

SKRETTING
XUNTA DE GALICIA
UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo Marítimo e de Pesca (FEMP)
PRAXAIR
EUROSTARS ISLA DE LA TOJA
galicia
OKANA-21, S.L.
PAVIMENTOS INDUSTRIALES
PAVIMENTOS DECORATIVOS
INYECCIONES DE RESINA
IMPERMEABILIZACIONES
REPARACIONES ESTRUCTURALES
ipac. acuicultura
miSPeces.com
o grove paraíso do marisco
ILMO. CONCELLO O Grove galicia
XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MAR
CSIC
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Grupo de Investigación Biología de Moluscos
UNIVERSIDAD DE ORIENTE
PESCANOVA GRUPO
INSUIÑA S.L.

ORGANIZADO POR:
Dpto. de Bioquímica e Bioloxía Molecular da Universidade de Santiago de Compostela
Padroado de Turismo do Concello de O Grove
Insuiña S.L. Pescanova
Instituto Galego de Formación en Acuicultura (I.Ga.F.A.)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

FORO DOS RECURSOS MARIÑOS E DA ACUICULTURA E DAS RÍAS GALEGAS

XIX Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas





O Grove, 6 e 7 de outubro 2016

Hotel EUROSTARS Isla de la Toja
Illa da Toxa, O Grove, Pontevedra

Editores: Manuel Rey Méndez
Jacobo Fernández Casal
César Lodeiros Seijo
Alejandro Guerra Díaz
Miguel Anxo Lastres Couto
Xosé Antonio Padín Álvarez

XIX FORO DOS RECURSOS MARIÑOS E DA ACUICULTURA DAS RÍAS GALEGAS



XXVIII CICLO CULTIVANDO O MAR

Illa de A Toxa (O Grove), día 6 e 7 outubro de 2016

Esta obra citarase como sigue:

Todo o libro:

Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Guerra A., Lastres M.A., Padín X.A., Lodeiros C. (Eds.). 2017. *Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas.* 19, 469 pp. Santiago de Compostela (España): Foroacui

E para un traballo concreto (exemplo):

Lodeiros C., Loor A., Márquez A., Jormil R., Sonnenholzner S. 2017. Avances en la descripción del ciclo de vida temprano de la ostra de roca *Striostrea prismatica* (Gray 1825). En: Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Guerra A., Lastres M.A., Padín X.A., Lodeiros C. (Eds.). *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* 19: 217-226.

Maquetación: Rosa Mª Martín García
Dep. Legal: C 2014-2016
ISBN: 978-84-697-2865-9

PRESENTACIÓN

O XIX Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas (FOROACUI), celebrado na Illa da Toxa os días 6 e 7 de outubro de 2016, mantivo o esquema de programación que comezou fai dous anos, dedicando a primeira xornada a algunhas das tradicionais mesas de traballo dos Foros (Marisqueo e Pesca de Baixura, Acuicultura, Empresa e Recursos), así como dúas conferencias maxistrais, onde a intervención de técnicos e expertos nas diferentes materias aportaron en cada caso unha visión axeitada e actual. O ciclo "Cultivando o Mar", que camiña da man do Foro e que xa cumpre vinteoito edicións, estivo este ano dedicado á "Recursos marisqueiros para o futuro, as novas oportunidades de hoxe: pepino de mar e outras especies", donde representantes de confrarías, da administración e da empresa, falaron da extracción, plans de explotación e acuicultura destes novos recursos. Esta actividade foi realizada no "Salón das cunchas" do Concello de O Grove, seguindo coa tradición de acercar este ciclo ao publico en xeral e en relación directa coa Festa do Marisco.

A segunda xornada foi dedicada a un tema específico "Novos recursos marisqueiros e da acuicultura: (I) explotación e xestión da produción; (II) presentación e comercialización" que, grazas ao patrocinio da Consellería do Mar, puidemos organizar cun panel de expertos que abordaron na primeira parte os protocolos de incorporación de novos produtos á cadea alimentaria, os plans experimentais de explotación e a produción en criadeiro de novos recursos mariños. Na segunda parte, nos aspectos de presentación e comercialización de novos recursos, interviron representantes das novas explotacións dos recursos, así como empresas transformadoras, acompañados da preparación de pratos en directo grazas á colaboración do restaurante "Culler de Pau" de O Grove e a Escola de Hostalería "CIFP Carlos Oroza" de Pontevedra, segido da degustación dos mesmos polos asistentes ao foro.

A publicación que tedes nas mans tenta recoller todos os contidos destas mesas e conferencias, xunto cos traballos en extenso que en forma de panel se presentaron nesta nova edición, sumándose ás memorias previas do Foro que, ao longo de dezanove anos, reflicten a evolución da acuicultura e da explotación dos recursos mariños en Galicia e no mundo. Tamén podedes seguir as informacións na páxina web do Foro (http://www.usc.es/congresos/foroacui/) ou ver o resumo do XIX Foro no video que MisPeces.com tivo a xentileza de facer (https://www.youtube.com/watch?v=vOvRKf7Njws).

O comité organizador quere agradecer a todas aquelas institucións, empresas e persoas que co seu apoio e financiamento permiten que o Foro siga adiante, pero sen esquecer que unha actividade deste tipo depende moi especialmente da calidade dos relatores e do interese e actualidade das temáticas a tratar que, xunto coa participación dos asistentes nas discusións e as súas propostas de novos temas para futuros eventos, facilitan a organización deste encontro anual no marco da Festa do Marisco do Grove.

O Comité Organizador

Os Coordinadores deste XIX FORO DOS RECURSOS MARIÑOS E DA ACUICULTURA DAS RÍAS GALEGAS *dan as grazas pola súa colaboración ás seguintes entidades:*

Consellería do Mar, Xunta de Galicia
Padroado de Turismo do Concello de O Grove
Skretting
Okana-21
Praxair
misPeces.com
Ipac Acuicultura
World Aquaculture Society (WAS)
Sociedad Española de Acuicultura (SEA)
EUROSTARS Isla de la Toja, A Toxa
CIFP Carlos Oroza de Pontevedra
Restaurante "Culler de Pau"
Insuiña S.L., Pescanova
CSIC
IGaFA
Universidade de Santiago de Compostela

Ao público pola súa participación

XIX Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas

COMITÉ ORGANIZADOR:

Manuel Rey Méndez (USC) ..... Presidente
Alejandro Guerra Díaz (CIMA)..... Tesoureiro
Belén Rodríguez Castro ..... Secretaria
Jacobo Fernández Casal (Insuiña, S.L.)..... Vocal
Miguel Anxo Lastres Couto (IGaFA)..... Vocal
Xosé Antonio Padín Álvarez (CSIC)..... Vocal
Jorge Rodríguez Castro (USC) ..... Vocal
Rosa Mª Martín García ..... Vocal

COMITÉ CIENTÍFICO:

Dr. Manuel Rey Méndez (USC) ..... Presidente
Lic. Jorge Rodríguez Castro (USC)..... Secretario
Dr. Cesar Lodeiros Seijo (IOV-UDO) Venezuela/CENAIM-ESPOL (Ecuador)..... Vocal
Dr. Pedro Fernandes Seixas (CIIMAR, Portugal)..... Vocal
Dra. Dorotea Martínez Patiño (CIMA-Ribadeo) ..... Vocal
Dra. Nieves González Henríquez (ULPGC)..... Vocal

ÍNDICE

CONFERENCIA INAUGURAL 15

Biología, tendencias poblacionales y conservación de los peces migradores ibéricos
Fernando Cobo 17

MESA DE TRABALLO: MARISQUEO E PESCA DE BAIXURA 27

Impacto de eventos extremos de salinidade e temperatura en ameixas e croque
Gonzalo Macho 29

Percepciones sobre los factores dinámicos que intervienen en la primera venta de los mosluscos infaunales en Galicia
José Alberto de Santiago Meijide 33

Investigación y desarrollo tecnológico de las pesquerías de moluscos en las rías
José Luis Escalante González 43

CONFERENCIA MAXISTRAL 63

Acuicultura del Ecuador: actual aporte del CENAIM-ESPOL
Stanislaus Sonnenholzner 65

MESA DE TRABALLO: ACUICULTURA 79

Veta la Palma: acuicultura sostenible, servicios ecosistémicos e integración económica y social en el entorno de Doñana
Miguel Medialdea 81

Cultivo y estado actual de la acuicultura de atún rojo en España
Aurelio Ortega 91

Producción intensiva de langostino en sistemas cerrados, hacia un futuro sostenible
Sergio Rengel 99

MESA DE TRABALLO: EMPRESA E RECURSOS 103

+ que cebos
Alberto Novoa González 105

Depuración de bivalvos en recirculación: pros y contras
Carlos Temperán 109

XXVIII CICLO CULTIVANDO O MAR: RECURSOS MARISQUEIROS PARA O FUTURO, AS NOVAS OPORTUNIDADES DE HOXE: PEPINO DE MAR E OUTRAS ESPECIES 121

Explotación e aproveitamento da holoturia na Confraría de Pescadores "San Xosé" de Cangas

Jesús David Fernández Pérez 123

Proyecto H2020 "TASCMAR": Implicación de iMare Natural S.L.

Carolina Alonso Pozas 127

MESA DE TRABALLO: NOVOS RECURSOS MARISQUEIROS E DA ACUICULTURA (I): EXPLOTACIÓN E XESTIÓN DA PRODUCIÓN 143

Plans experimentais en Galicia. As novas especies

Jesús A. Fernández Barreiro 145

iMare Natural: i+D en el cultivo acuícola de ortiguillas de mar y holoturias

Pedro A. Álvarez Molina y Carolina Alonso Pozas 151

Protocolos para la incorporación de nuevos productos marinos a la cadena alimentaria comercial

José Ángel Viñuela Rodríguez 165

MESA DE TRABALLO: NOVOS RECURSOS MARISQUEIROS E DA ACUICULTURA (II): PRESENTACIÓN E COMERCIALIZACIÓN 171

Novos recursos marisqueiros e da acuicultura: explotación e xestión da produción

García del Campo M. y Alfaya Massó J. 173

A confraría de pescadores "San Antonio" de Cambados no Foro dos Recursos mariños e da Acuicultura das Rías Galegas

Carlos Mariño Balsa 177

PORTO-MUIÑOS, S.L., novos recursos marisqueiros e da acuicultura: presentación e comercialización

Manuela Buján 179

Galuriña, elaboración de empanadas de algas ecológicas con mariscos y pescados

Carmen Sánchez Sánchez 185

SHOWCOOKING DE NOVOS RECURSOS MARISQUEIROS E DA ACUICULTURA 197

PANEIS 201

A new record of the pearl oyster, *Pinctada radiata* (Bivalvia: Pteriidae), in the eastern Adriatic Sea (Croatia): morphological and molecular characterization

Nerlović V., Quinteiro J. & Rey-Méndez M.....203

Avances en la descripción del ciclo de vida temprano de la ostra de roca *Striostrea prismatica* (Gray 1825)

Lodeiros C., Loor A., Márquez A., Jormil R. & Sonnenholzner S. 217

Primeiro premio: Calidad comercial de distintas especies de *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) potencialmente cultivables en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI) en recirculación (RAS)

Casais E., Couce A., Alamrousi A. & Cremades J. 227

Segundo premio: Comparativa de luz L.E.D. versus luz fluorescente en el cultivo de microalgas. Evaluación del coste energético por célula producida

Lastres M., Carragal R., González P., López A., Potel I., Figueira I., Cid E., Andrés C., Casais E., Da Costa F., Nóvoa S. & Martínez-Patiño D. 235

Caracterización de la fracción proteica de ensilados biológicos de residuos de *Micropogonias furnieri* Desmarest, 1823

Fernández Herrero A., Vittone M. & Salomone A. 251

Caracterización de una población de coquina (*Donax trunculus*, L. 1758) en la playa de Bastiagueiro, A Coruña

Catoira J.L., SeoaneP., Martínez D., Ojea J., Méndez J. & No E. 261

Caracterización genética preliminar de *Spondylus limbatus* G.B. Sowerby II, 1847, de la costa ecuatoriana

Lamas A., Quinteiro J., Rey-Méndez M. 275

Caracterización molecular de recursos marinos de interés comercial en Ecuador: estudios preliminares

Quinteiro J., González-Henríquez N., Tomalá-Reyes S., Flores-Suárez D., Balón-Lainez K., Rodríguez-Pozo J., Cornejo M.H., Chavarría-Viteri J., Melena-Cevallos J. & Villón J.J. 287

Characterization of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* strains isolated from cultured sea bass

Fernández-Álvarez C., Torres-Corral Y. & Santos Y. 297

Contribución al estudio de la biodiversidad microbiana marina en la región de Safi en el atlántico marroquí

Elkhalfi B., Laghriab M., Hdia J., Rodriguez-Castro J., Quinteiro J., Rey-Méndez M. & Soukri A. 307

Cultivo suspendido de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* en la Bahía de Ayangue, Ecuador: influencia de los factores ambientales

Lodeiros C., Rodríguez-Pesantes D., Márquez A., Revilla J. & Sonnenholzner S. 317

Desarrollo y aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico temprano de enfermedades bacterianas en tejido de rodaballo

Chapela M.J., Garrido-Maestu A., Ferreira M., Ruiz-Cruz A., Martin-Varela I. & Fernández J..... 331

Deseño dun método de PCR multiplex en tempo real para o diagnóstico rápido de tres enfermidades bacterianas na troita arco da vella

Ferreira M., Chapela M.J., Varela C., Garrido Maestú A. & Arregui L...... 341

Ensayos de crecimiento de coquina (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758) en sistemas de cultivo en el medio natural

Seoane P., Catoira J.L., Martínez D. & Ojea J. 345

Estrategias productivas para la mejora del crecimiento y supervivencia durante el preengorde y engorde de ostra rizada (*Crassostrea gigas*) en el Delta del Ebro

Vallejo O. & Fernandez C. 357

Estudio de la evolución espacial y temporal de la productividad y el precio del longueirón (*Ensis siliqua* Linnaeus, 1758*)* en los bancos naturales del seno de Corcubión (Galicia)

Suárez Santos J.M., Catoira Gómez J.L., Alborés Blanes I. & Fernández Rodríguez L...... 363

Estudio de la variabilidad espacial y temporal en la talla comercial del longueirón (*Ensis siliqua* Linnaeus, 1758) en los bancos naturales del seno de Corcubión (Galicia)

Alborés Blanes I., Suárez Santos J.M., Catoira Gómez J.L. & Fernández Rodríguez L...... 373

Evaluación de la eficacia de compuestos químicos y naturales frente a infecciones bacterianas y fúngicas de la trucha arcoíris

Lama-López R., Saltos Rosero N., García Diez C., Sánchez-Arévalo A.R., Martínez A. & Y. Santos.....383

Factibilidad biológica del cultivo suspendido de la Concha Nácar *Pteria sterna* en aguas ecuatorianas: crecimiento, supervivencia e influencia de factores ambientales

Lodeiros C., Rodríguez-Pesantes D., Márquez A., Revilla J., Freites L., Lodeiros-Chacón C. & Sonnenholzner S. 391

Marcadores moleculares para la identificación genética de especies comerciales en Ecuador

González-Henríquez N., QuinteiroJ., Flores-Suárez D., Tomalá-Reyes S., Balón-Lainez K., Rodríguez-Pozo J., Oñate D., Cornejo-Rodríguez M.H., Chavarría-Viteri J., Melena-Cevallos J., Villón J., Medina-Alcaraz C. & Sarmiento-Herrero R. 403

Protocolo de cultivo de la navaja (*Ensis magnus* Schumacher, 1817) en criadero

Nóvoa S., Ojea J. & Martínez D. 415

Restauración de *Spondylus* en Ecuador: Producción de juveniles y avances de la repoblación de *Spondylus limbatus* G. B. Sowerby II, 1847 en la reserva El Pelado, Provincia de Santa Elena, Ecuador

Márquez A., Revilla J., Lodeiros C., Loor A., Rodríguez D. & Sonnenholzner S. 423

Sensitivity of *Pseudomonas anguilliseptica* to natural compounds and antimicrobial agents

Torres Corral Y., Fernández Álvarez C. & SantosY......435

Técnicas de preengorde en suspensión de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) en el Delta del Ebro. Hacia una talla de siembra mayor en parques de arena

Vallejo O. & Fernandez C......443

Valorización do berberecho *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) da costa galega, mediante un marcador de identidade da súa orixe xeográfica. VALOBER.GAL

Quinteiro J. & Rey-Méndez M. 449

Índice de autores 465

PROGRAMA

XOVES, DÍA 6/X/16

09.00 BENVIDA, RECOLLIDA DE DOCUMENTACIÓN E COLOCACIÓN DE PANEIS

10.00 INAUGURACIÓN DO FORO

- José Antonio Cacabelos Río. Alcalde de O Grove
- Juan Maneiro Cadillo. (Director Xeral de Pesca, Acuicultura e Innovación Tecnolóxica). Xunta de Galicia

10.30 CONFERENCIA INAUGURAL

- Fernando Cobo. Director da Estación Hidrobiolóxica do Con. USC.
  "*Bioloxía, tendencias poboacionais e conservación dos peixees migratorios ibéricos"*
- Moderador: Manuel Rey Méndez. USC

11.30 CAFÉ

12.00 MESA DE TRABALLO: MARISQUEO E PESCA DE BAIXURA

- Gonzalo Macho. Investigador Postdoutoral en Cambio Climático e Recursos Pesqueiros da Universidade de Vigo e da University of South Carolina (USA)
  "*Impacto de eventos extremos de salinidade e temperatura en ameixas e croque*"
- José Alberto de Santiago Meijide. Fundación CETMAR.
  «*Percepcións sobre os factores dinámicos que interveñen na primeira venda dos mosluscos infaunais en Galicia"*
- J. Luis Escalante. CIPES (Centro de Interpretación da Pesca e da Salga).
  "*Investigación e desenvolvemento tecnolóxico das pesquerías de moluscos nas rías*"
- Moderador: Alejandro Guerra, Científico.

13.30 CONFERENCIA MAXISTRAL

- Stanislaus Sonnenholzner. Director do Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas. Escola Superior Politécnica do Litoral, Ecuador.
  "*Acuicultura do Ecuador: actual aporte do CENAIM-ESPOL*"
- Moderador: César Lodeiros. Investigador Programa Prometeo, CENAIM.

16.30 MESA DE TRABALLO: ACUICULTURA

- Miguel Medialdea González. Pesquería Isla Mayor (PIMSA).

  "*Veta la Palma: acuicultura sostible, servizos ecosistémicos e integración económica e social no entorno de Doñana*"

- Aurelio Ortega. IEO Murcia

  "*Cultivo e estado actual da acuicultura do atún vermello en España*"

- Sergio Rengel. Gamba Natural.

  "*Produción intensiva de langostino en sistemas pechados, cara un futuro sostible*"

- Moderador: Jacobo Fernández Casal, Insuiña

18.00 MESA DE TRABALLO: EMPRESA E RECURSOS

- Alberto Novoa González. KF Iber Frost, S.L.

  "*+ que cebos*"

- Carolina Alonso Pozas. iMare natural. Proxecto TASCMAR.

  "*Compostos bioactivos mediante o cultivo de invertebrados mariños e simbiontes asociados*".

- Carlos Temperán

  "Depuración de bivalvos en recirculación: pros e contras"

- Moderador: Antonio Padín, CSIC.

20.00 XXVIII CICLO CULTIVANDO O MAR: RECURSOS MARISQUEIROS PARA O FUTURO, AS NOVAS OPORTUNIDADES DE HOXE: PEPINO DE MAR E OUTRAS ESPECIES

- Jesús David Fernández Pérez. Xerente da Confraría de Pescadores S. Xosé de Cangas

  "Explotación e aproveitamento da holoturia na Confraría de Pescadores San Xosé de Cangas".

- Carolina Alonso Pozas. iMare Natural

  "*Proxecto H2020 "TASCMAR": Implicación de iMare Natural S.L.* ".

- Jesús A. Fernández Barreiro. Consellería do Mar.

  "*Plans experimentais en Galicia. As novas especies*"

- Moderador: Antonio Padín, CSIC.

VENRES, DÍA 7/X/16

09.30 MESA DE TRABALLO: NOVOS RECURSOS MARISQUEIROS E DA ACUICULTURA (I): EXPLOTACIÓN E XESTIÓN DA PRODUCIÓN

- Jesús A. Fernández Barreiro. Consellería do Mar. Delegación de Carril (Vilagarcía de Arousa).

  "*Plans experimentais en Galicia. As novas especies*"

- Pedro Álvarez Molina. iMare Natural.

  "*iMare Natural: i+D no cultivo acuícola de ortiguillas de mar e holoturias"*

- José Ángel Viñuela Rodríguez. Xefe de Servicio de Seguridade Alimentaria, Dirección Xeral de Saude Pública da Xunta de Galicia.

  "*Protocolos para a incorporación de novos produtos mariños á cadea alimentaria comercial*"

- Moderador: Miguel Lastres, IGaFA.

11.30 CAFÉ

12.00 MESA DE TRABALLO: NOVOS RECURSOS MARISQUEIROS E DA ACUICULTURA (II): PRESENTACIÓN E COMERCIALIZACIÓN

Showcooking elaborado por diversos cociñeiros de prestixio:

- Javi Olleros. Restaurante Culler de Pau (O Grove).

- Escola de Hostalería "CIFP Carlos Oroza" de Pontevedra:

  - Manuel Hermo. Director, Pilar Tallón, Vicedirectora
  - Daniel Pulzoni, Jorge Verdeal, José Luis Lubiáns, Francisco Rodríguez, Carlos Rodríguez e Diego Mosquera.
  - Alumnos da Escola de Hostalería.

  Coa intervención de representantes de explotacións das novas especies de marisqueo e da acuicultura, así como de empresas transformadoras de novos produtos:

- Misael García del Campo. Patrón Maior da confraría de Pescadores de Vigo
  "*Novos recursos marisqueiros e da acuicultura: explotación e xestión da produción*"

- Carlos Mariño Balsa, Confraría de Pescadores "San Antonio" de Cambados
  "*A confraría de pescadores San Antonio de Cambados no Foro dos Recursos mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*"

- Manuela Buján. Porto-Muiños S.L.
  "PORTO-MUIÑOS, S.L., novos recursos marisqueiros e da acuicultura: presentación e comercialización"

- Carmen Sánchez. Galuriña. Esteiro, Muros
  "Galuriña, elaboración de empanadas de algas ecolóxicas con mariscos e peixes"

- Moderador: Lucio Grassia. Escola de Hostelería IPSSAR "Pietro D'Abano" (Abano Terme, Padua, Italia).

14.30 ENTREGA DO XIII PREMIO AO MELLOR PANEL E CLAUSURA

- Andrés Paz-Ares Rodríguez. Director Xeral de Saúde Pública. Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia

CONFERENCIA INAUGURAL

D. Fernando Cobo. USC

Biología, tendencias poblacionales y conservación de los peces migradores ibéricos

Fernando Cobo
Estación de Hidrobioloxía "Encoro do Con". Universidade de Santiago de Compostela. Castroagudín – Cea. 36617 Vilagarcía de Arousa. Pontevedra.
Departamento de Zooloxía, Xenética e Antropoloxía Física. Facultade de Bioloxía, de Santiago de Compostela. 15782 Santiago de Compostela.
fernando.cobo@usc.es

Introducción

Los peces diádromos representan menos del 1% de la fauna de peces del mundo, pero su valor cultural, patrimonial y etnográfico es muy considerable en determinadas regiones de la Península Ibérica. A pesar de ello, los peces migradores se encuentran entre las especies más amenazadas de las aguas europeas, pues se trata de especies muy afectadas por la alteración de su hábitat y algunas están sometidas a un sobreesfuerzo pesquero que afecta al estado de sus poblaciones.

Todas las especies de peces anfihalinos son merecedoras de algún tipo de protección: la lamprea mariña (*Petromyzon marinus*), el sábalo y la sáboga (*Alosa alosa* y *Alosa fallax*), y el salmón (*Salmo salar*) se encuentran entre las especies de fauna protegida en el Anexo III del Convenio de Berna de 1979, en el que se regula su explotación de forma que sus poblaciones no queden en peligro y la Directiva Hábitat (92/43/CEE) las considera especies de los Anexos II y V, objeto de medidas de conservación de su hábitat. Además se relacionan en las listas de la UICN con categoría de insuficientemente conocidas. No obstante está regulada su captura como especies objeto de pesca deportiva y existen pesquerías internacionales con artes de enmalle y fines comerciales en algunos ríos europeos. Además, las poblaciones de

lamprea del sur y este de España están catalogadas como en peligro de extinción en la legislación nacional. Por otro lado, los estados miembros de la UE están obligados al cumplimiento de los acuerdos en el marco del Convenio para la Conservación del Salmón en el Atlántico Norte como integrantes de la NASCO.

En el caso de la anguila (*Anguilla anguilla*) y de acuerdo con el dictamen científico del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM/ICES), su población está fuera de los límites de seguridad biológica y la pesca no se ejerce actualmente de forma sostenible. El CIEM recomienda desarrollar un plan urgente de recuperación para toda la población de anguila europea y que la explotación y otras actividades humanas que afectan a las poblaciones de peces se reduzcan en la medida de lo posible. Por ello, el 19 de julio de 2004, el Consejo, teniendo en cuenta la Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo, de 1 de octubre de 2003, relativa al desarrollo de un plan de acción comunitario para la gestión de la anguila europea, adoptó una serie de conclusiones entre las que pidió a la Comisión que presentase propuestas sobre la gestión a largo plazo de la anguila en Europa. El 15 de noviembre de 2005, el Parlamento Europeo adoptó una resolución en la que invitó a la Comisión a presentar de inmediato una propuesta de Reglamento del Consejo que establece medidas para la recuperación de la población de anguila europea.

El reo, forma migradora de la trucha común (*Salmo trutta*) no está registrado como tal en las listas oficiales de protección de la fauna, ya que las referencias se refieren al ecotipo sedentario.

Amenazas a su conservación

Las poblaciones de peces migradores están en franco declive, las entradas en los ríos de las que fueron abundantes especies de peces se han reducido, tanto que su escasez se ha vuelto un nuevo y creciente problema para la conservación de la biodiversidad.

En el transcurso de su ciclo biológico, y teniendo en cuenta su carácter migrador, estos peces sufren un amplio abanico de agresiones que resultan de eventos naturales (estrés osmótico, natación prolongada contra fuertes corrientes, franqueo de obstáculos naturales, depredación, parasitismo, etc), pero también del impacto de las actividades humanas (restricción de las vías de migración mediante la construcción de todo tipo de barreras físicas, reducción del caudal de los ríos, contaminación generalizada de las aguas tanto las estuáricas como las de agua dulce, sobreexplotación pesquera, extracción de sedimentos, etc). Los efectos antrópicos han tenido, a lo largo del tiempo, un peso importante en la drástica restricción del área

de distribución de las especies migradoras. Este fenómeno se detecto a comienzos del siglo XIX y se incrementó considerablemente durante todo el siglo XX. En la Península Ibérica el hábitat fluvial accesible para los peces diádromos se redujo en un 92% por término medio, considerando las diferentes especies y su mayor o menor capacidad para superar obstáculos.

Los peces migradores figuran entre las especies más valiosas explotadas por las pesquerías continentales. Se comercializan sobre todo localmente y son a menudo parte del patrimonio cultural en algunas regiones. Sin embargo es cada vez mayor el riesgo al que están sometidas como consecuencia de la introducción de especies exóticas en su hábitat (Cobo *et al.,* 2010).

Según datos extraídos de Antunes *et al*. (2015), España y Portugal tienen una larga tradición pesquera y representan dos de los países con mayor consumo de pescado *per capita* (el consumo de pescado en Portugal es el más grande de Europa y el tercero en el mundo con 55,6 kg año^{-1}). Por lo tanto, la pesca marina, junto con la agricultura y la silvicultura, soportan la economía portuguesa tradicional. Sin embargo, la captura comercial interior representa sólo 63 t en Portugal y 6x10^{3} t en España.

