadas con la puesta, gran parte de ellas si lo estuvieron.

La **tabla 5.2.** muestra la variación de la mortalidad a lo largo de la experiencia. En esta tabla se observa que las mortalidades más altas se produjeron en los primeros 8 días desde la selección de los reproductores.

Es lógico suponer que una gran parte de las mortalidades observadas se debió a la muerte de aquellos gusanos de entre seleccionados que se encontraban en un estado más avanzado de maduración, es decir con óvulos de mayor diámetro.

Tabla 5.2. Mortalidad observada

	<b>Día 8</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 2</b>
<b>Cubeta 1</b>	4	0	1
<b>Cubeta 2</b>	2	3	2
<b>Cubeta 3</b>	8	1	1
<b>Cubeta 4</b>	4	1	1

La disminución de los diámetros medios en las cubetas 1 y 3 puede explicarse por lo tanto como una consecuencia de las mortalidades registradas. No obstante, las cubetas 2 y 4 también registraron mortalidades similares a las de las cubetas 1 y 3 y sin embargo mostraron incrementos en el diámetro de los oocitos. Probablemente en el caso de estas dos cubetas el descenso producido por la muerte de aquellos gusanos más maduros se ha visto compensada por el crecimiento experimentado al producirse un incremento en la maduración. Este incremento de la maduración podría estar relacionado con el cambio de condiciones ambientales. Aunque las poblaciones de *Nereis diversicolor* muestran un ciclo reproductivo continuo en los estuarios cántabros, siendo posible encontrar gusanos maduros durante todo el año, existen picos de intensidad, que en las poblaciones del Pas coinciden con el inicio de la primavera y del Otoño (García del Real *et al*, 2005). Arias y Drake, (1995) también encontraron periodos prolongados de reclutamiento con máximos en las mismas épocas.



Esto es además consistente con los óptimos encontrados para el desarrollo de las larvas en este estudio que se encuentran entre los 15 y los 18°C, temperaturas que se dan normalmente en primavera e invierno. Tras los primeros 8 días las mortalidades se reducen notablemente.

La cubeta nº 2 que mostraba gran número de óvulos con diámetros superiores a los 225 µm sufre las mayores mortalidades con 4 gusanos muertos, produciéndose un descenso en el diámetro de los óvulos observados en el día 15. Tanto la cubeta 2 como la cubeta 4 muestran un crecimiento rápido de sus cortes de óvulos desapareciendo estas cuando alcanzan diámetros superiores a los 225 µm. Este hecho confirma el rápido crecimiento de los óvulos cuando son sometidos a cambios de temperatura y fotoperiodo. Las cubetas 1 y 3 también muestran un crecimiento importante de los óvulos más pequeños, pero muestran una menor presencia de óvulos con diámetros superiores a los 225 µm.



## 5.2. ENSAYO DE CRÍA EN ESTANQUE EXTERIOR SUJETO A CONDICIONES AMBIENTALES: ESTUDIO DE DENSIDADES DE CULTIVO.

### 5.2.1. INTRODUCCIÓN

Las granjas de gusanos marinos que operan en el Reino Unido, Holanda y Australia cuentan con un sistema de cultivo en estanques exteriores. Este sistema presenta diferencias significativas con respecto a las múltiples experiencias de cultivo reflejadas en la literatura científica, ya que el diseño de las instalaciones se orienta hacia la producción y cosechado, y no hacia el control estricto de variables específicas. Estas instalaciones cuentan con una renovación continua del agua, al igual que la mayoría de las instalaciones de acuicultura con fines comerciales.

En la visita realizada en el año 2003 a las instalaciones de la empresa SEABAIT LTD. en Newcastle, se pudo observar una de estas granjas de cultivo de la especie *Nereis virens*, comprobándose que la infraestructura necesaria para la producción comercial de gusanos marinos es relativamente sencilla, al compararse con otras plantas dedicadas al cultivo marino de otras especies, en su mayoría piscícolas.

Las condiciones de cultivo de *Nereis diversicolor* han sido específicamente estudiadas (Fidalgo e Costa P., 1999; Fidalgo e Costa P. *et al.* 2000; Fidalgo e Costa P. y Cancela da Fonseca L., 2001), habiendo determinado estos autores las condiciones de temperatura, salinidad y sustrato más adecuadas para el cultivo en laboratorio. Estas condiciones se determinaron en cubetas experimentales de pequeño volumen con renovación semanal. Scaps y Retière (1992) estudiaron la influencia en el crecimiento de la especie de diversos parámetros en condiciones de cultivo experimental (ración alimentaria, densidad intraespecífica, relaciones entre individuos y estrés).

La presente experiencia se ha realizado en un tanque exterior, sometido a las variables ambientales y climatológicas, y pretende reproducir la situación de un sistema de cultivo a la intemperie en lagunas someras. La inviabilidad técnica de la renovación constante del agua de cultivo en nuestras instalaciones, es suplida con un sistema experimental de depuración desarrollado por este Equipo de Investigación, el cual también se ha puesto a prueba y ajustado durante el desarrollo de la experiencia.

La experiencia se cerró al cabo de los seis meses desde su inicio, contando los gusanos en ese momento con unos ocho meses de edad.



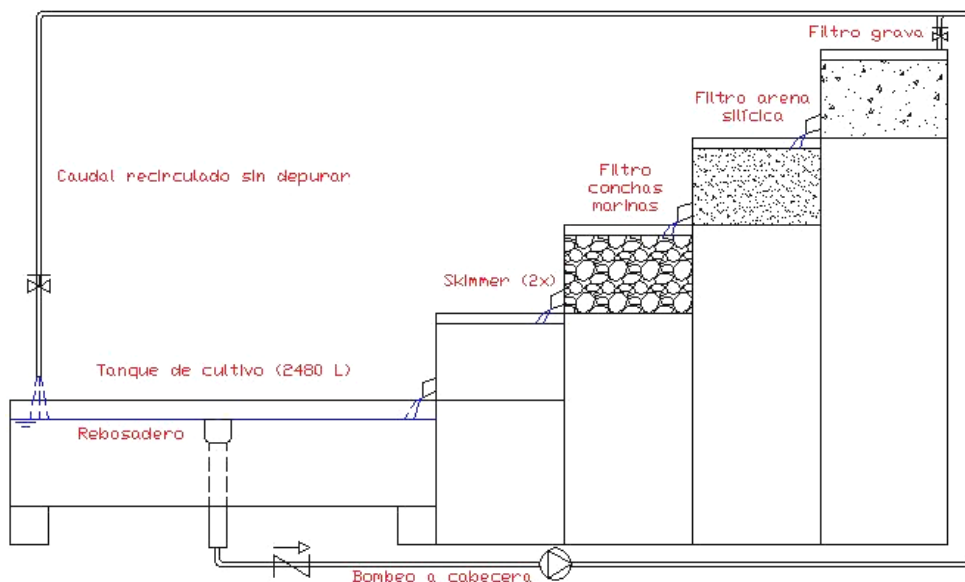


La causa fue la tendencia a la maduración y progresiva mortalidad de la población que se presentaba en todas las cubetas de ensayo, independientemente de la densidad de cultivo. La posible causa de las altas mortalidades ha sido el aumento de la temperatura del agua en el tanque de cultivo, lo que ha favorecido el crecimiento de algas que han afectado a la transferencia de oxígeno entre el agua y el sedimento habitado por los gusanos.

Los resultados obtenidos son prometedores en su inicio, si bien, según avanza la experiencia, los efectos de la maduración hacen que los resultados obtenidos (en relación a las tasas de crecimiento) sean peores que los que se puedan obtener con un control más estricto de las variables ambientales, fundamentalmente la temperatura y el fotoperiodo.

### 5.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La experiencia se llevó a cabo en un estanque exterior, con recirculación del agua de cultivo a través de un sistema de filtros en cascada. En la **Fig. 5.6.** se muestra un esquema de la instalación de cultivo. En el interior del tanque se dispusieron 8 cubetas con una superficie de  $0,1 \text{ m}^2$  y una profundidad de 25 cm de sustrato compuesto por arena silícica de granulometría media. Las cubetas 1 y 5 tenían  $200 \text{ ind/ m}^2$ , las cubetas 2 y 6  $400 \text{ ind/ m}^2$ , las cubetas 3 y 7  $1000 \text{ ind/ m}^2$  y por último las cubetas 4 y 8,  $2000 \text{ ind/ m}^2$ . Todo el estanque se cubrió con una red, de forma que no se limitaba la penetración de luz solar, y se evitaba la entrada de cuerpos extraños o animales en el tanque de cultivo.



**Fig. 5.6.** Sistema de filtros con recirculación en cascada diseñado para el cultivo en exterior.



El desarrollo de los gusanos se midió en función del incremento de la biomasa en peso fresco, calculándose la Tasa media de engorde diario (DW) y la Tasa media de crecimiento específico, tal y como se refleja a continuación. También se calcularon la Tasa de supervivencia (TS%), expresada como el porcentaje de individuos supervivientes (n) respecto al total inicial, y se calculó el peso medio individual (PMI), estimado a partir del peso total y el número de individuos pesados.

- *Tasa de supervivencia* (TS %), expresada como el porcentaje de individuos supervivientes (n) respecto al total inicial (N)
- *Incremento de peso* ( $\Delta W$ ), que hace referencia al peso total de la población de cada cubeta individual.
- *Tasa media de engorde diario* ( $DW \text{ mg} \cdot \text{día}^{-1}$ ) = (peso final – peso inicial)/nº días
- *Peso medio individual* (PMI gr) = Peso final / nº individuos
- *Tasa media de crecimiento específico* ( $TCE \text{ d}^{-1}$ ) =  $\text{Ln}(W_t - W_0) / n^\circ \text{ días}$

Para ello se realizó el pesaje de los individuos, procediéndose conforme al protocolo elaborado, que se incluyó en el Anexo 1 de la memoria entregada en Septiembre 2005. Las pesadas se realizaron con una balanza digital de precisión, con una resolución de 0,005 g. La periodicidad del muestreo fue mensual.

Finalmente se realizó el análisis de varianzas sobre los datos obtenidos (ANOVA) mediante el empleo del paquete estadístico SPSS 14.0, así como el estudio de contraste de medias mediante la realización del Test de Tukey.



### 5.2.3. RESULTADOS

#### 5.2.3.1. Crecimiento

Los resultados del ANOVA (**Tabla 5.3.**) realizado muestran lo siguiente:

- **Efecto de la densidad de cultivo:** se rechaza la hipótesis nula (igualdad de medias), aceptando que las distintas densidades de cultivo tienen efecto sobre el incremento del peso medio individual con una probabilidad de error,  $p < 0.000$ .
- **Efecto del tiempo:** se rechaza la hipótesis nula (igualdad de medias), aceptando que el tiempo tiene efecto sobre el incremento del peso medio individual con una probabilidad de error,  $p < 0.000$ .
- **Efecto conjunto densidad de cultivo-tiempo:** se rechaza la hipótesis nula (igualdad de medias), aceptando que existe interacción entre los dos factores considerados sobre la variable dependiente peso medio individual con una probabilidad de error,  $p < 0.045$ .

**Tabla 5.3.** Prueba de los efectos inter-sujetos para la variable dependiente P.M.I.

Variable dependiente: PMI

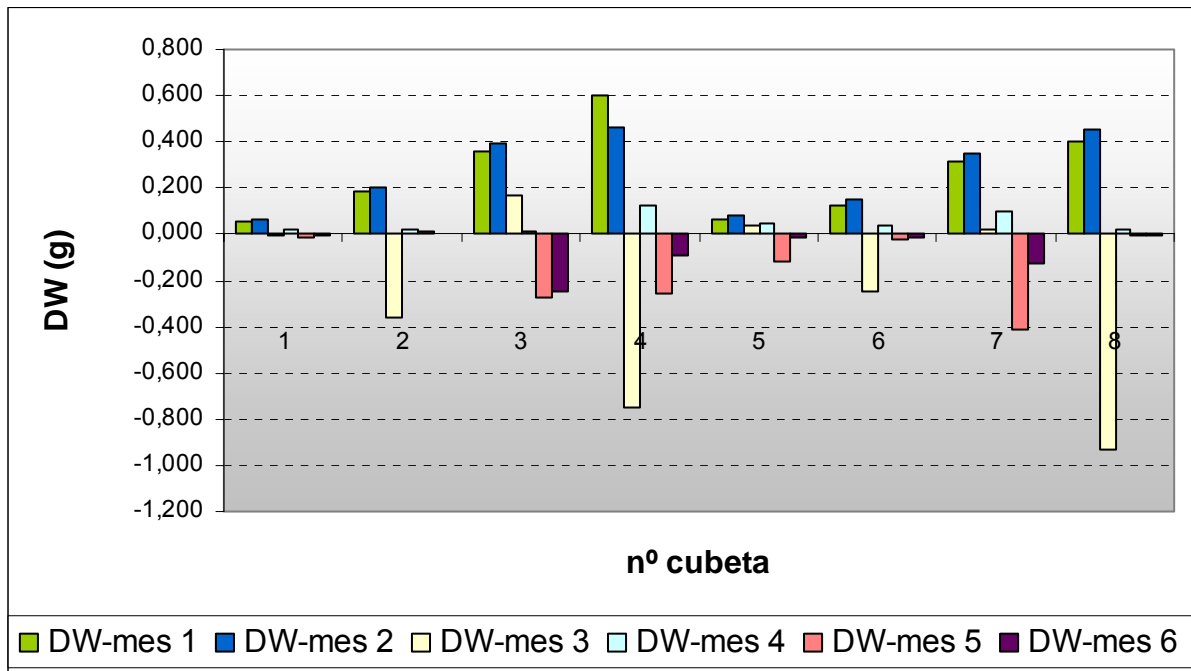
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,199 <sup>a</sup>	27	,044	10,357	,000
Intersección densidad tiempo	4,272	1	4,272	996,780	,000
densidad	,107	3	,036	8,297	,000
tiempo	,936	6	,156	36,379	,000
densidad * tiempo	,156	18	,009	2,027	,045
Error	,120	28	,004		
Total	5,591	56			
Total corregida	1,319	55			

a. R cuadrado = ,909 (R cuadrado corregida = ,821)

Durante los dos primeros meses de la experiencia, se observa un crecimiento rápido de la biomasa, independiente de la densidad de cultivo (Ver **Fig. 5.7**). El crecimiento sufre un gran parón durante el tercer mes, en el que gran parte de las cubetas muestran crecimientos negativos debido a las mortalidades elevadas observadas durante este periodo. Esta circunstancia también puede observarse en la **Fig. 5.8**, donde se reflejan los incrementos de los pesos medios individuales promediados entre todas las cubetas. Esta misma situación se da entre el cuarto y el quinto mes.



Los ritmos de crecimiento obtenidos en cuanto al PMI (peso medio individual) se ven continuamente afectados por las variables ambientales, fundamentalmente la temperatura.



**Fig. 5.7.** Tasas de engorde diario para cada cubeta, comparándose los resultados de los distintos meses que duró el cultivo.

El Test de Tukey (**Tabla 5.4.**) revela diferencias significativas entre la densidad de 200 ind/m<sup>2</sup> y la densidad de 1000 ind/m<sup>2</sup> con una probabilidad de error,  $p < 0.002$  y entre la densidad de 1000 ind/m<sup>2</sup> y la densidad de 2000 ind/m<sup>2</sup> con una probabilidad de error,  $p < 0.001$ .

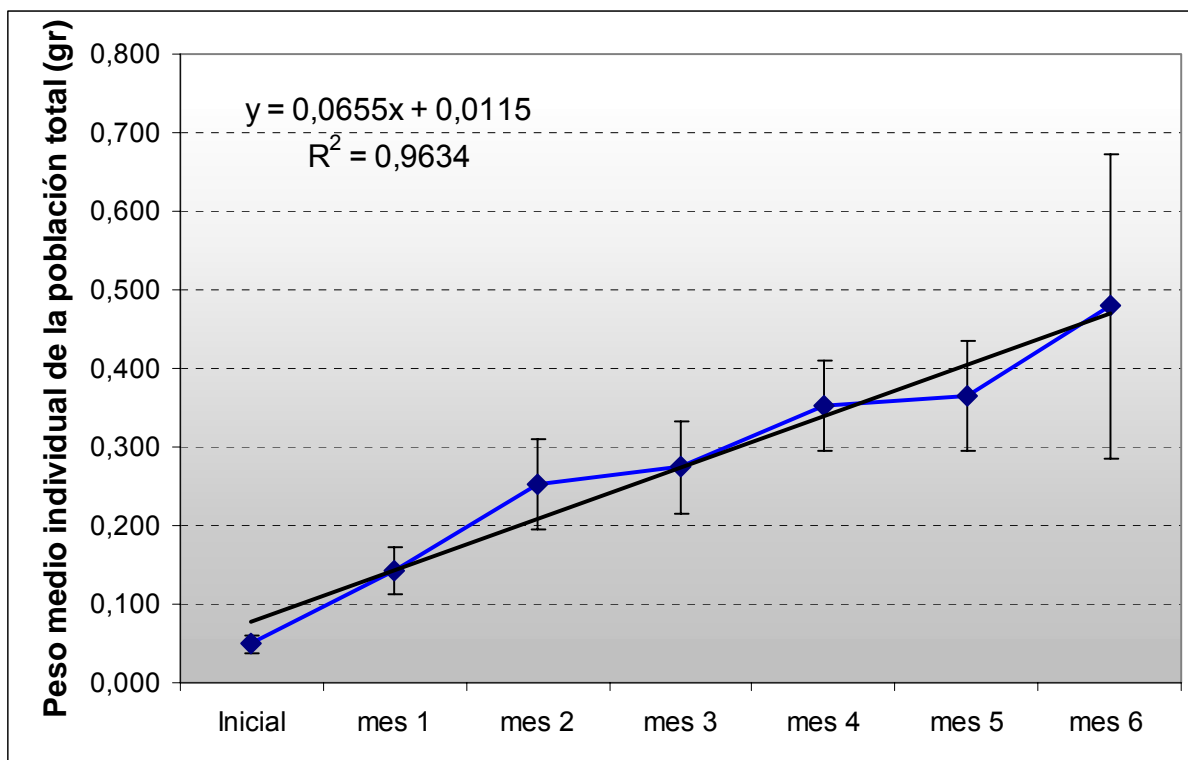


Fig. 5.8. Incremento del PMI promedio de todas las cubetas, con Desviación Estándar.