Situación y tendencias poblacionales

Existen otros peces anfídromos eurihalinos que presentan nomadismo entre las aguas dulces y el mar, y que pueden penetrar un largo recorrido aguas arriba de los principales ríos costeros ibéricos: los múgeles (*Chelon labrosus*, *Mugil cephalus*, *Liza* spp.), la robaliza o lubina (*Dicentrarchus labrax*), la solla o platija (*Platichthys flesus*) y el piobardo o pejerrey (*Atherina boyeri*) no son tratados en esta ponencia, aunque merecían ser estudiados con detenimiento, tanto por el riesgo al que están sometidas sus poblaciones como por la falta de datos científicos sobre su biología.

Esturión

El esturión (*Acipenser sturio*) existió en estado silvestre en los principales ríos de la Península Ibérica. Fue capturado por pescadores profesionales hasta que se produjeron severas disminuciones en su abundancia a mediados del siglo XX. La pesca en el río Miño, por ejemplo, se detuvo en la década de 1960 debido a la extinción local y los últimos ejemplares ibéricos conocidos fueron capturados en 1992 en el Guadalquivir y un ejemplar en Gijón en 2010 (Mota *et al*., 2016).

Lamprea

Las principales poblaciones de lamprea marina parecen estar en el noroeste de la Península Ibérica (España y Portugal) y en el oeste y suroeste de Francia, regiones que también presentan las principales pesquerías comerciales. Se han realizado evaluaciones anuales de las poblaciones de larvas de lamprea en doce ríos de Galicia, entre 2007 y 2011, observándose una amplia distribución en un número alto de cursos de agua, si bien su hábitat disponible se limita al 36% de la longitud total del río, un porcentaje un poco más elevado que el 20% descrito para el resto de la Península Ibérica (Mateus *et al*., 2012). La biomasa y la densidad de larvas de lamprea mostraron un aumento significativo en los ríos gallegos entre 2007 y 2011. Igualmente, hay signos de aumento de población en Francia y Reino Unido; pero se necesitan datos de más regiones y relacionados con series cronológicas más largas para corroborar una posible tendencia general de aumento para las poblaciones europeas (Silva *et al*., 2016). En este sentido también se observa un aumento de las capturas de adultos, pero los datos deben de tomarse con precaución pues no deberían ser vistos como una indicación de la mejora de sus poblaciones sino que, muy probablemente, se refieren a un aumento importante del esfuerzo de pesca dirigido hacia esta especie en el último medio siglo como consecuencia de la acusada disminución de las capturas de otras especies, en particular del sábalo. Esta hipótesis está apoyada por correlaciones estadísticamente significativas obtenidas al comparar la evolución de las capturas de sábalo, salmón y lamprea en el siglo pasado.

En España, la pesca de la lamprea sólo se permite en los ríos Ulla y Miño. El promedio de capturas de la pesca comercial en el río Ulla fue de 4.817 ± 969,9 lampreas por año (rango: 710 a 7.751) entre 2003 y 2010. Sin embargo, siguiendo el patrón descrito para otras pesquerías, se calcula que la cantidad real de las capturas es muy superior a la declarada (Cobo, 2009). El río Ulla soporta una de las más importantes pesquerías de esta especie en Europa, pero está muy lejos de las dos principales que son la del río Miño y el sistema Garonne-Dordogne (Francia). En la pesquería del Miño se registra una media de 65.695 ± 3.829,2 (± DE) lampreas por año (rango: 53.648-78.217), según los datos que fueron declarados entre 2003 y 2008. Sin embargo, se estima que la captura promedio real para el mismo período tendría que ser al menos 500.000 individuos por año (Cobo *et al*., 2011).

Anguila

La pesca de la angula fue prohibida en el año 2000 en todas las cuencas fluviales portuguesas excepto en el Miño (río internacional) y en España esta pesquería todavía existe en varios estuarios asturianos y vascos, en el Guadalquivir, en el delta del Ebro y en la Albufera de Valencia. Además, existen importantes pesquerías de anguilas amarillas y plateadas en

Galicia, Comunidad Valenciana y Cataluña. En la región central de Portugal (cuencas del Vouga y del Mondego), la pesca de la anguila amarilla tiene también valor comercial. La pesca recreativa en estas regiones fue prohibida en 2009. Las capturas oficiales de angula son sistemáticamente subestimadas en el río Miño al igual que en otros ríos europeos, sin embargo, reflejan cifras proporcionales a la abundancia real. Por lo tanto, los datos históricos reflejan una verdadera disminución muy pronunciada de la abundancia. Así, se declaró un máximo de 50 t en la temporada 1980-1981, mientras que entre 2000 y 2012 el valor medio fue de sólo 3 t. Si comparamos estos datos con los procedentes de los ríos franceses Vilaine, Loire y Adour, observamos que siguen la misma tendencia, ya que pasaron de 113 t a finales de la década de los 70 del siglo XX a 36 t en la década de los 80 (Cobo *et al.,* 2011).

Alosas

Las dos especies europeas de alosas: el sábalo [*Alosa alosa* (Linnaeus, 1758)] y la saboga [*Alosa fallax* (Lacépède, 1803)], coexisten en la Península Ibérica, muchas veces en simpatría en algunos ríos. El conocimiento sobre ambas especies en España es bajo en comparación con el resto de Europa, las referencias apenas existen en trabajos generales (informes de presencia/ausencia y algunos de dudosa precisión taxonómica). En el contexto ibérico, la información disponible está virtualmente restringida a las poblaciones portuguesas, a las del Miño y a las poblaciónes de *Alosa fallax* del Ulla y del Ebro (Nachón *et al*., 2014).

El sábalo fue desde siempre la especie simbólica del río Miño, contando con una elevada importancia ecológica, económica y etnográfica en el tramo internacional. Sin embargo el análisis efectuado por Leite (1999) de las capturas de salmón, sábalo y lamprea en Portugal entre los años 1885 y 1993, con datos procedentes de la capitanía do Porto de Caminha, refleja un primer período comprendido entre 1885 y 1920 en el que esta especie fue predominante en las capturas, con un 91% del total. Más adelante las capturas de lamprea aumentaron hasta ser las más numerosas en el período 1960-1993, mientras que el salmón se mantuvo siempre entre un 0,3 y 0,4% del total de capturas. La pesca del sábalo fue la que más descendió: de los casi 1,5 millones de sábalos capturados entre 1914 y 1929 se pasó a 24.974 individuos entre 1978 y 1993. Por término medio se supone una variación de 77.305 sábalos/año a 4.664 sábalos/año. El descenso en el número de capturas coincide con la construcción del embalse de Belesar (provincia de Lugo), y se vio acentuado por la construcción de los restantes embalses en la cuenca.

La saboga sólo se ha registrado en Galicia en los ríos Ulla y Miño y, aunque se han citado ejemplares procedentes de la pesca deportiva en el río Eo, no hay ningún espécimen disponible que permita la identificación taxonómica correcta. En España, además, se conocen

poblaciones en los cursos bajos del Guadiana, Guadalquivir y Ebro. Por otro lado, la pérdida de hábitat accesible y de zonas de reproducción para ambas especies ha conducido a la aparición de individuos híbridos allí donde coexisten.

Según Nachón *et al*. (2013) las estadísticas oficiales de las descargas marinas (en kilos) producidas en todas las lonjas de Galicia durante un período de 17 años, desde 1997 hasta 2013, muestran que *A. fallax* y *A. alosa* son capturas accesorias de otras pesquerías. Más del 97,5% de las capturas de *A. alosa* se descargaron en las Rías Biaxas, siendo A Guarda el puerto más importante en cuanto a descargas (7.475 kg; 70,3% de las capturas totales). En Cambados y Vigo se descargaron el 14,9% (1.583 kg) y el 6,4% (684 kg) del total de las capturas respectivamente, seguidos de las descargas en la Costa da Morte: Malpica (493 kg; 4,6%) y A Coruña (259 kg; 2,4%). Por otro lado, todas las descargas de *A. fallax* se produjeron en las Rías Baixas, siendo Baiona el puerto más importante (215 kg; 96,4% de las capturas totales).

Las capturas de *A. alosa* mostraron considerables variaciones interanuales que se repitieron de manera cíclica a lo largo de toda la serie de datos estudiada. Se registraron tres picos en los años 2000, 2004 y 2008, con valores superiores a los 1.000 kg, después de sucesivos descensos en las capturas.

Las capturas marinas de *A. fallax* descargadas en la lonja de A Guarda siguieron una tendencia similar a la observada para las capturas de *A. alosa*, aunque existe un ligero desajuste entre ambas series de datos. De hecho, esas dos pesquerías mostraron la misma tendencia pero en algunos casos hubo un cierto desfase entre las dos series de datos, de manera que los picos de capturas producidos en una de las dos pesquerías se mostrarían en la otra pesquería el siguiente año.

En el período comprendido entre 1997 y 2007 no hubo capturas de *A. fallax* (en 2004 hay un registro de 2 kg). Desde 2008, las capturas ocurrieron de manera continua, mostrando variaciones anuales similares a las observadas para *A. alosa*. El mayor registro se produjo en 2009 con 80 kg.

Salmón

En lo tocante al salmón, las capturas siempre fueron sensiblemente inferiores a las de otras especies migradoras, debido fundamentalmente al tipo de migración, expresado en un menor número de ejemplares. Excepto en el río Miño, en el que el 74% de las capturas de salmón corresponden a la pesca profesional, el resto de estadísticas con las que se cuenta hacen referencia a la pesca deportiva en cursos de la cornisa cantábrica. En el pasado, los salmones

de los ríos gallegos constituyeron más de la mitad de las capturas de *S. salar* de toda España, aportando del orden de 12.000 ejemplares al año en las décadas de 1920 y 1930. A principios de la segunda mitad del siglo XX, las capturas totales en los ríos gallegos, incluido el Miño, llegaron a 2.000 individuos en los años más productivos. Desde 1980 el promedio ha bajado a c. 200. Entre 1949 y 1999 en los ríos que entran en el Océano Atlántico, se capturaron 230.000 salmones, de los cuales el 65% fueron capturados en Asturias, el 19% en Cantabria, el 14% en Galicia y el norte de Portugal y el 2% en el País Vasco y Navarra. A principios del siglo XXI, los reproductores sólo se habían observado en 32 ríos de la Península Ibérica (siete de ellos en Galicia y el norte de Portugal: Eo, Landro, Masma, Mandeo, Ulla, Lérez y Miño).

Reo

En la Península Ibérica, el reo (forma migradora de la trucha común) habita la mayor parte de los ríos que desembocan en el Mar Cantábrico y en el Océano Atlántico al norte de Portugal. El conocimiento de su biología y ecología en esta área geográfica es escaso, aunque en los últimos dos decenios se han publicado algunos trabajos sobre este tema. En general, la información sobre esta especie procede de datos oficiales de seguimiento de la pesca deportiva y en algunos casos de la procedente de estaciones de captura en determinados ríos. Las capturas en el mar sugieren que el reo no se aleja demasiado de la costa, pero se han detectado a más de 500 km del río de origen. En un análisis comparativo de poblaciones de reos ibéricos se ha observado que los ríos del sur de Galicia (Rías Baixas) muestran mayor crecimiento y menor longevidad que las poblaciones septentrionales (Cantabria), donde el crecimiento es menor pero los reos viven más tiempo y la proporción de iteroparidad es más alta (Caballero *et al*., 2006).

En España, las únicas comunidades autónomas con un cierto grado de información disponible sobre las tendencias de la abundancia de la trucha marina son Navarra y Galicia, que vienen registrando datos de adultos y esguines desde la década de los 90. El promedio de densidades de juveniles, en las áreas de reo de los ríos gallegos y en el Bidasoa, es relativamente bajo (ríos atlánticos de Galicia = 10,9 ind./100 m^2, ríos cantábricos gallegos = 10,29 ind./100 m^2 y río Bidasoa = 3,49 ind./100 m^2) y la tendencia en estos ríos es más o menos estable. No obstante, para los adultos se observa una disminución en las capturas de los tres capturaderos de Galicia y un aumento en el Bidasoa, probablemente porque en este último se hayan subestimado el número de reos en los primeros años del período de estudio (río Tea: 985 ind./año; Ulla: 266 ind./año; Lérez: 207 ind./año y Bidasoa 52 ind./año).

Con relación a las estadísticas de captura de la pesca deportiva, los cambios en el tamaño legal de captura han distorsionado la serie en Galicia, pero de todos modos se pasó de 3.000

reos declarados en 1995 a alrededor de 700 en los años 2011-2013. Analizando esta serie sin el efecto de cambio de límite de tamaño la tendencia es también negativa, como en la serie de trampas situadas en los ríos. Este descenso incluye el colapso de la población de reos del río Eume, el de mayores capturas oficiales, como consecuencia del drenando ácido de piritas ocurrido en 2007-2008.

Agradecimientos

El autor quiere expresar su agradecimiento, por la ayuda prestada durante la realización de este trabajo, al Dr. Sergio Silva Bautista y a D. David José Nachón García, investigadores de la Estación de Hidrobiología de la Universidad de Santiago.

Bibliografía

Antunes C., Cobo F. & Araújo M.J. 2015. *Iberian inland fisheries*. Freshwater Fisheries Ecology. John F. Craig Ed. Wiley-Blackwell. 268: 282.

Caballero P., Cobo F. & González M.A. 2006 Life History of a Sea Trout (*Salmo trutta* L.) Population from the North-West Iberian Peninsula (River Ulla, Galicia, Spain). In Harris G.S. & Milner N.J. (Eds). *Sea Trout: Biology, Conservation and Management*. Proceedings of First International Sea Trout Symposium, Cardiff, July 2004. Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 234 – 247.

Cobo F. 2009. Estado de conservación y pesquería de la lamprea de mar (*Petromyzon marinus*) en Galicia. *Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*, 11: 43-48.

Cobo F., Vieira-Lanero R., Rego E. & Servia M.J. 2010. Temporal trends in non-indigenous freshwater species records during the 20th century: a case study in the Iberian Peninsula. *Biodivers Conserv*. 19: 3471-3487.

Cobo F., Sánchez J., Vieira-Lanero R., Servia M. J., Barca S., Couto M., Rivas S., Nachón D., Silva S., Morquecho C., Gómez P. & Lago L. 2011. *Inventario do hábitat fluvial, os hábitats de interese comunitario, análise dos peixes migratorios e ordenación do seu aproveitamento no Baixo Miño* (INTERREG IV). Informe final del proyecto "INTERREG IV:Valorización dos recursos naturais da bacia hidrográfica do Miño-Minho".

Leite, A. 1999. *As pesqueiras do río Minho. Economia, Sociedade e Património.* Ed. COREMA, Caminha.

Mateus C.S., Rodríguez-Muñoz R., Quintella B.R., Alves M.J. & Almeida P.R. 2012. Lampreys of the Iberian Peninsula: distribution, population status and conservation. *Endangered Species Research*, 16: 183-198.

Mota M., Rochard E. & Antunes C. 2016. Status of the Diadromous Fish of the Iberian Peninsula: Past, Present and Trends. *Limnetica*, 35 (1): 1-18.

Nachón D.J., Silva S. & Cobo F. 2014. The twaite shad, *Alosa fallax* (Lacépède, 1803), in NW of Iberian Peninsula. *Workshop on Lampreys and Shads* (WKLS). Lisboa 27-29 November.

Nachón D.J., Mota M., Antunes C., Servia M.J. & Cobo F. 2013. Marine and continental distribution and dynamic of the early spawning migration of twaite shad (*Alosa fallax* (Lacépède, 1803)) and allis shad (*Alosa alosa* (Linnaeus, 1758)) in the north-west of the Iberian Peninsula. *Mar. Freshwater. Res.*, 67(8): 1229-1240.

Silva S., Barca S., & Cobo F. 2016. Advances in the study of sea lamprey (*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758) in the NW of the Iberian Peninsula. *Jawless Fishes of the World*. Volume 1. Alexei Orlov & Richard Beamish Ed. Cambridge Scholars Publishing. Newcastle upon Tyne. 346 - 385.

Accede a la presentación



MESA DE TRABALLO: MARISQUEO E PESCA DE BAIXURA

D. Gonzalo Macho. Investigador Postdoutoral en Cambio Climático e Recursos Pesqueiros da Universidade de Vigo e da University of South Carolina (USA)

D. José Alberto de Santiago Meijide. Fundación CETMAR

D. José Luis Escalante. CIPES (Centro de Interpretación da Pesca e da Salga)

Impacto de eventos extremos de salinidade e temperatura en ameixas e croque

Gonzalo Macho
Universidade de Vigo e University of South Carolina (USA)
ECIMAT, Illa de Toralla, s/n. 36631, Vigo (Pontevedra). gmacho@uvigo.es

Diversos factores poden ser causantes de estrés fisiolóxico en invertebrados mariños e limitar o desempeño ecolóxico dos organismos. Entre os factores de estrés, a temperatura e a salinidade son especialmente importantes debido a súa conexión co clima e coa meteoroloxía e como axentes fundamentais que limitan, ou favorecen, as taxas e o desempeño fisiolóxico dos organismos (Macho *et al.,* 2016). As curvas de desempeño amosan que en xeral pequenos incrementos do factor (i.e temperatura ou baixadas de salinidade) por riba dos valores óptimos de desempeño, poden dar lugar a descensos abruptos no rendemento fisiolóxico dos organismos, e polo tanto do seu desempeño ecolóxico, afectando fortemente ao crecemento, capacidade reprodutora, ... e incluso supervivencia.

Recentemente publicouse un extenso estudo para Galicia no que se avaliaron as evidencias do cambio climático na atmosfera, nos ecosistemas terrestres, peláxicos mariños e litorais, e se estudaron os impactos futuros nestes ecosistemas e máis na economía e na saúde (Pérez-Muñuzuri *et al.,* 2009). Esta iniciativa, coñecida como CLIGAL (Evidencias e Impactos do Cambio Climático en Galicia), recolleu evidencias e amosa un futuro con fortes cambios no clima de Galicia en diversos factores:

- O incremento de temperatura do aire media anual a mediados deste século podería duplicar a taxa actual. O efecto será máis acentuado no verán, especialmente nas temperaturas máximas (agárdanse incrementos de 2,75ºC), e se agardan tamén maiores e máis frecuentes ondas de calor.

- No horizonte dos anos 2075-2099 a temperatura media da capa superficial no océano adxacente a Galicia, estará entre 1 e 3ºC por riba dos valores actuais.
- Aumento evidente dos episodios de chuvia intensa no outono, mentres que diminúen na primaveira. Ademais, constátase que os eventos extremos de precipitación serán máis frecuentes no tempo.
- Ademais, dende o ano 1965 ata a actualidade observouse unha redución da extensión do período de afloramento (ventos costeiros de compoñente nordeste) do 30%, e unha redución da súa intensidade media do 45%. Isto deu lugar a que o tempo medio de renovación das Rías Baixas durante o período favorable ao afloramento aumentase de 10 a 20 días. Nestes anos observouse un descenso da produción neta do ecosistema de plataforma continental do 50% e do ecosistema de rías do 15%.

O impactos destes cambios nas comunidades de bivalvos se descoñecen en gran parte pola falta de series históricas, sen embargo, o proxecto CLIGAL si foi capaz de predicir unha diminución do crecemento do mexillón (*Mytilus edulis*) dun 50% no período 2075-2099, e do índice de condición dun 10%, a maiores dunha diminución do período de explotación de ata 70 días menos ao ano. Tamén predí un incremento da mortalidade de moluscos bivalvos, especialmente do berberecho e da cadelucha, por riadas, pero non obtivo datos concluíntes dos impactos do cambio climático nas especies de ameixa máis importantes para o marisqueo en Galicia.

No laboratorio ECOCOST da Facultade de Ciencias da Universidade de Vigo e en colaboración con Sally Woodin e David Wethey da University of South Carolina (EEUU), levamos dende o 2012 analizando os datos do marisqueo en Galicia e facendo experimentos nos que estudiamos o impacto de ondas de calor e baixadas de salinidade nas ameixas babosa (*Venerupis corrugata*), fina (*Ruditapes decussatus*), xaponesa (*R. philippinarum*) e no berberecho (*Cerastoderma edule*). O proxecto principal dentro do cal estamos a facer estes traballos é o proxecto MARISCO (Bancos de marisqueo en Galicia: prevención de riesgos producidos por eventos extremos sobre especies comercialmente importantes), financiado polo Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, do cal Elsa Vázquez é a investigadora principal.

Nestes estudos, que detallamos nas diapositivas da presentación que podedes ver a continuación, atopamos que as ventas históricas de ameixa babosa e fina en Galicia están descendendo mentres que a xaponesa está en aumento, e isto débese principalmente a que as capturas destas ameixas están a diminuír en moitos bancos intermareais de Galicia. A maiores, en varios destes bancos (por exemplo no interior da Ría de Pontevedra e Vigo) os días de peche dos bancos de ameixa están a aumentar por mor do incremento das mareas vermellas tóxicas.

Tras moitos experimentos de campo e laboratorio nos que sometemos as ameixas e berberechos a diferentes períodos e intensidades de baixadas de salinidade e olas de calor, en diferentes momentos do seu ciclo reprodutivo, observamos que cada especie ten capacidades moi diferentes para sobrevivir e limitar o impacto destes cambios.

A ameixa babosa é a especie máis afectada polas chuvias e polas altas temperaturas. As predicións de aumento de temperatura da auga do mar e do aire e de chuvias extremas, poderían traer no medio prazo unha desaparición desta especie no intermareal, quedando relegada a bancos submareais.

O berberecho é tamén unha especie que vai sufrir maiores eventos de mortalidade por chuvias e altas temperatura, xa que é moi sensible a ámbalas dúas variables. Sen embargo a súa plasticidade e rápida capacidade de recuperación, polas altas taxas de recrutamento e crecemento, danlle unha vantaxe que non ten a babosa. O impacto do patóxeno *Marteilia cochillia,* que está a dizimar o berberecho nas Rías Baixas non foi abordado neste estudo, e a súa relación co cambio climático, se a ten, é polo de agora descoñecida.

A ameixa fina ten unha alta resistencia as baixadas de salinidade, sen embargo é moi sensible a temperaturas extremas cando acaba de realizar a posta, xa que fai desove masivo nun curto intervalo de tempo ao final da maduración que a deixa, exhausta. É de esperar que eventos de mortalidade masiva no verán no intermareal sexan cada vez máis frecuentes.

A ameixa xaponesa é a especie mais resistente ao cambio climático (alta resistencia ás baixadas de salinidade e a ondas de calor), o que xunto con outras características (*i.e.* alto crecemento, maior resistencia aos patóxenos,...), podería explicar que esta especie vaia dominar os bancos marisqueiros intermareais en Galicia no medio-longo prazo.

O descenso de ameixa babosa e fina en favor da xaponesa implicaría un forte impacto socioeconómico nas mariscadoras a pé xa que se trata de especies locais de alto valor comercial, cun prezo de venda 2-3 veces maior que a xaponesa (o prezo medio en Galicia no 2016 foi de 8,7 €/kg para a xaponesa e de 15,6 e 27,3 €/kg para a babosa e fina respectivamente; fonte: www.pescadegalicia.gal).

Tendo en conta que o impacto do cambio climático vaise notar principalmente nos bancos intermareais e que o marisqueo a pé é unha actividade maiormente exercida polas mulleres (78,5% de mulleres e 21,5% de homes no ano 2016; fonte: www.pescadegalicia.gal), este impacto traerá asociado un desequilibrio de xénero xa que no marisqueo a flote, menos afectado, a maior parte dos mariscadores son homes.

Bibliografía

Pérez-Muñuzuri V, Fernández-Cañamero M & Gómez-Gesteira JL (coord.). 2009. Evidencias e impactos do Cambio Climático en Galicia. Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible, Xunta de Galicia. 724 pp.

Macho G, Woodin SA, Wethey DS & Vázquez E. 2016. Sublethal and lethal temperature stress on three of the primary venerid clams subject of fisheries exploitation in Europe. J. Shellfish Res. 35(2): 405-419. http://dx.doi.org/10.2983/035.035.0215.

Accede a la presentación



Percepciones sobre los factores dinámicos que intervienen en la primera venta de los mosluscos infaunales en Galicia

José Alberto de Santiago Meijide
Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR. Eduardo Cabello s/n. Bouzas. 36208 Vigo. jmeijide@cetmar.org; jadesantiagom@gmail.com

La primera venta en las lonjas, es un hecho relevante que se produce cotidianamente en todos los puertos de Galicia en los que se venden productos pesqueros. No siempre se hizo así y eso generó desequilibrios entre los agentes económicos, que realizan las transacciones de compra-venta de estos productos.

La primera referencia de la que tengo constancia, se generó a partir del conflicto de la sardina, entre 1900 y 1904 en Vigo, que enfrentó a los pescadores entre sí, por la introducción de una nueva arte de pesca fomentada por la industria conservera (cerco de jareta), que colisionaba con el tradicional (xeito) y los precios que pagaban las citadas industrias, por la sardina. El conflicto llegó a una magnitud tal, que obligó a intervenir al ayuntamiento de Vigo y en 1905, se inaugura la Lonja del Berbés, donde regía la subasta al estilo holandés; esto es, a la baja.

Hay lonjas repartidas por todo el litoral de España, pero su funcionamiento era dispar y la obligatoriedad de hacer la primera venta, no estaba del todo clara, por lo que había cierta diversidad de criterio a la hora de ejecutar las transacciones. En un sector tan regulado como el de la pesca, es inevitable que algo tan importante como la venta de los productos pesqueros, también lo esté.

Si bien no es el objetivo principal de esta ponencia, hacer una revisión exhaustiva de la normativa, se hace necesario hablar del marco legal, para establecer el "terreno de juego" en el que se va a mover la primera venta y su íntima relación con las lonjas.

El *Reglamento (CE) nº 1224/2009, por el que se establece un régimen comunitario de control para garantizar el cumplimiento de las nomas de la PPC,* comienza a establecer

las bases de la regulación de la primera venta. La legislación española, se hace eco de la legislación comunitaria en el *Real Decreto 418/2015, de 29 de mayo, por el que se regula la primera venta de los productos pesqueros*, estableciendo las bases de esta actividad, para todo el territorio español.

La legislación gallega (*D.419/93 y D.101/2006* que lo modifica), es anterior a la legislación española, pero no solo no la contraviene, sino que se adelantó a ella, seguramente a causa de la importancia del sector pesquero y marisquero de la CA de Galicia.

En el *art. 1.2 del RD 418/2015*, se define la primera venta como:

"*Aquella que se realice por primera vez dentro del territorio comunitario y en la cual se acredite documentalmente, el precio del producto pesquero con ocasión de su desembarque, o bien, cualquier otra modalidad de entrada en el territorio nacional (...)".*

Desde un punto de vista más intuitivo, podría decirse que la primera venta, es el momento en el cual, a un recurso natural, se le asocia un precio. Hasta ese momento, sí tiene un valor económico, porque tiene una utilidad potencial, una estima por parte del público, pero aún no se le ha adjudicado un precio de mercado.

La venta en lonja se ha constituido en un elemento de control de la producción y de la comercialización, siendo también un elemento básico, para uno de los pilares de la seguridad alimentaria actual, que es la trazabilidad.

Tal vez sea el momento para definir qué es una lonja y para ello se recurrirá al *art. 4,10, de la Ley de 11/2008 de Pesca de Galicia*, que define la lonja como:

"Son instalaciones situadas en los puertos gallegos en las que se deberán realizar las actividades de exposición y primera venta de los productos pesqueros frescos, así como las actividades de control del proceso de comercialización en origen"

En Galicia hay un total de 63 lonjas y establecimientos de venta autorizados. La distribución por Rías, es la siguiente:

- Ría de Vigo: 9
- Ría de Pontevedra: 6
- Ría de Arousa: 12
- Ría de Muros: 5

- Ría Coruña/Ferrol: 8
- Otras: 23

Como esta ponencia se centra en los moluscos bivalvos infaunales, indicar que del total de Galicia, son 50 las que habitualmente los ofertan. La mayoría de las lonjas salvo 5 excepciones, están en manos de las Cofradías de Pescadores y estas infraestructuras son elementos básicos, para el sostenimiento de las mismas.

En las lonjas deben venderse los productos pesqueros, que son los procedentes de la pesca extractiva, tanto marítima como de aguas continentales; los procedentes del marisqueo, de la acuicultura; la producción de algas y la recolección de argazos. (*R.D 418/2015.Art 1.1*).

Esta definición es muy amplia, ya que lo implica prácticamente todo. En la filosofía basal de este R.D, está el control integral de la venta y la trazabilidad, y no tanto el cómo se hagan las transacciones entre los agentes económicos.

Se permite que las lonjas y establecimientos autorizados de venta, puedan estar o no ubicados en recintos portuarios; se permite también, que el tipo de transacción, sea mediante subasta o no… Pero todo lo que se vaya a hacer, debe estar registrado previamente en la lonja.

La compra de mariscos en las lonjas, tiene una idiosincrasia muy particular, que incluso varían de una a otra. Uno de los actores fundamentales que intervienen en ellas, son los compradores. Entre ellos, se podrían diferenciar básicamente, tres tipos de compradores.

- Compradores de plantilla
- Compradores comisionistas
- Consumidor final

Las industrias (depuradoras, conserveras…), son los principales clientes de las lonjas gallegas para los moluscos bivalvos; éstas para acceder a las subastas, pueden autorizar por escrito a una serie de personas, para que hagan compras en su nombre. Aunque hay mucha casuística, en general estos pueden ser personal de plantilla de las citadas depuradoras o bien comisionistas externos a ellas.

El personal de plantilla de estas industrias, puede ser un asalariado o incluso el propio titular de la industria. En cualquier caso, conocen previamente el precio que pueden pagar, por un determinado bivalvo, en función de su talla, color, resistencia, etc., pero muy especialmente, en función de lo que el mercado está dispuesto a pagar por él.

El comprador comisionista, no pertenece a la plantilla de la industria, sino que compran para una o varias de ellas, quedándose una comisión por kilo de producto. Salvo que su cliente prefiera una lonja concreta, compran donde consideran oportuno y donde la gestión de la lonja, sea mejor para sus propios intereses, aunque con el condicionante de que su cliente tenga un aval que le permita comprar en la lonja elegida.

Por norma general, hay un acuerdo verbal entre el comprador comisionista y el industrial, en donde se estipula la comisión; ésta suele rondar 0,1-0,6 € por kilo. También acuerdan el tipo de bivalvo que necesita y la horquilla de precios que le es adecuado para competir en el mercado.

El acceso del comprador particular o consumidor final, a la primera venta, está restringido por los propios gestores de la lonja. De modo que puede dar acceso a la subasta o no, en función de los intereses de la lonja. En el caso de la subasta electrónica, con no ceder un mando… es suficiente.

Pero hay otra restricción legal que se establece en el *art. 4,7 del RD 418/2015* y tiene que ver con la prohibición expresa, de comprar moluscos bivalvos, gasterópodos, equinodermos y tunicados a particulares. Salvo éstos, podría adquirir, hasta 5 kilos de producto por día en el caso de Galicia.

Si se mira la evolución de la oferta de infaunales en las lonjas de Galicia, entre los años 2001 y 2015, se observa que el año 2008 es el de mayor oferta con más de 11.200.000 kilos. A continuación hay un descenso prolongado hasta 2014, donde se alcanza la menor oferta de todo el periodo estudiado, con poco más de 5.900.000 kilos.

Del mismo modo el valor de lo vendido, sigue una pauta similar, aunque con pendientes más suaves. En el año 2008 se alcanzó el máximo valor para ir decreciendo hasta 2013, a partir del cual comienza a ascender nuevamente, como consecuencia del ascenso de los precios promedio. En todo caso, la pérdida acumulada entre 2008 y 2015, es de más de 3.482.000 kilos y en valor superior a 13.666.000 €.

Un dato oficioso de ventas de las depuradoras de moluscos bivalvos indican que, la cantidad de moluscos blancos que venden anualmente está en torno a los 15 millones de kilos. Si este dato se verifica como real, supone que el marisqueo gallego está reduciendo su capacidad para surtir a sus clientes, por lo que éstos no tendrán más remedio que surtirse en otros lugares.

Por otro lado, los precios de nuestros competidores son sensiblemente más baratos que los gallegos. El precio medio de algunos bivalvos es elocuente; por ejemplo la almeja japonesa, el precio promedio de 2015 fue de 7,45 €/ kg mientras que la más cara de Portugal fue de 4-4,5 €/kg. El berberecho de Galicia tuvo un precio promedio de 5,06 €/kg, mientras que el

escocés llegó a 3,97 €/kg. Otro ejemplo es la navaja; la gallega tuvo de precio promedio 8,75 €/kg, mientras que la holandesa llega a España a 3,70 €/kg.

Otra ventaja que tiene el bivalvo foráneo es la estabilidad en el precio, frente a la alta variabilidad de los precios que se alcanzan en lonja, que no siempre puede repercutirse a los clientes. La mayor parte de los clientes prefieren una estabilidad en los precios que un ajuste continuo en los mismos.

Tal vez sea interesante ver que rías son las que contribuyen a la oferta de moluscos bivalvos de Galicia, tanto en kilos como en valor. La ría de Arousa, es la que más contribuye, con un 53% en kilos y un 54% en valor. Le sigue la ría de Noia, con un 20% en kilos y un 18% en valor.

Así pues, más del 90% de la oferta de moluscos bivalvos y de su valor económico se obtiene desde la ría de Muros/Noia a la ría de Vigo. El resto de Galicia es sólo el 7-8% del total.

Volumen y precio son los dos factores que condicionarán el valor de la pesca expuesta en las lonjas. Hay una serie de elementos que intervienen tanto sobre el volumen de producto que se va a ofertar en las lonjas como en el precio que van a alcanzar, siendo de diversa índole.

- Ambientales: riadas, temporales, contaminación, cambios en las corrientes…
- Económicas: periodos de crisis, desempleo…
- Institucionales: cambios en la política pesquera, modelos de gestión de los bancos naturales…
- Biológicas/sanitarias: cambios de estatus sanitario, periodos de biotoxinas,
- Sociales: cambios de gustos por parte del mercado, sistema de trabajo de los productores…
- Comerciales: características propias del producto, del establecimiento en el que se venden, redes comerciales, competencia…

Esta ponencia se va a centrar en dos factores que han llamado la atención, y son los relativos al propio producto y a las lonjas. Se van a presentar los resultados preliminares de una investigación que se está llevando a cabo. Durante el trabajo previo, llamó la atención que los precios no parecían estar acordes con la oferta; o que bivalvos de zonas limítrofes, tuvieran precios muy dispares, cuando *a priori*, no parecen diferentes o incluso pertenecen a un mismo

banco natural, solo dividido por causas administrativas; o lo que es más llamativo, que un lote que se ha dividido en dos partes, alcance en una lonja un precio 25 ó 30 % más que en otra.

Esto sugirió la necesidad de preguntar a los clientes de las lonjas, cuáles son esos factores que hacen que se pague más por un producto que por otro. O por qué decide ir a una lonja u otra.

Antes de comentar los resultados de las encuestas, debe establecerse una premisa de partida:

"*Los agentes económicos, desean optimizar su utilidad"*.

Entendiendo por ello, en este caso, que:

- El productor, quiere extraer el producto con el mínimo esfuerzo y venderlo al mayor precio posible.
- Un comprador asiste a una lonja determinada porque espera satisfacer sus necesidades de abastecimiento en calidad y cantidad, al mínimo coste posible.

Dentro de estos costes, también se incluyen, distancia a su residencia habitual, el transporte, conveniencia de horarios, mecanización, gustos de sus propios clientes…

Partiendo de estas premisas, se analizan los resultados preliminares que se están obteniendo de las encuestas que se están realizando. A cada factor se le da un valor entre 1 y 5; tal que 1 es la mínima importancia y 5 es la máxima.

En cuanto a los **factores dinámicos relacionados con el producto**, la mayor importancia se la han dado al tamaño; donde en general a mayor tamaño, mayor precio, aunque existe un límite superior, a partir del cual, no se incrementa el precio y en algunas especies, incluso disminuye. Esto tiene varias explicaciones, por un lado el consumidor final no gusta de un marisco tan grande y por otro la relación peso de valva/peso de carne es excesiva, de modo que una mortalidad normal, supone una gran merma en kilos.

El siguiente factor es el color y el brillo de la concha. Son más apreciadas las de tonos claros, homogéneos, sin manchas y brillantes. Se penalizan los lotes con tonos oscuros y opacos.

Seguidamente está la supervivencia en las piscinas de depuración, aspecto especialmente relevante para los depuradores. Algunas especies, en ciertas épocas del año, se ven penalizadas por la alta mortalidad en las piscinas. También se valora mucho, la supervivencia en el mercado, dado que tienen que estar vivos durante su comercialización. En caso contrario, pueden ser objeto de decomiso y por tanto, genera problemas de reclamaciones con el cliente y de índole interna, que incrementan los costes de transacción.

La forma de las valvas, también es un aspecto que se tiene muy en cuenta a la hora de pagar más o menos por un bivalvo. Las valvas deben carecer de deformaciones o hendiduras en sus bordes. El umbo, debe ser liso y sin desconchar.

El estado gonadal también es un aspecto importante por varios motivos. Si se observa desde el punto de vista biológico, es evidente que el reclutamiento se ve favorecido, cuanto más reproductores estén lanzando sus gametos al medio.

Pero desde un punto de vista comercial, también es importante, sobre todo cuando su destino es la industria conservera. Un bivalvo que tenga riesgo de desovar en la lata, puede estropear el contenido de la misma. Aunque para el fresco también es un aspecto a tener en cuenta, pues los bivalvos sometidos a un intenso estrés reproductivo, son menos resistentes a la desecación y en ocasiones generan olor. A pesar de lo dicho, no se le ha dado tanta importancia como cabría esperar.

La resistencia de las valvas a los golpes, se valoró como la segunda menor importancia. Algunos bancos naturales producen mariscos con valvas más resistentes que otras a los golpes, esto hace que el lote se deteriore menos durante los diversos transportes y manipulaciones que debe sufrir, desde que se pesca hasta que llega al consumidor final. Este es un factor importante de supervivencia y por tanto de merma, en las distintas fases de la comercialización.

Las líneas de crecimiento es el factor al que se le ha dado la menor importancia, aunque los encuestados indican que deben ser homogéneas y sin irregularidades que le den un aspecto abombado, pues tienden a que su biometría dorso-ventral sea casi igual a la antero-posterior. Estas líneas de crecimiento en "escalera" se asocian a malas condiciones ambientales, que reducen las tasas de crecimiento durante un período de tiempo más o menos largo.

Así pues, una coloración oscura, discontinua y mate, el umbo desconchado, las líneas de crecimiento en "escalera", le dan un aspecto avejentado al bivalvo, que reduce su precio en lonja.

En cuanto a los **factores propios de la lonja**, se pueden destacar los siguientes.

Al que más importancia se le ha dado es, al porcentaje de merma que debieran aplicar las lonjas. Indican que las lonjas ajustan en exceso el peso y cuando hay ejemplares rotos, solo recaen los costes del lado del comercializador. Algunas lonjas dan un porcentaje en algunas especies, aspecto que las hace más atractivas.

El siguiente factor es "*ex aequo*", para la cantidad y variedad de marisco que hay en la subasta. La oferta que ofrece la lonja, tanto en variedad como en cantidad de bivalvos, influye en la decisión de asistir o no a una determinada lonja, a pesar de la posibilidad de conseguir un precio mejor ante la ausencia de competidores en otras lonjas menos concurridas.

Este aspecto puede verse desde dos puntos de vista: como productor o como comercializador.

Si se aborda desde el punto de vista del productor, es evidente que si tiene poca oferta tanto en kilos como en variedad de especies de bivalvos, puede no ser atractivo para los comercializadores y que estos no asistan a pujar por el marisco. O bien, que sean pocos los compradores y la competencia entre ellos se vea diluida.

En este sentido, se están dando casos donde cofradías a cuyas lonjas no ha asistido ningún comercializador y han tenido que ir ofertando su producto directamente a las depuradoras. Es evidente que por debajo de un nivel de extracción diaria, los productores son vulnerables y deberían realizar alianzas estratégicas con otras cofradías. De hecho, se está dando el caso que productores de determinadas cofradías prefieren ir a otro puerto a vender su pesca porque obtienen mejores precios y les compensa, a pesar de que el porcentaje que le retiene la lonja sea superior a la de su puerto base, incluso contando con el gasto extra de combustible.

Si se aborda este aspecto desde el punto de vista de los comercializadores, deberemos hacer diferencias en función del volumen de ventas que realizan. Si el comercializador tiene una pequeña empresa familiar, con una depuradora de poca capacidad, sí le interesa ir a lonjas donde la oferta es de poco volumen y donde los clientes industriales con grandes plantas de proceso no asisten habitualmente.

Un industrial con una gran planta, cada vez que va a la lonja, tiene que comprar obligatoriamente. No puede perder el tiempo en lonjas con oferta muy pequeña, con poca variedad de producto; no puede permitirse enviar un empleado y un vehículo a perder el tiempo a esa lonja, donde en la primera parada de la subasta puede llevárselo todo o bien no obtiene la cantidad, variedad y calidad que necesita.

Por tanto, este tipo de comercializador prefiere una lonja grande, con buena calidad, variedad de especies y tallas; a pesar de que sepa que en lonjas pequeñas podría comprar a mejor precio, no puede arriesgarse a quedar desabastecido.

Los compradores comisionistas, de los que se ha hablado en el apartado anterior, también prefieren las lonjas con ofertas elevadas en cantidad y variedad, ya que ellos cobran un porcentaje por kilo; por tanto, también les interesan las cantidades grandes.

Si se habla de la conserva, este aspecto de la oferta se hace todavía más importante si cabe. Los industriales reciben muestras de la lonja y examinan el estado del bivalvo (estado gonadal, % en carne…); si el estado es óptimo, se lo hacen saber a los productores que extraerán el bivalvo. La extracción debe ser en grandes cantidades, dado que a una conservera sólo así le compensa (sueldos, electricidad, etc.) montar una línea de procesado. Por

eso prefieren ir a donde saben que va a haber grandes cantidades de bivalvos, en óptimas condiciones para su industria.

Cómo se tratan los bivalvos en la lonja lo han colocado en cuarto lugar. En algunas lonjas se utilizan medios mecánicos de selección, los cuales no siempre son adecuados, pues aportan factores de labilidad. Estos factores afectan más o menos en función del sistema mecánico que utilicen y de la especie de bivalvo que sufra el proceso.

Algunas especies como el berberecho, son muy sensibles a la vibración de las tamizadoras industriales, sobre todo las de vía seca; este tipo de tamizado puede ser adecuado cuando el bivalvo se destina para uso industrial (conserva), pero inadecuado para el fresco pues genera mortalidades elevadas durante el proceso de depuración.

Como tratan los mariscadores el producto se situó en quinto lugar. La supervivencia de los bivalvos empieza a ser condicionada desde el momento en que son extraídos; los comercializadores son buenos conocedores de como los mariscadores de las distintas cofradías tratan el producto a bordo, en qué condiciones se estabulan y se protege su vitalidad. Así pues, la experiencia les dicta qué marisco va a aguantar mejor los procesos de depuración, expedición y puesta a la venta.

El sistema de cobro de las lonjas se situó en sexto lugar. La explicación es, según los encuestados, que todas funcionan igual. La mayor parte de las lonjas facturan semanalmente las ventas realizadas a los compradores. Por su parte, éstos suelen cobrar las ventas que hacen a sus respectivos clientes en el mejor de los casos a 30 días.

Se produce entonces un desfase temporal en el sector comercializador, entre lo que ellos deben pagar a las lonjas y cuando ellos reciben el pago de sus propios clientes. De este modo, cuando el sector de la comercialización recibe el dinero de sus ventas, ya ha tenido que adelantar previamente este dinero a la(s) lonja(s).

Esto se debe a que en el sector marisquero generalmente se paga a la semana a los productores. De este modo, la lonja se ve en la obligación de facturar a sus clientes semanalmente, para poder hacer frente a los pagos a los mariscadores. Tal vez éste sea un aspecto que haya que adaptar a los nuevos tiempos dominados por la globalización.

Después de todo lo dicho, tal vez puedan sacarse unas pocas **conclusiones**, que centraríamos en lo siguiente:

- La primera venta de pescados y mariscos debe hacerse en las lonjas y centros autorizados por las CCAA.

- La oferta local en Galicia se ha ido reduciendo desde 2008, con un pequeño repunte en 2015. En términos de porcentaje la reducción es de un 31% en kilos y de un 17,5% en valor.
- Los factores que influyen en la primera venta son variados y complejos, se retroalimentan entre ellos y en la mayoría de los casos inciden más que el volumen y el precio. Dichos factores hacen tomar decisiones tanto a vendedores como a compradores, atendiendo a la utilidad potencial que esperan obtener.
- El productor, aunque generalmente vende en la lonja de su puerto base, puede decidir en donde vender, ya que es cada vez más consciente de que el precio que va a alcanzar su producto, no tiene que ver necesariamente con la calidad del mismo.
- Los compradores toman decisiones similares. Necesitan un determinado tipo de producto, una calidad determinada, pero también valoran mucho la cantidad y variedad de los productos que se exponen en la lonja. El comprador va a comprar, pues no puede arriesgarse a no surtir a sus clientes.
- Estos factores hacen que una lonja sea más apetecible que otra, tanto para vendedores como para comparadores, lo cual puede variar a lo largo del tiempo. Esto es, su competitividad relativa va variando a lo largo del tiempo.

Accede a la presentación



Investigación y desarrollo tecnológico de las pesquerías de moluscos en las rías

José Luis Escalante González
Salgadeiras de Moreiras, espazo museístico. Concello do Grove. Praza do Corgo s/n
36980 O Grove. Pontevedra. España. jlescalante6@hotmail.com

Resumen

Este trabajo pretende ofrecer una aproximación a las innovaciones que se fueron produciendo en el trabajo y los instrumentos empleados por los mariscadores de moluscos de las rías gallegas a lo largo de la historia. Pensamos que para una buena comprensión de esta actividad convendría apostar por un protagonismo de la imagen fotográfica.

Palabras clave

Marisqueo, Molusco, Recolección, Arte de pesca, Concheiro, Rastro, Arenal, Rías, Prehistoria, Galaico-Romano, Puerto, Embarcación.

Introducción

El marisqueo es una actividad que no ha cambiado en muchos aspectos a lo largo de los tiempos, pero para obtener una perspectiva adecuada de la evolución de los métodos y

utensilios usados es necesario remontarse a los inicios del contacto de los humanos con el medio marino.

A través de la historia ha habido épocas de mayor actividad haliéutica, como en los siglos de dominación romana, y otras de decadencia, motivadas generalmente por causas de origen social y económico que afectaron a las poblaciones ribereñas.

Las líneas de investigación que estudian el instrumental pesquero de la Antigüedad se encuentran aún en sus fases iniciales. Desde la década de 1970 se ha incrementado el número de estudios relativos a este campo de la antropología.

También desde mediados del siglo XX con la difusión de los motores marinos, la sustitución de las fibras vegetales por el nylon, el acero inoxidable, el poliéster y otras innovaciones técnicas en el mundo del mar, se ha visto incrementado en la actualidad el esfuerzo pesquero, a la vez que se han mejorado las condiciones de trabajo de las mujeres y los hombres del mar.

Materiales y métodos

El trabajo se ha llevado a cabo mediante visitas a diversos puertos de las Rías Baixas desarrollando entrevistas con los marineros y mariscadores/as, usando además la documentación y el material recogido, durante los últimos años, en el centro interpretativo de la pesca y la salazón **Salgadeiras de Moreiras** de O Grove.

La investigación el desarrollo y la innovación

En la expresión I+D+I podemos definir la *investigación* como una inversión de tiempo y recursos con el fin de obtener conocimientos. Con la *innovación* invertiríamos esos conocimientos adquiridos para conseguir mayores recursos.

En el mundo del mar esta investigación inductiva la realiza tradicionalmente el marinero o la mariscadora, estudiando las costumbres de los animales marinos, las condiciones del mar donde trabajan, climatología, tipo de fondo etc. Y así comunican o explican al artesano o al técnico (cuando no pueden realizarlo ellos mismos) las necesidades de modificación o confección de un instrumento determinado para el marisqueo, un tipo de embarcación idónea, etc.

Los inicios del marisqueo

El marisqueo ha pervivido en el tiempo a lo largo de milenios, contribuyendo al desarrollo de las comunidades que vivieron próximas al mar.

El comienzo de la actividad pesquera podemos encontrarlo en la recolección de moluscos en la bajamar, de la misma forma que el hombre del paleolítico recogía frutos silvestres.

El mar es una gran fuente de recursos alimenticios y para conseguirlos no se necesita en principio una tecnología desarrollada, sobre todo cuando el recurso abunda. Basta a veces con usar las manos, un palo o una piedra para recoger moluscos bajo la arena o arrancarlos de la roca a la que se fijan.

Existen en los últimos años estudios que documentan evidencias de la explotación de recursos marinos ya por los Neandertales, tanto en las costas mediterráneas como atlánticas de la Península Ibérica. Predominan en estos hallazgos los moluscos, sobre todo del genero Patella. Aunque este gasterópodo puede recogerse golpeándolo con una piedra más o menos plana, algunos arqueólogos apuntan la posibilidad de que se usaran para ello durante la prehistoria herramientas líticas más elaboradas, como *picos triedricos achelenses y bifaces*.

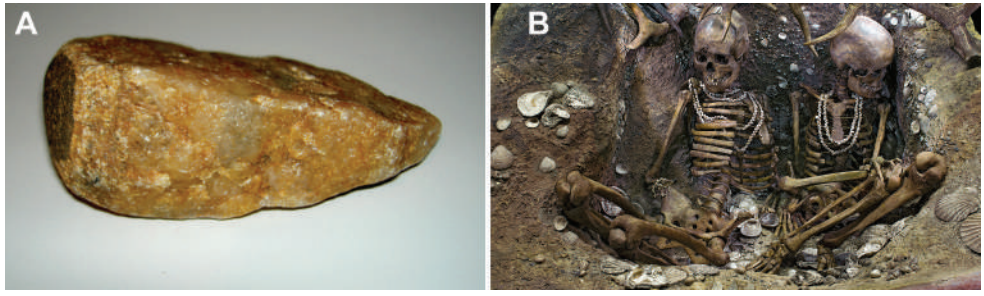


Figura 1.-(A) Bifaz. Herramienta lítica multiusos. **(B)** Enterramiento de Théviec. Bretaña, 6.700 años B.P.

Es importante tener en cuenta que el uso de las conchas de moluscos tuvo durante la prehistoria gran importancia ornamental y artística, también con simbolismo religioso, e incluso fueron usadas como moneda.

Los concheiros de los castros gallegos

Los *concheiros*, acumulación de restos de conchas en zonas concretas de los castros costeros, producto de los desechos de cocina y otros desperdicios, nos proporcionan mucha información sobre el aprovechamiento de los recursos marinos en la Edad del Hierro e incluso ya en la cultura Galaico–Romana.

De la cantidad y variedad de especies halladas en ellos se deduce que la pesca y el marisqueo tuvieron notable importancia para sus moradores. Abundan los gasterópodos y bivalvos de la zona intermareal próxima a cada asentamiento. Las especies que habitan en sustrato arenoso como las almejas (*Venerupis* spp.), berberechos (*Cerastoderma edule*) y longueirones (*Solen marginatus*), son los más frecuentes, aunque también abundan en algunos yacimientos las de sustrato rocoso como lapas (*Patella* spp.), bígaros (*Littorina littorea*) y mejillones (*Mytilus galloprovincialis*).

Debido a lo perecedero de los materiales usados para su recolección quedan escasas pruebas arqueológicas de los instrumentos usados específicamente, aunque cabe suponer que se emplearían aperos utilizados también para labores agrícolas, como hoces, rastrillos de madera o pequeñas azadas.



Figura 2.- *Fouciña* para mariscar navajas y almejas y *rasquetas* del berberecho. Expo. Salgadeiras de Moreiras.



Figura 3.- *Sachas* usadas en O Grove *y ganchelo* de Vilanova. Marisqueo de almeja "ao buraco". Expo. Salgadeiras de Moreiras.



Figura 4.- Diversos aperos de labranza usados para el marisqueo. Horquilla para navajas, angazo y sachos. Expo. Salgadeiras de Moreiras.



Figura 5.- Fisgas para longueirón. Expo. Salgadeiras de Moreiras.



Figura 6.- Varios tipos de raspas para percebe y mejillón. Expo. Salgadeiras de Moreiras.

A lo largo de todas las costas del planeta podemos encontrar similitudes en los métodos y herramientas usadas para la pesca, aunque también existen muchos elementos con tipologías locales propias.

En 1792 Antonio Sañez Reguart describe e ilustra en su obra **"Diccionario histórico de los artes de la pesca nacional"** modos y útiles sencillos del marisqueo de la época, que probablemente tengan su origen en tiempos muy anteriores.

Entresacamos algunos párrafos de esta obra:

"*…otros llevan un tosco cuchillo con el que escavan aquella parte de los arenales en que por disposición exterior del terreno y por ciertos agujeritos que hay en la superficie saben que se hallan almejas y otras conchas que extraen".*

"…otros usan la desechada o vieja hoz… "

"Algunos también se valen de la especie de azadón a causa de que el marisco está más interiorizado en la parte del arenal en que le buscan".

Cita también la normativa expresada en las Ordenanzas de Marina de la provincia de Pontevedra de 1768, que en su artículo XXIV dice:

"Se declara que también hay para pescar la ostra el instrumento del Rastro; pero este no debe ser de hierro sino de palo, o pescar con Tangas, según se practica en Rianjo o con Angazo, según se usa en Puente San-Payo, y al que usase rastro de hierro se le sacarán mil maravedíes de multa, y se tomará por perdido dicho instrumento".



Figura 7.- Escena de marisqueo con rastrillos. Sañez Reguart, 1792.



Figura 8.- Utilización de animales en las faenas de marisqueo. Sañez Reguart, 1792.



Figura 9.- Mariscando con *legón* en la ría de Pontevedra. Año1920. Foto Pintos.



Figura 10.-Recogiendo almejas del vivero, con *sacha*. O Grove 1961. Foto Dieuzaide.

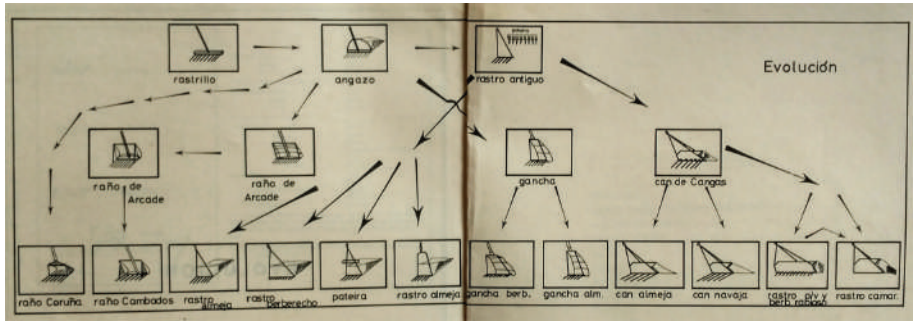


Figura 11.-Evolución de los diversos tipos de rastros y endeños en la ría de Arousa. Según Arnaiz y de Coo, 1978.