Variable dependiente: PMI  
DHS de Tukey

(I) Densidad	(J) Densidad	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
					Límite inferior	Límite superior
200,00	400,00	-,0591	,02474	,103	-,1267	,0085
	1000,00	-,1015*	,02474	,002	-,1690	-,0339
	2000,00	,0033	,02474	,999	-,0642	,0709
400,00	200,00	,0591	,02474	,103	-,0085	,1267
	1000,00	-,0424	,02474	,336	-,1099	,0252
	2000,00	,0624	,02474	,078	-,0051	,1300
1000,00	200,00	,1015*	,02474	,002	,0339	,1690
	400,00	,0424	,02474	,336	-,0252	,1099
	2000,00	,1048*	,02474	,001	,0372	,1724
2000,00	200,00	-,0033	,02474	,999	-,0709	,0642
	400,00	-,0624	,02474	,078	-,1300	,0051
	1000,00	-,1048*	,02474	,001	-,1724	-,0372

Basado en las medias observadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

Tabla 5.4 Resultados de la prueba de contraste de medias para la variable dependiente peso medio individual y el factor densidad de cultivo.



DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

Densidad	N	Subconjunto	
		1	2
2000,00	14	,2336	
200,00	14	,2369	
400,00	14	,2960	,2960
1000,00	14		,3384
Significación		,078	,336

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,004.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 14,000

b. Alfa = ,05.

Tabla 5.5. Subconjuntos homogéneos generados por el Test de Tukey para la variable dependiente peso medio individual y el factor densidad de cultivo

Los dos grupos generados por el test de Tukey (**Tabla 5.5.**) nos agrupa por un lado a las densidades de 200 y 2000 ind/m<sup>2</sup> y a la densidad de 1000 ind/m<sup>2</sup> por otro, quedando la densidad de 400 ind/m<sup>2</sup> incluida en ambos grupos. Aunque haya diferencias significativas entre estos grupos, los problemas de mortalidad acaecidos durante la experiencia no nos permiten tomar conclusiones claras en torno a la densidad óptima de cultivo.

Los resultados del Test de Tukey para la variable peso medio individual y el factor tiempo muestra un crecimiento lento del peso medio individual durante el primer mes, siendo luego mayor para los siguientes dos meses y volviendo luego a ser más ralentizado para los siguientes meses salvo para el ultimo en el que vuelve a aumentar la tasa de crecimiento. Las causas de este desigual crecimiento se debe de explicar en base a las temperaturas de cultivo bajas que se tuvieron en los meses de invierno, las cuales influyeron de forma clara en la tasa de crecimiento.



### 5.2.3.2. Supervivencia

En el caso de la variable supervivencia, el ANOVA realizado muestra (**Tabla 5.6.**):

- **Efecto de la densidad de cultivo:** se rechaza la hipótesis nula (igualdad de medias), aceptando que las distintas densidades de cultivo tienen efecto sobre la supervivencia con una probabilidad de error,  $p < 0.000$ .
- **Efecto del tiempo:** se rechaza la hipótesis nula (igualdad de medias), aceptando que el tiempo tiene efecto sobre la supervivencia con una probabilidad de error,  $p < 0.000$ .
- **Efecto conjunto densidad de cultivo-tiempo:** se rechaza la hipótesis nula (igualdad de medias), aceptando que existe interacción entre los dos factores considerados sobre la variable dependiente sobre la supervivencia con una probabilidad de error,  $p < 0.000$ .

Tabla 5.6. Resultados de la prueba de los efectos inter-sujetos para la variable dependiente supervivencia.

Variable dependiente: supervivencia

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	67984,339 <sup>a</sup>	27	2517,938	32,968	,000
Intersección	244332,161	1	244332,161	3199,112	,000
densidad	9987,482	3	3329,161	43,590	,000
tiempo	47274,214	6	7879,036	103,162	,000
densidad * tiempo	10722,643	18	595,702	7,800	,000
Error	2138,500	28	76,375		
Total	314455,000	56			
Total corregida	70122,839	55			

a. R cuadrado = ,970 (R cuadrado corregida = ,940)

En la **Figura 5.9.** quedan reflejadas las altas tasas de supervivencia registradas al término de los dos primeros meses (TS mínima = 92%). Esta alcanza valores del 100% en las cubetas 2, 5 y 7 durante el primer mes. Las mortalidades encontradas se pueden considerar dentro de lo normal. Durante el periodo correspondiente al tercer y cuarto muestreo se registra una alta mortalidad, tendencia que se ve incrementada en sucesivos muestreos, la cual afecta negativamente a los resultados globales de supervivencia (así como a los de crecimiento),



aunque lo hace de forma muy desigual entre cubetas, y no siendo función de la densidad de cultivo. No parece que esta mortalidad por lo tanto este relacionada con la densidad de cultivo, siendo necesario buscar otras explicaciones (cambios de temperaturas, exceso de alimentación, presencia de cubierta algal en el estanque).

Fig. 5.9. Tasas de supervivencia en todo el periodo experimental para cada cubeta

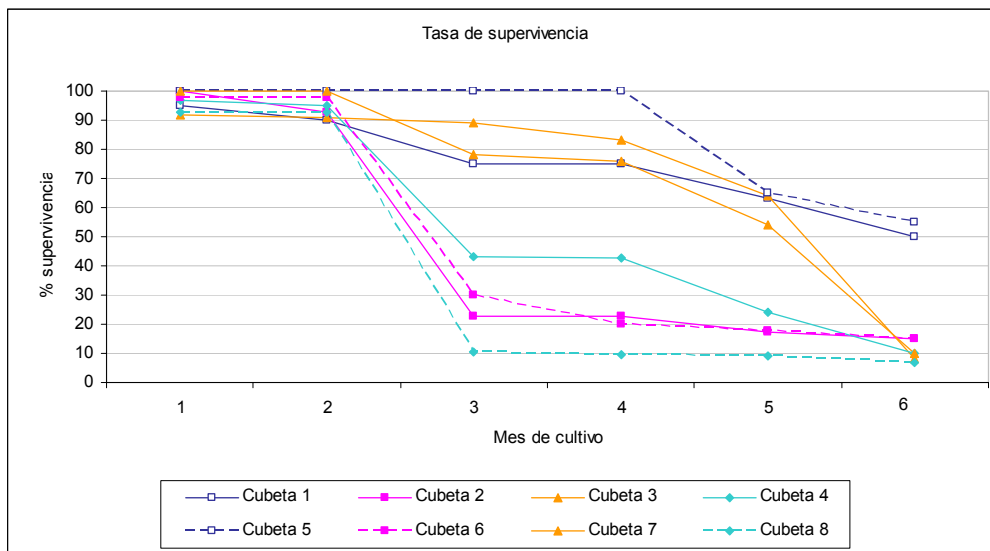


Tabla 5.7. Resultados de la prueba de contraste de medias para la variable dependiente supervivencia y el factor densidad de cultivo.

Variable dependiente: Supervivencia  
DHS de Tukey

(I) Densidad	(J) Densidad	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
200,00	400,00	29,7857*	3,30314	,000	20,7671	38,8043
	1000,00	8,7857	3,30314	,058	-,2329	17,8043
	2000,00	30,9286*	3,30314	,000	21,9100	39,9472
400,00	200,00	-29,7857*	3,30314	,000	-38,8043	-20,7671
	1000,00	-21,0000*	3,30314	,000	-30,0186	-11,9814
	2000,00	1,1429	3,30314	,985	-7,8757	10,1615
1000,00	200,00	-8,7857	3,30314	,058	-17,8043	,2329
	400,00	21,0000*	3,30314	,000	11,9814	30,0186
	2000,00	22,1429*	3,30314	,000	13,1243	31,1615
2000,00	200,00	-30,9286*	3,30314	,000	-39,9472	-21,9100
	400,00	-1,1429	3,30314	,985	-10,1615	7,8757
	1000,00	-22,1429*	3,30314	,000	-31,1615	-13,1243

Basado en las medias observadas.

\* La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.





El test de Tukey (**Tabla 5.7.**), como ocurriera en el caso del peso medio individual, nos muestra diferencias significativas entre los distintos grupos aunque no se aprecia un patrón de comportamiento claro. Así, los subconjuntos generados por el test de Tukey (**Tabla 5.8.**) nos agrupa por un lado a las densidades de 200 y 1000 ind/m<sup>2</sup> y por otro a las densidades de 400 y 2000 ind/m<sup>2</sup>.

Tabla 5.8. Subconjuntos homogéneos generados por el Test de Tukey para la variable dependiente supervivencia y el factor densidad de cultivo.

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

Densidad	N	Subconjunto	
		1	2
2000,00	14	52,5000	
400,00	14	53,6429	
1000,00	14		74,6429
200,00	14		83,4286
Significación		,985	,058

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 76,375.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 14,000

b. Alfa = ,05.

En el caso del efecto del factor tiempo sobre la variable supervivencia el Test de Tukey (**Tablas 5.9. y 5.10.**) nos agrupa por un lado a los dos primeros meses en los que la supervivencia fue prácticamente total, luego por otro lado a los meses 3 y 4, que sin tener diferencias significativas entre ellos, muestran una alta tasa de mortalidad en relación a los dos meses anteriores, y luego nos genera para los meses 5 y 6 dos subgrupos diferentes, volviendo a ser la mortalidad relativamente alta. En este último caso la mortalidad se debió de relacionar con un deterioro de la calidad del agua en el estanque de cultivo.



Tabla 5.9. Resultados de la prueba de contraste de medias para la variable dependiente supervivencia y el factor tiempo

Variable dependiente: Supervivencia

DHS de Tukey

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
					Límite inferior	Límite superior
,00	1,00	3,1250	4,36964	,990	-10,7361	16,9861
	2,00	5,0000	4,36964	,908	-8,8611	18,8611
	3,00	43,8750*	4,36964	,000	30,0139	57,7361
	4,00	46,2500*	4,36964	,000	32,3889	60,1111
	5,00	60,6250*	4,36964	,000	46,7639	74,4861
	6,00	78,7500*	4,36964	,000	64,8889	92,6111
1,00	,00	-3,1250	4,36964	,990	-16,9861	10,7361
	2,00	1,8750	4,36964	,999	-11,9861	15,7361
	3,00	40,7500*	4,36964	,000	26,8889	54,6111
	4,00	43,1250*	4,36964	,000	29,2639	56,9861
	5,00	57,5000*	4,36964	,000	43,6389	71,3611
	6,00	75,6250*	4,36964	,000	61,7639	89,4861
2,00	,00	-5,0000	4,36964	,908	-18,8611	8,8611
	1,00	-1,8750	4,36964	,999	-15,7361	11,9861
	3,00	38,8750*	4,36964	,000	25,0139	52,7361
	4,00	41,2500*	4,36964	,000	27,3889	55,1111
	5,00	55,6250*	4,36964	,000	41,7639	69,4861
	6,00	73,7500*	4,36964	,000	59,8889	87,6111
3,00	,00	-43,8750*	4,36964	,000	-57,7361	-30,0139
	1,00	-40,7500*	4,36964	,000	-54,6111	-26,8889
	2,00	-38,8750*	4,36964	,000	-52,7361	-25,0139
	4,00	2,3750	4,36964	,998	-11,4861	16,2361
	5,00	16,7500*	4,36964	,010	2,8889	30,6111
	6,00	34,8750*	4,36964	,000	21,0139	48,7361
4,00	,00	-46,2500*	4,36964	,000	-60,1111	-32,3889
	1,00	-43,1250*	4,36964	,000	-56,9861	-29,2639
	2,00	-41,2500*	4,36964	,000	-55,1111	-27,3889
	3,00	-2,3750	4,36964	,998	-16,2361	11,4861
	5,00	14,3750*	4,36964	,038	,5139	28,2361
	6,00	32,5000*	4,36964	,000	18,6389	46,3611
5,00	,00	-60,6250*	4,36964	,000	-74,4861	-46,7639
	1,00	-57,5000*	4,36964	,000	-71,3611	-43,6389
	2,00	-55,6250*	4,36964	,000	-69,4861	-41,7639
	3,00	-16,7500*	4,36964	,010	-30,6111	-2,8889
	4,00	-14,3750*	4,36964	,038	-28,2361	-,5139
	6,00	18,1250*	4,36964	,005	4,2639	31,9861
6,00	,00	-78,7500*	4,36964	,000	-92,6111	-64,8889
	1,00	-75,6250*	4,36964	,000	-89,4861	-61,7639
	2,00	-73,7500*	4,36964	,000	-87,6111	-59,8889
	3,00	-34,8750*	4,36964	,000	-48,7361	-21,0139
	4,00	-32,5000*	4,36964	,000	-46,3611	-18,6389
	5,00	-18,1250*	4,36964	,005	-31,9861	-4,2639

Basado en las medias observadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.



Tabla 5.10. Subconjuntos homogéneos generados por el Test de Tukey para la variable dependiente supervivencia y el factor tiempo.

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

Tiempo	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
6,00	8	21,2500			
5,00	8		39,3750		
4,00	8			53,7500	
3,00	8			56,1250	
2,00	8				95,0000
1,00	8				96,8750
,00	8				100,0000
Significación		1,000	1,000	,998	,908

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 76,375.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8,000

b. Alfa = ,05.

En general, las altas mortalidades se asocian a periodos de incrementos o descensos acusados de las temperaturas. Así, los descensos por debajo de 10°C, sobretodo cuando los gusanos son muy jóvenes tienen efecto sobre los gusanos. Esta situación se da entre el segundo y cuarto muestreo, cuando los gusanos tienen entre 3 y 5 meses de edad. Durante esta época se observa una inapetencia de los gusanos por el alimento, acumulándose este y favoreciendo la aparición de hongos y bacterias que pueden afectar a los gusanos. Además se incrementa la demanda de oxígeno por parte de las bacterias para degradar estos restos de comida sin ingerir, reduciéndose la capacidad de aireación del sustrato. En el caso contrario, los aumentos bruscos de temperaturas, se asocian a crecimientos de algas en todo el estanque y sobretodo en las rejillas que impiden a los gusanos escaparse de las cubetas, lo que produce condiciones limitantes de oxígeno que afectan a la aireación del sustrato. Tras el cuarto y el quinto muestreo, las temperaturas aumentaron hasta alcanzar máximos debido a una ola de calor. Las condiciones de estrés térmico debieron incrementar la competencia intraespecífica generando las altas mortalidades observadas.

Durante el primer y el segundo mes el crecimiento es sostenido en todas las cubetas, siendo la tasa de crecimiento diario, mayor cuanto mayor es la densidad de cultivo (barras verdes y azules en la **Fig. 5.10.**)

El tercer mes disminuyen las tasas, siendo nulas o incluso negativas en todas las cubetas, excepto en la cubeta 3, con una densidad de 1000 ind/m<sup>2</sup> en la que se tuvieron tasas de engorde positivas. El cuarto mes se observan ligeros incrementos y el quinto mes, las tasas de



engorde diario son prácticamente nulas, excepto en la cubeta 4 (densidad de 2000 ind/m<sup>2</sup>) y la 7 (densidad de 1000 ind/m<sup>2</sup>).

Es destacable los resultados de las cubetas de mayor densidad 4 y 8 (densidad 2000 ind/m<sup>2</sup>) para el tercer mes, puesto que en estas es donde más se refleja la disminución de peso, en términos de la tasa de engorde diario.

La **figura 5.10** nos muestra la evolución de la biomasa en las distintas cubetas a lo largo del tiempo que duró la experimentación. Se aprecia que las mayores biomásas se han obtenido con las mayores densidades, así como que los episodios de mortandad acaecidos en los últimos meses son más patentes (sus efectos) en las mayores densidades.

La información que ofrece esta figura se complementa con la que se obtiene de la **figura 5.11**, en el que se representa la evolución del peso medio individual de los gusanos por cubeta. Los resultados son dispares debido al factor mortalidad, pero se observa como los mayores pesos individuales se consiguieron en las cubetas con una densidad de 1000 ind/m<sup>2</sup>.