Figura 12.- (A) Mariscando con angazo. (B) Mariscadoras en Moreiras. Moreiras. Año 2016.

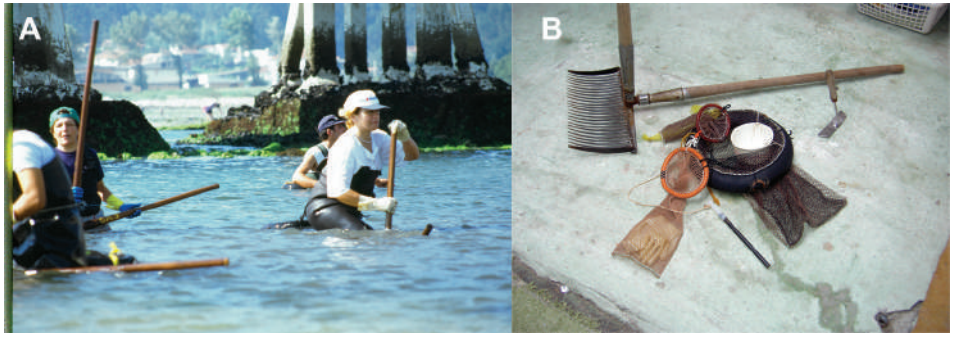


Figura 13.- (A) Mariscando con Horquilla. O Grove Año 2013. **(B)** Horquilla para almejas y accesorios.



Figura 14.- Modelo de carrillo usado por las mariscadoras de Cambados. O Sarrido.



Figura 15.- Otras adaptaciones para el transporte.



Figura 16.- Mariscadora de Campelo con carrillo.

Innovaciones en el marisqueo a flote



Figura 17.- (A) Armazón de rastro. **(B)** Raño. En la década de 1960 sustituyó al rastro de almeja.



Figura 18.- Del neumático de camión como protector del costado y el hombro al de neopreno, de elaboración casera.



Figura 19.- Molinete manual con su rastro. Fue muy utilizado en la década de 1970 para la pesca de navaja en la playa de A Lanzada.



Figura 20.- Lancha de poliéster con tres raños provistos de sus respectivas planchas de aluminio, colocadas para que al efectuar la largada del arte éste planee alejándose del punto de fondeo. San Tomé. Cambados, 2016.



Figura 21.- Molinetes (o carreteles) hidráulicos en planeadora. Para tres tripulantes. San Tomé. Cambados, 2016.

Los tubos de PVC empleados, de longitud aproximada a los 4 m. y grosor de entre 2 y 3 cm., van unidos (*encanados*) mediante tornillos de fijación (macho-hembra). Estos tubos, muy flexibles y ligeros sustituyen, a partir del "enchufe" o "funda", que es el primer tramo de la vara del *raño,* a las antiguas varas de eucalipto que se iban uniendo por tramos mediante ligaduras de cordel. El enchufe en la actualidad aún puede ser de madera o también de hierro galvanizado.

Los pequeños molinetes, derivados de los "haladores", van provistos en su interior de una corona dentada de goma que permite la sujeción de las varas a medida que son izadas.

Este sistema de izado permite trabajar "a la vara" en profundidades cercanas a los 40 m., reduciendo en gran manera el esfuerzo requerido para este trabajo a tal profundidad.

Tiempo atrás se usaba en Cangas un sistema parecido pero el molinete, en forma de muñón, izaba un cabo que estaba sujeto al empalme de la funda con el raño.



Figura 22.-Modernas embarcaciones para el marisqueo a flote en el puerto de Tragove. Cambados. Con motores fueraborda de entre 40 y 50 CV. Año 2016.



Figura 23.- "Rasteiros" faenando en Moreiras. O Grove, 2016.



ENDEÑO.—Arte de arrastre, muy corriente en algunos puertos de mar de nuestras costas bajo distintos nombres, porque yo le conozco por endeño, rastro, almejero, coquinero y otros; pero el que aquí se describe es el que le llaman en Galicia endeño en unos sitios y rastro en otros (véase esta voz), y que se dedica a la pesca de la ostra, de la zamboriña, de la aviñeira, de la almeja y del verberecho, y hasta a veces cogen también con el endeño cangrejo pequeñito.

Se compone el endeño de una armazón de hierro o de madera, de formas muy variadas, que lleva sujeto un saco de malla de red, de cabo bastante grueso, la cual, al arrastrar, mete dentro piedras y cascajo, que luego se escoge separando las ostras y demás mariscos.

Este arte se emplea siempre desde una embarcación pequeña, tripulada por dos hombres, que o bien van bogando poco a poco o camina el barco a la vela, y de cuando en cuando levantan la red recogiendo lo que haya dentro y devol-

Figura 24.- Benigno Rodriguez Santamaria, 1923.



Figura 25.- "Can da ameixa", endeño remolcado para la pesca de almeja roja (*Venerupis rhomboides*) en profundidad, de uso muy restringido por las leyes de pesca actuales. Foto Salgadeiras de Moreiras.



Figura 26.- En los arenales de Carril se usaba un sacho de pala apuntada por estar a menudo el terreno muy compactado. Foto Salgadeiras de Moreiras.

En los parques o viveros de moluscos de Carril, próximos a la isla de Cortegada y a la playa de Compostela, se emplea un sistema para recoger las almejas estabuladas consistente en acoplar, a la tradicional "gancha", un tubo para bombear agua desde una motobomba que va arrastrada por el mar sobre un flotador. Esta forma de recoger los moluscos que aquí se cultivan, permite disminuir el esfuerzo realizado por los parquistas al ablandar el terreno. Este innovador y eficaz método de extracción tiene sus inconvenientes al dañar la semilla en épocas de reproducción e interferir negativamente en los desoves, por lo que es desaconsejable usarlo en las épocas en que estos se producen.



Figura 27.- Foto Monica Irago. Diario La Voz de Galicia. Enero de 2016.

Agradecimientos

A todos las mariscadoras y mariscadores que han colaborado con sus opiniones y su inestimable información acerca de su trabajo en el mar.

Bibliografía

Arnaiz R. & de Coo A. 1978. *Artes de marisqueo usadas en la ría de Arosa*. Plan de Explotación Marisquero de Galicia. 103 pp.

Calo Lourido F. *As artes de pesca*. 1980. Museo do Pobo Galego. Santiago. 87 pp.

Casimiro-Soriger Escofet M. & Hernando J.A., 2011 Marisqueo y mariscadores en la actualidad. *Pescar con arte*. Servicio de publicaciones de la Universidad de Cadiz. 55-64 pp.

Figueras A. 1979. Explotación de los recursos marinos renovables de la zona costera de Galicia. *Estudio y explotación del mar en Galicia*. Universidad de Santiago de Compostela. 269-320 pp.

Rodriguez Santamaría B. 1923. *Diccionario de artes de pesca de España y sus posesiones*. Sucesores de Rivadeneyra S.A., Madrid. 815 pp.

Rolán E. 1993.*Guia ecolóxica das cunchas e moluscos de Galicia*. Edicións Xerais de Galicia. 196 pp.

Sañez Reguart A. 1792. *Diccionario histórico de los artes de la pesca nacional*. Madrid.

Vazquez Varela J.M. & Rodriguez Lopez C. 1999. El aprovechamiento de los recursos marinos en la prehistoria y la antigüedad de Galicia. *Boletín do Museo Provincial de Lugo*. Nº 9. 335-366 pp

CONFERENCIA MAXISTRAL

D. Stanislaus Sonnenholzner. Director do Centro Nacional de Acuacultura e Investigaciones Marinas. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador

Acuicultura del Ecuador: actual aporte del CENAIM-ESPOL

Stanislaus Sonnenholzner
Centro Nacional de Acuacultura e Investigaciones Marinas – Escuela Superior Politécnica del Litoral (CENAIM-ESPOL), Ecuador. ssonnen@espol.edu.ec

Introducción

Ecuador, hasta los momentos, ha sido un país monoproductor en acuicultura, llegándose a estimar para el presente año cosechas que rondan sobre las 350.000 t de camarones, lo cual lo hace ser un referente mundial. Sin embargo, las demandas de alimento a nivel global, la necesidad de restauración ecológica y la misma alternativa de producción para el sector camaronero ecuatoriano, así como los riesgos de desequilibrio en la producción de camarón por enfermedades emergentes y otros factores ya acontecidos en décadas pasadas, hacen necesario e imperativo la diversificación de la acuicultura en Ecuador.

En este sentido, ya se están consolidando esfuerzos y existe producción comercial de algunas otras especies, particularmente dulce acuícolas, que en conjunto aportan muy poco al volumen de producción acuícola de Ecuador, pero que se encuentran en vías de desarrollo. La maricultura aún no se ha desarrollado, sin embargo se comienza a implementar algunas tecnologías en moluscos, peces y equinodermos.

El presente trabajo hace una sinopsis de la acuacultura en Ecuador en función de su diversificación, y el esfuerzo en investigación que ha realizado y está realizando el CENAIM-ESPOL para ello, en acompañamiento particularmente de la Secretaria Nacional de Educación Ciencia y Tecnología (SENESCYT) y la Subsecretaría de Acuicultura del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (SA-MAGAP).

Cultivo de camarón (*Penaeus vannamei* Boone, 1931)

La acuacultura del Ecuador nace accidentalmente a mediados de los años 60, cuando pequeños embalses localizados en zonas de manglar del estuario del Golfo de Guayaquil se llenaban durante las más altas mareas, trayendo consigo larvas de camarón, los cuales después de un determinado tiempo eran cosechados. Estas primeras experiencias cementaron las bases para las primeras granjas de camarón siguiendo los diseños de otros países, principalmente de Panamá. Los primeros registros históricos de producción de camarón en cautiverio datan de 1976 con un total 1.318 toneladas , siendo el camarón blanco *Penaeus vannamei* la principal especie de cultivo.

El cultivo de camarón ha experimentado desde entonces un crecimiento vertiginoso, alcanzando en el 2015 un total de 327.000 toneladas exportadas. Desde el año 2000, luego de la epidemia del Virus de la "Mancha Blanca", el crecimiento anual ha sido sostenido (16% anual). Las exportaciones de camarón ocuparon el segundo lugar de las actividades comerciales no petroleras del Ecuador con un valor de 1.278 millones de dólares en el 2012, después del banano y el plátano (Fig. 1).

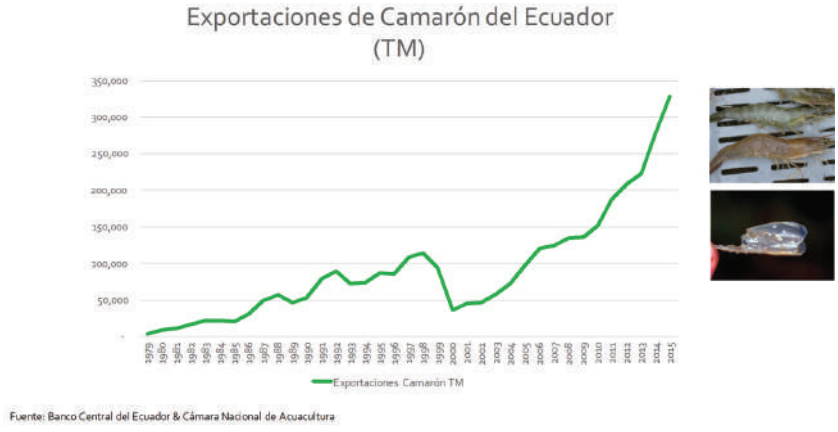


Figura 1.- Exportaciones del camarón *Penaeus vannamei* en Ecuador (1979-2015), mostrando eventos de enfermedades que condicionaron la producción.

Existen actualmente 212.000 hectáreas registradas de fincas camaroneras, distribuidas principalmente en las provincias del Guayas (65%) y El Oro (19%). El restante 15% se encuentra en las provincias de Manabí y Esmeraldas (Fig. 2).

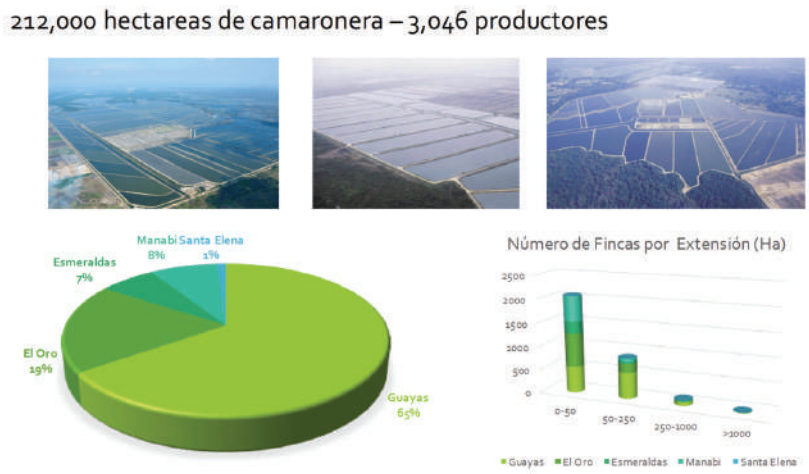


Figura 2.- Distribución porcentual de hectáreas de producción de camarón por provincia y número de camaroneras por tamaño de granja. Fuente: Cámara Nacional de Acuacultura del Ecuador

Se estima un total de 3.046 productores camaroneros, de los cuales el 68% posee granjas con extensiones menores a 50 hectáreas. Un 28% de los camaroneros tiene extensiones mayores, entre 50 a 250 hectáreas, y el 4% restante posee extensiones superiores a las 250 hectáreas. El sector camaronero participa con un 5% de la población empleada del Ecuador, contribuyendo con un total de 180.000 plazas de trabajo directas e indirectas. Se estima que por cada 10 empleos generados en la actividad camaronera se crean 9 empleos adicionales indirectos, contribuyendo así significativamente a la economía del Ecuador.

El origen de las larvas de camarón para la siembra de las fincas camaroneras era mayoritariamente silvestre hasta mediados de los años 90, eran capturados en la orilla de las playas cerca de la rompiente y esteros de manglar con el arte de pesca denominado "tijera". Sin embargo, los primeros laboratorios de larvas ya habían surgido a mediados de los años 80, llegando a construirse más de 300 laboratorios de larvas en todo el país. La gran mayoría de estos laboratorios no realizaban la maduración de reproductores en cautiverio, sino que dependían de la captura de hembras grávidas fertilizadas en el mar, a las cuales hacían desovar en sus instalaciones para luego realizar la larvicultura. Dado el riesgo de introducción de enfermedades emergentes por vía silvestre, el creciente cuestionamiento ambiental de extracción de larvas de camarón del mar, principalmente por el efecto de la captura acompañante que era descartada en la playa, y para fomentar el cierre del ciclo de vida productivo de la especie, así como fortalecer los programas de mejoramiento genético del camarón, se prohibió en el año 2002 la captura de camarones silvestres mediante un Acuerdo Ministerial expedido por la Subsecretaria de Recursos Pesqueros.

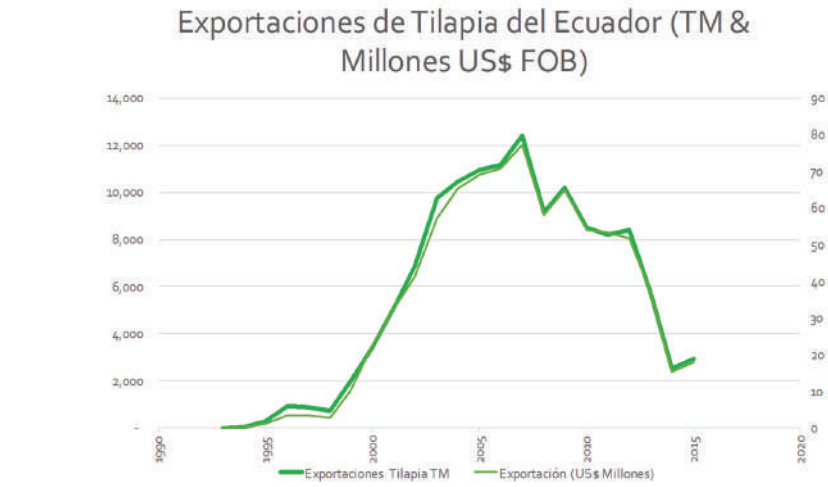
En 2016 la industria camaronera se articuló con un total de 100 laboratorios de larvas y 19 de maduración de camarón, mayoritariamente ubicados en la provincia de Santa Elena. En el país se registran un total de 93 plantas de procesamiento de camarón. La inmensa mayoría del camarón cosechado es exportado hacia los mercados asiáticos, europeos y de Estados Unidos; muy poco producto es consumido internamente. (Fig. 3).



Figura 3.- Actividades productivas vinculadas a la producción del Ecuador: plantas procesadoras de camarón, plantas de alimento balanceado, laboratorios de larvas, empresas proveedoras de insumos y servicios.

La importancia de la industria del camarón es vital para la economía de Ecuador. En 2016 las exportaciones de camarón generaron 2.455 millones de dólares, cubriendo una gran cantidad de negocios de productos y servicios, principalmente de suministro de alimento balanceado y otros insumos de carácter químico (fertilizantes, cal, antibióticos, entre otros) y biológicos (probióticos principalmente).

La segunda especie acuícola de importancia cultivada en el Ecuador después del camarón es la *Tilapia spp.*, que se cultiva principalmente en las provincias de la costa ecuatoriana y amazonia. Los primeros reportes de introducción de *Tilapia* en Ecuador data de fines de los 70, sin embargo, la "tilapia roja" se introduce en el país en 1993. La producción a escala comercial se empiezan a registrar a raíz de la aparición de la mancha blanca en el camarón (finales de 1999), lo cual produjo una reducción notable en la producción de este rubro y con ello la migración hacia el cultivo de otras especies en Ecuador, y ya en 2007 se producían unas 12.000 t, cuyo principal mercado fue EEUU. Sin embargo, la producción vuelve a decaer con la recuperación del cultivo de camarón, y la migración de la actividad a este sector más rentable. Hoy en día, la producción de tilapia en Ecuador se encuentra sobre las 3.000 t/año (Fig. 4).



Fuente: Cámara Nacional de Acuacultura

Figura 4.- Producción en toneladas métricas y en millones de dólares de tilapia en Ecuador.

La trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Fig. 5) fue introducida sobre el año 1928 en Ecuador con la importación de ovas de EEUU y España. Se cultiva principalmente en las provincias de la sierra ecuatoriana sobre los 1.000 m de altitud. El único registro oficial de producción data de 2007 (982 t) producto de unos 210 criaderos.

Recientemente se comienza a cultivar el paiche, pirarucú o arapaima *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) y la cachama blanca, pacú blanco o pez chato *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) (Fig. 5). El paiche es una especie osteoglosiforme de la familia Arapaimidae, es el segundo pez de agua dulce más grande del mundo, después de esturión beluga. Es un pez carnívoro que crece hasta superar los 3 m de largo y pesar hasta 250 kg. Su cultivo en Ecuador se realiza en pequeñas estaciones piscícolas de la Amazonia (provincias de Napo y Pastaza principalmente), no existe una estadística oficial, pero existen buenas expectativas de su cultivo, con un crecimiento de hasta 12 kg/año sembrado a 0,5 kg (2,5 kg en 6 meses con talla inicial de 100 g) con un factor de conversión 4:1 y un valor que puede permitir buenas rentabilidad (US$ 8,9/kg).

La cachama blanca es un pez de la familia Charidae originario de la Amazonia, es de color plateado y aletas rojizas y alcanza 0,8 m de longitud y hasta 20 kg de peso, se cultiva en pequeñas estaciones piscícolas de la Amazonia (provincias de Napo y Pastaza principalmente), particularmente cultivado con tilapias, el precio es de unos 3$/kg.

Otros peces de agua dulce que se cultivan en Ecuador son el chame *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844) y la vieja azul *Aequidens rivulatus* (Günther, 1859) (Fig. 5) que en conjunto aportan muy poco al volumen de producción acuícola de Ecuador; no obstante, se encuentran en vías de desarrollo.



Figura 5.- Diferentes especies de peces de agua dulce que se cultivan en Ecuador.

La maricultura en Ecuador aún no se ha desarrollado; sin embargo, su apuesta cada vez toma más auge. Ecuador tiene 2.237 km de costa y 173 caletas pesqueras (España tiene 7.905 km de costa), lo cual supone un área que puede generar un ordenamiento territorial con gran oportunidad para el desarrollo de la acuacultura marina, la cual se encuentra ya regida a través de legislación y ordenamiento para la actividad acuícola expedido finalmente en 2015 mediante acuerdo ministerial del Ministerio de Agricultura, Acuacultura y Pesca. No obstante, actualmente solo una empresa tiene concesión para cultivo, esta empresa es Oceanfarm que realiza cultivo de cobia *Rachycentrum canadum* (Linnaeus, 1766) en jaulas a escala comercial (Fig. 6). La empresa se inicio en 2007 con introducción de reproductores y desarrollo de cultivo de alevines y juveniles y recién en 2015 obtienen la concesión del MAGAP. Posee jaulas de 10.600 m^3 (30 m de diámetro y 15 de profundidad) ubicadas a 9,2 millas de la costa frente a la ciudad de Manta-Jaramijó a una

profundidad de 65 m. Posee un laboratorio que produce 200.000 alevines/mes, los cuales son sembrados en las jaulas y alimentados con piensos balanceados con un factor de conversión alimenticia de 1,62, con un precio de US$ 5,45 / libra.



Figura 6.- Cultivo de cobia *Rachycentrum canadum* en la empresa Oceanfarm.

La ostra japonesa u ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)/syn. *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), fue introducida formalmente a Ecuador en 1990 por CENAIM a través de un proyecto auspiciado por la agencia de cooperación japonesa (JICA) en función de implementar la reproducción y producción de semillas en CENAIM-ESPOL desde 1992. De esta manera el CENAIM-ESPOL desarrolló tecnología de producción ostra-camarón en piscinas camaroneras (siembras de 100 a 200 mil/ha) y el cultivo en líneas suspendidas dentro de reservorios y/o piscinas.

Actualmente por iniciativa del sector gubernamental (SA-MAGAP) se están desarrollando cultivos en comunidades costeras con producciones importantes de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* a través de las técnicas de producción de semillas del CENAIM-ESPOL, con resultados alentadores dado su elevado precio unitario de US$ 0,50-0,80/unidad (Fig.7).

Actualmente el CENAIM-ESPOL (Fig. 8) se encuentra en expansión con un proyecto de remodelación de su infraestructura y creación de espacios adecuados para la investigación en acuicultura y biodiversidad marina, que finalizará en el año 2018 como uno de los centros

más grandes e importantes de América Latina en función de la generación de conocimientos para el desarrollo (Fig. 9). Este proyecto es auspiciado por la SENESCYT y además de la infraestructura contempla la continuidad de investigaciones realizadas en el cultivo de especies autóctonas y otras, para el desarrollo de la diversificación de la acuicultura y la biodiversidad marina de las costas de Ecuador.



Figura 7.- La ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* y diferentes actividades de su cultivo en Ecuador.



Figura 8.- Instalaciones actuales del CENAIM-ESPOL.



Figura 9.- Proyección del CENAIM-ESPOL para el 2018.

El CENAIM-ESPOL genera conocimiento en el ámbito de la acuacultura marina y recientemente en el ámbito de la biodiversidad marina, mediante varios proyectos auspiciados principalmente por entes gubernamentales tales como la Secretaría Nacional de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador (SENESCYT) y la Secretaria de Acuacultura adscrita al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (SA-MAGAP). Entre los proyectos auspiciados por la SENESCYT se puede mencionar (i) el proyecto de **biodiversidad** para la bio-prospección y caracterización de invertebrados marinos de la reserva marina del Islote El Pelado, así como la caracterización y obtención de bio-productos y compuestos activos para propósitos de salud humana y animal, (ii) el proyecto de **sanidad acuícola** con miras a implementar herramientas de diagnóstico de enfermedades del camarón y otros organismos acuáticos, establecer un sistema de alerta epidemiológico del camarón, y desarrollar métodos de control de las principales enfermedades del camarón a través de estrategias de uso de organismos (probióticos), extractos naturales de origen vegetal o animal (betaglucanos, aceites esenciales) que potencien el estado inmune del camarón y/o presenten propiedades contra patógenos (actividad antimicrobiana, "quorom sensing/quenching", entre otros), y (iii) el proyecto de **diversificación acuícola**, con el propósito de generar domesticación y tecnologías de producción de peces marinos, equinodermos y moluscos bivalvos de interés comercial y/o ecológico para el Ecuador. En este último programa, el CENAIM-ESPOL ha adelantado investigaciones para alcanzar tecnologías de producción de alevines de huayaipe *Seriola rivoliana* Valenciennes, 1833 y lenguado *Paralichthys woolmani* Jordan

& Williams, 1897, así como juveniles de pepinos de mar *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) y *Holothuria (Selenkothuria) theeli* Deichmann, 1938 y el erizo *Tripneustes depressus* A. Agassiz, 1863. A nivel de moluscos bivalvos, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de, semillas de la ostra de roca *Striostrea prismatica* (Gray, 1825), la vieira o concha abanico *Nodipecten subnodosus* (G. B. Sowerby I, 1835), *Spondylus* particularmente *Spondylus limbatus* G. B. Sowerby II, 1847 y *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819 y las ostras perlas *Pteria sterna* (Gould, 1851) y *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) (Fig. 10), así como en la ostra japonesa *Crassostrea gigas*, donde el CENAIM-ESPOL está realizando investigaciones para la optimización de su cultivo en mar y/o en cuerpos de agua de camaroneras.

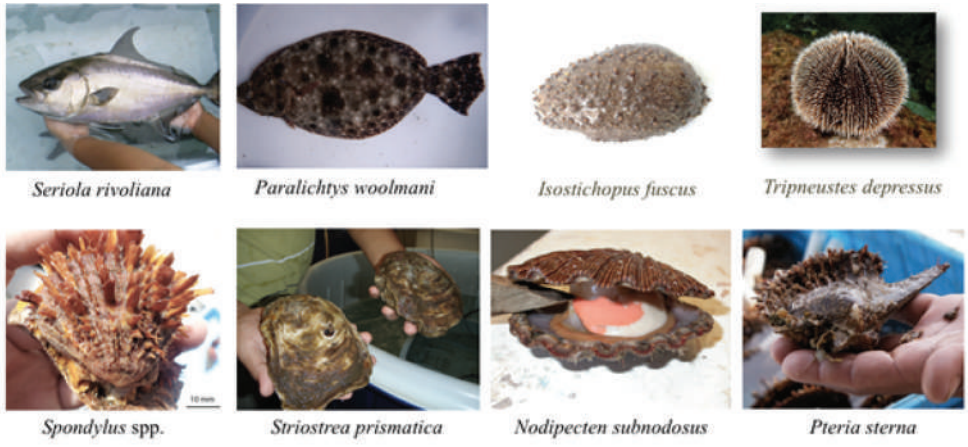


Figura 10.- Principales especies en las cuales el CENAIM-ESPOL se encuentra investigando en función de crear protocolos de cultivo para el desarrollo de la diversificación de la acuicultura en Ecuador.

Muchas de esas investigaciones ya han dado resultados alentadores tanto en la producción de alevines (lenguado, huayaipe, *Spondylus limbatus*, *Nodipenten subnodosus*, pepino de mar y erizo) como para su crecimiento en exteriores con miras a la producción comercial (*Crassostrea gigas*, *Pteria sterna*) y las repoblaciones en el medio natural como *Spondylus limbatus* y pepino de mar (Fig. 11); gran parte de estos adelantos se encuentran ya publicados en manuales que serán de uso colectivo (Fig. 12).

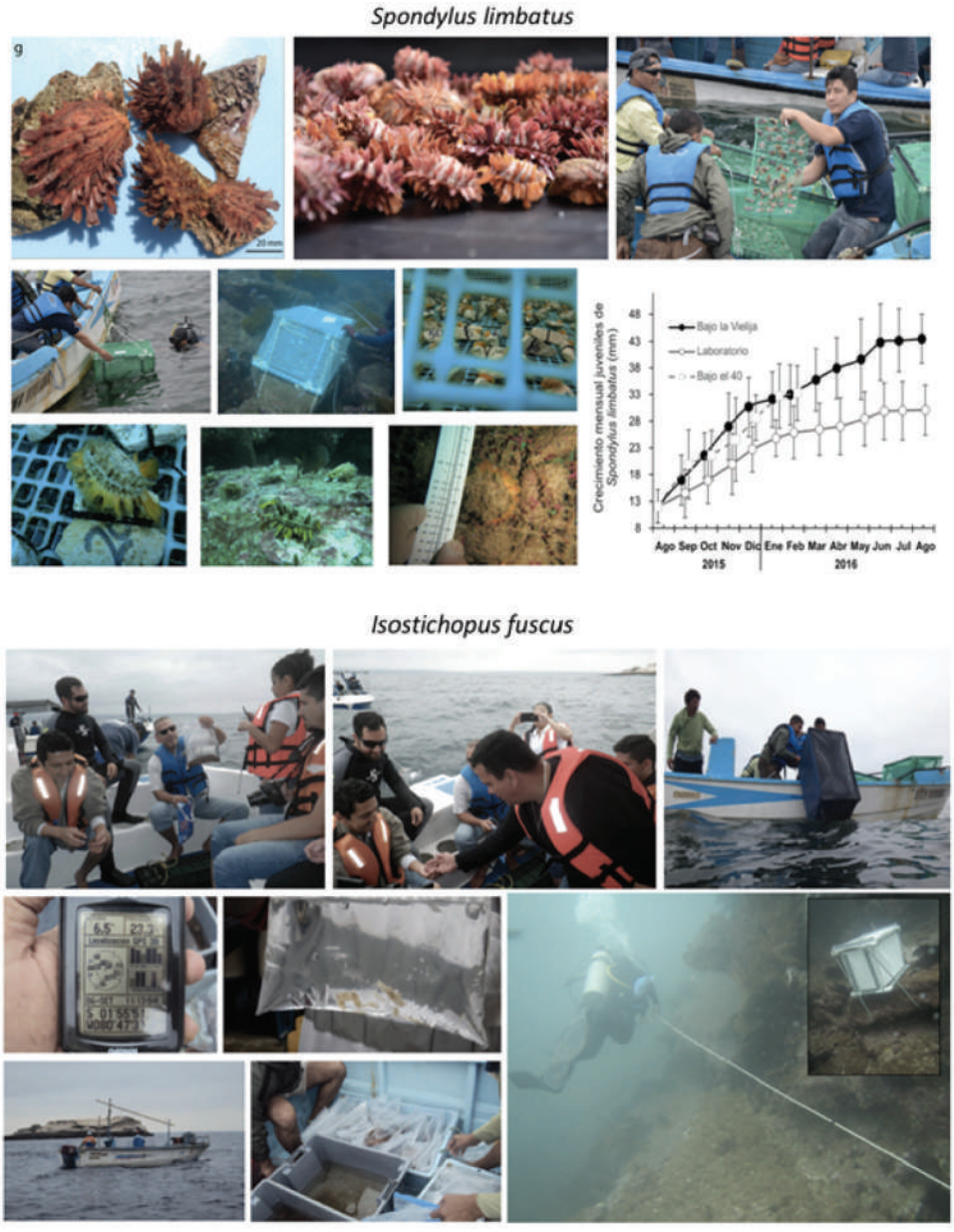


Figura 11.- Actividades de siembra y seguimiento de *Spondylus limbatus* y el pepino de mar *Isostichopus fuscus.*



Figura 12.- Manual para la producción de pepino de mar y *Spondylus* producidos por el CENAIM-ESPOL y la SA-MAGAP.

Agradecimientos

La mayoría de los resultados presentados en esta conferencia han sido posibles gracias al financiamiento de la SENESCYT a través de los proyectos “Caracterización de la biodiversidad microbiológica y de invertebrados de la reserva marina El Pelado a varias escalas: taxonómica, metabolómica y metagenómica, para uso en salud humana y animal”; “Desarrollo de protocolos de domesticación para uso sostenible de nuevas especies marinas para consumo de alimentos y repoblación de bancos naturales”; y “Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura o repoblación”; el proyecto PROMETEO, y el proyecto “Prestación de Servicios de Investigación Profesional y Exámenes de Laboratorio, Spondylus y Pepino de Mar” de la Subsecretaria de Acuacultura-MAGAP a través del proyecto Maricultura y Piscicultura para el Fomento Acuícola en el Ecuador.

Accede a la presentación



MESA DE TRABALLO: ACUICULTURA

D. Miguel Medialdea González. Pesquería Isla Mayor (PIMSA)

D. Aurelio Ortega. IEO Murcia

D. Sergio Rengel. Gamba Natural

Veta la Palma: acuicultura sostenible, servicios ecosistémicos e integración económica y social en el entorno de Doñana

Miguel Medialdea
Responsable de Calidad y Medio Ambiente, PIMSA. Real 34, 41920 – San Juan de Aznalfarache (Sevilla). miguel.medialdea@vetalapalma.es

Acuicultura y sostenibilidad: Veta la Palma como ejemplo de gestión responsable

La finca Veta la Palma, de 10.300 hectáreas de extensión, ocupa la mitad sur de la Isla Mayor del Guadalquivir y forma parte del denominado Espacio Natural Doñana, figura de conservación que engloba al Parque Nacional y a un conjunto de espacios de titularidad pública o privada que lo rodean, cuyas actividades están reguladas y deben ser compatibles con los objetivos del Parque (Fig. 1).

En 1982, la empresa Agropecuaria del Guadalquivir, hasta entonces propietaria de estos terrenos, es adquirida por el grupo empresarial Hisparroz, S.A. y transformada en la actual Pesquerías Isla Mayor, S.A. (PIMSA). A partir de entonces, la finca Veta la Palma se convierte en un ejemplo de actuación integrada, en el que la creación de un humedal artificial destinado a acuicultura ha potenciado los valores naturales de una zona en la que las antiguas prácticas de control del régimen de encharcamiento habían alterado el equilibrio ecológico original.

En 1990 y bajo autorización de la Dirección General de Pesca de la Junta de Andalucía, siguiendo lo dispuesto en el Plan Rector de Uso y Gestión del Parque Nacional de Doñana (PRUG), se pone en marcha la actividad acuícola en la finca a partir de 600 hectáreas iniciales, hasta conformar actualmente una zona de 2.500 hectáreas inundadas con agua del estuario del Guadalquivir, que alberga una nutrida población de peces y crustáceos que son la base de los cultivos acuícolas extensivos y semi-extensivos de lubina (*Dicentrarchus*

labrax), dorada (*Sparus aurata*), corvina (*Argyrosomus regius*), camarón (*Palaemon varians*) y mugílidos (*Mugil cephalus* y *Liza ramada,* entre otras especies).

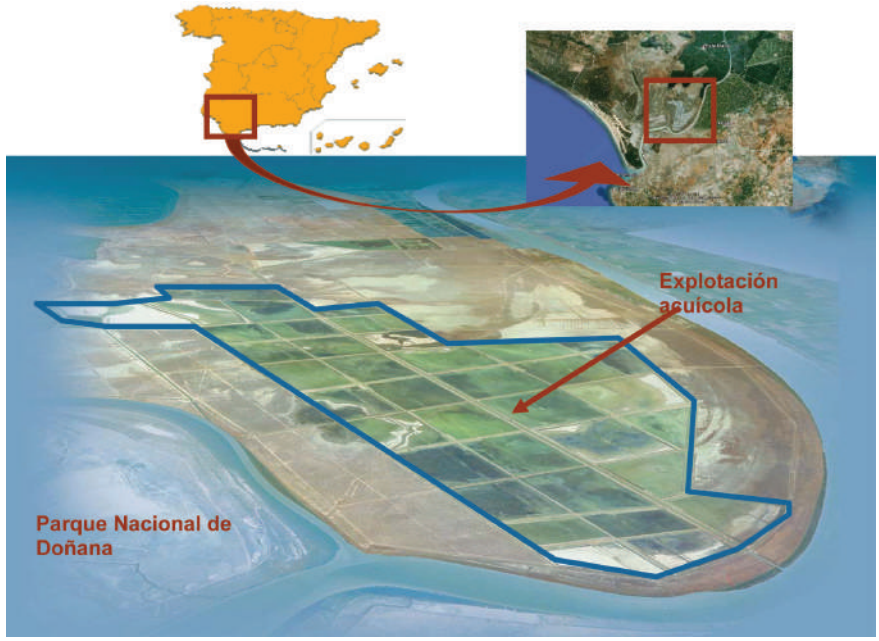


Figura 1.- Montaje fotográfico realizado por satélite de la finca Veta la Palma. Las imágenes superpuestas ilustran la principal actividad económica actual de la finca – la acuicultura extensiva y semi-extensiva – y su contribución a la conservación.

La superficie de cultivos está compuesta por 45 balsas de una media de 70 ha de extensión, interconectadas entre sí y con los ríos Guadalquivir y Guadiamar por una compleja red de canales de riego y drenaje de más de 300 km. El sistema está asociado a una estación con capacidad para bombear 12.000 l/s en circuito abierto, semi-abierto o cerrado según demanden las circunstancias ambientales y de los cultivos.

Servicios ambientales soportados por el sistema de explotación acuícola de Veta la Palma

La actividad acuícola practicada en esta finca soporta un conjunto de servicios ambientales para la hidrología y ecología de las marismas del Bajo Guadalquivir. Las balsas de cultivo acuícola conforman una zona húmeda de extraordinaria importancia, cuya gestión ha permitido restaurar las funcionalidades ecológicas perdidas por anteriores usos no compatibles, a la vez que mejora el medio ambiente de la zona añadiendo nuevos valores económicos y de conservación (Fig. 2).



Figura 2.- Aspecto general de las balsas de cultivo extensivo.

❖ **Incremento de la diversidad trófica como consecuencia de la estabilidad hidráulica**

Las balsas de cultivo de Veta la Palma se caracterizan por su estabilidad en cuanto a superficie de inundación (2.500 ha), profundidad (40-50 cm), caudal de renovación (hasta 1 hm^3/día en verano) y salinidad, aunque ésta fluctúa según la estación y el nivel de precipitaciones (6-15 g/l en períodos húmedos y hasta 25 g/l durante las sequías).

Esta estabilidad permite amortiguar los cambios en la concentración de nutrientes propios del curso bajo del río, provocando un desarrollo masivo de fitoplancton (productores primarios) que asimila rápidamente los excedentes de nitrógeno y fósforo del agua. El aporte continuo de materia orgánica hacia el sedimento, vía fitoplancton, favorece en los períodos de temperaturas favorables el desarrollo de la flora bacteriana descomponedora y de los productores primarios del bentos. Se han medido valores de producción primaria de hasta 3,9 g C/m^2 d para el caso del bentos y 23 g C/m^2 d en la columna de agua (fitoplancton).

El nivel de consumidores lo componen el zooplancton, una variada fauna de microcrustáceos asociados al compartimento bentónico, crustáceos de gran importancia como el camarón y peces como los mugílidos y la dorada. Finalmente, en la cúpula de la red trófica se encuentran depredadores activos como la lubina, la corvina y la anguila.

Por tanto, la combinación de solo tres elementos iniciales (agua, luz y nutrientes), gracias a la fotosíntesis y a un cuidadoso manejo de las masas de agua, genera una compleja red trófica tan productiva como la existente fuera de la explotación en aguas del estuario del Guadalquivir (Fig. 3).



Figura 3.- Producción natural de camarón (izquierda) y pesca comercial de lubina (derecha).

❖ Mejora de la calidad del agua del estuario

Las balsas extensivas se comportan como auténticas depuradoras que convierten los nutrientes (nitrógeno, fósforo, etc.) y la materia orgánica en biomasa, finalmente regulada y extraída del sistema tanto por la pesca comercial como por la avifauna.

Por ejemplo, en el caso del nitrógeno la concentración de amonio en las balsas de cultivo disminuye como consecuencia del ciclo químico-biológico que ocurre en estas grandes extensiones de agua. En general, los valores de amonio medidos en las balsas raramente superan los 0,1 mg/l, y el amonio pasa con rapidez a nitrito por oxidación química y biológica (nitrificación). Niveles de nitrito superiores a 0,5 mg/l, obtenidos de forma continuada, son considerados tóxicos para las formas de vida acuática más sensibles. Sin embargo, en las balsas de Veta la Palma los valores de nitrito son muy inferiores a los medidos en el agua de captación de la explotación (<0,2 mg/l), lo que demuestra que la oxidación producida durante el recorrido del agua en la explotación permite convertir todo el nitrito en nitrato, forma final del nitrógeno que

es asimilada por las plantas acuáticas y las algas. Se estima que el 96% de todo el nitrógeno que circula a través del sistema de cultivo queda retenido (unas 410 t por año o 0,0015 kg/m^2) y pasa a formar parte de la biomasa viva.

Los valores obtenidos en los análisis periódicos realizados en el agua por laboratorios acreditados por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía en materia de protección ambiental (Resolución de 9 de junio de 1999), permiten asegurar que el agua captada en Veta la Palma para la operatividad de su sistema productivo es devuelta al río con una calidad físico-química y microbiológica más que aceptable.

❖ **Desinfección de suelos y prevención de brotes infecciosos endémicos del humedal**

En las áreas de marisma original existentes en el Parque Nacional de Doñana, los bajos niveles hídricos durante la temporada seca y en las sequías interanuales que periódicamente azotan esta zona climática, unidos a las altas temperaturas veraniegas (de más de 25ºC de media), elevada salinidad y baja oxigenación consecuencia de la falta de renovación en el agua, aumentan la probabilidad de desencadenar procesos epidémicos infecciosos como el botulismo o la salmonelosis, que pueden terminar afectando seriamente a la avifauna salvaje, como ya ha ocurrido en numerosas ocasiones.

Los distintos compartimentos de la explotación acuícola de Veta la Palma (balsas, canales, etc.) están sometidos a un riguroso ciclo de mantenimiento encaminado a mantenerlos en perfectas condiciones sanitarias y ambientales. Esto es esencial tanto para la práctica de la actividad acuícola como para lograr una óptima integración ecológica de ésta en el entorno. Las balsas de cultivo están sujetas a un régimen de inundación / desecación de carácter cíclico y rotativo. Al final del ciclo de cultivo, cada balsa es desecada completamente con objeto de sanearla y retirar el exceso de sedimento acumulado, operación que se realiza de manera rotativa en las 45 balsas operativas.

La desecación alternativa de las balsas de cultivo tiene un efecto de prevención sobre la posibilidad de aparición de cualquier brote infeccioso que pueda afectar a los cultivos acuícolas o a las aves. Dado que las tareas de desecado se realizan a comienzos de la estación estival y una vez concluida la temporada de cría de las aves, las altas temperaturas y la sequía del verano permiten que en los fondos secos de las balsas se mineralicen por completo, eliminándose por foto-oxidación la materia orgánica y los elementos de resistencia de los agentes causantes del botulismo, la salmonelosis y otras enfermedades epidémicas habituales en esta zona.

❖ **Gestión paisajística del ecosistema**

Cuando, a principios de los años 90, comenzó la actividad acuícola en Veta la Palma, la enorme extensión de las masas de agua creadas por reinundación artificial contribuyó a mejorar notablemente el paisaje de la finca, potenciando el aspecto natural que debió tener cuando estas marismas permanecían inundadas en invierno y estaban sujetas en verano a la influencia de las fuertes mareas del río Guadalquivir.

Además, desde el año 1992 y de manera ininterrumpida, PIMSA ha venido dedicando grandes esfuerzos materiales y humanos, con objeto de mejorar aún más la situación ambiental de Veta la Palma en lo respectivo a la protección de las aves y al medio ambiente en general. Entre las numerosas actuaciones llevadas a cabo en la finca, cabe destacar la creación de más de 100 islas y cordones en las balsas de cultivo acuícola, para la nidificación de las aves acuáticas, y la revegetación de la totalidad de orillas y bordes de las balsas de cultivo.

❖ **Amortiguación de las fluctuaciones hídricas intra e interanuales del ecosistema marismeño**

Para prevenir la posibilidad de aparición de brotes infecciosos, el sistema de gestión del Parque Nacional de Doñana suele optar por una política de saneamiento forzado de la marisma natural del Parque, consistente en acelerar, mediante drenaje, su desecación natural anual a comienzos de cada estación seca. El resultado es que cada año, miles de fochas y anátidas que se reproducen en el Parque Nacional y muchas de las cuales aún no han terminado su cría cuando la marisma es drenada, se ven forzadas a buscar lugares con agua fuera de los límites del Parque. Estas aves se desplazan mayoritariamente a la finca Veta la Palma, donde el humedal artificial cuidadosamente manejado es capaz de aportarles las adecuadas condiciones de espacio, alimento y tranquilidad que requieren para completar su ciclo anual.

Veta la Palma juega un papel primordial asegurando el alimento tanto a las aves que completan su ciclo de desarrollo juvenil y pueden luego migrar a otras zonas durante la primavera y el verano (anátidas, limícolas, ardeidas…), como a aquellas que, estando ya en pleno proceso migratorio entre África y Europa, se instalan temporalmente en la finca para obtener el alimento necesario que les permita poder proseguir su migración.

❖ **Incremento de las poblaciones de aves**

Es preciso considerar la enorme importancia actual que tienen las balsas de cultivo acuícola de Veta la Palma para la conservación de muchas especies de aves. La acuicultura extensiva y semi-extensiva no sólo no ha supuesto ningún impacto negativo sobre la comunidad de aves que utiliza el área de Doñana, sino que por el contrario la ha favorecido

considerablemente. Desde el inicio de la actividad, la presencia de aves tanto nidificantes como migratorias, y en especial de aquellas especies clasificadas como raras, vulnerables o en peligro de extinción en su hábitat original, no ha dejado de aumentar en la finca.

En la actualidad, la comunidad de aves de esta finca es única en Europa por su tamaño y por su relevancia ecológica. Se pueden observar casi 250 especies en total, de las que 110 son aves acuáticas y rapaces. Entre ellas se cuentan 17 especies "*En peligro*" o "*En peligro crítico*" de extinción (como el águila pescadora, la malvasía cabeciblanca, la focha cornuda o la cerceta pardilla); 9 especies en "*Riesgo Menor, casi amenazadas*" de extinción (como el flamenco, la avoceta o la gaviota picofina); y 14 especies "*Vulnerables*" a la extinción (como la espátula, la pagaza piconegra o el charrancito).

La población total de aves de la finca, que supera en todos los meses del año los 60.000 ejemplares, llega a alcanzar la cifra de 600.000 individuos durante los meses de agosto a octubre, período en el que las 2.500 hectáreas de superficie inundada albergan casi el 80% de todas las aves del Espacio Natural de Doñana.

La finca cumple la práctica totalidad de los criterios generales y específicos que define a un Humedal de Importancia Internacional, según el Convenio de Ramsar para la Protección de las Zonas Húmedas. En un estudio realizado en 2003 por la Estación Biológica de Doñana (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), a través de un convenio establecido con la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, sobre los invertebrados acuáticos en Doñana y su importancia en las dietas de las aves acuáticas, se señala que *"…a pesar de que Veta la Palma no es una zona natural, ya que está sometida a explotación y su inundación es artificial, sin duda es un humedal artificial muy importante para las aves acuáticas de la zona, cumpliendo con creces los criterios Ramsar…. Además, para mantener la abundancia y diversidad de aves acuáticas en Doñana, es evidente la necesidad de gestionar zonas como Veta la Palma para que proporcionen una alta biomasa de alimento (invertebrados y macrófitos) para las aves"*

Conclusión: la producción acuícola como base para un equilibrio estable entre desarrollo y conservación

La acuicultura ha hecho de Veta la Palma un referente en la mejora de la calidad ambiental de los humedales, donde la creación de biodiversidad es el resultado de la aplicación de un modelo de producción que produce importantes beneficios económicos para las comunidades del entorno. Esta explotación es hoy día una parte integral del ecosistema de Doñana, limitando la producción primaria del medio subacuático marismeño a un nivel sostenible, recuperando artificialmente los antiguos humedales desaparecidos por la actividad humana

y evitando su eutrofización. Los cultivos acuícolas mantienen el humedal de Doñana en un estado favorable de conservación, mientras las balsas de cultivo junto a las áreas de marisma que las circundan, constituyen un recurso espacial y trófico de primera importancia cuando en las zonas colindantes, entre ellas el Parque Nacional de Doñana, se hace sentir la sequía estacional. Veta la Palma está incluida en la Reserva de la Biosfera de Doñana y forma parte, con absoluta compatibilidad, de la Red Natura 2000.

Desde un punto de vista estrictamente económico y de gestión de la calidad, la naturaleza de Veta la Palma y el manejo de sus recursos tienen un reflejo directo en la valorización comercial de sus productos de cultivo y permiten diferenciarlos de los procedentes de la acuicultura convencional. Por ejemplo, la elevada productividad natural descrita en el agua de cultivo de la finca hace que los peces y crustáceos de esta explotación posean una alimentación mixta, basada en el aprovechamiento de la riqueza nutritiva del agua del río complementada con una dieta artificial específicamente formulada y elaborada para ellos. El componente natural de la ingesta diaria aumenta sus defensas naturales frente a enfermedades y proporciona a su carne unas cualidades insuperables de textura y sabor, además de un perfil nutricional particularmente rico en vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y compuestos antioxidantes de gran importancia.

La granja marina de Veta la Palma dispone de los certificados de calidad de AENOR bajo las Normas ISO 9001:2008, ISO 14001:2004 y el Reglamento EU 1221/2009 (EMAS III). Además, sus productos poseen el distintivo Calidad Certificada propiedad de la Junta de Andalucía y las prácticas de sostenibilidad en el cultivo que se encuentran operativas en la finca han sido recientemente reconocidas con el prestigioso sello de calidad internacional Friends of the Sea.

Bibliografía

Algarín Vélez S. 2000. *Antecedentes Históricos de la Pesca en la Marisma de Doñana*. Conferencia inaugural de las Jornadas: *LA PESCA Y SU CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO SOSTENIBLE DE DOÑANA*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía y el C.S.I.C.

Fernández-Cruz M., Martín-Novella C., Fernández G., González E. & París M. 1989. Informe sobre la evolución e importancia de las poblaciones de aves de los antiguos lucios reinundados del sur de Isla Mayor (Sevilla). En *Modificaciones y Actividades Complementarias al Proyecto de Acuicultura Extensiva en la finca Veta la Palma, pesquerías Isla Mayor, S.A.*

Otero C. & Bailey T. 2003. *European natural and Cultural Heritage*. Friends of the Countryside Eds., 701 pp.

PIMSA 1995. *Incidencia de los cultivos acuícolas de PIMSA en la calidad del agua.* Monografía realizada por Pesquerías Isla Mayor, S.A.

PIMSA 2000. *La piscicultura extensiva y la conservación de especies amenazadas en el entorno de Doñana. Veta la Palma, Isla Mayor, Sevilla*. Monografía realizada por Pesquerías Isla Mayor, S.A.

PIMSA, IIMA & EURODUCK 1992. *Proyecto para la adecuación del territorio de Veta la Palma como refugio de aves acuáticas en las marismas del Guadalquivir, España.* Editado por Pesquerías Isla Mayor, S.A. (PIMSA), Iberian Institute for the Environment and Natural Resources (IIMA) y European Waterfowl Habitat Fund (Euroduck).

Rodríguez Pérez H. & Green A.J. (2003). *Estudio de los invertebrados acuáticos en el Parque Natural de Doñana y su importancia en la dieta de las aves acuáticas*. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y el C.S.I.C. Eds.

Walton M.E.M., Vilas C., Cañavate J.P., Gonzalez-Ortegon E., Prieto A., van Bergeijk S.A., Green A.J., Librero M., Mazuelos N., Le Vay L. 2015. A model for the future: Ecosystem services provided by the aquaculture activities of Veta la Palma, Southern Spain. *Aquaculture*. 448: 0, 382-390.

Walton M.E.M., Vilas C., Coccia C., Green A.J., Cañavate J.P., Prieto A., van Bergeijk S.A., Medialdea J.M., Kennedy H., King J. & Le Vay L. (2015). The effect of water management extensive aquaculture food webs in the reconstructed wetlands of the Doñana Natural Park, Southern Spain. *Aquaculture*. 448: 451–463.

Accede a la presentación



Cultivo y estado actual de la acuicultura de atún rojo en España

Aurelio Ortega
Instituto Español de Oceanografía
Carretera de la Azohía s/n 3086º Mazarrón (Murcia)
aurelio.ortega@mu.ieo.es

El atún rojo pertenece a la familia de los escómbridos. Incluye 50 especies y 2 subfamilias, la más importante de la cuales es la SCOMBRIDAE. Esta familia incluye 4 tribus:

- Scombrini
- Scomberomorini
- Sardini
- Thunini

Los escómbridos se distribuyen ampliamente y son muy apreciados comercialmente. Se puede consumir en fresco, en salazón o en conserva y se pescan con muy diversos artes: almadrabas, curricán, palangre, cerco, arrastre, artes de enmalle, etc.

Peces muy veloces, realizan grandes migraciones y pueden formar grandes cardúmenes. La mayoría de las especies son predadores, alimentándose de otros peces, crustáceos y cefalópodos.

Presentan sexos separados con escaso o nulo dimorfismo sexual. La puesta de la mayoría de las especies se realiza en aguas costeras tropicales o subtropicales.

La tribu Thunini incluye 5 géneros: Allothunnus, Auxis (melva), Euthynnus (Bacoreta), Katsuwonus (listado) y Thunnus (atunes). Dentro de los atunes existen varias especies, y podemos citar el Rabil o Atún claro (*Thunnus albacares),* Albacora o Bonito del Norte (*Thunnus alalunga), Patudo (Thunnus obesus)* y el Atún rojo.

El Atún rojo es un pez que se encuentra extendido por todo el mundo. En realidad con el nombre de Atún rojo nos referimos a tres diferentes especies:

- *Thunnus macoyi* (Southern Pacific bluefin tuna) que se distribuye en el hemisferio Sur alrededor de Oceanía
- *Thunnus orientalis* (Northern Pacific bluefin tuna) que se distribuye por todo el Pacífico Norte, desde Japón a California
- *Thunnus thynnus* (Atlantic bluefin tuna), que se distribuye fundamentalmente en el Atlántico Norte y en el Mediterráneo, aunque también puede distribuirse por el hemisferio Sur (fundamentalmente costas de Brasil) y por el Mar Negro.

Son especies de gran tamaño, que en el caso de *Thunnus thynnus* puede alcanzar 3 m de longitud, más de 600 kg de peso y puede vivir más de 20 años. Son capaces de desplazarse miles de kilómetros y están consideradas como especies altamente migratorias.

Predador oportunista, presentan el cuerpo robusto, aletas pectorales cortas y segunda dorsal más alta que la primera. Presentan vejiga natatoria y su color es azulado en el dorso y blanco-plateado en el vientre. Las pínnulas tienen un color amarillo intenso.