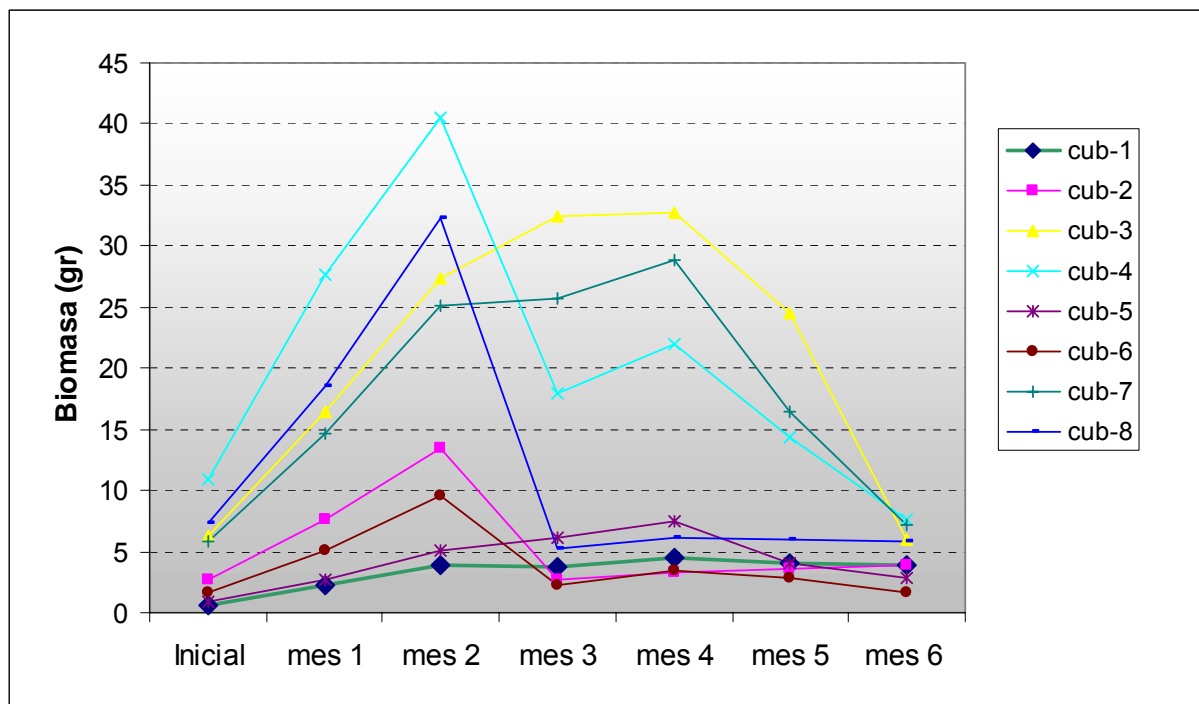


Figura 5.10. Incremento de la biomasa total en peso fresco para las distintas cubetas.



Los pesos medios individuales obtenidos en el caso de las mayores densidades fue 0,3 g. mayores que los obtenidos en cubetas con el doble de densidad. En las cubetas de 2000 ind/m<sup>2</sup> el crecimiento es más sostenido pero menor que en la cubeta de 1000 ind/m<sup>2</sup>.

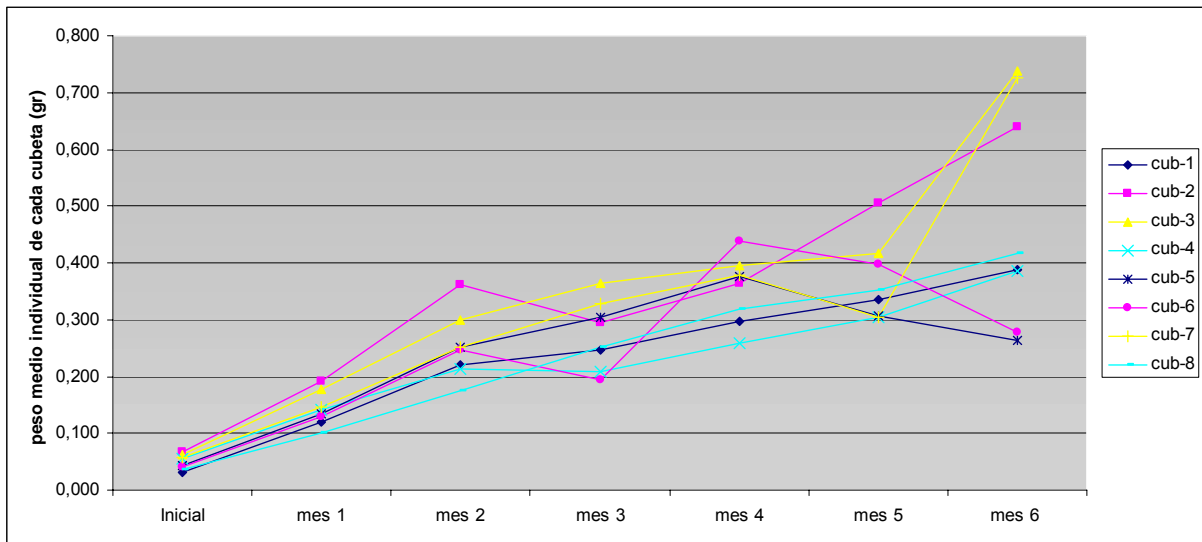


Figura 5.11. Evolución de peso medio individual en las distintas cubetas de cultivo durante los seis meses de cultivo.

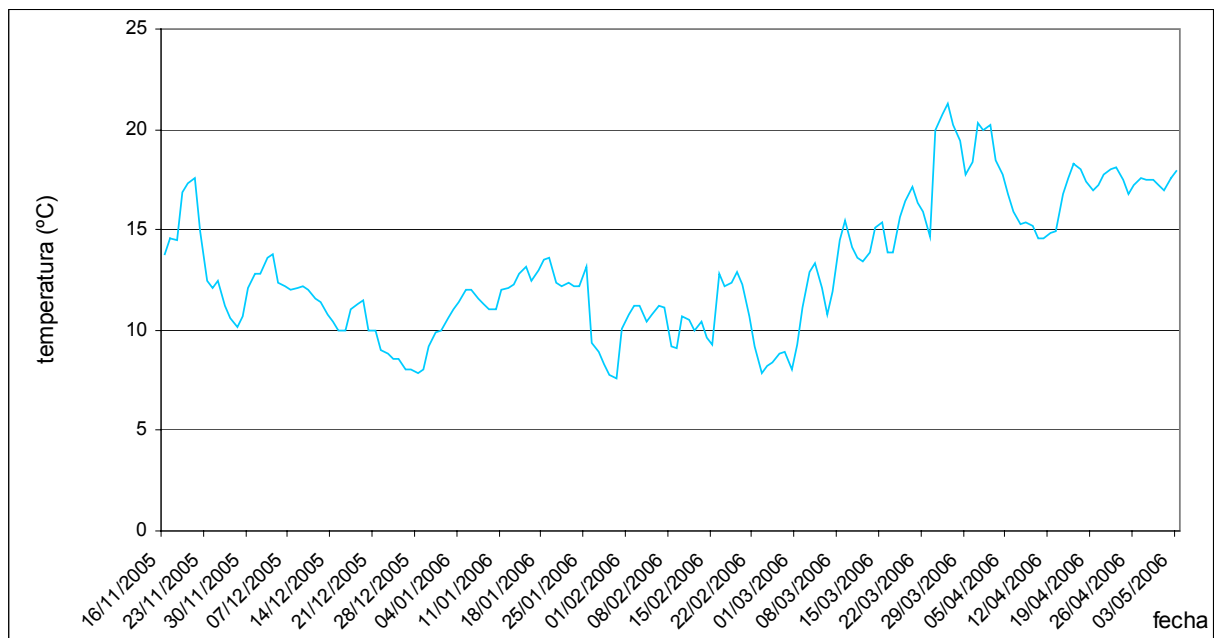


Figura 5.12. Evolución de la temperatura en el cultivo exterior (Temperaturas a mediodía)



#### 5.2.4. DISCUSIÓN

Durante los dos primeros meses el crecimiento de los individuos ha sido rápido y sostenido, con tasas de supervivencia muy elevadas, siendo a partir de ese momento cuando de forma súbita ha comenzado a detectarse una mortalidad elevada y una disminución en la velocidad del crecimiento.

La disminución en la velocidad de incremento de peso (expresado como PMI en la **figura 5.8.**), parece relacionarse con el descenso de las temperaturas, el cual tiene influencia directa en la actividad de alimentación, eficiencia de asimilación del alimento y el crecimiento en peso de los gusanos (Lambert et al., 1992; citado en Olivier *et al*, 1996).

Cabe suponer que en condiciones más estables los ritmos de crecimiento hubieran sido mayores, y por tanto se podrían haber obtenido individuos de talla comercial en menos de un año (se calcula que en unos 9 ó 10 meses). Hay que destacar el peso máximo obtenido por alguno de los gusanos a los siete meses y medio de vida, cercanos a los 0,7 g de peso, siendo el tamaño comercial entorno a 1 g.

De la observación de los datos obtenidos de supervivencia y del registro de temperaturas de agua en el estanque, se consideran las temperaturas entre 14 y 18 °C adecuadas para el buen desarrollo de los gusanos.

La desigualdad en las mortalidades producidas en las distintas cubetas no parece relacionarse con la densidad del cultivo, y las razones deben ser buscadas en algún factor que haya influido de manera desigual. Entre los hipotéticos factores se baraja la posibilidad de un exceso de alimento, unido a una disminución de la temperatura invernal. En efecto, se ha detectado un incremento sostenido de la concentración de nitrógeno amoniacal asociado temporalmente con el aumento de las dosis alimentarias y el descenso de la temperatura. Como indican Lambert et al. (1992, Citado en Olivier *et al*, 1996), a los 8°C de temperatura, la alimentación de *Nereis diversicolor* se detiene completamente. Este efecto negativo del exceso de alimento en descomposición se analiza con detalle en el apartado sobre Control de la Calidad del Agua. El aumento súbito de materia orgánica podría haber aumentado la demanda de oxígeno de forma local por encima del umbral de tolerancia de *Nereis diversicolor*. Por otra parte, se ha detectado un rápido crecimiento de algas sobre las rejillas situadas en la parte superior de las cubetas, las cuales tienen la función de evitar la fuga de los individuos. En apenas dos semanas, la capa de algas era muy densa en algunas cubetas, y especialmente en las cubetas 2, 6 y 8, en las cuales se han registrado las mayores mortalidades y el sustrato aparecía en peores condiciones de oxigenación (color negruzco y olor fuerte a sulfuro de hidrógeno).



Esta cubierta algal podría haber limitado la normal transferencia de agua y oxígeno a través de la rejilla de las cubetas, agravando la anoxia producida por los restos de alimento y provocando una mortalidad masiva de los gusanos. La cubierta algal ha estado relacionada con episodios de aumentos súbitos de la temperatura del agua del estanque.

No se han obtenido conclusiones en torno a la densidad de cultivo, dado que las tasas de mortalidad han sido altas prácticamente en todas las cubetas por las causas comentadas anteriormente. Durante los tres primeros meses la máxima densidad ensayada (2000 ind/m<sup>2</sup>) ha dado como resultado mortalidades muy elevadas, aunque como se ha discutido previamente, los motivos no son obvios y podrían no ser consecuencia de la densidad, ya que mortalidades similares se han registrado en otras cubetas con densidades mucho menores (p.ej. en la cubeta 2 y en la cubeta 6, con densidad de 400 ind/m<sup>2</sup> y T.S. entre el 20 y el 30% al cabo de estos meses). Una causa podría ser la mayor cantidad de alimento sobrante en estas cubetas, el cual habría generado una mayor contaminación, unida al mencionado efecto de las algas sobre la tapa de rejilla. Del mismo modo, las cubetas 3 y 7, con densidades de 1000 ind/m<sup>2</sup>, presentaron buenas tasas de supervivencia, con T.S.= 89 y 78% respectivamente al tercer mes de cultivo. Posteriormente la población también declinó en estas cubetas pero a un menor ritmo que el hallado en otras cubetas.

Los datos no son muy concluyentes entorno al efecto de la competencia intraespecífica, debido al “ruido” generado por la variación en las condiciones ambientales. Se debe repetir esta experiencia en las instalaciones de interior, bajo condiciones controladas y estables de temperatura y fotoperiodo.

El incremento paulatino de las temperaturas tras el invierno, más allá de los 20°C produjo altas tasas de mortalidad en todas las cubetas, debido posiblemente, al incremento del efecto de crecimiento algal sobre las cubetas.



### 5.2.5. Conclusiones

- La instalación de cultivo diseñada parece ser, *a priori*, capaz de mantener una población estable de gusanos, aunque existen algunos factores aún no perfectamente controlados en relación a las necesidades de depuración y las dosis alimentarias en relación a las temperaturas ambientales.
- La aparición de densas cubiertas algales en algunas rejillas podría tener un efecto negativo sobre la transferencia de oxígeno a las cubetas de cría, además de interferir negativamente en la transmisión luminosa. Aunque son efectos no demostrados fehacientemente, podría ser un buen ejemplo de *fouling* en este tipo de instalaciones de acuicultura, y debe ser tenido muy en cuenta durante las labores de mantenimiento y control.
- Se deberá comprobar en próximas experiencias el efecto que haya podido tener sobre la mortalidad de los gusanos la rejilla instalada en la parte superior de las cubetas.
- Los resultados muestran que no existe limitación aparente al crecimiento para densidades de hasta 2000 ind/m<sup>2</sup>, para gusanos de tamaños inferiores a 0,4 g/ind. Una vez alcanzado este tamaño no es posible conocer la densidad adecuada, ya que comenzaron las mortalidades masivas en todas las cubetas, si bien la falta de relación causal con las distintas densidades permite ser optimista en cuanto al uso de densidades elevadas (2000 ind. /m<sup>2</sup>).
- La temperatura es un factor de gran importancia a controlar en el agua de producción. Además un sistema de producción industrial debe de contar con renovaciones frecuentes, sino continuas del agua de cultivo.





## 6. FECUNDACIÓN DE NEREIS DIVERSICOLOR

### 6.1. INTRODUCCIÓN

El anélido poliqueto *Nereis diversicolor* presenta una reproducción sexual con sexos separados y fecundación externa, en la cual se produce la muerte de los reproductores tras la puesta. A este tipo de reproducción se la conoce como reproducción semélpara.

Los procesos que experimentan los tejidos de los individuos de *Nereis diversicolor* durante la reproducción y que causan en última instancia su muerte, fueron descritos en profundidad por Dales (1950). Básicamente consiste en una autofagocitosis de las fibras musculares de la pared corporal, lo cual provoca un debilitamiento general y le otorga la apariencia frágil de los individuos maduros. Bartels-Hardege y Zeeck (1990) describieron el comportamiento reproductivo de *Nereis diversicolor* en cautividad. Según estos autores el macho de esta especie reptaba fuera de su madriguera en busca de una hembra madura. Cuando la encuentra suelta su esperma directamente delante de la galería excavada por esta, pero sin que haya contacto directo entre ambos sexos, provocando un incremento en la actividad tanto de la hembra más cercana, como de otras hembras maduras que se encuentran algo más alejadas. Las hembras realizan movimientos de ventilación saliendo y entrando de la galería y después comienzan a introducir el esperma dentro de la misma, ayudándose de la probóscide en un comportamiento similar al de alimentación. Mientras que el macho muere pocas horas después de iniciada la puesta, la hembra aún sobrevive varios días.

Según Marty *et al* (1997) la presencia de la hembra aún después de producida la fecundación produce numerosas ventajas para los óvulos fertilizados, permitiendo una renovación del agua dentro de la madriguera, lo que supone una mejor limpieza de los metabolitos producidos durante el desarrollo de los óvulos fertilizados, así como por la emisión de sustancias con actividad antimicrobiana, etc.

Además de la fecundación natural, la fecundación artificial de ejemplares de *Nereis diversicolor* también ha sido desarrollada con éxito por varios autores (Dales, R.S., 1950; Smith, R.I., 1964; Ozoh, P.T.E. y Jones, N.V.; 1990). En estos trabajos la fecundación se realizaba en placas Petri tras la extracción de los gametos mediante masajes o punciones, cuando era necesario, en los individuos maduros. A pesar de esta gran cantidad de estudios, la metodología para la fecundación artificial y posterior desarrollo de las larvas obtenidas continúa albergando bastantes incógnitas.



Existen algunas contradicciones entre los distintos autores, tanto en las condiciones idóneas de salinidad y temperatura (**Tabla 6.1.**) como en el diámetro óptimo de los óvulos para el inicio de las fertilizaciones.

Tabla 6.1. Variación de las condiciones empleadas en los distintos trabajos presentes en la bibliografía.

<b>AUTOR</b>	<b>TEMPERATURA EMPLEADA</b>	<b>SALINIDAD EMPLEADA</b>	<b>DIÁMETRO DE LOS ÓVULOS</b>
<b>Dales (1950)</b>	Variable, entre 6,5 y 12,5	No descrita	220 $\mu\text{m}$ de media (varió entre 200 y 275 $\mu\text{m}$ )
<b>Smith (1964)</b>	16-20°C	9-27 partes por mil	190-200 $\mu\text{m}$
<b>Ozoh y Jones (1990)</b>	0-27°C	Amplio rango	Desconocido
<b>Fidalgo y Costa, (1999)</b>	18-22 °C	14-17 partes por mil	Desconocida, fecundaciones naturales

Además, el hecho de que estos estudios no contemplasen la producción comercial de la especie, sino otro tipo de objetivos, hace que parte de la problemática del desarrollo de técnicas para el cultivo comercial de *Nereis diversicolor* no haya sido abordada previamente en la metodología empleada por estos autores.

La diversidad de resultados y los diferentes enfoques de los trabajos realizados han hecho necesario el desarrollo de numerosas experiencias para conseguir adaptar los conocimientos previos de la especie a las exigencias de un protocolo de fecundación y desarrollo larvario como paso previo a la cría intensiva de *Nereis diversicolor*.

## 6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Aunque la metodología empleada para la obtención de las larvas ha sufrido ligeras modificaciones desde el inicio de las primeras experiencias en octubre del 2005, en general se ha mantenido constante, siendo muy similar a la que uso Dales (1950) en sus experiencias. Esto no ha ocurrido sin embargo, con las experiencias realizadas con las larvas una vez obtenidas, que han variado enormemente durante la duración del proyecto en función del objetivo de la experiencia realizada.

El capítulo de material y métodos se divide en dos partes:



- La primera parte incluye una metodología general común a todas las fecundaciones. Este apartado incluye a todas las experiencias realizadas, con pequeñas variaciones durante la duración del proyecto, encaminadas a su perfeccionamiento.
- El segundo apartado describe la metodología empleada en cada experiencia. Este apartado aborda la metodología de cada experiencia por separado, al ser esta específica en cada caso.

### 6.2.1. METODOLOGÍA GENERAL

Para la realización de la fecundación se procedía a la extracción de los gametos sobre placas Petri con agua de mar, mediante suaves presiones sobre los reproductores o pequeñas punciones cuando la manipulación del gusano no era suficiente para producir la liberación de los gametos. El agua de mar empleada en las primeras experiencias tan solo era filtrada previamente a su utilización durante su recolección, en las instalaciones de la planta de cultivos del Instituto Español de Oceanografía, en el bocal (Santander).

En las últimas experiencias esta metodología se reforzó con la esterilización previa del agua de mar empleada en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Se utilizó agua de mar diluida al 50% con agua destilada, con una salinidad aproximada de 17 partes por mil. La temperatura y la salinidad a la que se realizaron los ensayos varió entre los 16 y los 22 °C y entre las 0 y las 35 partes por mil, en función de las experiencias realizadas. Una vez extraídos los gametos se procedía a la fecundación artificial de los mismos. Para ello, se extraían mediante pipetas Pasteur, 1 ml de agua de mar con espermatozoides y se añadía a las placas con óvulos, cuando era posible esta operación se repetía al menos tres veces para asegurar una concentración suficiente de espermatozoides para el número de óvulos presente.

Posteriormente, las placas se agitaban suavemente para asegurar la correcta mezcla de los gametos y después se dejaba reposar durante una hora para dar tiempo a que se produjese la fecundación de los óvulos. Tras esto, se procedía a la retirada del espermatozoides sobrante y de los restos de gusanos de las placas mediante el lavado de los óvulos en probetas de 100 ml. El lavado de los óvulos fue otra parte de la metodología que se varió en las últimas experiencias, reforzándose al percibir que en gran número de ocasiones las placas *Petri* mostraban elevadas concentraciones de protozoos, perjudiciales para el desarrollo de los óvulos.



Para ello se añadía el líquido de las placas a probetas con 100 ml de agua de mar esterilizada, a la misma salinidad que la empleada en las placas. Después se dejaba que los óvulos se hundiesen y por último se retiraban aproximadamente 90 ml del agua de mar superior de las probetas, dejando solo la base de la misma con los óvulos ya limpios.

Por último, se procedía al trasvase desde la probeta a una placa Petri limpia donde se añadía cuando era necesario unos 10 ml más de agua de mar limpia. La placa Petri se transportaba al sistema refrigerador para el cultivo de los óvulos fecundados, o se depositaba en bandejas fuera del mismo en función de la temperatura que quisiera ensayarse.

## 6.2.2. METODOLOGÍA ESPECÍFICA

### **6.2.2.1. Inicio de las fertilizaciones. 1ª serie de reproductores (17 de octubre-23 de diciembre del 2005).**

El 17 de Octubre del 2005 se realizó el primer intento de fecundación artificial de *Nereis diversicolor* en esta segunda parte del proyecto. Las fertilizaciones se realizaron mediante el empleo de 40 gusanos adquiridos previamente a mariscadores profesionales y cultivados en condiciones controladas hasta el inicio de la maduración, momento en el cual fueron seleccionados para la realización de las experiencias de fecundación. El inicio de las experiencias siempre estuvo condicionado por la presencia de individuos maduros, ya que debido al carácter seméiparo de *Nereis diversicolor* los reproductores morían tras la maduración, siendo posible realizar tan solo de una a tres experiencias con cada stock de reproductores. Este stock de reproductores fue utilizado hasta en tres ocasiones para la realización de experimentos de fecundación, con resultados diversos como se refleja en el siguiente capítulo de esta memoria. De esta primera serie de experiencias se obtuvieron tan sólo dos larvas que fueron utilizadas para comprobar los requerimientos de las mismas durante su ciclo hasta llegar al tamaño de juvenil al alcanzar el 20º segmento setífero (Dales, 1950). Las larvas fueron mantenidas a temperatura ambiente, la cual osciló durante la duración de la experiencia entre los 19 y los 24 °C, con una temperatura media de 22 °C. La salinidad se mantuvo entorno a las 17 partes por mil, si bien en algunas ocasiones pudo oscilar debido a procesos de evaporación incrementándose ligeramente. El agua se cambiaba un vez cada tres días en inicio y después una vez por semana.



### **6.2.2.2. 2ª serie de reproductores (12-2005/3-2006)**

El 23 de Diciembre del 2005 se realizó la segunda serie de experiencias de fecundación con individuos procedentes de los experimentos de engorde, que habían sufrido una maduración prematura, probablemente debido a un incremento en la temperatura. Estos gusanos procedían de puestas naturales producidas en el interior de los acuarios de engorde y se trataban por lo tanto de gusanos de segunda generación, que han desarrollado todo su ciclo biológico en las instalaciones del proyecto. Estos individuos, eran por su tamaño y peso (hasta tres veces menor que el de gusano adultos) juveniles por lo que existían serias dudas sobre la viabilidad del experimento. Aún así se llevó a cabo. Aunque no se obtuvo éxito en las fecundaciones artificiales, se consiguió el objetivo final de conseguir larvas de *Nereis diversicolor* mediante fecundación natural en el stock de reproductores. Desde la aparición de larvas en los sistemas de engorde, el agua de los reproductores se chequeaba periódicamente en busca de larvas como resultado de fecundaciones naturales.

Durante uno de estos chequeos periódicos se detectó la presencia de larvas y se procedió a iniciar una experiencia de crecimiento larvario. Para ello, se dividió el heterogéneo conjunto de larvas en dos grupos en función de su tamaño y cada uno de los dos grupos en 4 placas Petri, sometidas a cuatro tratamientos distintos, distribuidos de la siguiente forma:

1. Tratamiento 1 : Sin sustrato/sin comida
2. Tratamiento 2 : Sin sustrato/con comida
3. Tratamiento 3 : Con sustrato/con comida
4. Tratamiento 4 : Con sustrato/sin comida

El análisis de los distintos resultados se realizó mediante el programa estadístico SPSS 14.0 para Windows. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para las variables dependientes crecimiento y mortalidad, con el objeto de testar su normalidad, cumpliéndose en ambos casos. Además, todas las pruebas de Anova se acompañaron de pruebas de Levene con el objeto de testar la homogeneidad de las varianzas cumpliéndose en todos los casos los requisitos necesarios para los análisis utilizados.

La variable crecimiento se calculó acorde a la siguiente fórmula:

$$C = (X_f - X_i) / n$$

donde:

C= Crecimiento	X <sub>i</sub> = Tamaño inicial
N= N° de días	X <sub>f</sub> = Tamaño final



La mortalidad se cálculo como el número de gusanos encontrados muertos o desaparecidos en cada muestreo.

El estudio del efecto de las distintas variables independientes analizadas sobre la variable dependiente se estudio mediante un procedimiento de modelo lineal general. El análisis de la varianza se realizó con tres fuentes de variación:

1. Sustrato. Dos niveles: Presencia / Ausencia
2. Comida. Dos niveles: Presencia / Ausencia
3. Grupo. Dos niveles: Larvas grandes / Larvas pequeñas

Además se realizó un análisis de comparación de medias mediante una Anova para la variable independiente tratamiento y la variable dependiente crecimiento. La variable tratamiento tenía 4 niveles obtenidos como combinación de las variables sustrato y comida:

1. Tratamiento 1 Sin Sustrato / Sin comida
2. Tratamiento 2 Sin Sustrato / Con comida
3. Tratamiento 3 Con Sustrato / Sin comida
4. Tratamiento 4 Con Sustrato / Con comida

Dentro de este análisis se realizaron pruebas de comparaciones múltiples Tukey, y Tukey-b.

#### **6.2.2.4. 4ª serie de reproductores (5-12-2006)**

Para esta última serie de fertilizaciones artificiales se emplearon gusanos provenientes de dos stocks sometidos a condiciones opuestas de fotoperiodo y temperatura. La metodología respecto a la obtención, control y procedencia de los reproductores se detalla de una manera más completa en el capítulo 5.

Una vez los reproductores eran seleccionados se les extraían los gametos y se realizaban las fertilizaciones, tal y como se describe en la metodología general.

El 5-12-2006 se consiguió fertilizar con éxito los óvulos de dos hembras con esperma de un macho maduro. La principal novedad respecto a otras fertilizaciones fue el gran volumen de larvas obtenido, que se estimó inicialmente en unas dos mil quinientas larvas, el mayor obtenido en este proyecto. Además, todo el proceso de fertilización y desarrollo larvario se desarrollo por duplicado, en dos temperaturas diferentes: **Calor (14-18°C)** y **Frio (11,5-13,5°C)**.



Con las larvas obtenidas se desarrolló un experimento similar al desarrollado en la segunda serie de fertilizaciones descrita en esta memoria aunque con los tratamientos desarrollados por duplicado a las dos temperaturas descritas. Además, se mantuvieron dos stocks de reproductores, que a su vez también se mantuvieron en condiciones de frío y calor.

### 6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para facilitar la correcta comprensión de los resultados se procederá a presentar cada una de las diferentes series de experiencias realizadas en los dos años que ha durado el proyecto, de manera separada y en orden cronológico.

#### 6.3.1. Inicio de las Fertilizaciones. 1ª serie de reproductores (17 de Octubre - 23 de Diciembre del 2005)

Como se ha explicado en el apartado de material y métodos, de los 40 gusanos seleccionados por sus caracteres externos de maduración tan solo 3 eran machos. Además de esta escasez, los machos, a diferencia de las hembras, no mostraban gametos fértiles encontrándose los tres en el primer estadio de maduración, es decir con el esperma almacenado en las placas espermáticas. Debido al estado inmaduro de los machos, como por otro lado era previsible no se consiguieron fertilizaciones. Además, debido a los daños causados durante la extracción dos de los tres machos murieron.

Diez días después, el macho superviviente mostraba un esperma más maduro, con la gónada en la fase II, es decir los espermatozoides agrupados en tétradas y presencia de espermatozoides fértiles. Por esta razón, el 27 de Octubre de 2005 se procedió a realizar un segundo intento de fecundación. Los resultados de la misma pueden observarse en la **Tabla 6.4.**

Aunque los resultados en cuanto a porcentaje fueron escasos, las larvas segmentadas obtenidas en esta experiencia crecieron hasta alcanzar la fase adulta, siendo la primera vez que se conseguía cerrar el ciclo de *Nereis diversicolor* en este proyecto.



Tabla 6.4. Resultados de la fertilización del 25 de octubre del 2005.

	<b>Nº óvulos utilizados</b>	<b>Diámetro medio por óvulo</b>	<b>% de óvulos fecundados</b>	<b>% de larva trocofora</b>	<b>% de óvulos fase Larva segmentada</b>
<b>Hembra 1</b>	25	166,5 $\mu\text{m}$	16%	0%	0%
<b>Hembra 2</b>	80	186,5 $\mu\text{m}$	37,5%	0%	0%
<b>Hembra 3</b>	46	200 $\mu\text{m}$	58,70%	13,04%	4,34%
<b>Hembra 4</b>	65	166,5 $\mu\text{m}$	0%	0%	0%

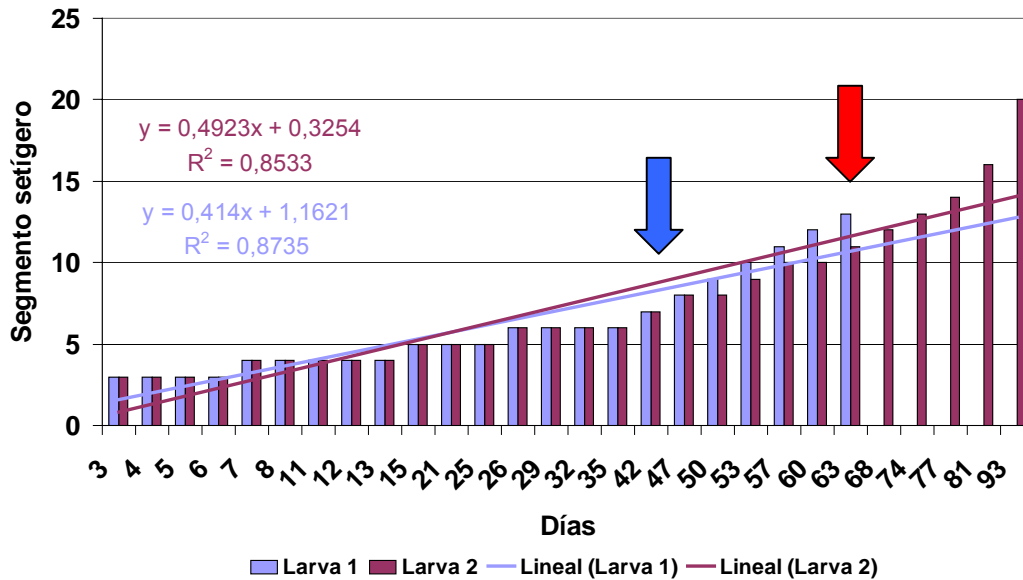
La **Figura 6.1** muestra las velocidades de crecimiento obtenidas para estas dos primeras larvas. A pesar de que el reducido número de larvas supone un inconveniente muy importante a la hora de establecer velocidades de crecimiento, esta primera experiencia con éxito permitió extraer valiosas conclusiones. Así, por ejemplo, se obtuvieron los primeros indicios del prematuro comportamiento alimenticio de las larvas de *Nereis diversicolor*, cuatro segmentos antes de los descrito por Dales (1950). Además, se comprobó la eficacia del pienso *Solea* pulverizado en la alimentación de las larvas. Por último, permitió comprobar que el objetivo de cerrar el ciclo de este anélido poliqueto podía ser fácilmente abarcable dentro del presente proyecto. La velocidad media de crecimiento de las dos larvas en los 63 días que se mantuvieron vivas las dos fue de 0,21 seg. /día la larva más rápida y 0,17 seg. /día la más lenta.


El tercer experimento fue realizado el 31 de Octubre, cuatro días después de haberse llevado a cabo el anterior. De las cuatro hembras que fueron usadas en el anterior experimento, una apareció muerta en el acuario donde era mantenida, por lo que solo pudieron usarse tres. Probablemente se trató de la hembra 3, responsable del éxito en el experimento 2 que tras llegar al grado máximo de maduración y realizar la puesta, murió. Este hecho fue confirmado por la presencia de numerosos huevos fecundados en el acuario






Figura 6.1. Crecimiento de las dos larvas obtenidas en la fertilización de octubre.



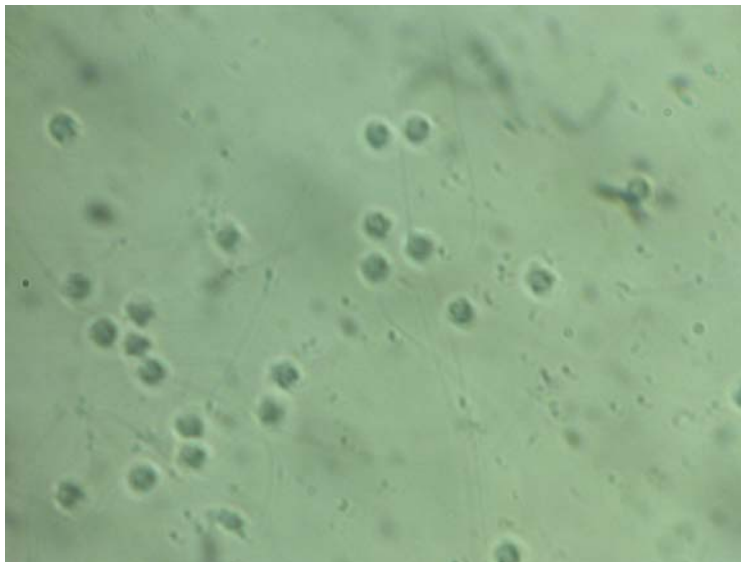
 En este segmento setígero se observó los primeros comportamientos de alimentación en las larvas, que evaginaban su probóscide sobre los granos de arena como si intentasen ramonear sobre ellos. Tras la observación de este comportamiento se procedió a la adicción de pienso Solea. Nótese el considerable incremento observado en la velocidad de crecimiento.