El Atún rojo Atlántico se distribuye por el océano Atlántico entre los 60ºN y los 40ºS y por todo el Mediterráneo. A efectos prácticos se consideraba que existían dos stocks prácticamente aislados a nivel reproductivo:

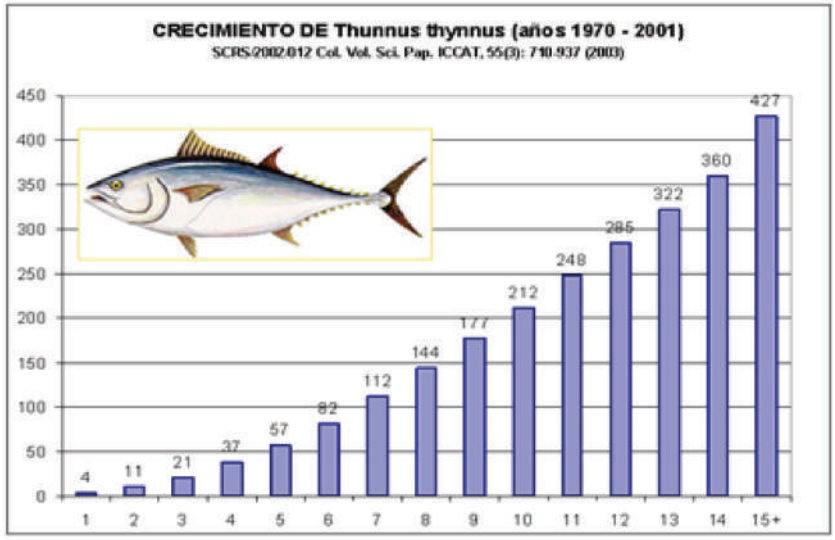
- El stock del Atlántico Oeste se reproduce entre abril y junio en el Golfo de México
- El stock del Atlántico Este se reproduce entre junio y agosto en el Mediterráneo

No obstante, estudios recientes cuestionan el supuesto aislamiento reproductivo de los dos stocks, y el seguimiento de atunes marcados ha confirmado que hay ejemplares que cruzan el Atlántico.

Dentro del Mediterráneo hay tres principales áreas de reproducción: una en el Mediterráneo Occidental, en las Islas Baleares, otra en el Mediterráneo Central que incluye el Norte de Sicilia y Malta y otra en el Mediterráneo Oriental, cerca de las costas de Chipre y Turquía.

Thunnus thynnus presenta sexos separados y ovario asíncrono. El stock del mediterráneo alcanza la madurez sexual entre los 3 y 5 años. La época de puesta es en junio-julio. Dura aproximadamente 30-40 días y el intervalo medio entre dos puestas consecutivas es de 1,2 días. Los huevos fecundados son redondos y trasparentes y tienen un diámetro de 1 mm. Eclosionan uno o dos días después de la fecundación y la larva recién eclosionada mide unos 3 mm.

Los juveniles de atún presentan un rápido crecimiento, alcanzando los 2 kg a los 4-5 meses de vida. La siguiente gráfica muestra el crecimiento de los atunes en la naturaleza:



- La pesca se realiza con diferentes artes: almadraba, cerco, palangre, etc. En la década de los 90 y los primeros años del 2000, se produjo un gran esfuerzo pesquero que llevó a una situación de sobrepesca. Así desde ICAAT se establecieron una serie de medidas correctoras:
  - Establecimiento de cuotas
  - Incremento del tamaño mínimo de captura, pasando de 6 kg a los 30 kg
  - Límite en el periodo de captura para la flota de cerco: solo unos días entre mayo y junio

Estas medidas han resultado efectivas, y las últimas evaluaciones han mostrado que las poblaciones están aumentando, lo que ha permitido que desde hace unos años vuelvan a aumentar las cuotas, aunque de un modo más moderado de lo que reclaman las diferentes organizaciones pesqueras.

Cultivo industrial: engrase de ejemplares capturados del medio

El cultivo industrial se basa en engordar-engrasar ejemplares procedentes del medio natural. Esta actividad se dirige fundamentalmente al mercado japonés. El cultivo parte de peces recién desovados, y en estas condiciones los atunes tienen una cantidad pequeña de grasa, ya que durante su migración reproductora prácticamente no comen. Así, el cultivo intenta fundamentalmente que los atunes aumenten su cantidad de grasa corporal para recuperar los niveles que tenía antes de la puesta.

Los peces son pescados durante el final de su migración reproductiva, normalmente cerca de las Islas Baleares con artes de cerco. Entonces son cuidadosamente trasvasados a jaulas de transporte que serán remolcadas hasta los lugares de engorde. La alimentación consiste en pescado azul fresco o congelado (caballa, sardina, etc.). Los peces se alimentan "ad libitum", y la tasa de alimentación oscila del 1 al 10%, con una media del 2-3%.

Es una actividad estacional, aunque últimamente se intenta mantener durante todo el año para surtir al mercado con continuidad. La densidad de las jaulas oscila sobre 4-5 kg/m^3, y la mortalidad no suele superar el 5%. El crecimiento está muy influenciado por la talla de los animales y por la temperatura. En España, en los 6 meses de engrase los ejemplares más pequeños, de 15-20 kg, pueden casi duplicar su peso, mientras que los atunes mayores de 200 kg pueden aumentar su peso alrededor de un 10-15%.

En el 2001 se produjeron en España casi 8.000 t, la mayoría de ellas en la Región de Murcia, facturando más de 150 millones de euros y originando más de 500 empleos directos. Pero como resultado de la recesión en las capturas, muchas empresas cerraron y sólo se han mantenido activas tres, que están recuperando paulatinamente su producción, y que en 2015 vendieron algo más de 2.000 t.

Cultivo integral de atún rojo

Los primeros proyectos de investigación comenzaron en Japón en 1970, obteniéndose las primeras puestas en 1979. Tras diez años en los que no obtuvieron puestas, a partir de 1994 se regularizaron, y comenzaron las experiencias de cultivo larvario. En 2002, se produjo la reproducción de individuos nacidos en cautividad, cerrándose el ciclo del Atún rojo del Pacífico, y ya se comercializan atunes procedentes de estos reproductores de ciclo cerrado, de tal modo que la actividad de engorde en Japón se nutre en la actualidad tanto de juveniles pescados en el mar como de individuos producidos en cautividad.

La producción de atunes de criadero se realiza fundamentalmente en dos centros de la Universidad de Kinki: Amami y Oshima. Después de varios años con una producción de unos 30.000 alevines, en 2009 se produjeron casi 200.000 juveniles de 30-40 días y 6-8 cm de longitud. Estos alevines se preengordan hasta 300 gr y entonces se venden a las instalaciones de engorde. Pero la mortalidad en esta fase de preengorde sigue siendo elevada.

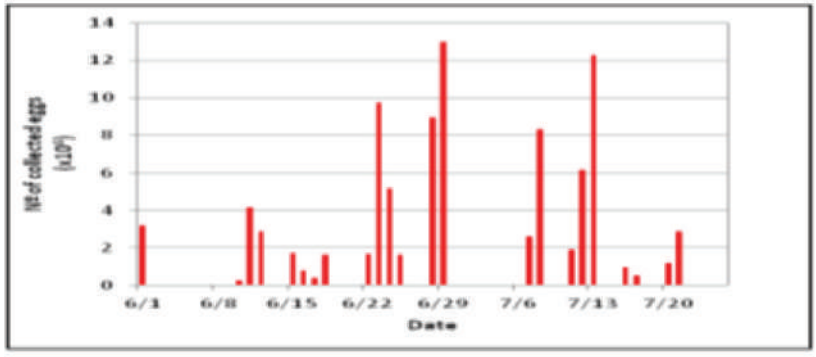
Las tres principales causas de mortalidad larvaria son la mortalidad temprana (debida a calidad de la puesta y a problemas relacionados con la inflación de la vejiga), canibalismo, problemas nutricionales y colisiones. La investigación ha conseguido mejorar estos aspectos, y además en 2009 se desarrolló una dieta artificial basada en harinas de pescado tratadas enzimáticamente que ha permitido mejorar los resultados de supervivencia, que pueden llegar a ser en torno al 4-5%.

No obstante, la mortalidad en el preengorde, desde los 4-5 a los 300-500 gramos, sigue siendo demasiado elevada. Son varios los factores que influyen en ello:

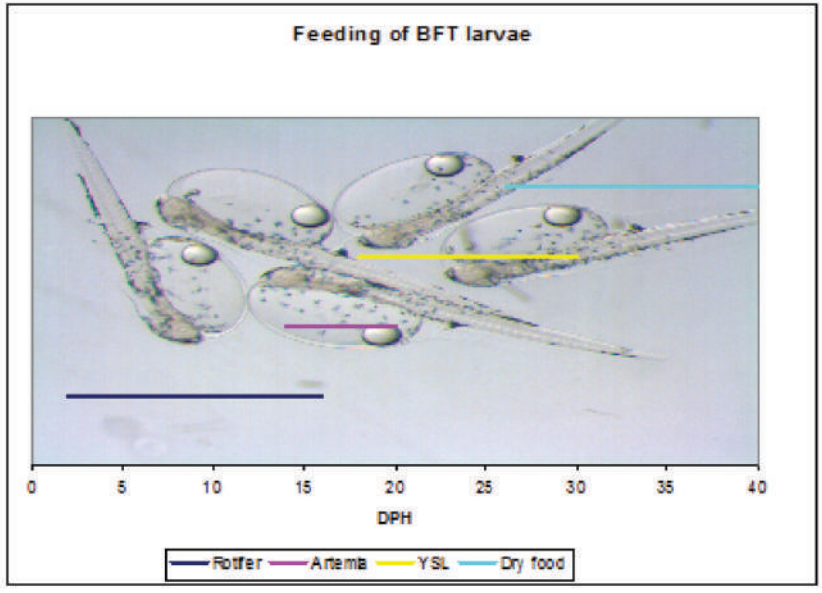
- Las jaulas se deben situar en lugares protegidos, lo que a veces conlleva oscilaciones en parámetros fisicoquímicos con baja salinidad, alta turbidez, bajadas de temperatura, etc. Prevalencia de enfermedades como Iridovirus, Pasteurella, etc.
- Colisiones y problemas de manejo.

En España, las investigaciones sobre su cultivo comenzaron a principios del 2000. Aparte de algunos intentos llevados a cabo en Cádiz, han sido liderados por el IEO de Murcia, que participó y coordinó dos importantes proyectos, REPRODOTT y SELFDOTT, financiados por la Unión Europea y en los que intervinieron aparte del IEO, el grupo Fuentes (Tuna Graso y Caladeros del Mediterráneo), la Universidad de Cádiz y diferentes instituciones europeas. Como resultado de los mismos se obtuvieron las primeras puestas de Atún rojo a partir de individuos mantenidos en jaulas. Las primeras puestas se obtuvieron mediante inducción hormonal, pero los años sucesivos los atunes maduraron y expulsaron los gametos de un modo espontáneo. Además se llevaron a cabo las primeras experiencias de cultivo larvario y producción de juveniles de Atún rojo. Estas experiencias han seguido, ya sin el apoyo de la Unión Europea, pero con la colaboración de diferentes empresas murcianas (Caladeros del mediterráneo, Fortuna Mare y Grupo Fuentes y Piscifactorías Albaladejo), de la CCAA de Murcia y de la Administración Central.

Los reproductores se mantienen en jaulas ubicadas en el mar en las que se dispone un sistema de colectores de huevos que consiste en una cortina de PVC que se sitúa en los metros más superficiales. El sistema funciona con corrientes bajas y buenas condiciones de la mar. La estación de puesta se alarga durante 25-40 días. La máxima duración ha sido de 50 días en 2015.



El cultivo larvario se realiza en tanques cilíndricos de 40-55 m^3, dotados de flujo ascendente de agua y aireación. La temperatura oscila entre 22-27ºC y el fotoperiodo es de 14hL:10hD. La densidad inicial oscila entre 5 y 10 huevos por litro. El siguiente esquema refleja la alimentación suministrada:



La principal diferencia con otras especies marinas cultivadas es la necesidad de alimentar con larvas de peces de saco vitelino (YSL), en nuestro caso larvas recién nacidas de dorada.

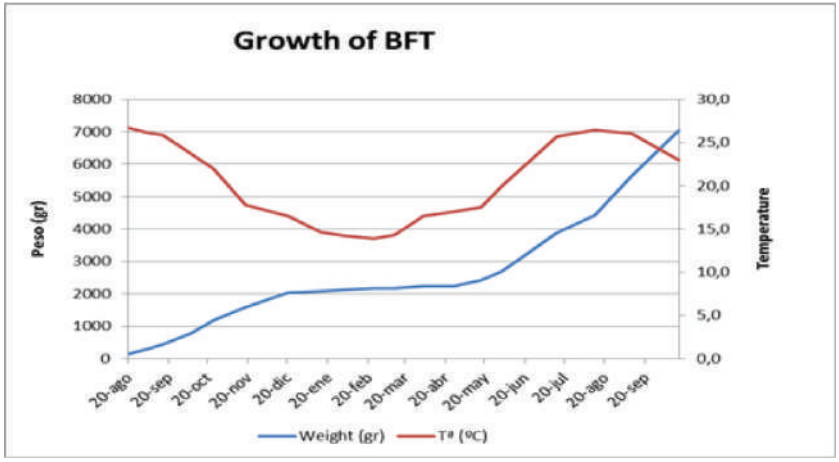
En los últimos tres años estamos llevando a cabo un proyecto para evaluar la utilización de nauplius y copepoditos de *Acartia tonsa* para la alimentación larvaria de Atún rojo con resultados muy alentadores, no solo a nivel de supervivencia, sino también de crecimiento y de menor incidencia de malformaciones.

A los problemas que se indicaron anteriormente al hablar de la situación en Japón, hay que añadir los relativos a la recogida de huevos en el mar: la disponibilidad de huevos embrionados está supeditada a las condiciones del mar y por otro lado es frecuente que con los huevos embrionados de atún vengan huevos fecundados de otras especies (bacoreta, bonito, etc.) que presentan en los primeros días un crecimiento más acelerado y que se comen a las larvas de Atún rojo. También puede ser frecuente la presencia de medusas de pequeño tamaño que predan los huevos de atún.

El destete se realiza entre los días 20 y 30 de vida, y se puede hacer con pienso seco o con pescado triturado. Cuando los alevines alcanzan los 3-5 gramos de peso (sobre 35-40 días de vida) son trasportados a jaulas en el mar.

La siguiente gráfica muestra el crecimiento que experimentó un lote los primeros 15 meses en el mar. Es interesante señalar que:

1. Los atunes crecen rápido en las jaulas, alcanzando 500 gr en 2 meses, 1 kg en tres meses y los 2 kg a los 5 meses en el mar. La tasa de crecimiento específico es superior a 4.
2. Temperaturas por debajo de 18ºC enlentecen el crecimiento, que se detiene por debajo de los 16ºC.



Los problemas en las jaulas son similares a los descritos en Japón, y es posiblemente el principal cuello de botella que existe en la actualidad para el desarrollo del cultivo. La mortalidad es especialmente crítica en el trasporte y la primera semana en el mar, y se mantiene elevada durante los primeros meses, oscilando entre el 50 y el 90% en los dos primeros meses

en el mar. A partir de este momento, cuando los atunes tienen un peso en torno a los 500 gramos, la mortalidad disminuye considerablemente.

En el caso de la acuicultura en España se suma el problema de mover peces tan pequeños a sitios expuestos, que los puede hacer especialmente vulnerables si las condiciones del mar son duras en la primera semana y la inexistencia de piensos comerciales para estas fases.

Señalar por último que el IEO acaba de inaugurar recientemente una instalación dedicada a la reproducción del atún en cautividad que consta de dos grandes tanques con una capacidad total de más 6.000 m^3 de agua, que permitirá controlar la reproducción en los próximos años y así solucionar uno de los cuellos de botella del cultivo como se señaló anteriormente.

Accede a la presentación



Producción intensiva de langostino en sistemas cerrados, hacia un futuro sostenible

Sergio Rengel
Gamba Natural S.L.U. Carretera Olmedo, km 2,5, 47400 Medina del Campo, Valladolid
srengel@gambanatural.es

El mercado mundial de langostino y sus retos

Situación actual

En términos generales el mercado de langostino se distribuye de la siguiente forma:

- Mundial: 6,4 mill t/año.
- Europa: 1 mill t/año.
- España: 170.000 t/año

España es el principal mercado europeo de comercialización de langostino.

El mercado del langostino se abastece bien por la pesca o por la acuicultura a partes iguales.

Perspectivas

El crecimiento acelerado de la población mundial y el crecimiento del PIB de muchos países en vías de desarrollo harán que el consumo de productos de la pesca llegue hasta los 20 kg/hab/año.

El estancamiento de las capturas de pesca extractiva por sobreexplotación de los mares y las nuevas regulaciones de pesca responsable (paradas biológicas, técnicas de pesca menos indiscriminadas, etc.), hacen que haya que buscar nuevas formas de obtención de productos de la pesca alternativos.

En este sentido, la acuicultura supondrá más del 50% de todos los productos de la pesca a partir del 2025.

- La producción acuícola de langostino

  En la actualidad la producción mundial de langostino se centra en terceros países situados en regiones tropicales en zonas costeras. Los problemas derivados de estos sistemas productivos son:

  - Distancia: Al ser productos alejados de los mercados, son productos congelados donde transcurren varias semanas o meses hasta su puesta a la venta al público.
  - Medio Ambiente: Son instalaciones situadas en zonas costeras ocupadas anteriormente por humedales de especial importancia ecológica. Además los vertidos provocan eutrofización de los ecosistemas y la pérdida de la biodiversidad.
  - Control de parámetros: Al ser instalaciones a cielo abierto están sujetas a fluctuaciones meteorológicas y de la calidad de la propia agua de captación, que hacen que los parámetros de cultivo sufran constantes variaciones que afectan a la productividad.
  - Enfermedades: Los sistemas abiertos y de grandes extensiones no tienen capacidad para controlar las entradas y salidas de enfermedades, por lo que sus producciones se ven afectadas y por tanto los precios de mercado también sufren importantes oscilaciones.
  - Calidad: Al tratarse de terceros países, la regulación de determinados productos químicos (desinfectantes, crusticidas, etc.) y medicamentos (antibióticos), a veces no se corresponde con las buenas prácticas exigidas en los países de destino
  - Eficiencia: Son en muchos casos sistemas poco eficientes que requieren el uso de muchos recursos (agua, territorio, etc.), para producir la misma cantidad de producto que otros sistemas.

- Sistemas de producción acuícola

  En la actualidad existen tres tipos predominantes de producción de langostino.

  - Extensivos: Son sistemas con densidades de siembra muy bajas (5-10 Pls/m^2) y por tanto también sus rendimientos (<100 g/m^3). No precisan el uso de alimentos

balanceados ni sistemas de aireación, pero sí un importante recambio de agua (habitualmente por bombeo) y la ocupación de amplias zonas costeras. Tienen un impacto sobre el medio ambiente de tipo medio, pues la transformación del territorio no es muy elevada y la carga contaminante de los vertidos tampoco.

- ◊ Semi-Intensivos: Las densidades se incrementan hasta las 25 pls/m^2 con rendimientos de 100-500 g/m^3. Precisan de alimentación con piensos, aireación, fertilización del agua y bombeo con recambios diarios de hasta el 15%. Tienen un impacto elevado sobre el medio ambiente por la ocupación de zonas costeras, la modificación del territorio y la mayor tasa de contaminación de los vertidos.
- ◊ Intensivos: Las densidades de siembra oscilan entre los 50-150 pls/m^2 con rendimientos de 1-2 kg/m^3. La ocupación del territorio es menor, aunque más transformado, con estanques forrados de plástico, alta aireación y fuerte alimentación. Los intercambios de agua son menores al incluir sistemas de bioflóculos que autodepuran el agua.

El modelo Gamba Natural

El modelo que propone Gamba Natural, viene a solucionar gran parte de los problemas tradicionales de los sistemas descritos anteriormente:

- ◊ Localización: El producto se cultiva cerca de los mercados, por lo que la comercialización es inmediata, lo que posibilita la venta de un producto fresco de alta calidad.
- ◊ Ocupación del territorio: Son sistemas muy productivos en pequeñas áreas de producción, que pueden ubicarse en cualquier punto, independientemente de áreas costeras o medioambientalmente sensibles.
- ◊ Interacciones con el Medio Ambiente: Son sistemas cerrados, pues suelen estar confinados por sistemas de invernadero o naves industriales que lo aíslan del entorno. Además el uso del agua también está cerrado, pues hay una depuración/reciclado del agua de cultivo para reutilización.
- ◊ Uso de químicos y medicamentos: El aislamiento del medio natural, previene la aparición de enfermedades y por tanto el uso de productos químicos o medicamentosos, a la vez de que permite una producción constante con precios estables todo el año.
- ◊ Control de parámetros: Estos sistemas confinados permiten un mayor control de los parámetros de cultivo, que son muy estables al no verse influidos por factores como la mayor o menor irradiación solar, viento, lluvia, desbordamientos, avifauna, etc. que afectan a la producción.

Accede a la presentación



MESA DE TRABALLO: EMPRESA E RECURSOS

D. Alberto Novoa González. KF Iber Frost, S.L.

Dna. Carolina Alonso Pozas. iMare natural. Proxecto TASCMAR

D. Carlos Temperán. Acuariologia.org

+ que cebos

Alberto Novoa González
KF Iber Frost, S.L. Bº Aldea, 24 Taborda. 36739 Tomiño, Pontevedra.
sales@koralfarm.com

Los comienzos y la resolución de problemas

Hace tiempo que venimos investigando en cebos artificiales para la pesca, con el propósito de hacerles una vida más llevadera a los marineros en las arduas tareas a bordo de sus embarcaciones. Empezamos con la realización de una hamburguesa de sardina (Fig.1) para las nasas pero, después de muchas pruebas en diferentes puertos y con diferentes marineros, no tuvimos mucho éxito.



Figura 1.- En los comienzos de este invento innovador se pensó en una hamburguesa de sardina y caballa, ya que es el cebo más común usado por los marineros desde que se comprobó que usando cebo se pescaba más.

Un buen día se nos ocurrió la brillante idea de comprimir el producto y mezclarlo con aglomerantes, comenzando de nuevo a hacer pruebas y más pruebas, algunas veces con éxito y otras no, pero no sabíamos qué era lo que estaba mal, ya que siempre hacíamos la misma fórmula. Comenzamos entonces a hacer anotaciones de los diferentes puertos y pruebas de mar realizadas, lo que nos llevó después de meses de muchas pruebas, a cambiar un poco la fórmula con diferentes ingredientes. Pero los fracasos continuaron.

Empezamos a investigar en los diferentes cebos artificiales del mercado y comprobamos que nuestro cebo desprendía más materia grasa que los cebos de la competencia y en menos tiempo, y aún así no encontrábamos donde estaba el error, qué era lo que hacíamos mal para que unas veces funcionara y otras no. Comenzamos a tomar muestras del agua del mar cuando llovía y cuando hacia bueno, también cuando se pescaba y cuando no. Esta tarea nos llevó meses y más meses sin resultados positivos, hasta que un buen día nos dimos cuenta que dependía de la forma en cómo se usaba el cebo, si se ponía en una nasa funcionaba de una manera y si se ponía en un trasmallo era diferente, en la nasa el producto estaba en el fondo y dependía de las zonas de más o menos corriente de agua y en los trasmallos el cebo siempre estaba a merced de las corrientes marinas. Esto no ayudó a ver las cosas de diferente forma y el producto llevó otro nuevo cambio en la producción, teníamos que hacer que el cebo no liberase las materias grasas tan rápido, tarea difícil al estar hecho de pescado como materia prima principal de la formulación. Se hicieron cambios y más cambios en la formulación para llegar a un resultado satisfactorio.



Figura 2.- Desde los inicios de este formidable invento contamos con la colaboración de Ángel Rodriguez patrón del Claribel María (2A), haciendo las pruebas de mar con diferentes

resultados. Resultados que podemos comprobar cuando Ángel retira sus trasmallos en la ria de Vigo, lugar donde faena desde hace muchos años (2B).

Una vez realizados los diferentes cambios se comenzaron a hacer las pruebas de mar de nuevo, las primeras pruebas salieron bien, luego nos fuimos a otro puerto y no nos funcionó. Volvíamos a los inicios del cebo, ya no sabíamos por donde tirar ni qué hacer, así que comenzamos de nuevo una vez más. Se hicieron pruebas tomando temperaturas y presiones de fabricación, parecía una tontería pero el problema estaba en la producción. este problema empezaron a salir bien ya que. L era quedonde se colocaba el cebo ya quemuy ; óhacer con , solucionándose el problema. En las nuevas pruebas de mar se empezaron a ver resultados satisfactorios, tanto en cantidad de pescado como en variedad, incluso con diferentes mariscos. Se empezó a dar el producto a los marineros para que realizaran pruebas y los resultados seguían siendo favorables, unas veces se pescaba más y otras menos pero el producto tenia buenos resultados.

El resultado

Después de siete interminables años producimos un producto que desprende de manera progresiva los mismos componentes que un cebo natural, atrae más que cualquier cebo natural y es más efectivo con todo tipo de pescados, crustáceos y cefalópodos, dura más que los cebos naturales (entre tres y cinco días) por lo que no es necesario encarnar todos los días y funciona tanto para la pesca en nasa como en trasmallo. Su nombre es SARDITRAP.

Nuestro cebo no necesita conservación ni congelación, es un producto que dura un año en el envase original (Fig. 3) soporta el frio y el calor bastante bien, puede almacenarse en el barco o en tierra. Se comercializa en envases de En la Tabla I se muestran los análisis comparativos de costes respecto a otros cebos.

Tabla I.- Analisis comparativo de costes

	Sardina	Caballa	Jurel	Otros	Sarditrap
Precio/kg	1,40 €	0,70€	0,35 €	2,75 €	5,00 €
Encarnes	5	5	5	5	2
Peso/cebo	0,12 k	0,20 k	0,30 k	0,60 k	0,04 k
Coste/nasa	0,84 €	0,70 €	0,52 €	8,25 €	0,40 €



Figura 3.- SARDITRAP ha sufrido diferentes cambios en los ingredientes y en su formato desde los inicios del producto hasta el día de hoy. Esto nos llevó a diferentes formas de presentarlo y como resultado final se decidió el que aquí se muestra.

Ahora estamos haciendo pruebas en la pesca de altura en el palangre del pez espada y está dando resultados muy buenos, el problema es que las autoridades no permiten el uso de las carpetas por ser de plástico.

Accede a la presentación



Depuración de bivalvos en recirculación: pros y contras

Carlos Temperán
Acuariologia.org
info@acuariologia.org

Proceso general en depuración de bivalvos

Los moluscos son muy apreciados en la alimentación, constituyendo una excelente fuente de nutrientes al aportar proteínas de alto valor biológico (similares a las de la carne y los huevos), un contenido variado en minerales, oligoelementos y vitaminas y lípidos poliinsaturados. Con el fin de garantizar la salubridad de estos alimentos, los productos provenientes de la pesca, la extracción natural y la acuicultura están bajo presión para mantenerse al día en la legislación internacional sobre la seguridad alimentaria.

En los centros de expedición y depuración, los aspectos de salud pública se enfocan principalmente en evitar la presencia de riesgos biológicos (parásitos, bacterias y virus) y químicos (plaguicidas, metales pesados y biotoxinas). Dichos riesgos, solo pueden ser eliminados por medio de la introducción de programas de buenas prácticas en los centros de producción y comercialización, así como con la emisión y vigilancia de normas y regulaciones específicas por parte de las autoridades competentes.

En la industria alimentaria, es muy importante considerar estos nuevos sistemas de control de calidad sanitaria del producto, porque de acuerdo a la nueva legislación, para tener acceso a los mercados mundiales, los productos nacionales o los importados de terceros países, requieren ser producidos bajo control en materia de inocuidad y estar acompañados de los registros de producción y expedición.

Los reglamentos de la UE contienen pocas estipulaciones detalladas sobre el procedimiento de depuración a seguir. La legislación comunitaria estipula los límites máximos de varios contaminantes, de tal forma que los moluscos bivalvos deben depurarse continuamente durante un período suficiente para cumplir con el estándar microbiológico del producto final (*E. coli* ≤ 230 / 100 g; ausencia de *Salmonella* en 25g). Los estados miembros deberán establecer controles oficiales para garantizar el cumplimiento de estos parámetros.