 Entre el día 63 y el 68 la larva más grande desapareció de la placa Petri donde se había estado desarrollando. Se desconocen las causas, si bien es posible que muriese y sirviese de alimento a su hermana. La adelfofagia ha sido descrita en *Nereis diversicolor* (Martí et al, 1997). Otra posibilidad es que consiguiese escapar de la placa petri donde se encontraba, aunque esta posibilidad es poco probable.

En este tercer experimento el macho tenía un color verdoso característico de los machos maduros. Soltó el esperma sin necesidad de realizar punción alguna. Tras recoger una muestra del mismo y observarla al microscopio se comprobó que se trataba de un macho totalmente maduro. (Figura 6.2.)



Figura 6.2. Fotografía sacada al microscopio con un ocular de 100X aumentos. En la foto pueden observarse varios espermatozoides maduros de *Nereis diversicolor*.



Los resultados obtenidos en este tercer experimento se muestran en la **Tabla 6.5**. Por desgracia, la elevada presencia de larvas trocóforas que presagiaban un éxito notable en este tercer experimento no continuaron con su normal desarrollo debido a un error en el mantenimiento de las condiciones de cultivo, que incremento la desecación de la placa Petri provocando su muerte.

Tabla 6.5. Resultados del experimento realizado el 31 de Octubre.

	<b>Nº óvulos utilizados</b>	<b>Diámetro medio por óvulo</b>	<b>% de óvulos fecundados</b>	<b>% Larva trocofora</b>	<b>% Larva segmentada</b>
<b>HEMBRA 1</b>	45	186.5 $\mu\text{m}$	<b>0%</b>	0%	0%
<b>HEMBRA 2</b>	72	186.5 $\mu\text{m}$	80%	16,67%	Error impidió continuar. *
<b>HEMBRA 3</b>	56	166.5 $\mu\text{m}$	0%	0%	0%



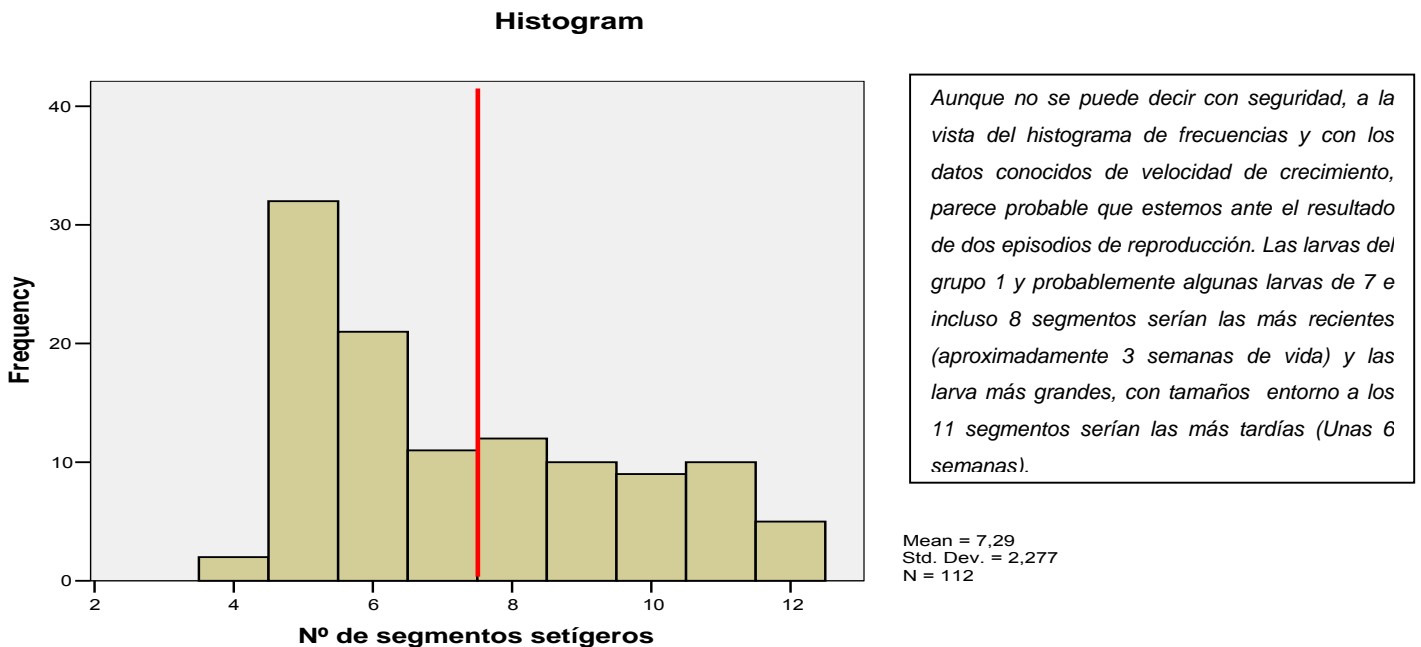
### 6.3.2. 2ª serie de reproductores (12-2005/3-2006)

El stock de esta segunda experiencia proveniente de gusanos de segunda generación, es decir, que han desarrollado todo su ciclo biológico dentro de las instalaciones de cultivo se caracterizó por la elevada presencia de machos, muy superior a la encontrada en la bibliografía. Pese a la elevada presencia de machos y su elevado grado de madurez el estado de los reproductores no fue el adecuado, puesto que inversamente a lo ocurrido en la primera serie de experiencias, las hembras no mostraban un estado maduro, lo que provocó el fracaso en las fecundaciones.

Como se ha explicado en Material y Métodos, pese al fracaso en la fecundación artificial se consiguieron nuevos ejemplares de *Nereis diversicolor* mediante fecundaciones naturales. La distribución de tamaños obtenida, se observa en la **Fig. 6.3**, así como los dos grupos de larvas seleccionados.

-

Figura 6.3. Distribución de tamaños de las larvas obtenidas por fecundación natural





Las diferencias en los diversos tratamientos testados, así como entre las larvas grandes y las larvas pequeñas fueron analizadas mediante un análisis de la varianza con tres fuentes de variación, sustrato, alimento y grupo, cada uno de los cuales tenía dos niveles. La **Tabla 6.7.** muestra el resultado de este análisis, mientras que la **Tabla 6.6.** muestra algunos estadísticos descriptivos para facilitar la interpretación de los resultados.

Tabla 6.6. Estadísticos descriptivos.

Variable dependiente: crecimiento

Sustrato	comida	Grupo	Media	Desv. típ.	N	
Sin sustrato	Sin comida	larvas pequeñas	,2892	,29352	4	
		larvas grandes	,1274	,13441	3	
		Total	,2199	,23787	7	
	Con comida	larvas pequeñas	,3547	,33925	4	
		larvas grandes	,9745	,28904	3	
		Total	,6204	,44175	7	
	Total	larvas pequeñas	,3220	,29576	8	
		larvas grandes	,5510	,50591	6	
		Total	,4201	,39921	14	
	Con sustrato	Sin comida	larvas pequeñas	,4944	,20688	3
			larvas grandes	,4468	,36698	3
			Total	,4706	,26771	6
Con comida		larvas pequeñas	1,2795	,89638	4	
		larvas grandes	,6675	,33143	3	
		Total	1,0172	,73851	7	
Total		larvas pequeñas	,9431	,76949	7	
		larvas grandes	,5571	,33528	6	
		Total	,7649	,61886	13	
Total		Sin comida	larvas pequeñas	,3772	,26339	7
			larvas grandes	,2871	,30283	6
			Total	,3356	,27402	13
	Con comida	larvas pequeñas	,8171	,79876	8	
		larvas grandes	,8210	,32503	6	
		Total	,8188	,61983	14	
	Total	larvas pequeñas	,6118	,63274	15	
		larvas grandes	,5541	,40920	12	
		Total	,5861	,53598	27	



Tabla 6.7. Prueba de los efectos Inter-sujetos.

Variable dependiente: crecimiento

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	3,677 <sup>a</sup>	7	,525	2,632	,044
Intersección	8,886	1	8,886	44,525	,000
Sustrato	,540	1	,540	2,706	,116
comida	1,523	1	1,523	7,630	,012
Grupo	,017	1	,017	,084	,775
Sustrato * comida	,004	1	,004	,018	,895
Sustrato * Grupo	,517	1	,517	2,590	,124
comida * Grupo	,020	1	,020	,098	,758
Sustrato * comida * Grupo	,750	1	,750	3,757	,068
Error	3,792	19	,200		
Total	16,745	27			
Total corregida	7,469	26			

a. R cuadrado = ,492 (R cuadrado corregida = ,305)

El máximo crecimiento correspondió a las larvas pequeñas con sustrato y con comida (1,279seg/día) seguidas de las larvas grandes sin sustrato pero con comida (0,974 seg/día). El crecimiento menor fue como era de esperar, el de las larvas sin sustrato ni comida para ambos tamaños de larvas. Las larvas pequeñas crecieron más que las grandes en todos los tratamientos, excepto para el tratamiento 2 (con sustrato pero sin comida) donde crecieron más las larvas grandes que las pequeñas. En este tratamiento, las larvas grandes mostraron un crecimiento excepcionalmente alto, superior incluso al de las larvas con sustrato y comida, sin que hasta el momento se conozca la causa exacta. El crecimiento medio de las larvas grandes fue de 0,552 seg/día, mientras que en el caso de las larvas pequeñas fue de 0,644 seg/día.

Como se observa en la tabla de los efectos inter-sujetos (**Tabla 6.7.**) la única variable independiente que influye de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento de las larvas es la comida. Ni la variable sustrato ni la variable grupo, tienen efecto sobre la variable dependiente crecimiento, siendo las diferencias entre las larvas grandes y pequeñas o entre las larvas con y sin sustrato no significativas. Además, la interacción entre las distintas variables independientes tampoco resultó significativa.

Para poder comprobar de una manera más clara las diferencias entre los distintos tratamientos se realizó un análisis de la varianza ANOVA, con el tratamiento como variable independiente y el crecimiento como variable dependiente.



La variable independiente tratamiento tiene 4 niveles de variación como ya se describió en el capítulo de material y métodos. Los resultados del análisis se muestran en las **Tabla 6.8.** y **6.9.**

Tabla 6.8. Resultados del Anova.

crecimiento					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,328	3	,776	3,472	,033
Intra-grupos	5,141	23	,224		
Total	7,469	26			

Tabla 6.9. Comparaciones múltiples

Variable dependiente: crecimiento

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
HSD de Tukey	1	2	-,40050	,25271	,406
		3	-,79734*	,25271	,021
		4	-,25077	,26303	,777
	2	1	,40050	,25271	,406
		3	-,39684	,25271	,414
		4	,14974	,26303	,940
	3	1	,79734*	,25271	,021
		2	,39684	,25271	,414
		4	,54657	,26303	,190
	4	1	,25077	,26303	,777
		2	-,14974	,26303	,940
		3	-,54657	,26303	,190

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

La **Tabla 6.8.** muestra que existen diferencias significativas en función de la variable tratamiento ( $p < 0,05$ ). Además, la **Tabla 6.9** de comparaciones múltiples nos muestra que las principales diferencias se dan entre los tratamientos 1 y 3, como era de esperar ya que se trata de los tratamientos sin comida y sin sustrato (tratamiento 1) y con comida con sustrato (tratamiento 3). Los tratamientos 2 y 4 muestran posiciones intermedias entre ambos extremos y no muestran diferencias significativas con ninguno de estos dos tratamientos.

Es especialmente llamativo el efecto positivo que sobre el crecimiento tiene la presencia de sustrato cuando no hay alimento. Si observamos la **Tabla 6.6.** de los estadísticos descriptivos se observa que las larvas cultivadas en presencia de sustrato mantienen crecimientos considerables aún en ausencia de alimento llegando a superar en el caso de las larvas



pequeñas a las larvas cultivadas con comida pero sin sustrato. Probablemente, la presencia de materia orgánica añadida junto con los granos de arena y la capacidad de las larvas de alimentarse ramoneando los granos de arena las permitían disminuir de manera considerable el estrés debido a la falta de pienso añadido directamente a las placas. El comportamiento ramoneador de las larvas de *Nereis diversicolor* ha sido observado en numerosas ocasiones a la lupa y consiste en la evaginación de la probóscide hacia los granos de arena, tratando de arrancar la película vegetal que recubre a los mismos. Aunque se desconoce la importancia real de este aporte nutritivo en el desarrollo de las larvas, las diferencias observadas respecto a las cultivadas sin sustrato hace pensar que pueda tener una importancia relativa, incluso para las larvas más grandes.

La mortalidad fue añadida al modelo como covariable, sin que su efecto sobre el crecimiento fuese importante, no influyendo de manera significativa en el modelo.

El menor crecimiento de las larvas en el caso del tratamiento 1, que no incluía ni alimento ni sustrato se aprecia de manera clara en las **Fig. 6.4.** y **6.6.**, con una única excepción notable a esta tendencia. Durante la primera semana de vida en las larvas más pequeñas, el crecimiento de las larvas sometidas a este tratamiento, fue igual o incluso superior al de las larvas de los otros tratamientos. Tras esto, el crecimiento medio de las larvas del tratamiento 1 desciende bruscamente, pasando de ser uno de los tratamientos que registra los mayores crecimientos al menor de todos, una semana después. Esta excepción solo fue observada en las larvas pequeñas no registrándose en las larvas grandes, donde el tratamiento 1 siempre registro los valores más bajos llegando a tener incluso valores negativos (Ver **Fig. 6.6.**)

Durante los primeros días de la experiencia, las larvas de tamaño pequeño se desarrollaron desde una media de algo más de 5 segmentos hasta los 8. La explicación más probable para este rápido crecimiento inicial así como para el declive que le sigue es precisamente su pequeño tamaño. Es muy probable que en el entorno de los segmentos 6-7 la larva de *Nereis diversicolor* agote el vítelo y comience a alimentarse de comida ingerida del exterior. Durante la primera semana las larvas se alimentaron de su propio vítelo por lo que la ausencia de alimento en el exterior no les afectó, dando como resultado un crecimiento similar o incluso superior al de los otros tratamientos durante los primeros días. Tras esto, la ausencia de alimento para sustituir el vítelo ya consumido limitó en gran medida el crecimiento de las larvas. Estos resultados, que confirman lo observado en el crecimiento de las dos primeras larvas obtenidas en este proyecto (Ver **Fig. 6.1.**) contradice lo observado por Dales (1950) quién en un completo trabajo sobre el ciclo biológico de *Nereis diversicolor* no observó este comportamiento hasta por lo menos el décimo segmento setífero.



Figura 6.4. Crecimiento larvario expresado como seg/día en cada uno de los 4 tratamientos ensayados para las larvas pequeñas.

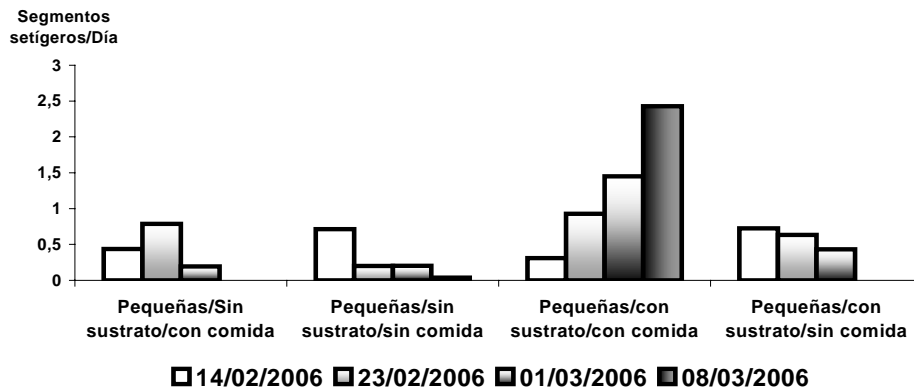


Figura 6.5. Supervivencia de las larvas pequeñas para los 4 tratamientos.

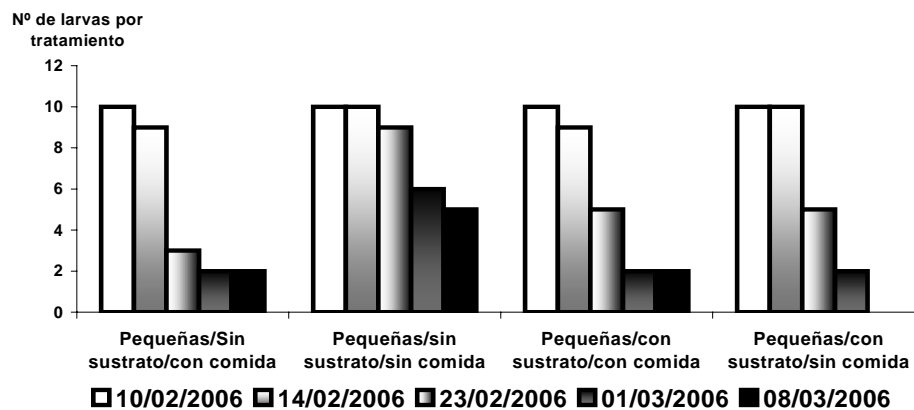


Figura 6.6. Crecimiento larvario expresado como seg/día en cada uno de los 4 tratamientos ensayados para las larvas grandes.

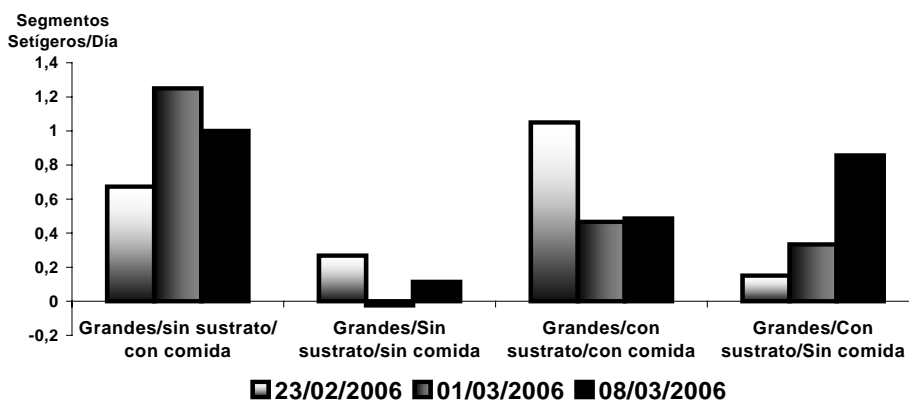
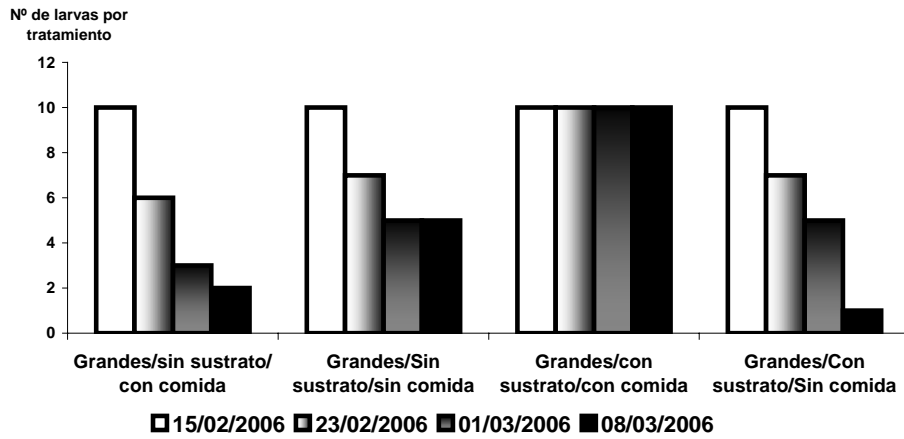






Figura 6.7. Supervivencia de las larvas grandes para los 4 tratamientos.



No obstante, no todos los resultados son tan claros. La falta de alimento disponible en el tratamiento 1, responsable del bajo crecimiento observado, debería haber provocado además elevadas mortalidades, hecho que no sólo no se observa sino que ocurre de manera contraria en el caso de las larvas pequeñas, siendo precisamente las larvas sin sustrato ni comida las que menor mortalidad mostraron. Para ver si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto a la mortalidad se realizó un análisis de la varianza, cuya variable dependiente fue la mortalidad observada y los factores los mismos que en el análisis anterior, (grupo, sustrato y comida). Los resultados se muestran en las **Tablas 6.10** y **6.11**.



Tabla 6.10. Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: Mortalidad

Sustrato	comida	Grupo	Media	Desv. típ.	N
Sin sustrato	Sin comida	larvas pequeñas	1,25	1,258	4
		larvas grandes	1,67	1,528	3
		Total	1,43	1,272	7
	Con comida	larvas pequeñas	2,00	2,708	4
		larvas grandes	2,67	1,528	3
		Total	2,29	2,138	7
	Total	larvas pequeñas	1,63	1,996	8
		larvas grandes	2,17	1,472	6
		Total	1,86	1,748	14
Con sustrato	Sin comida	larvas pequeñas	3,33	2,887	3
		larvas grandes	3,00	1,000	3
		Total	3,17	1,941	6
	Con comida	larvas pequeñas	2,00	1,826	4
		larvas grandes	,00	,000	3
		Total	1,14	1,676	7
	Total	larvas pequeñas	2,57	2,225	7
		larvas grandes	1,50	1,761	6
		Total	2,08	2,019	13
Total	Sin comida	larvas pequeñas	2,14	2,193	7
		larvas grandes	2,33	1,366	6
		Total	2,23	1,787	13
	Con comida	larvas pequeñas	2,00	2,138	8
		larvas grandes	1,33	1,751	6
		Total	1,71	1,939	14
	Total	larvas pequeñas	2,07	2,086	15
		larvas grandes	1,83	1,586	12
		Total	1,96	1,850	27

La mortalidad máxima observada se produjo tanto en el caso de las larvas grandes como en el caso de las larvas pequeñas en el tratamiento sin comida pero con sustrato. En las larvas pequeñas la mortalidad fue total, no llegando ninguna larva viva al final del experimento.

La mortalidad menor se produjo en el tratamiento de larvas sin sustrato y sin comida para las larvas pequeñas y en el tratamiento de larvas con sustrato y con comida para las larvas grandes.

Como puede observarse en la tabla de los efectos ínter-sujetos (**Tabla 6.11**), ni la comida ni el grupo ni el sustrato influyen de manera significativa en la mortalidad. No obstante, la interacción entre el sustrato y la comida sí resultó significativa. Esta interacción significativa probablemente se deba al hecho de que en el caso de las larvas grandes la conjunción de comida y sustrato redujo la mortalidad a cero.



Tabla 6.11 Prueba de los efectos intersujetos.

Variable dependiente: Mortalidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	24,213 <sup>a</sup>	7	3,459	1,015	,452
Intersección	104,830	1	104,830	30,761	,000
Sustrato	,233	1	,233	,068	,797
comida	2,761	1	2,761	,810	,379
Grupo	,647	1	,647	,190	,668
Sustrato * comida	15,313	1	15,313	4,493	,047
Sustrato * Grupo	4,830	1	4,830	1,417	,248
comida * Grupo	,830	1	,830	,244	,627
Sustrato * comida * Grupo	1,520	1	1,520	,446	,512
Error	64,750	19	3,408		
Total	193,000	27			
Total corregida	88,963	26			

a. R cuadrado = ,272 (R cuadrado corregida = ,004)

En las **Figura 6.5.** y **6.7.** podemos comprobar que efectivamente la distribución de la mortalidad no muestra patrones claros, a excepción de las larvas grandes con sustrato y comida. Estas larvas no mostraron ni un solo caso de mortalidad durante la duración de la experiencia. Aunque es evidente que no se controla gran parte de las causas de la mortalidad parece claro que tanto la adicción de sustrato como de alimento es necesario para su correcto desarrollo.

Especial mención merecen los comportamientos de canibalismo, que ya han sido descritos para esta especie por Marty *et al* (1997) y que puede haber producido elevadas mortalidades especialmente en el caso de las larvas pequeñas.

Tanto si las mortalidades fueron provocadas por comportamientos de canibalismo entre larvas como sí simplemente lo que se produjo fue un comportamiento carroñero sobre larvas que ya estaban muertas esto debería producir un incremento en el crecimiento. Para comprobar esta posibilidad se realizó un análisis de regresión para todas las larvas con el crecimiento como variable dependiente y la mortalidad como variable independiente. Los resultados se muestran en la **Tabla 6.12.**



Tabla 6.12. Resultado del Anova

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	,000	1	,000	,000	,985 <sup>a</sup>
	Residual	7,469	25	,299		
	Total	7,469	26			

a. Variables predictoras: (Constante), Mortalidad

b. Variable dependiente: crecimiento

Como puede observarse en la **Tabla 6.12** no existe correlación significativa ( $p > 0,05$ ) entre la mortalidad y el crecimiento, lo que en principio descarta el canibalismo como principal causa de mortalidad. Aunque existen ciertos tratamientos donde la mortalidad elevada ha venido acompañada de crecimientos muy elevados, como en el caso de las larvas pequeñas con comida y con sustrato, el análisis de los datos separando estos casos concretos tampoco muestra correlación entre ambas variables. Aunque esto no descarta que se hayan podido producir episodios puntuales, parece poco probable que sea una práctica generalizada con efectos sobre el crecimiento.

### 6.3.3. 3ª Serie de reproductores (5-2006/7-2006)

En este ensayo las primeras larvas aparecieron tan solo tres días después de iniciada la fecundación, con un tamaño único de tres segmentos setígeros. Tras la uniformidad inicial, las larvas adquirieron velocidades de crecimiento muy diferentes y dos semanas después mostraban una gran diversidad de tamaños. Durante las seis semanas que duro la experiencia se realizaron 3 muestreos, en los que se estimó el n° de larvas presentes en el recipiente y el tamaño de 50 larvas elegidas al azar. El resultado de estos muestreos se refleja en la **Figura 6.8**.



Seg. Setíferos

Nº de larvas

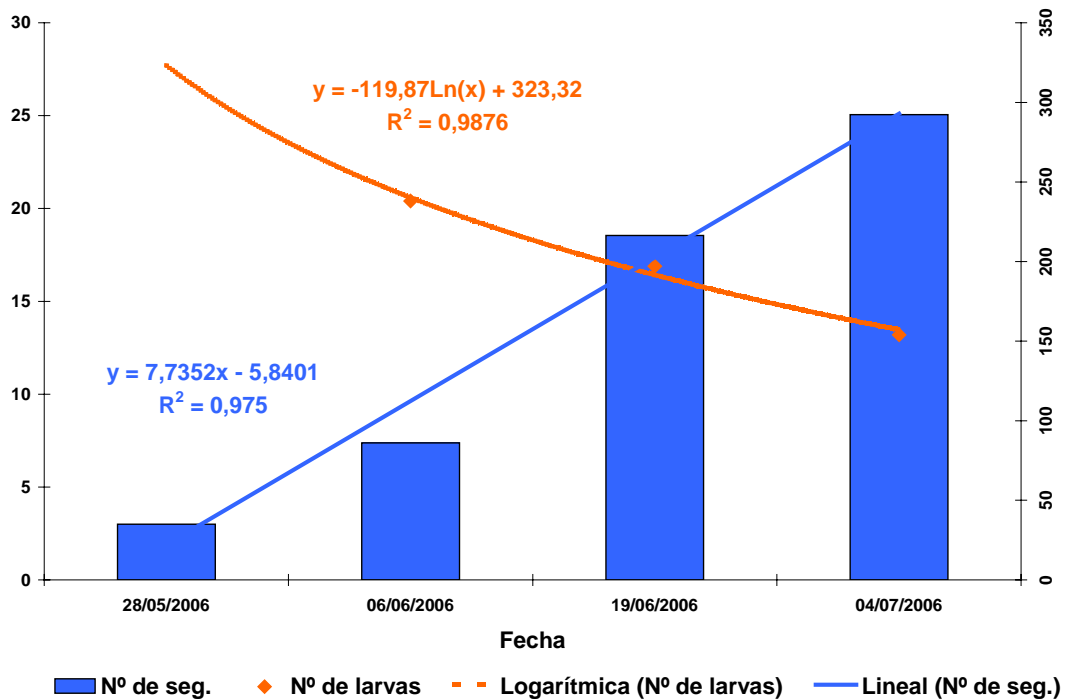


Figura 6.8. Evolución de las larvas 25-5-2006.

La velocidad de crecimiento de las larvas respondió a una ecuación de regresión lineal  $y=7,7325x-5,8401$  con una R cuadrado de 0,975. Mientras que la mortalidad mostró una evolución logarítmica como puede observarse en la **Figura 6.8**.

La velocidad media de crecimiento fue de 0,66 seg/día, una velocidad muy similar a la observada en el experimento anterior para todas las larvas pequeñas, si bien bastante inferior a los crecimientos máximos observados en dicha experiencia. La supervivencia total observada fue de aproximadamente un 50 %, lo cual es una tasa de bastante aceptable si se tiene en cuenta que en el experimento anterior hubo mortalidades muy elevadas, incluso del 100%. Probablemente, el menor estrés debido a la reducción en la periodicidad de los muestreos así como las condiciones favorables de alimento y sustrato y el mayor volumen de los recipientes utilizados, contribuyeron de manera decisiva al óptimo resultado alcanzado.



Las larvas, que tras el último muestreo habían alcanzado en su mayor parte el tamaño de juveniles (20 segmentos setíferos) fueron traspasadas a la planta de engorde para la continuación de las experiencias en unas condiciones más adecuadas para esta parte del ciclo biológico.

#### 6.3.4. 4ª serie de reproductores (5-12-006)

Las fertilizaciones se realizaron a dos temperaturas diferentes y con óvulos de dos hembras con diámetros diferentes. El diámetro de los óvulos empleados fue muy superior al utilizado normalmente, en ambas hembras, si bien el de la hembra número 1 era especialmente alto. El diámetro de los óvulos así como el éxito en la reproducción y las distintas velocidades de desarrollo larvario se muestran en la **Tabla 6.12**.

Como se observa en esta tabla, seis días después de realizadas las fertilizaciones ya se apreciaban las primeras diferencias entre las distintas temperaturas ensayadas, así como entre las dos hembras utilizadas.

La hembra 1, liberó unos óvulos con diámetros comprendidos entre los 260 y los 300  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Estos tamaños son los más elevados empleados nunca en una fertilización tanto en este proyecto como en la bibliografía (ver **Tabla 6.1**). Los resultados para esta hembra son muy positivos en ambas temperaturas, si bien en el caso del ensayo con calor, los porcentajes de éxito son menores que en el caso de la hembra 2.

Las velocidades de desarrollo de los óvulos fertilizados fueron muy diferentes en ambas temperaturas. En el caso de los desarrollados a temperaturas altas, prácticamente el 100% había alcanzado el estadio de larva segmentada y tan solo una de las más de 60 larvas observadas mostraba aún un estadio de larva Trocófora. Sin embargo, los óvulos desarrollados en condiciones de temperaturas bajas no alcanzaron el estadio de larva segmentada hasta dos días después, mostrando el 100% de los mismos un estadio de larva Trocófora en el momento del muestreo.



Tabla 6.12. Resultados de la fertilización del 5-12-2006.

Nº de Hembra	Diámetro de los óvulos	Temperatura	Estado del óvulo seis días después de la fertilización	
HEMBRA 1	24% de 295/300 $\mu\text{m}$ 32% de 290/294 $\mu\text{m}$ 40% de 285/289 $\mu\text{m}$ 4% de 255/260 $\mu\text{m}$	CALOR	Ov. Muerto	70,67%
			Trocófora	1,33%
			Larva inmóvil	0
			Larva móvil	28%
		FRIO	Ov. Muerto	9,09%
			Trocófora	90,91%
			Larva inmóvil	0%
			Larva móvil	0%
HEMBRA 2	8% de 258/260 $\mu\text{m}$ 24% de 252/254 $\mu\text{m}$ 20% de 238/240 $\mu\text{m}$ 36% de 232/234 $\mu\text{m}$ 8% de 246/248 $\mu\text{m}$ 4% de 226/228 $\mu\text{m}$	CALOR	Ov. Muerto	24,56%
			Trocófora	0
			Larva inmóvil	1,76%
			Larva móvil	73,68
		FRIO	Ov. Muerto	100%
			Trocófora	0%
			Larva inmóvil	0%
			Larva móvil	0%

Ambas velocidades de desarrollo son inferiores a las observadas hasta el momento. En todas las experiencias previas el estadio de larva segmentada se había alcanzado tres días después de realizar la fertilización.

Las bajas temperaturas son probablemente las responsables de la lenta velocidad de desarrollo. Las temperaturas medias de experiencias anteriores, estuvieron comprendidas entre los 18 y los 22 °C, mientras que en esta ocasión las temperaturas más altas oscilaron entre los 14 y los 18 °C, 4 °C por debajo.

La hembra 2 mostró resultados contradictorios para ambas temperaturas, con resultados excelentes de fertilización en la temperatura alta (mas del 75 de éxito) y resultados muy negativos para las temperaturas bajas, en las que no prospero ninguno de los óvulos fertilizados.



Es difícil explicar con los datos de los que se dispone estas diferencias tan grandes en el éxito de la fertilización para las dos temperaturas ensayadas. Lo más probable es que las mortalidades observadas en la placa de frío se deban a variables no controlados en el ensayo, como una densidad de cultivo excesiva en la placa, elección de óvulos en mal estado, o problemas en la difusión del oxígeno por una mala colocación de la placa.

Una vez obtenidas las larvas se procedió a la realización de una experiencia de desarrollo larvario en condiciones diferentes de sustrato y alimento, tal y como se hizo en la experiencia de febrero del 2006, aunque con el doble de larvas por placa, 20 en vez de 10 y a dos temperaturas distintas. Se emplearon un total de 160 larvas extraídas del stock de calor. La temperatura más alta osciló entre los 14 y los 18 °C y la más baja entre los 12 y los 14 °C.

Para el análisis de los resultados se utilizó un análisis de la varianza mediante un proceso de modelo lineal general, con el crecimiento como variable dependiente y el sustrato, la comida y la temperatura como factores fijos con dos niveles de variación. La fecha, expresada como número de días desde iniciada la experiencia se introdujo como covariable. La **Tabla 6.13.** muestra el resultado del análisis y la **Tabla 6.14.** los estadísticos descriptivos más importantes.

Tabla 6.13. Prueba de los efectos Inter.-sujetos.