Los moluscos bivalvos son organismos acuáticos que se encuentran desde los límites superiores de la pleamar hasta las zonas abisales. Se alimentan filtrando el agua, concentrando de este modo los contaminantes que se hallan en el agua y en los fangos en los que habitan.

Debido a su modo de alimentación por filtración, los moluscos bivalvos tienden a concentrar bacterias patógenas, virus, toxinas y contaminantes químicos. Los contaminantes que concentran los moluscos bivalvos en su organismo, pueden provocar toxiinfecciones alimentarias en las personas que los consumen, sobre todo si se consumen crudos.

El método de obtención de moluscos para asegurar la garantía sanitaria es el cultivo y la recolección en áreas que no estén sometidas a una fuente externa de contaminación; o bien, un proceso posterior de depuración o reinstalación.

Se consideran centros depuradores de moluscos bivalvos, *aquellas instalaciones o establecimientos dotados de los medios técnicos necesarios para conseguir la eliminación de los gérmenes patógenos en los moluscos vivos destinados al consumo humano*.

La depuración consiste en la inmersión de los bivalvos en tanques con agua de mar limpia, en condiciones que permitan maximizar la actividad natural de filtración y reducir así la contaminación. De esta forma, se produce un efecto de dilución y los moluscos van eliminando, poco a poco, los contaminantes que han ido adquiriendo en su medio natural o durante su cultivo.

Para conseguir que los parámetros que se consideran críticos logren que la depuración sea eficaz en la eliminación de la contaminación microbiológica, se debe tener en cuenta que el diseño del sistema de depuración, y el manejo de todo el proceso, (*Depuración de bivalvos* - FAO, 2010), deben:

- Permitir la rápida reanudación de la actividad de filtración de los moluscos.
- Facilitar la eliminación de la carga bacteriana de los bivalvos.
- Evitar la recontaminación microbiológica de los moluscos.

La depuración es un proceso que presiona los mecanismos fisiológicos naturales de los moluscos para promover la purga del tracto gastrointestinal. La eficacia de la depuración se define como el grado en que los microorganismos y otros agentes contaminantes serán eliminados de los moluscos durante el proceso, con el fin de reducir la probabilidad de que la transmisión de la carga bacteriana fecal sean perjudicial para los consumidores.

El propósito principal de las unidades de depuración utilizados en las plantas depuradoras es el tratamiento y la desinfección de agua del circuito. Se puede considerar el uso de varias barreras de tratamiento en el proceso de la depuración, en donde cada barrera actúa para reducir aún más la probabilidad de contaminación del agua. Estas barreras de tratamiento pueden incluir el uso de diferentes procesos físicos, químicos y biológicos de tratamiento del agua.

El innovador sistema de recirculación del agua se basa en un proceso de tratamiento de efluentes con residuos, para hacer posible su reutilización mediante un mínimo de recambio del agua, y poder rebajar la toxicidad de los metabolitos excretados. El mantenimiento de la calidad del agua durante el proceso de depuración, se lleva a cabo por equipos complementarios de: eliminación de **sólidos, depuración biológica, estabilización química,** oxidación, oxigenación, refrigeración, y radiación UV como proceso de esterilización.

En los sistemas cerrados que reutilizan el agua, es necesario colocar los múltiples componentes de los sistemas de reciclaje del agua en el orden lógico, para así maximizar el rendimiento de cada componente y de todo el sistema; y cada unidad debe funcionar y mantenerse de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Condicionantes de la depuración de moluscos bivalvos

La bibliografía disponible en la materia tratada, indican que, en general, los sistemas de depuración en moluscos bivalvos contaminados reducen con éxito los niveles de agentes bacterianos, y moderadamente los agentes virales. El estado actual de los sistemas de depuración, y los factores que afectan a la eficacia del proceso, se resumen a continuación.

- La depuración de moluscos, en condiciones de funcionamiento adecuadas, es capaz de eliminar muchas especies bacterianas de los moluscos, incluidos los coliformes fecales.
- La temperatura del agua, salinidad y turbidez influyen en la eficacia de la depuración. Estos factores deben ser optimizados para mantener el estado de salud de los mariscos con el fin de maximizar la eficacia de la depuración.

- Es probable que las condiciones óptimas para la depuración, son variables entre las diversas especies de moluscos, o en una misma especie que se ha aclimatado a diferentes ambientes.
- La carga de patógenos inicial, la duración a la exposición de patógenos y la ubicación de los patógenos dentro de los tejidos de los moluscos, influirán en la eficacia de cada uno de los sistemas de depuración. En general, la eficacia de la depuración se reduce cuando la carga inicial de patógenos es alta.
- La radiación ultravioleta UV, como un medio de desinfección del agua durante la depuración, es relativamente eficiente y rentable.
- Se requiere más investigación para evaluar la desinfección UV, y para mejorar los métodos alternativos de desinfección disponibles (ozono, cloro, yodóforos).
- No todas las especies bacterianas se eliminan de los moluscos a la misma velocidad durante la depuración.
- Evidentemente, las bacterias que constituyen parte de la microbiota natural de los bivalvos (p.ej., *Vibrio spp.*), se eliminan menos fácilmente que las bacterias introducidas (p.ej., *E. coli*).
- La capacidad de depuración, para eliminar de forma efectiva los agentes virales en los moluscos es incierto, porque son capaces de permanecer en los moluscos después del proceso de depuración; por lo que, toma un periodo de tiempo más largo en comparación con las bacterias, para ser eliminado de manera efectiva de los mariscos.

Proceso biológico durante la depuración

Los sistemas de recirculación provienen de la acuicultura intensiva. El concepto *"recirculación del agua"* es utilizado en sistemas en los que el agua fluye de cada tanque o piscina de depuración al proceso de tratamiento y desinfección del agua, y luego se devuelve nuevamente a los tanques, previo paso de control y regulación de los parámetros de calidad del agua.

Los sistemas de recirculación reutilizan el efluente de agua de la depuración con un mínimo de recambio de agua nueva del total del sistema, siendo posible mantener la calidad del agua en las mejores condiciones por un largo tiempo a un costo mínimo. Por eso, se puede considerar y llamar a estos sistemas como *"circuitos cerrados"*.

Los sistemas de recirculación del agua permiten mantener los moluscos durante varias semanas, sin pérdida de calidad, mediante un óptimo diseño del caudal, de los equipos de tratamiento, de enfriamiento, de desinfección y del reparto del oxígeno disuelto.

La depuración, como sistema de purificación del agua, es una técnica aplicada en muchos países para eliminar los contaminantes microbianos de los moluscos bivalvos que estén moderadamente contaminados, poniéndolos en tanques de agua de mar limpia para que lleven a cabo su actividad normal de filtración durante el periodo de tiempo necesario, que puede variar desde unas horas hasta varios días.

El proceso de depuración de bivalvos comerciales para consumo humano se lleva a cabo por exigencias de la legislación internacional, nacional o local para satisfacer los requisitos legales y proteger a sus consumidores, y superar los problemas causados por la contaminación fecal de zonas de cría de moluscos bivalvos provocada por la gran concentración de población existente en las zonas costeras, o debida asimismo a las prácticas ganaderas extensivas.

El objeto de esta charla sobre los sistemas de recirculación del agua en depuración, es aplicativo e informativo para la industria sectorial, y trata sobre los procesos de depuración basados en los sistemas cerrados de reciclaje del agua, con un plan comercial por lotes de *<todo dentro / todo fuera>*; en cumplimiento con los principios generales de bioseguridad con respecto a las consideraciones de salud alimentaria pública y de la salud fisiológica de los moluscos.

Los aspectos principales que inciden en la efectividad de la depuración son el diseño del propio sistema, la calidad del agua de mar que se emplea, y la forma de gestionar el sistema y los procesos adjuntos derivados de la comercialización; además, de fortalecer las condiciones fisiológicas adecuadas para mantener la salud de los moluscos bivalvos durante un periodo de tiempo suficiente hasta su llegada al consumidor final.

Según se plantea en depuración, la base del proceso de tratamiento del agua, se fundamenta en que debido a los procesos biológicos del stock de animales, se liberan en el agua productos de desecho que, para objeto de la filtración, son:

- *Materiales inorgánicos en suspensión:* limo, fango, arenillas, etc.
- *Materiales orgánicos en suspensión (MES):* detritus, heces, restos, etc.
- *Materiales orgánicos en suspensión vivos:* algas, desoves, bacterias, etc.

- *Compuestos disueltos orgánicos (MOD):* urea, proteínas, azúcares, etc.
- *Compuestos disueltos nitrogenados:* amoníaco, nitritos y nitratos.

Los productos catabólicos liberados por los moluscos se van acumulando en el agua del sistema produciendo efectos tóxicos en los propios moluscos. Por eso, el agua del sistema ha de ser renovada: bien por recambio total de agua (en circuitos abiertos), o bien, por medio de procesos de tratamientos (en circuitos cerrados); en los cuales, antes de recircularse nuevamente, se ha de tratar para eliminar todos los cambios producidos, con un mínimo de aporte de agua nueva.

Casi todos ellos acaban descomponiéndose finalmente en amoníaco. El hecho de que el agua esté limpia y cristalina no indica que esté bien; puede contener productos como el amoníaco y los nitritos que a pesar de no dar color, son muy tóxicos para los animales. Además, existe el condicionante de mantener los valores óptimos de los parámetros físicos y químicos que afectan a la salud de los organismos acuáticos y, consecuentemente, a su capacidad depurativa.

Las modificaciones que los parámetros físicos y químicos **experimentan** como consecuencia de la actividad fisiológica de los organismos acuáticos (especialmente de la concentración de compuestos nitrogenados y oxígeno disuelto), se han de establecer valores límite para algunas variables que pueden ocasionar problemas de toxicidad o de estrés por su limitación, en los diferentes tanques. En este asunto, radica la prioridad de la medición, control y regulación de los principales parámetros físicos, químicos y biológicos a considerar para asegurar la salud de los organismos acuáticos estabulados.

Los condicionantes técnicos más críticos en la depuración de bivalvos, tratan de mantener en todo momento las variables fisiológicas óptimas para que los moluscos realicen su actividad de filtración, con la máxima efectividad de eliminación de la carga microbiana. La única forma de conseguirlo es asegurar la ESTABILIDAD de la calidad del agua en los valores similares a las condiciones reinantes en su medio marino original, a través de los equipos tecnológicos usados en los sistemas de reciclaje o recirculación del agua.

La calidad del agua en el sistema de recirculación depende de gran cantidad de factores, tales como el tamaño de los tanques, la biomasa que hay en dichos tanques, la tasa de filtración, la temperatura, la eficiencia del tratamiento para la eliminación de sólidos, el dimensionamiento del biofiltro, la capacidad de la espumación, etc. El flujo de agua es el mecanismo a través del cual el oxígeno es transportado hacia los tanques de depuración de bivalvos, y por el cual, los productos residuales son retirados.

Ingeniería técnica del proceso de depuración

El funcionamiento correcto de un sistema de depuración en recirculación precisa la calificación continua de la calidad del agua a través de unos análisis objetivos y fiables. Dichos análisis pueden ser realizados por el propio promotor, si está cualificado; o bien, deben realizarse por un laboratorio. Es muy importante la correcta toma de muestra, tanto en el protocolo a seguir, como con el recipiente y tiempo hasta análisis adecuado.

Conseguir cumplir con los requisitos biológicos exigidos, precisa la realización de la *Ingeniería Técnica del Proceso*, que se inicia con el diseño hidráulico y el dimensionamiento de las variables técnicas, pasando por las infraestructuras y equipos tecnológicos necesarios, hasta consideraciones de puesta en marcha, funcionamiento, mantenimiento y planes de contingencia. El diseño y dimensionamiento de la capacidad máxima de depuración por día, son esenciales para asegurar le eficacia y el éxito en el proceso depurativo.

En los sistemas de recirculación del agua, se deben tener en cuenta dos sistemas paralelos: la biomasa de moluscos y la purificación del agua. Debido a que los desechos producidos por los bivalvos, deterioran su propio entorno acuático; estos desechos deben ser eliminados o convertidos en productos menos nocivos a través de los procesos de tratamiento y depuración del agua. La purificación del agua precisará también del proceso de esterilización para la inactivación de los microbios.

El sistema de depuración propuesto aquí, se produce por la recirculación del agua en régimen de circuito cerrado, con un aporte mínimo de agua nueva necesaria para el total control de la calidad del agua; lo que influye en el estado fisiológico de los moluscos y en la eficacia del proceso de la depuración, debido a la influencia de varios factores importantes, tales como: la temperatura, oxigenación, turbidez, salinidad y flujo de agua, que pueden estresar al animal y, por la misma razón, modificar el rendimiento de su estado de filtración y eliminación de gérmenes.

Los sistemas de purificación del agua suelen incluir varios tipos de filtración. Los principales productos de desecho que han de eliminarse son todo tipo de partículas orgánicas e inorgánicas, en suspensión y en disolución, mencionadas en el párrafo anterior. **La cantidad de sustancias excretadas y los límites de tolerancia de la especie,** junto con dos características del sistema: eficiencia del filtro y porcentaje de agua renovada determinan el volumen de agua necesario y el flujo de la misma.

Estos tratamientos reciben el nombre de depuración del agua, y son una consecuencia de fenómenos físicos, químicos y biológicos (adsorción, floculación, decantación, flotación, oxidación bioquímica, etc.); que se han desarrollado hasta el punto de crear un sistema integrado de tratamiento del agua (filtración, purificación, espumación, circulación, aireación, esterilización y termoregulación) que permite un control artificial de los cambios que van teniendo lugar continuamente.

Etapas del Sistema de Recirculación del agua

Las fases o etapas del sistema de tratamiento del agua a instalar, son:

- *Fase I. Filtración mecánica. Control de materias orgánicas en suspensión (MES);* por sistemas de sedimentación, ciclón, filtro arena, tambor malla o perlón.
- *Fase II. Filtración biológica. Control de compuestos nitrogenados (NH_3, NO_2);* por filtración biológica de goteo o húmedos, y/o recambios parciales de agua.
- *Fase III. Filtración de orgánicos disueltos. Control de materias orgánicas disueltas (MOD)*; por filtración química, con espumadores y/o carbón activo.
- *Fase IV. Oxidación por ozono. Control del Potencial Oxi Reductor (ORP);* por sistema de ozonización, con adición de ozono para dosis de oxidación.
- *Fase V. Oxigenación y desgasificación.* Control del oxígeno (O_2); por sistemas de aireación u oxigenación, por soplantes de aire u oxígeno puro.
- *Fase VI. Desinfección y esterilización. Control de la carga bacteriana;* por sistemas de esterilización, con rayos UVA.
- *Fase VII. Refrigeración. Control de la temperatura (TºC);* por termorregulación del agua, activando la refrigeración del agua.
- *Fase VIII. Grupo de bombeo. Circulación del agua y circuito hidráulico;* por sistemas de bombeo de retorno, con equipos de doble bomba automatizados.
- Fase IX. Acondicionamiento de la química. Control de parámetros:
  - Control del ORP; por ozono y retirada de compuestos orgánicos.
  - *Control del pH;* por reactores calcáreos o dosificación de álcalis.
  - *Control de nitratos;* por recambios parciales de agua.
  - *Control de la salinidad;* por recambios de agua salada.

- ◊ *Control del anhídrido carbónico;* por sistemas de desgasificación de gases control del pH y la alcalinidad.

❖ *Fase X. Funcionamiento del Sistema. Control del manejo; por* automatismos, sistemas de alarma, monitorización automatizada de parámetros, planes de contingencia, programas de Bioseguridad, mantenimiento de equipos, etc.

Descripción del proceso de recirculación del agua

Los sistemas de depuración actuales, suelen utilizar tanques de bins isotérmicos y apilables, y piscinas construidas en obra, siempre en superficies terminadas en acabado alimentario.

El proceso se inicia en el contenedor con los bivalvos a depurar (tanques o piscinas), separados del fondo sobre una rejilla elevada. El agua efluente del contenedor arrastra las impurezas desprendidas por los moluscos hacia la etapa de filtración mecánica y biológica, en los que se eliminan las materias orgánicas, y se transforman los componentes amoniacales tóxicos en compuestos inócuos.

La tecnología de la filtración mecánica se desarrolla mediante un medio de soporte sintético, complementado con carbón activo, que permite la retirada completa de las materias en suspensión de mayor tamaño.

El biofiltro, con soporte bacteriano estático o en suspensión, conlleva una gran superficie biológica, que debe permitir un buen flujo de agua por toda el área de colonización bacteriana.

El agua procedente de los filtros es bombeada a los siguientes procesos de tratamiento del agua para su ozonización por espumación, que agiliza la total retirada del remanente de micropartículas orgánicas, ureas y proteínas.

La inyección automatizada de ozono, complementado con el proceso de espumación en el skimmer, acelera la retirada de materias en suspensión de pequeño tamaño; con la total separación de ureas y proteínas del agua, favoreciendo el incremento y regulación del potencial de oxidación y reducción.

La desinfección del agua se realiza mediante radiación ultravioleta. La desinfección UV es un proceso físico inócuo para los moluscos que es mantenido como el sistema de desinfección ideal en los centros de depuración internacionales.

Las siguientes etapas permiten la refrigeración y el control de la temperatura del agua en el valor idóneo para la mayor eficacia del proceso de depuración de los moluscos.

El equipo de refrigeración del agua debe ser de alta potencia frigorífica, con intercambiadores de titanio integrados, y termostato pogramable.

La integración opcional de otros niveles de automatización, pueden ser: el control del bombeo, retrolavado del filtro, control de la desinfección y medición contínua de los principales parámetros físico-químicos de la instalación.

La diferente disposición del sistema de tratamiento, tanques y depósitos, atiende al espacio y capacidad de carga de mariscos, según las necesidades de cada planta depuradora.

Bibliografía

Depuración de bivalvos (FAO, 2010).

Manual de Auditoría ASC para Bivalvos (Aquaculture Stewardship Council).

Depuration des Coquillages. L'Institut Français de Recherche pour l'exploitation de la Mer (Ifremer – FR).

L'Agence Régionale de Santé Bretagne (ARS – FR).

Comité National de la Conchyliculture (CNC – FR).

Centre for Environment Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS - UK).

Seafish Industry Authority (SEAFISH - UK).

Food Standards Agency (FSA - UK).

Food Standards Agency Scotland (FSAS).

Association Europenne des Producteurs des Mollusques (EMPA – FR).

Safe Management of Shellfish and Harvest Waters. World Health Organization (WHO).

Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual (EPA).

Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Moluscos Bivalvos para la Inocuidad Alimentaria. Centro de Investigación en Alimentación (Mxco).

Manual de Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo de Moluscos. Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano (OSPESCA).

Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2011-2015 (AESAN).

Guía para la gestión sanitaria en acuicultura (JACUMAR).

Il Controllo Ufficiale Nei Centri Di Depurazione MBV. Dott. Lari Boschetti (IT).

Trattamento Acque Reflue Centri Depurazione Molluschi. Dott. Rossetti E. (IT).

La implantación de Sistemas de autocontrol (APPCC) en el sector primario (ANFACO-CECOPESCA).

*Interpretación Legislativa en materia de higiene de productos pesqueros (*ANFACO-CECOPESCA).



XXVIII CICLO CULTIVANDO O MAR: RECURSOS MARISQUEIROS PARA O FUTURO, AS NOVAS OPORTUNIDADES DE HOXE: PEPINO DE MAR E OUTRAS ESPECIES

D. Jesús David Fernández Pérez. Xerente da Confraría de Pescadores S. Xosé de Cangas

Dna. Carolina Alonso Pozas. iMare Natural

D. Jesús A. Fernández Barreiro. Consellería do Mar

Explotación e aproveitamento da holoturia na Confraría de Pescadores "San Xosé" de Cangas

Jesús David Fernández Pérez
Confraría de Pescadores San Xosé de Cangas, Avda. Castelao s/nº, 36940 Cangas do Morrazo Pontevedra, david@cofradiadecangas.org

A demanda do mercado actual, no que aparecen novos compradores asiáticos interesados na procura de canles de comercialización con España, e máis concretamente con Galicia, na busca de novos produtos, fan que a maior parte dos distribuidores cos que actualmente mantemos relacións, se estean a pór en contacto con esta entidade para obter información sobre a comercialización do cogombro ou "pepino de mar".

No transcurso dos anos 2013-2014 enviáronse, a boa parte dos nosos comercializadores, mostras de holoturias (sen fins comerciais), de cara a abrir novos mercados. A día de hoxe existen distribuidores interesados na compra de holoturias.

As holoturias captúranse e comercialízanse en máis de 70 países de todo o mundo. Son explotadas pola pesca industrial, semi-industrial e artesanal nas rexións polares, temperadas e en zonas tropicais. As holoturias comercialízanse evisceradas, fervidas, salgadas e secas, o chamado "*Trepang*" ou "*Beche-de-mer*". Tamén é habitual o consumo da holoturia crúa ou en diversas preparacións culinarias específicas para cada zona, así como o procesado de certas partes específicas para a elaboración de produtos *delicatessen*.

En Galicia existe un interese cada vez maior na explotación das holoturias, recollido xa desde hai anos pola regulamentación galega: Orde pola que se regula a recollida, explotación e circulación de equinodermos na comunidade autónoma de Galicia para a campaña 1987/88. (Orden XG de 01 de decembro de 1987 -DOG 7/1988-. Art. 2.2), na que se citan dúas especies, *Holothuria forskali* e *Parastichopus regalis*.

Do total de especies de holoturias que se poden atopar na comunidade galega, polo de agora tan só consideramos interesante para a súa comercialización a *Holothuria (Panningothuria) forskali*.

H. forskali atópase no litoral rochoso desde a zona intermareal ata os límites infralitorais, e aínda que súa presenza está documentada ata os 50 metros, as poboacións máis importantes sitúanse nos primeiros 15 m. A densidade é superior en fondos rochosos ou rochedos infralitorais de bosques de laminarias, cá en zonas lamacentas ou lamacentas-areentas. A diferenza doutras especies afíns de cogombros, esta mantén o seu corpo limpo de calquera elemento que se empregue para ocultarse dos depredadores, facilitando o traballo aos mergulladores. A súa alimentación é vía detritívora, e o seu comportamento alimentario é tanto diúrno como nocturno.

No ano 2014 a confraría de Cangas elaborou un plan de explotación de equinodermos no que se solicitaba a extracción de ourizo de mar e de tres especies de holotura: *Aslia lefevrei*, *Holothuria (Panningothuria) forskali* e *Leptopenctata elongata*, inda que finalmente só consideran interesante para a súa comercialización unha delas, *Holothuria (Panningothuria) forskali*. O total de embarcacións participantes no plan de explotación é de 7 barcos e o de 22 tripulantes. A recolección deste equinodermo realizase nos meses de xaneiro a abril (ambos incluídos) e os meses de outubro a decembro. O total de días autorizados no ano é de 125.

O actual sistema de venda da nosa lonxa consiste na adquisición de toda a mercadoría por un só cliente ao inicio de cada campaña. O motivo de adxudicar a un só cliente é que maioritariamente o destino dos exemplares capturados no noso ámbito é a República Popular China. Co obxecto de xuntar a maior cantidade de produto, de cara a elaboralo e contratar os servizos de transporte oportunos, é polo que precisan adquirir unha cantidade importante da referida especie para un transporte único, que faga rendible a súa explotación.

As empresas que mercan o carallote en lonxa, procésano e conxélano para o seu envío nun contedor marítimo con varias toneladas de produto (24 t), polo que precisan asegurarse a compra da práctica totalidade da produción, a fin de contratar o servizo de transporte, cuxo gasto resulta moi elevado e, asemade, garantir aos seus clientes unha entrega mínima de produto, etc…

Ao inicio das explotacións, no ano 2015, a Consellería do Mar autorizounos a extracción de tan só 5 kg de carallote por barco. Isto implicaba que as empresas que pretendían adquirir o produto non podían acumular unha cantidade mínima rendible para a súa comercialización.

Xa no plan de explotación presentado para o ano 2016, e despois de achegar distintos informes de avaliación de recurso e de necesidades de comercialización, a Consellería do

Mar autorizou a extracción durante 125 xornadas de traballo, 40 delas cun tope de 100 kg/embarcación/día, e as restantes (85) a 20 kg/barco/día.

Mais, tal e como temos autorizada a extracción no plan de explotación, fáisenos imposible atender as peticións das empresas, xa que estas están acostumadas a traballar doutro xeito con outros países.

No ano 2016 a Consellería do Mar, atendendo a demanda da confraría, autorizou a extracción de 100 kg durante 60 días, pero aínda que o incremento foi bastante considerable, somos conscientes de que non é suficiente para os nosos clientes. Non obstante, entendemos que o sistema de traballo doutros países cómo Grecia, México, etc.. non é o máis axeitado, e na actualidade están na situación que están por extraer sen ningún tipo de control, avaliación do recurso, estado de biomasa, ciclo reprodutor, etc.

Na actualidade a confraría de Cangas participa en distintos proxectos e colabora na realización de estudos con centros de investigación cómo o Ecimat, a fin de coñecer todos estes parámetros, de cara a efectuar unha explotación sostible do recurso, atendendo por unha banda á viabilidade da explotación dos nosos barcos e pola outra á conservación do recurso, incidindo nos controis continuados de poboacións, co obxecto de e non caer nunha sobre explotación do recurso.

Proyecto H2020 "TASCMAR": Implicación de iMare Natural S.L.

Carolina Alonso Pozas
iMare Natural, Polígono "El Vadillo" C/ Santo Domingo Nave 2. carolina.imare@gmail.com

iMare Natural nació hace ya tres años como una Spin-Off de la Universidad de Granada por la vinculación que uno de sus socios fundadores, Pedro A. Álvarez Molina, aún conserva con el departamento de Biología Animal en colaboración con Félix Hidalgo en la elaboración de su tesis doctoral. Es por ello, que iMare siempre ha estado relacionada con la investigación y la innovación.

iMare Natural lo forman un pequeño grupo de personas con perfiles profesionales muy ligados a las ciencias marinas y a la acuicultura:

Pedro A. Álvarez:

- Licenciado en CC. del Mar y socio fundador, es director de i+D.
- Proyectos de investigación acuícola.
- Doctorado en la UGR junto al Profesor Félix Hidalgo Puertas (junto con quien también colabora en el plan nacional de cultivo de erizo de mar, y trabajando en el diseño de piensos en colaboración con el SAMS (Scottish Association of Marine Science).
- Cultivo erizo.

Carolina Alonso:

- Licenciada en CC. del Mar y socia fundadora, es directora ejecutiva.

- Siempre vinculada al sector pesquero.
- Colaboración en proyectos de investigación de IEO Cádiz.
- Observadora pesquera en buques de altura elaborando manuales de calidad en apoyo a las políticas pesqueras.

Ana Esther Ortiz:

- Licenciada en CC del Mar.
- 20 años de trayectoria profesional en acuicultura y acuarios públicos.
- 10 años de innovación en la reproducción y cultivo de nuevas especies: de Lenguado y Seriola.
- Colaboración con CSIC en proyectos de conservación e introducción de especies marinas amenazadas.

Rafael Belda Poveda:

- Técnico en química industrial
- 7 años de trayectoria profesional en acuicultura y acuarios públicos.
- 2 años de innovación y cultivo de *Litopenaeus vannamei* (camarón patiblanco) y *Holoturia scabra* en la empresa NAQUA (Arabia Saudí), innovando con sistemas biofloc y sustratos verticales para el camarón y consiguiendo con éxito la reproducción sexual de la holoturia.

Nuestros primeros años de actividad empresarial únicamente estában orientados a proyectos de investigación relacionados con la acuicultura. Nuestro objetivo fundamental era (y aún sigue siendo) conseguir una diversificación de los cultivos marinos tan necesaria en el sector, así como nuevas técnicas de cultivo para comercializar, en nuestro caso, Ortiguilla de Mar, Espárrago de Mar y Espardeñas o Pepinos de Mar.