Dependent Variable: Crecimiento

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,507 <sup>a</sup>	8	,063	3,525	,003
Intercept	,498	1	,498	27,680	,000
Fecha	,458	1	,458	25,449	,000
Sustrato	,001	1	,001	,046	,831
temperatura	,047	1	,047	2,599	,114
Comida	,001	1	,001	,046	,831
Sustrato * temperatura	,000	1	,000	,025	,874
Sustrato * Comida	2,85E-005	1	2,85E-005	,002	,968
temperatura * Comida	,001	1	,001	,074	,787
Sustrato * temperatura * Comida	,000	1	,000	,010	,919
Error	,845	47	,018		
Total	1,392	56			
Corrected Total	1,352	55			

a. R Squared = ,375 (Adjusted R Squared = ,269)





Tabla 6.14 Estadísticos descriptivos.

Dependent Variable: Crecimiento

Sustrato	temperatura	Comida	Mean	Std. Deviation	N
si	calor	si	,010648	,1329325	6
		No	-,008565	,2065605	8
		Total	-,000331	,1728253	14
	frio	si	,065476	,1775234	7
		No	,058333	,1665277	7
		Total	,061905	,1654027	14
	Total	si	,040171	,1546918	13
		No	,022654	,1855046	15
		Total	,030787	,1689904	28
No	calor	si	-,011376	,1396325	7
		No	,003893	,1128225	7
		Total	-,003741	,1222144	14
	frio	si	,046958	,1725742	7
		No	,050000	,1771691	7
		Total	,048479	,1680332	14
	Total	si	,017791	,1538192	14
		No	,026946	,1446873	14
		Total	,022369	,1466059	28
Total	calor	si	-,001211	,1313093	13
		No	-,002751	,1637994	15
		Total	-,002036	,1468869	28
	frio	si	,056217	,1684725	14
		No	,054167	,1652423	14
		Total	,055192	,1637493	28
	Total	si	,028567	,1516721	27
		No	,024726	,1641045	29
		Total	,026578	,1568073	56

El crecimiento medio mayor se dio para las larvas desarrolladas en presencia de sustrato y comida (0,065 seg/día) a temperaturas bajas, mientras que el crecimiento menor se produjo en las larvas desarrolladas sin sustrato pero con alimento a temperaturas altas (-0,011 seg/día).

Estas larvas no solo no crecieron sino que desarrollaron un crecimiento medio negativo. En general, los crecimientos medios fueron anormalmente bajos, siendo muy inferiores a los alcanzados en experiencias similares, en los que se alcanzaron crecimientos de un segmento setígero por día. Es más, con los resultados de crecimiento medio de la **Tabla 6.13**, se puede afirmar que prácticamente no hubo crecimiento de las larvas en ninguna de las placas Petri durante los 35 días que duró la experiencia.

Además, la **Tabla 6.13** muestra que las diferencias entre los distintos tratamientos así como entre las distintas temperaturas no fueron significativos ( $P > 0,05$ ). La única variable que tuvo un efecto muy significativo sobre el crecimiento fue el tiempo ( $p < 0,01$ ).



Las curvas de crecimiento de los distintos tratamientos a las dos temperaturas ensayadas se muestran en las **Figura 6.9** y **6.10**. Como puede observarse en estas dos figuras, los cuatro tratamientos empleados apenas muestran diferencias para ninguna de las dos temperaturas ensayadas, mostrando un crecimiento más o menos rápido que se detiene en ambos casos en torno al 5º segmento.

Fig.6.9. Crecimiento larvario de los distintos tratamientos a temperaturas altas (14-18°C.)

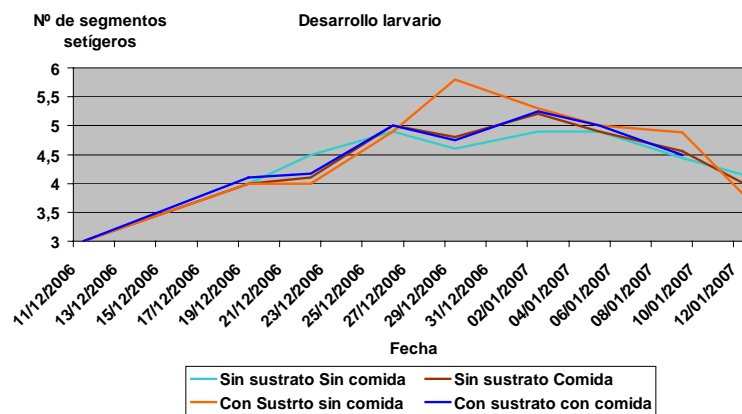
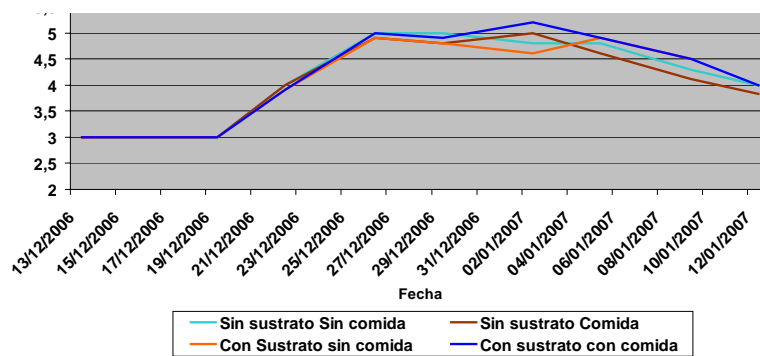


Fig.6.10. Crecimiento larvario de los distintos tratamientos a temperaturas bajas (12-14°C.)



La principal diferencia que se observa entre ambas figuras es la distinta velocidad de crecimiento de las larvas sometidas a las dos temperaturas durante los primeros días de la experiencia. De esta forma, se puede observar que mientras que todas las larvas cultivadas a temperaturas altas independientemente del tratamiento alcanzaban el cuarto segmento setífero, ocho días después de iniciada la experiencia, las larvas cultivadas en la cámara de refrigeración tardaron cuatro días más en alcanzar el mismo tamaño. Es más, durante los primeros ocho días las larvas de frío no mostraron crecimiento alguno respecto al número de segmentos setíferos, mostrando una línea de crecimiento paralela al eje de las X.

No obstante, tras este periodo inicial las larvas de ambas temperaturas se igualan, alcanzando el 5º segmento prácticamente a la vez.



A partir de aquí el crecimiento se detuvo prácticamente en todas las placas Petri, con la excepción de las larvas de calor con sustrato pero sin comida que aún crecieron algo más alcanzando un tamaño medio de 5,6 segmentos setíferos. La detención del crecimiento vino acompañado del inicio de elevadas mortalidades en todas las placas como se vera más adelante. Hay que tener en cuenta que tanto las larvas que se desarrollaron a temperaturas bajas como las que se desarrollaron a temperaturas altas fueron extraídas del stock de larvas desarrolladas con calor. Es posible que la falta de crecimiento observada para las larvas de frío durante los primeros 6 días de la experiencia sean la consecuencia de la aclimatación de las larvas a las nuevas condiciones, tras el cual mostraron un rápido crecimiento alcanzando a las larvas desarrolladas con calor.

La falta de diferencias observadas entre lo distintos tratamientos de sustrato y alimento es lógico si se tiene en cuenta que según lo observado en los experimentos previos, es el alimento y no el sustrato el principal factor en las diferencias observadas. Teniendo en cuenta que las larvas de *Nereis diversicolor* no comienzan la alimentación externa hasta por lo menos el 6º segmento setífero y que la mayoría de las larvas no alcanzaron este tamaño, el resultado de la falta de efecto del tratamiento confirma lo observado hasta el momento sobre el desarrollo de estas larvas.

El efecto de la temperatura no solo fue establecido para las larvas separadas en placas Petri sino que también fue testado en el caso de los dos stocks de larvas, que se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura a las que fueron fertilizadas durante la duración de la experiencia. La **Figura 6.11** muestra las distintas velocidades de crecimiento de ambos stocks de larvas.

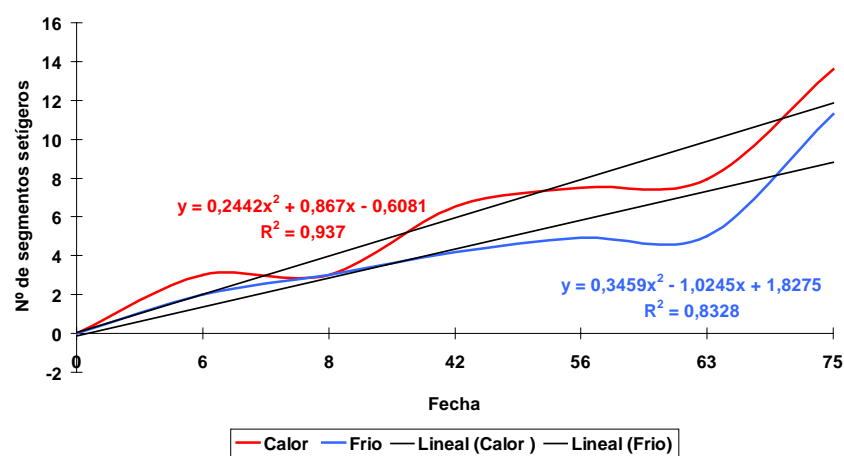


Figura 6.11. Desarrollo larvario de las larvas de los stocks de calor y frío.



En esta figura se observa de una manera clara las diferencias existentes en las velocidades de crecimiento en las dos temperaturas ensayadas. Para comprobar si existían diferentes significativas entre ambos stocks se realizó un análisis de varianzas mediante un procedimiento de modelo lineal general. El crecimiento se estableció como variable dependiente, la temperatura como variable independiente y la fecha como covariable. Los resultados se muestran en la **Tabla 6.15**.

Tabla 6.15. Prueba de los efectos Inter.-sujetos.

Dependent Variable: Crecimiento

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,086 <sup>a</sup>	2	,043	,614	,562
Intercept	,443	1	,443	6,326	,033
fecha	,058	1	,058	,827	,387
temperatura	,028	1	,028	,401	,542
Error	,630	9	,070		
Total	1,463	12			
Corrected Total	,717	11			

a. R Squared = ,120 (Adjusted R Squared = -,075)

Como puede observarse en esta tabla ni la fecha ni la temperatura mostraron un efecto significativo ( $P > 0,05$ ) sobre el crecimiento. Probablemente esto se deba a la peculiar forma en la que se produjo el crecimiento en los dos stocks. En el periodo comprendido entre el día 8 y el día 42 se produjeron las mayores diferencias entre ambos, con un crecimiento mucho mayor en las larvas de calor (0,10 seg/día) que en las de frío (0,03 seg/día).

Tras esto, se produjo una ralentización el crecimiento en las larvas de calor, ajustándose la pendiente de la curva de esta a la curva de las larvas de frío (**Figura 6.10**). Por último, en los 12 días finales ambos grupos mostraron un crecimiento exponencial muy similar en ambos casos entorno a los 0,5 seg/día. El crecimiento medio total fue de 0,166 seg/día, siendo en el caso de las larvas de calor de 0,181 seg/día y en el caso de las larvas de frío de 0,151 seg/día. La ausencia de diferencias significativas en función de la temperatura podría explicarse por lo tanto, porque salvo en el periodo comprendido entre el día 8 y el día 42, no hubo diferencias en las velocidades de crecimiento de ambos grupos.

El crecimiento medio de ambos grupos fue similar al crecimiento larvario observado en el caso de las larvas obtenidas en octubre del 2005 e inferior a la mayor parte de los crecimientos de las larvas de la experiencia realizada con las larvas de febrero y mayo del 2006.



La mortalidad en las placas Petri con los 4 sustratos ensayados y las dos temperaturas también fue analizado. Para ello, se realizó un análisis de la varianza mediante un proceso de modelo lineal general como en casos anteriores, aunque sustituyendo el crecimiento por la mortalidad como variable dependiente. El resultado de ese análisis se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 6.16. Prueba de los efectos Inter-sujetos.

Dependent Variable: Mortalidad

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	141,475 <sup>a</sup>	8	17,684	2,767	,012
Intercept	14,312	1	14,312	2,239	,140
Fecha	132,570	1	132,570	20,743	,000
Sustrato	3,467	1	3,467	,543	,465
Comida	,181	1	,181	,028	,867
temperatura	,133	1	,133	,021	,886
Sustrato * Comida	2,461	1	2,461	,385	,538
Sustrato * temperatura	,401	1	,401	,063	,803
Comida * temperatura	,854	1	,854	,134	,716
Sustrato * Comida * temperatura	,005	1	,005	,001	,977
Error	351,510	55	6,391		
Total	745,000	64			
Corrected Total	492,984	63			

a. R Squared = ,287 (Adjusted R Squared = ,183)

La **Tabla 6.16.** muestra que la única variable que tiene un efecto sobre la mortalidad es la fecha, no existiendo diferencias significativas en función del sustrato, del alimento o de la temperatura. La explicación para esto es sencilla ya que la mortalidad fue muy elevada en todos los tratamientos, prácticamente igualándose en todos. La mayor parte de las mortalidades ocurrieron a partir del 2/1/007, después de esta fecha comenzó a apreciarse un estado de debilidad general en todas las larvas, tras el cual comenzaron a desaparecer larvas y a aparecer cadáveres. El inicio de las mortalidades coincide con el descenso de tamaño medio de las larvas observado en las **Figura 6.8 y 6.9**, ya que muchas de las larvas que murieron inicialmente tenían tamaños grandes, reduciendo el tamaño medio total. Es difícil establecer la causa de esta mortalidad generalizada ya que la metodología empleada fue la misma que en otras ocasiones. Es posible que incrementar la densidad de 10 larvas por placa a 20 fuese una de las causas, al reducir en exceso la concentración de oxígeno por la elevada actividad biológica en la placa. No obstante se han llegado a mantener en placas Petri densidades muy superiores, sin observar problemas de este tipo, aunque siempre en estadios iniciales. Es más, en la primera parte de este proyecto se observaron mortalidades masivas similares a las observadas en esta ocasión tras unos pocos días después de iniciado el desarrollo larvario, aunque en esa ocasión la densidad media por placa fue muy superior.



Otra posible causa es la ausencia de óvulos en las placas. Marti *et al* (1997) describieron la dependencia de las larvas de *Nereis diversicolor* de los óvulos que no habían eclosionado para alimentarse. Es más, este autor asegura en su artículo que tanto estos óvulos como en algunos casos otras larvas de la misma especie, son un complemento indispensable para la dieta de *Nereis diversicolor* durante los primeros estadios vitales de esta especie. Es posible que la ausencia de óvulos impidiese a las larvas alcanzar tamaños suficientemente desarrollados como para poder comenzar a cazar a sus congéneres siendo esta la causa última de su muerte. Sin embargo, esto no se corresponde con lo observado en febrero de 2006, donde las larvas se desarrollaron sin problemas sin la presencia de óvulos en las placas. Probablemente la causa de las mortalidades haya sido la combinación de varios factores entre ellos posiblemente alguno de los descritos, junto con otros no conocidos.

#### 6.4. DISCUSIÓN GENERAL

El éxito en la fertilización ha variado de manera importante en las múltiples experiencias realizadas, a pesar de que en términos generales, las condiciones de salinidad y temperatura no cambiaron. En la gran mayoría de las fertilizaciones se emplearon temperaturas entre los 18 y los 22 °C y una salinidad entorno a las 17 partes por mil. Además, incluso cuando las condiciones se variaron, no tuvieron un efecto significativo en el éxito de la reproducción (Ver apartados 2.3.3.y 2.3.4.)

La explicación más probable para esta falta de efecto de las condiciones ambientales es la gran tolerancia a los cambios de *Nereis diversicolor*, que ya fue observada por Ozoh y Jones (1990). Además, las condiciones utilizadas en gran parte de las experiencias se ajustan mucho a las consideradas óptimas por estos autores así como a las utilizadas por Fidalgo y Costa (1999). Probablemente, las variaciones observadas en el éxito de las fertilizaciones ensayadas estén más relacionadas con otro tipo de factores que no son los ambientales. Concretamente, el estado óptimo de los reproductores, especialmente de las hembras o la falta de machos fértiles, ha condicionado en gran número de ocasiones el éxito en la fertilización.

Uno de los descubrimientos más interesantes en esta parte del proyecto es la existencia de óvulos de más de 300 micras, de los más grandes descritos en la bibliografía. Estos óvulos muestran que probablemente los tamaños utilizados especialmente en las primeras experiencias de fertilización, menores de 200 micras, eran demasiado pequeños y por lo tanto inmaduros, condicionando en gran medida el éxito de muchas de las experiencias de fertilización realizadas. Esto desmiente lo afirmado por Smith (1964) que señalaba tamaños entre las 190 y las 200 micras como apropiados para la fertilización y da la razón a Dales (1950) que elevaba el tamaño hasta las 250 micras.



En próximos trabajos por lo tanto no deberían emplearse hembras con óvulos con un diámetro inferior a las 220 micras, siendo preferibles aquellas con tamaños superiores.

El crecimiento larvario observado en las diferentes experiencias realizadas ha variado enormemente con crecimientos que oscilan desde valores negativos hasta crecimientos superiores a un segmento setífero diario. Esta gran variedad de resultados se explica por la enorme diversidad de condiciones empleadas, con gran variabilidad de temperaturas, diferencias importantes en la densidad de cultivo, presencia o ausencia de sustrato y comida, distinto tamaño inicial de las larvas empleadas, etc. Todo esto dificulta la correcta interpretación de los resultados, a pesar de lo cual se han obtenido varias lecciones muy interesantes para la obtención comercial de nuevos ejemplares de *Nereis diversicolor* a partir de fertilizaciones artificiales. La temperatura óptima para el crecimiento de las larvas de *Nereis diversicolor* es la empleada en el apartado 2.3.2 de este capítulo.

En esta experiencia se empleó una temperatura ambiente que osciló entre los 18 y los 22 °C, obteniéndose en algunas de las placas obtenidas crecimientos medios de más de un segmento setífero. Tan solo los crecimientos observados por Fidalgo y Costa (1999) son similares, si bien estos crecimientos son estimativos al no conocerse el momento en el que se produjo la fertilización. Este autor calculo crecimientos de 18 segmentos setíferos en tan solo 14 días, o lo que es lo mismo un crecimiento de 1,29 segm/día, con una temperatura que osciló entre los 18 y los 22°C. El crecimiento medio más rápido observado en esta experiencia se produjo en las larvas pequeñas con sustrato y con comida de la 3ª experiencia de fecundación (ver apartado 2.3.3.) y alcanzó los 1,28 seg/día. Los otros autores que han estudiado velocidades de crecimiento en larvas encontraron velocidades muy inferiores, si bien emplearon temperaturas bastante más bajas. Así Dales (1950) encontró velocidades medias de 0,21seg/día con una temperatura que osciló entre los 6 y los 12 °C, mientras que Smith (1964) describió crecimientos de sus larvas de 0,59 seg/día a temperaturas entre los 16 y los 20°C.

Por lo tanto, parece claro que la temperatura juega un papel fundamental a la hora de establecer la velocidad de crecimiento de las larvas, al incrementarse esta con la temperatura.

Sin embargo, esta relación no siempre es tan evidente y en algunos casos se producen resultados contradictorios. Así, los crecimientos más bajos observados en este proyecto se han descrito con temperaturas cercanas a la utilizada en los desarrollos larvarios con crecimientos máximos. Es más, en la misma experiencia en la que se registraron estos crecimientos máximos, se obtuvieron crecimientos muy similares a los de Dales (1950) que empleó una temperatura de entre 6 y 12 °C y obtuvo crecimientos muy bajos en relación a los de Smith (1964).



Esto se debe a que como ya se ha mencionado anteriormente, son muchas las variables que intervienen en el crecimiento larvario. Además de la temperatura, la presencia de sustrato y alimento juegan un papel fundamental, especialmente a partir del 6º segmento setífero cuando la larva agota el vitelo y comienza a ingerir alimento del exterior. Los resultados de la 2ª experiencia (apartado 2.3.2) muestran como la presencia de alimento y sustrato maximizan el crecimiento y lo que es más importante, en larvas grandes, reducen la mortalidad.

Por último, otras variable no controladas como la densidad de cultivo, la presencia de óvulos sin fecundar en el recipiente de cultivo o la aireación pueden influir, y de hecho lo hacen, en los crecimientos y las mortalidades de las larvas, por lo que los próximos trabajos deberán dirigirse a esclarecer en la medida de lo posible cual son los óptimos para estas otras variables.





## 6.5. CONCLUSIONES

- La elección de los reproductores debe hacerse con base a criterios de fertilidad de sus gametos, los cuales deben analizarse previamente a la fertilización. Los caracteres morfológicos de color, facilidad de puesta, etc., se han mostrado engañosos y no deben emplearse para la selección. Los machos deben mostrar espermatozoides libres y las hembras óvulos con diámetros superiores a las 220 micras.
- El protocolo adaptado de Dales (1950) con las últimas variaciones descritas en el apartado 2.2.2. de este proyecto es el más adecuado para la obtención de larvas, por lo que se recomienda emplearlo en una futura granja de gusanos.
- Una vez realizada la fecundación y tras lavar los restos de esperma, los óvulos, fecundados o no, deben ser añadidos a acuarios con aireación constante pero sin renovación de agua para evitar pérdidas de material. Los acuarios deben incluir una fina capa de sedimento y agua salobre con una salinidad de entre 17 y 20 partes por mil y una temperatura de 20°C, por ser estas condiciones las que se han mostrado más adecuadas para el crecimiento de las larvas.
- Las larvas de *Nereis diversicolor* no inician la ingesta de alimento proveniente del medio hasta alcanzar el 6° segmento setífero. No se debe iniciar la adición de alimento a los acuarios de cultivo hasta que las larvas alcancen este tamaño para evitar contaminar la calidad del agua con el exceso de materia orgánica.
- Aunque son necesarias más experiencias para poder establecer las condiciones óptimas de diferentes parámetros, como la densidad de cultivo, la cantidad de pienso o la velocidad con la que es necesario el cambio de agua, este proyecto ha desarrollado las certidumbres necesarias para iniciar el cultivo artificial de *Nereis diversicolor* con garantías de éxito.



## 7. CONCLUSIONES

### 7.1. GENERALES DEL ESTUDIO

El desarrollo de este Proyecto ha permitido ahondar más en los diferentes aspectos ligados a la cría intensiva de gusanos marinos, proporcionando los conocimientos necesarios para poder iniciar una cría experimental de gusanos poliquetos, si bien aún es necesario optimizar en gran medida todos los procesos de cultivo, especialmente los relacionados con el engorde de los juveniles hasta la talla comercial.

### 7.2. DE LAS DIFERENTES EXPERIENCIAS REALIZADAS

#### 7.2.1. DEL ESTUDIO DEL CICLO OOGÉNICO

##### 7.2.1.1. *Nereis diversicolor*

- A lo largo del periodo de tiempo estudiado existe siempre la posibilidad de hallar oocitos maduros, lo que indica que hay hembras de *Nereis diversicolor* susceptible de reproducirse durante todo el año en la ría del Pas.
- No existe un único momento de reproducción a lo largo del año en la ría del Pas.
- Hay diferencias locales en los tamaños de las hembras potencialmente maduras en la ría del Pas.



### 7.2.1.2. *Diopatra neapolitana*

- La época de puesta de *Diopatra neapolitana* en los estuarios del centro y este de Cantabria se inicia en el mes de mayo y se extiende hasta finales de septiembre, principios de octubre, con posibles maduraciones secundarias en función de las condiciones meteorológicas.
- La maduración de los individuos de *Diopatra neapolitana* podría estar relacionada con el incremento de la temperatura y el fotoperiodo que se observa durante el inicio de la primavera, como demuestra el comienzo de la época de puesta a finales del mes de Mayo.
- Temperaturas iniciales de entre 16 y 20 °C podrían ser adecuadas como punto de partida en el desarrollo de nuevas experiencias de fertilización larvaria con la especie *Diopatra neapolitana*.

### 7.2.2. DE LAS EXPERIENCIAS DE FERTILIZACION Y CRÍA LARVARIA DE *NEREIS DIVERSICOLOR*

- La elección de los reproductores debe hacerse con base a criterios de fertilidad de sus gametos, los cuales deben analizarse previamente a la fertilización. Los caracteres morfológicos de color, facilidad de puesta, etc., se han mostrado engañosos y no deben emplearse para la selección. Los machos deben mostrar espermatozoides libres y las hembras óvulos con diámetros superiores a las 220 micras.
- El protocolo adaptado de Dales (1950) con las últimas variaciones descritas en el apartado 2.2.2. de este proyecto es el más adecuado para la obtención de larvas, por lo que se recomienda emplearlo en una futura granja de gusanos.
- Una vez realizada la fecundación y tras lavar los restos de esperma, los óvulos, fecundados o no, deben ser añadidos a acuarios con aireación constante pero sin renovación de agua para evitar pérdidas de material. Los acuarios deben incluir una fina capa de sedimento y agua salobre con una salinidad de entre 17 y 20 partes por mil y una temperatura de 20°C por ser estas condiciones las que se han mostrado más adecuadas para el crecimiento de las larvas.



- Las larvas de *Nereis diversicolor* no inician la ingesta de alimento proveniente del medio hasta alcanzar el 6° segmento setífero. No se debe iniciar la adición de alimento a los acuarios de cultivo hasta que las larvas alcancen este tamaño para evitar contaminar la calidad del agua con el exceso de materia orgánica.
- Aunque son necesarias más experiencias para poder establecer las condiciones óptimas de diferentes parámetros, como la densidad de cultivo, la cantidad de pienso o la velocidad con la que es necesario el cambio de agua, este proyecto ha desarrollado las certidumbres necesarias para iniciar el cultivo artificial de *Nereis diversicolor* con garantías de éxito.

### **7.2.3. DE LAS EXPERIENCIAS CON REPRODUCTORES DE *NEREIS DIVERSICOLOR***

- Se ha observado que la maduración de los gusanos responde a los cambios en las condiciones de fotoperiodo que citan Olive et al (1999), por las que los gusanos que han visto modificado su fotoperiodo han respondido al estímulo. Sin embargo, existen otros factores que también han demostrado tener gran influencia en la reproducción como la temperatura que acelera los procesos de maduración, el estado inicial de maduración o la intensidad de luz.
- Aún son necesario más estudio para poder garantizar un control absoluto de la maduración que evite mortalidades tempranas de los individuos de engorde. En función de los resultados obtenidos, fotoperiodos cortos y temperaturas no muy altas (entorno a los 14°C) podrían ser las adecuadas para el engorde de los juveniles, mientras que un cambio en el fotoperiodo y un incremento de la temperatura pueden ser usadas para inducir la reproducción.
- Respecto al engorde de juveniles, si bien la instalación ensayada se mostró adecuada para el correcto desarrollo de los gusanos durante gran parte de la experiencia realizada, la aparición de fouling en las rejillas que evitaban la salida de los gusanos, provocó elevadas tasas de mortalidad en los últimos meses del experimento.



- Es necesario extremar la vigilancia de todos los sistemas de circulación para evitar episodios semejantes. Por último, la maduración prematura de los gusanos antes de alcanzar la talla comercial es un grave problema que debe ser resuelto antes de implantar una granja de cultivo intensivo.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ABRANTES A.J.C. ET AL., (1999), "Ecology of the polychaete *Nereis diversicolor* in the Canal de Mira (Ria de Aveiro, Portugal): Population dynamics, production and oogenic cycle". *Acta Oecologica*. Vol. 20, no. 4, pp. 267-283.
- ARIAS A. & DRAKE P., (1995). "Distribution and production of benthic macroinvertebrate community in shallow lagoon in the Bay of Cádiz". *Marine Ecology Progress Series*, 115, pp. 151-167.
- BARTELS-HARDEGE, H. D., Y ZEECK, E. (1990). Reproductive behaviour of *Nereis diversicolor* (Annelida: Polychaeta). *Marine Ecology*. Vol. 106, 409-412.
- BATISTA, P. FIDALGO E COSTA, A. RAMOS, A.M. PASSOS, P. POUSÃO-FERREIRA AND L. CANCELA DA FONSECA (2003). Production of the ragworm *Nereis diversicolor* (O.F. Muller, 1776), fed with a diet for gilthead seabream *Sparus auratus* L., 1758: survival, growth, feed utilization and oogenesis, *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 19 (1-4), pp. 447-451.
- CANTERAS JORDANA J.C., LÓPEZ LIÑERO S., PARDO LLEDIAS. J., (2004). "Anthropic Pressure On The Cantabrian coast". *Journal of Maritime Research*, Vol I, Nº 2 pp. 65-84.
- CHAMBERS, M. R. AND MILNE, H. (1975). Life cycle and production of *Nereis diversicolor* O. F. Müller in the Ythan Estuary, Scotland. – *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 3: 133-144
- CRYER, M. GREGORY, N. WHITTLE & RON W. (1987). "The Impact of Bait Collection by Anglers of Marine Intertidal Invertebrates". *Biological Conservation* 42 (1987) pp. 83-93.
- CUNHA, T., HALL A., QUEIROGA, H. (2005). "Estimation of the *Diopatra neapolitana* annual harvesting resulting from digging activity in Canal de Mira, Ria de Aveiro". *Fisheries research* 76. pp. 56-66.
- DALES R.P., (1950). "The reproduction and larval development of *Nereis diversicolor* O.F. Müller". *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 29, pp. 321-360.



- DAY I.H., (1967). "A monograph on the Polychaeta of Southern Africa. Part 1. errantia." Trustees of British Museum of Natural history, London, pp. 1-488.
- DAGLI, E, ZEKI, E. & CINAR, M.E. (2005). One-year observation on the population structure of *Diopatra neapolitana* Delle Chiaje (Polychaeta: Onuphidae) in Izmir Bay (Aegean Sea, eastern Mediterranean). Marine Ecology.
- FIDALGO E COSTA P., (1999). "Reproduction and growth in captivity of the polychaete *Nereis diversicolor* O.F. Müller, 1776, using two different kinds of sediment: preliminary assays". Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 15 (1-4), pp. 351-355.
- FIDALGO E COSTA, P. & L. CANCELA DA FONSECA (2000). "The management of natural stocks and the comercial culture of polychaetes measure to reduce the "bait-digging" impact promoted by sport and professional fishing in Portugal". Revista Portuguesa de Zootecnia 7
- FIDALGO E COSTA P. Y CANCELA DA FONSECA L., (2001). "Laboratory rearing of *Nereis diversicolor* O.F. Mueller 1776 under different conditions of temperature, salinity and sediment type". Aquaculture 2001: Book of Abstracts, 224 pp.
- FLACH E.C., BEUKEMA, J.J. (1994). "Density-governing mechanism in populations of the lugworm *Arenicola marina* on tidal flats". Marine Ecology Progress series, Vol 115, pp. 139-149
- GAMBI M.C et al (1994). "Polychaetes of commercial and applied interest in Italy: An overview". En: Dauvin J.C et al (eds.), Actes de la 4Th international polychaete conference. Mém. Mus. Natn. Hist. Nat., 162, pp. 593-603. París ISBN 2-85653-214-4.
- GARCÍA-ARBERAS L. y RALLO A., (2002). "Life cycle, demography and secondary production of the polychaete *Hediste diversicolor* in a Non-Polluted Estuary in the Bay of Biscay". Marine Ecology, 23 (3), pp. 237-251.



- GARCÍA DEL REAL, J.M., CANTERAS, J.C., VALCARCE, A. ANSORENA, F.J., LASO, I. PARDO, J. GONZÁLEZ, J.M. (2005). Datos preliminares sobre el ciclo oogénico de *Nereis diversicolor* en el estuario del río Pas (Cantabria: España). III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Marina. FOMAR Cádiz. 7-10 de Junio del 2005
- KRISTENSEN E., (1984). "Life cycle, growth and production in estuarine populations of the polychaetes *Nereis virens* and *Nereis diversicolor*". Holartic Ecol., 7, pp. 249-256.
- LAMBERT R. et al., (1992). "Activité de prospection de son aire d'alimentation par la polychete *Nereis diversicolor* (O.F.Müller) données preliminaries". Cah. Biol. Mar., 33, pp. 43-54.
- LAST, K.S., P.J.W. OLIVE & A.J. EDWARDS (1999). "An actographic study of diet activity in the semelparous polychaete *Nereis (Neanthes) virens* Sars in relation to the annual cycle of growth and reproduction". Invert. Reprod. Develop., 35: 141-146
- MARTY, R., (1997). Biologie de la reproduction et du développement de deux espèces d'Annélides Polychètes *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) et *Perinereis cultrifera* Grube. Thèse d'Université, Université de Rennes I, 173 pp.
- MCLUSKY, D. S., ANDERSON F. E., WOLFE-MURPHY, S. (1983). "Distribution and population of *Arenicola marina* and other benthic fauna after bait digging". Marine ecology Progress series, Vol 11, pp173-179.
- MÖLLER P., (1985). "Production and abundance of juvenile *Nereis diversicolor*, and oogenic cycle of adults in shallow waters, of western sweden". J. Mar. Bil. Ass. U.K., 65, pp. 603-616.
- NAVEDO, G. J. Y ROMERO RODENAS, F. (2003). "Caracterización del marisqueo en la zona intermareal del estuario del río Asón. Bases para una futura ordenación sostenible de la extracción de recursos marisqueros". En AYO. DE SANTOÑA (Ed.), Monte Buciero, 8: pp. 143-159.
- OLIVE, P.J.W. (1999). "Polychaete aquaculture and polychaete science: a mutual synergism". Hydrobiologia 402: 175-183.





- OLIVIER, M., G. DESROSIERS, A. CARON, C. RETIÈRE & A. CAILLOU (1996). "Juvenile growth of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) feeding on a range of marine vascular and macroalgal plant sources under experimental conditions". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208: 1-12.
- OZOH PT, JONES NV. (1990). The effects of salinity and temperature on the toxicity of copper to 1-day and 7-day-old larvae of *Hediste (Nereis) diversicolor* (O. F. Muller). *Ecotoxicol Environ Saf.*19(1):24-32.
- PAXTON H. (1993). "*Diopatra* Audoin and Milne Edwards (Polychaeta: Onuphidae) from Australia, with a discussion of developmental patterns in the genus". *The Beagle, Records of the Northern Territory Museum of Arts and Sciences*, 10, pp. 115-154.
- SCAPS P. *et al.*, (1992). "Effect of food ration, intraspecific density and inter-individual relations on the growth of juvenile *Nereis diversicolor* (Annelida: Polychaeta)". *Canadian Journal of Zoology.*, 71 (2), pp. 424-430.
- SMITH RI. (1964). On the early development of *Nereis diversicolor* in different salinities. *J. Morphol.* May;114:437-63.