Lo destacable de nuestro proyecto es que cultivamos las especies con una tecnología limpia y responsable con el medio gracias a la utilización de nuevas e innovadoras técnicas naturales en acuicultura, que garantizan la conservación del medio marino y de sus especies muchas de las cuales se encuentran en peligro de conservación por la sobreexplotación y el furtivismo, ya que las especies objetivo se encuentran actualmente en las cocinas y mesas más selectas de nuestra gastronomía.

Estas particularidades iniciales de nuestro proyecto y el hecho de ser pioneros en el cultivo de Ortiguillas de mar, es lo que nos llevó a podernos embarcar en nuestro último proyecto.

Hemos tenido la suerte de poder formar parte del proyecto europeo de investigación H2020 con una financiación de más de 6,5 millones de €, conocido por el acrónimo TASCMAR. Es un fuerte consorcio multidisciplinar formado por 13 instituciones internacionales y que tiene como único socio español a nuestra empresa, iMare Natural.

El objetivo del proyecto es la explotación de invertebrados y simbiontes marinos para descubrir aplicaciones aún desconocidas en el campo de la medicina, farmacología o cosmética, con un enfoque particular en el tema de la lucha contra el envejecimiento. Se centrará sobretodo en los invertebrados y simbiontes marinos de la zona mesofótica con aplicaciones aún desconocidas, y lo combinará con enfoques innovadores para su cultivo y la extracción de estos organismos marinos en laboratorio a escala piloto.

No olvidemos que los mares y océanos cubren más de las tres cuartas partes de la superficie de la tierra, donde los organismos marinos representan una parte importante de sus recursos biológicos. Los ecosistemas marinos y sus organismos relacionados siguen siendo en gran parte inexplorados, poco estudiados y escasamente explotados. Muchos de estos organismos producen una gran diversidad de compuestos químicos y bioquímicos, muchos aún desconocidos, que pueden tener importantes aplicaciones en diversos sectores industriales. De ahí el gran interés de iMare y de la comunidad europea en este proyecto de investigación que esperamos tenga resultados prometedores.

Los ecosistemas marinos de la zona mesofótica (30-100 m de profundidad), se caracterizan por unas condiciones extremas de temperatura, presión y oscuridad. Los invertebrados marinos (como corales blandos, esponjas y anémonas de mar) que se concentran en la zona, desarrollan respuestas adaptativas y adquieren diferentes mecanismos de interacción o cooperación para asegurar los nutrientes, para defenderse de los depredadores y competidores, para crecer y multiplicarse. En esta lucha por la vida estos organismos marinos “raros” o “poco investigados”, producen una gran diversidad de compuestos químicos que están siendo reconocidos como fuente de compuestos bioactivos con diversas aplicaciones comerciales en el campo de la cosmética y como fármacos médicos para la biorremediación, sin que esté además reñido con la protección del medio ambiente y la preservación de los recursos.

El envejecimiento de la población está empezando a ser una tendencia demográfica en todo el mundo. Según la OMS, en el 2040 la población mundial de 65 años o más puede llegar a un 14% de toda la población mundial y en consecuencia, las enfermedades relacionadas con esta longevidad como, enfermedades cardiovasculares, trastornos metabólicos, neurodegeneración, cáncer, Alzheimer, etc., aumentarán significativamente.

Esto ha sido reconocido como de vital importancia en el programa Horizonte 2020, donde el objetivo primordial será aumentar el periodo de vida saludable de los ciudadanos europeos en 2 años para 2020.

Con nuestra colaboración en este proyecto H2020, vamos de la mano de la Comisión Europea en el concepto “Blue Growth” o “Crecimiento Azul”, estrategia a largo plazo de apoyo al crecimiento sostenible de los sectores marino y marítimo, que reconoce la importancia de los mares y océanos como motores de la economía europea por su gran potencial para la innovación y el crecimiento.

Son ya reconocidas algunas de las beneficiosas aplicaciones que se han descubierto gracias a la investigación y extracción de sustancias bioactivas de determinadas especies marinas, entre ellas:

- Esponjas: antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, psoriasis
- Medusas bioluminiscentes: marcadores
- Briozoos: Alzheimer, cáncer de pulmón, leucemia
- Ascidias: Antitumorales Yondelis® (Pharmamar)

TASCMAR aspira a desarrollar nuevas herramientas y estrategias para superar los cuellos de botella existentes en el biodescubrimiento y la explotación industrial de nuevas biomoléculas marinas derivadas (metabolitos secundarios y enzimas), para su aplicación en productos farmacéuticos, nutracéuticos, cosméticos e industria química, y con un enfoque particular en el tema de la lucha contra el envejecimiento

Una vez seleccionadas las muestras y obtenidos los resultados de las pruebas *in vitro*, aquellas sustancias con alto potencial de simbiontes mesofóticos y con enzimas derivadas, serán evaluados y probados en productos de formulación farmacéutica e industrias de biorremediación.

Todo ello además, será evaluado constantemente a través de una gestión eficaz para su impacto social, económico y ambiental con el fin de encontrar el mejor compromiso entre el desarrollo industrial y el crecimiento sostenible.

El proyecto TASCMAR se organiza mediante 8 paquetes de trabajo (Work Package, WP1 – WP8), que ayudarán a la comprensión total del proyecto:

Objetivo WP1. Gestión de Recursos Biológicos:

Consiste en proporcionar los recursos biológicos necesarios durante todo el proyecto TASCMAR. Se partirá de una importante biblioteca de organismos marinos, extractos, metabolitos puros y biocatalizadores, aportados por los socios del proyecto destinados a ello, para ser explotados e investigados durante la duración del proyecto.

Comprende dos etapas principales:

En primer lugar, los socios del proyecto proporcionarán invertebrados marinos, (macroorganismos, microorganismos, simbiontes asociados, etc.) seleccionados de sus colecciones privadas para las investigaciones químicas que se llevarán a cabo en el WP2.

La segunda etapa consiste en realizar expediciones submarinas en diferentes zonas mesofóticas para recolectar muestras biológicas de corales blandos, esponjas, tunicados, equinodermos y anémonas de mar que serán también la base de estudio del proyecto.

Dos expediciones se llevarán a cabo en el Océano Índico (entre Islas Reunión y Madagascar), dos en las costas de Tailandia, dos en el Mar Rojo y dos en el Mediterráneo Oriental.

Los simbiontes microbianos asociados a estas especies recolectadas, serán aislados para construir una biblioteca de microorganismos diana para el cultivo. Así como aislar y cultivar las microalgas asociadas a estas especies diana.

Se escogerán de entre toda esta colección de más de 100 invertebrados marinos disponibles de los socios involucrados, aquellos con unos criterios específicos de rareza, poco grado de investigación sobre la especie, dificultad en su cultivo, alta carga de simbiontes, etc. y serán transferidos para una investigación química más exhaustiva.

Objetivos WP2. Investigaciones químicas:

De todas las extracciones realizadas en el WP1, así como de las microalgas y las resinas que se llevaron a cabo en el mismo, se obtendrá una muestra de cada extracto que generarán una biblioteca propia para la realización de bioensayos en el WP3. Se investigarán además las aguas circundantes de los invertebrados, así como rocas y arenas de apoyo.

Objetivos WP3. Bioensayos “Anti-envejecimiento y angiogenéticos”:

Las bibliotecas de extractos y compuestos del WP2 serán proporcionados a los socios responsables de este paquete de trabajo con el fin de evaluar su potencial farmacéutico, cosmético y nutracéutico.

Serán elegidos aquellos que sean capaces de interferir con los procesos celulares interesantes en pruebas de actividad anti-envejecimiento y / o efectos angiogenéticos utilizando moscas *Drosophila* como plataforma de pruebas.

Una vez se obtengan los resultados de las pruebas in-vitro, aquellas sustancias con alto potencial de simbiontes mesofóticos y con enzimas derivadas, serán evaluados y probados en productos de formulación farmacéutica e industrias de biorremediación.

Objetivos WP4. Mejoras de Cultivo:

Este es el paquete de trabajo prioritario para iMare, básicamente el objetivo es desarrollar protocolos para el cultivo en laboratorio a escala piloto de invertebrados marinos y sus simbiontes asociados.

De los resultados obtenidos en estrategias de cultivo durante los cuatro años del proyecto, se desarrollarán nuevos prototipos de cultivo industrial para estos microorganismos mesofóticos que serán transferidos al WP5.

Objetivos WP5. Equipos innovadores a escala piloto:

Desarrollar y construir equipos innovadores a escala piloto dedicados al cultivo de microorganismos marinos de acuerdo con los resultados obtenidos en el WP4.

Se utilizará el diseño virtual interactivo 3D para una fase inicial y a continuación se pondrán a prueba en equipos más desarrollados. En base a esto, se llevarán a cabo el diseño, fabricación y validación de un nuevo dispositivo de cultivo a escala piloto.

Objetivos WP6. Desarrollos industriales:

Toda la biomasa en bruto, los extractos, compuestos puros, enzimas, etc., serán evaluados para posibles desarrollos industriales.

Los compuestos prometedores de éxito se someterán a una evaluación farmacéutica mediante diferentes tecnologías como rayos X o cristalografía, tanto para la búsqueda de objetivos contra enfermedades como para la evaluación de posibles efectos secundarios.

Se enumerarán aquellos organismos y / o extractos que muestren potencialidad como ingredientes nutracéuticos, cosméticos, etc., siempre sujetos a las evaluaciones de seguridad.

Objetivos WP7. Impactos socio-económicos y ambientales:

Este paquete de trabajo tiene como objetivo supervisar toda la ejecución del proyecto en términos de expectativas socioeconómicas y ambientales.

Se desarrollará una metodología de evaluación de impacto para la protección de los hábitats naturales; nuevas normas ambientales para la recogida de muestras y por supuesto, los impactos económicos y sociales.

Objetivos WP8. Gestión y difusión:

Este paquete de trabajo tiene dos objetivos principales:

- Desarrollar una gestión eficaz para todo el consorcio TASCMAR, ya sea financiera, legal y administrativa, así como seguimiento y las notificaciones a la Comisión Europea sobre el avance del proyecto para asegurarse de que se lleva a cabo con éxito y se logran los objetivos previstos.
- Asegurar una buena promoción del proyecto y de sus resultados a través de actividades de difusión como medios de comunicación, talleres en las escuelas y universidades, difusión de los resultados a través de publicaciones y conferencias científicas, etc.

La principal aportación de iMare Natural al proyecto “TASCMAR” es en los paquetes de trabajo WP1 y WP4.

Para el WP1 se realizaron expediciones submarinas en puntos de alta biodiversidad marina y se compartieron con el resto de socios del consorcio la biblioteca privada de recursos para que se pudiera valorar los compuestos bioactivos aislados.

El proyecto comenzó en abril de 2015 y la finalización de la primera etapa de trabajo en el WP1 ha empezado a dar sus primeros resultados.

Todos los socios implicados en esta fase de trabajo han aportado sus propuestas a la biblioteca común de recursos naturales.

Como se ha mencionado anteriormente, iMare realizó un gran número de inmersiones como aportación de muestras, además de las ya catalogadas en su biblioteca privada.

Se recogieron 72 muestras del Mar Mediterráneo durante agosto 2015, como estaba previsto para el WP1.

Las muestras procedentes de zonas mesofóticas se recogieron en bateas de mejillones off-shore de un proyecto científico con el que iMare Natural colabora y las muestras de las zonas fóticas se tomaron de las colecciones de las instalaciones acuícolas en sistema abierto (muchas de los invertebrados se adhieren a las estructuras que se utilizan para el cultivo de anémonas) y también por el buceo en zonas adyacentes de la costa mediterránea como “El Tesorillo”, “Marina del Este” o “La Herradura”, todas zonas muy conocidas de la costa tropical por su biodiversidad.

Para el WP4, las especies seleccionadas se cultivarán en condiciones controladas, teniendo en cuenta las limitaciones del medio ambiente del lugar donde se recolectaron. Es vital tener todos los parámetros perfectamente controlados en un sistema de recirculación y lograr las condiciones óptimas para poder producir la cantidad deseada de biomasa de cada especie diana.

Dependiendo de la especie a cultivar, iMare adaptará las instalaciones y sistemas para cumplir con las necesidades de los parámetros físicoquímicos del agua, el fotoperíodo, la intensidad luminiscente, la fijación y la técnica de propagación.

Para ello, iMare cuenta con dos instalaciones de diferente tipología que serán usadas dependiendo de los requerimientos de cada cultivo:

- ◊ Planta acuícola con circuito en sistema abierto:

Adecuada para técnicas de propagación y de mantenimiento de simbiontes asociados. Las técnicas de cultivo al aire libre se utilizan para la producción de biomasa de especies como anémonas de mar, esponjas, o equinodermos. La alimentación se lleva a cabo mediante dietas de fórmula naturales y eutrofización de los tanques de producción acuícola.

Son unas instalaciones con mayor disponibilidad de volumen para realizar pruebas con gradientes de profundidad y luminosidad, jugar con hidrodinamismos más potentes, etc.

◊ Planta piloto con sistema cerrado de recirculación:

Adecuada para mantener un minucioso control de los parámetros de aquellas especies más sensibles cultivadas en recirculación. Siendo objetivo principal el establecimiento de los rangos óptimos de luz, salinidad, temperatura, flujo de agua de mar y el tipo de sustrato para las especies específicas.

Son perfectas para etapas previas de aclimatación de las especies capturadas, pruebas de fotoperiodos amanecer/atardecer programados y todas aquellas condiciones que mejor simulen las condiciones de donde fueron extraídas las muestras.

iMare colabora además con el diseño de nuevas estructuras de cultivo, combinando herramientas de hidrodinamismo y gradientes de luminosidad, que permitan aumentar la biomasa de las especies, así como mecanismos futuros de propagación.

Todo lo que ayude a una producción innovadora y sostenible de nuevas oportunidades de mercado y además siendo respetuosos con el medioambiente.

Nuestra eficiente tecnología mediante Acuicultura Multitrófica Integrada (AMTI) de anémonas de mar con equinodermos (pepinos de mar) y salicornias (espáragos de mar) en nuestras instalaciones de investigación de Motril, se trasladarán teóricamente a todas aquellas especies seleccionas para el proyecto y a otros entornos naturales, para preservar la generación de simbiontes asociados como fuente de compuestos valiosos.

En el WP8 iMare tiene una profunda implicación en la difusión y promoción tanto del proyecto como del avance del mismo. Se ha realizado un esfuerzo importante por mantener una presencia constante en prensa digital y escrita y hemos tenido la suerte de ser convocados en numerosas ocasiones para participar en Congresos, Ponencias o Foros como el que hoy nos reúne en este XIX ForoAcui 2016.

Como una actividad más de implicación, se han realizado talleres a escolares para dar a conocer la labor de TASCMAR en la investigación marina y la presencia española en este campo que sirva como incentivo a futuros investigadores nacionales.

Los socios vinculados al Proyecto H2020 “TASCMAR”:

El proyecto TASCMAR tiene una duración de 48 meses y se inició en abril de 2015. Desde entonces se han realizado dos asambleas generales: una en París al inicio del proyecto para la organización de los participantes y su grado de implicación (aunque todo queda minuciosamente detallado en el Grant Agreement) y otra en Granada, en nuestra sede, en abril de 2016, para poner en común el avance de los resultados tras el primer año de proyecto.

Los socios son reconocidos por sus experiencias y perfiles empresariales de manera que cada uno tiene perfectamente definida su labor en el proyecto, así como, con que otros participantes debe tener una mayor colaboración para la consecución de los objetivos TASCMAR.

1. CNRS:

El Centro Nacional de Investigación Científica “CNRS” es una organización de investigación financiada por el gobierno francés. Sus unidades de investigación se extienden por toda Francia y emplean una gran cantidad de investigadores permanentes. El presupuesto anual del CNRS representa una cuarta parte del gasto público francés en la investigación no militar.

CNRS es un participante importante en los programas marco de la UE, con una larga trayectoria en la actuación como coordinador de proyectos, y con personal especializado en aspectos financieros, legales y administrativos.

CNRS es el coordinador de TASCMAR, responsable de la gestión general del proyecto, incluyendo la presentación de informes a la Comisión Europea sobre los progresos y las finanzas del mismo.

2. UoA:

La Universidad de Atenas (UoA) es la institución académica principal y más famosa de Grecia. Las principales actividades de investigación del Departamento de Farmacología y Química de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia están relacionadas con el descubrimiento de nuevos compuestos activos naturales y sus derivados sintéticos, para diversas aplicaciones tales como productos farmacéuticos, suplementos alimenticios y cosméticos a partir de fuentes naturales (plantas, organismos marinos y microorganismos).

En los últimos 10 años, ha explorado el Mediterráneo y su biodiversidad que les ha llevado a la creación de una biblioteca de 5.000 extractos y más de 2.000 compuestos aislados únicos y una base de datos que contiene los espectros de 800 extractos.

Recientemente también se ha establecido un Laboratorio de Biotecnología que se centra en el descubrimiento de nuevas enzimas.

La Universidad de Atenas lleva el paquete de trabajo 2 en las investigaciones químicas y también está involucrado en el WP3 (bioensayos anti-envejecimiento y angiogenéticos), WP7 (impactos) y WP8 (gestión y difusión).

3. Tel Aviv University (TAU):

El Departamento de Zoología de la Universidad de Tel Aviv (TAU) se ha convertido en el mayor centro académico para la investigación zoológica y ecológica en Israel. En la actualidad, el departamento es el más grande de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Tel Aviv.

El departamento también abarca el I. Meier Segals Jardín Zoológico de Investigación, que ofrece instalaciones de investigación y enseñanza únicas que incluyen una casa verde con un sistema de agua de mar cerrado, así como las colecciones zoológicas del Museo Nacional de Historia Natural en la Universidad de Tel Aviv que es utilizado para la identificación de los organismos marinos recogidos durante el proyecto en todas las regiones.

Es responsable de coordinar el WP1 sobre la gestión y recolección de los recursos biológicos, y también estará involucrado en el WP4 (innovación en cultivos) y WP8 (gestión y difusión).

Para el WP1, la universidad de Tel Aviv recogió 40 muestras (32 especies de invertebrados y 74 réplicas) del Mediterráneo y del Mar Rojo entre mayo y julio de 2015.

Una vez recibidas todas las muestras, es el responsable de agruparlas, almacenarlas e identificarlas.

Universidad de Chulalongkorn:

El Centro de Excelencia de Biotecnología Marina (CEMB), Facultad de Ciencias y la Universidad de Chulalongkorn (CU) tiene buzos de investigación altamente cualificados que están familiarizados con las áreas de arrecifes tanto en el Golfo de Tailandia como el Mar de Andaman.

CEMB también tiene equipos de buceo y una red con varias tiendas de buceo en Tailandia que pueden proporcionar barcos de alquiler para el acceso a las diferentes islas. También dispone de personal altamente cualificado en acuicultura, sobretodo en propagación de organismos marinos.

Jugará un papel clave en la obtención de los recursos biológicos en el WP1 y también contribuirá al WP4 (innovación en cultivos) y al WP8 (gestión y difusión).

4. Universidad de Islas Reunión:

La Universidad de Islas Reunión es una institución francesa pública de educación superior e investigación que se encuentra en el corazón del Océano Índico, cerca de Madagascar.

El Laboratorio de Química de Sustancias Naturales y Ciencias de la Alimentación (LCSNSA) tiene una ubicación privilegiada que le proporciona un acceso a excepcionales focos de biodiversidad marina en la parte occidental del Océano Índico: Comoras, Mauricio, Madagascar, etc.

La Universidad de la Reunión jugará un papel clave en el WP1 (la gestión y recaudación de los recursos biológicos) y el WP2 (investigaciones químicas) y también contribuirá al WP8 (gestión y difusión).

5. CRELUX GmbH:

Crelux es una empresa independiente en el descubrimiento de fármacos situada en Munich, Alemania.

Los laboratorios de CRELUX/ I2C cuentan con 3000 m2 de instalaciones en el Campus de Biotecnología de Munich.

Trabajan para las 20 primeras compañías farmacéuticas del mundo y entre sus técnicas de laboratorio se incluyen: la clonación y producción de proteínas en paralelo, amplia plataforma de ensayos in vitro para estudios cualitativos y cuantitativos biomoleculares, ensayos celulares, farmacología, animales (ratones / ratas), síntesis química, cristalografía HTS, etc.

i2C es una empresa conjunta entre CRELUX y “4SC Descubrimiento GmbH” para proporcionar una plataforma de descubrimiento de fármacos para el desarrollo preclínico, tan necesario para avanzar en las pruebas formales y posteriormente, en los ensayos clínicos.

CRELUX conduce el WP3 (bioensayos anti-envejecimiento y angiogenéticos) y también estará involucrado en el WP6 (desarrollos industriales) y WP8 (gestión y difusión).

6. Bict:

Bict es una empresa enfocada a la investigación y producción de biomoléculas tales como enzimas y metabolitos secundarios, obtenidos ya sea a partir de fuentes naturales (plantas, animales y microorganismos) o por medio de técnicas de ADN recombinante.

Bict es experto en la producción industrial de ingredientes farmacéuticos a través de la biocatálisis. Trabaja para varios campos como la cosmética o la veterinaria.

Las principales instalaciones de Bict incluyen instrumental de biología molecular, cromatografía líquida de alta presión, fermentación, etc.

Juega un papel clave en el WP3 (bioensayos anti-envejecimiento y angiogenéticos), y en el WP6 (desarrollos industriales).

7. PIERRE GUERIN SAS (PGT):

Es una empresa industrial prominente a nivel internacional especializada en la fabricación y diseño de dispositivos de cultivo, incluyendo fermentadores y biorreactores que realizan la integración de características innovadoras para el mezclado, agitación, transferencia térmica de oxígeno, iluminación y desinfección.

Recopilan datos del proyecto y necesidades de los investigadores y proporcionan ideas y herramientas de mejora en el campo del cultivo de microorganismos marinos. PGT conducirá el WP5 (desarrollo de equipos innovadores a escala piloto).

8. AstaReal AB:

AstaReal tiene un amplio conocimiento en el cultivo comercial de microalgas para introducir nuevos productos al mercado en nutrición animal y humana. AstaReal ha sido pionero en el cultivo de astaxantina.

AstaReal tiene un laboratorio equipado para el cultivo de algas en condiciones climáticas controladas. También está equipado para el análisis de carotenoides y otros metabolitos y compuestos de las algas con espectrofotómetro.

Jugará un papel central en el WP6 (desarrollos industriales), que investiga la posibilidad de desarrollar nuevos productos nutracéuticos a partir de los productos derivados marinos naturales obtenidos en el proyecto.

9. APIVITA SA:

Es una empresa I+D de cosméticos naturales. Tienen más de 300 productos de belleza natural para el cuidado del cabello, el rostro y el cuerpo, todo ello con eficacia clínicamente demostrada. Sus productos pueden encontrarse en los principales balnearios y hoteles de países de todo el mundo y a través del comercio electrónico.

La experiencia que APIVITA aportará al proyecto es la investigación orientada al mercado y el desarrollo de moléculas bioactivas adecuadas para uso cosmético y su incorporación en fórmulas cosméticas naturales.

APIVITA conduce el WP6 (desarrollos industriales). También participa en el WP3 (bioensayos anti-envejecimiento y angiogenéticos) y WP8 (gestión y difusión).

10. T6:

T6 es una consultora con sede en Roma, que trabaja con instituciones de investigación y empresas internacionales. La empresa se compone de un grupo de personas de diferentes perfiles profesionales.

Sus actividades se centran en el análisis socio-económico, nuevas tecnologías y el medio ambiente, así como la cooperación internacional.

T6 ECO analizará el impacto de los resultados de la investigación a nivel económico, social y ambiental y la difusión de los resultados de la investigación. Por lo que T6 conduce WP7 sobre los impactos socio-económicos y ambientales de TASCMAR y jugará un papel central en las actividades de comunicación del WP8 (gestión y difusión).

11. EcoOcean:

Es una organización no gubernamental sin ánimo de lucro con sede en Israel. Está dedicada a promover la protección de los ambientes marinos y costeros en su región para aumentar la conciencia pública e influir en las políticas para la protección de los mares.

EcoOcean trabaja a través de la investigación, la educación, la conservación y la cooperación internacional en Israel. Además, operan en un buque de investigación único en la exploración del Mediterráneo con una tripulación de gran experiencia en el monitoreo y la recolección de organismos marinos con fines de investigación.

Ha realizado misiones de recolección de Ecosistemas Mesofóticos Coralinos (MCE) en 2015. El video muestra a un equipo ROV (Remotely Operated Vehicle), operado por el equipo de EcoOcean en el Mediterráneo oriental. El uso de ROV hace que sea posible recoger muestras con precisión y una mínima perturbación del medio marino a profundidades inaccesibles para los buceadores.

EcoOcean juega un papel clave en la obtención de los recursos biológicos en el WP1:

“EcoOcean ROV collection mission in the East Mediterranean for TASCMAR” (https://youtu.be/cbyIYqhoR3o).

Como resumen para una mejor comprensión del proyecto, nos gustaría compartir un pequeño video que realizó la cadena Euronews en nuestras instalaciones, mientras organizábamos una de estas expediciones para la recolección de invertebrados marinos:

https://youtu.be/pO-h8UQOzOs

Accede a la presentación



MESA DE TRABALLO: NOVOS RECURSOS MARISQUEIROS E DA ACUICULTURA (I): EXPLOTACIÓN E XESTIÓN DA PRODUCIÓN

D. Jesús A. Fernández Barreiro. Consellería do Mar.
Delegación de Carril (Vilagarcía de Arousa)
D. Pedro Álvarez Molina. Empresa, iMare Natural
D. José Ángel Viñuela Rodríguez. Xefe de Servicio de Seguridade Alimentaria,
Dirección Xeral de Saude Pública da Xunta de Galicia

Plans experimentais en Galicia. As novas especies

Jesús A. Fernández Barreiro
Biólogo na Consellería do Mar
jesus.fernandez.barreiro@xunta.es

En 1981 aprobouse o Estatuto de Autonomía, no seu artigo 27.15 establécese a competencia exclusiva en pesca en augas interiores, marisqueo e acuicultura. No ano 1985 apróbanse as primeiras leis específicas galegas, a lei 2/1985 e a 15/1985 que regulan a pesca e o marisqueo en Galicia respectivamente.

No ano 93 publicase a Lei 6/1993 que regula profundamente os sectores pesqueiro e marisqueiro de Galicia. Desta lei emanan varios Decretos que a desenvolven e concretamente o D. 424/93 regula as artes e aparellos de Galicia. Este decreto sufre varias modificacións que son fundamentais para o caso que nos ocupa, en concreto dúas: a primeira delas, D.294/1998 introduce un novo artigo, 3.3 bis que define os **plans experimentais** (*Artigo 3 bis: non obstante o previsto no artigo 13 c da Lei 6/1993, do 11 de maio, de pesca de Galicia).*

A segunda modificación prodúcese co D. 198/2004 modifica a temporalidade dos plans e regula a súa utilización (*Artigo 3º1.)*.

A pesares de ter unha nova lei de pesca (11/2008, modificada profundamente pola 6/2009) e un novo decreto de artes (D 15/2011) onde se definen os plans experimentais, artigo 3.3 (*Autorizarase o uso de artes, aparellos, útiles, equipamentos e técnicas diferentes aos regulados neste decreto mediante plans experimentais*), o Decreto 424/93 sigue en vigor pola disposición transitoria 3ª do D.15/2011.(*Os plans experimentais referidos no artigo 3º.3 bis do Regulamento da actividade pesqueira e das artes e aparellos de pesca permisibles en Galicia, aprobado polo Decreto 424/1993, do 17 de decembro, ata que non se aprobe a norma que o substitúa.*)

Paralelamente a todo este desenvolvemento normativo o sector, sobre todo o marisqueiro, non para de pensar "novas alternativas" as tradicionais especies capturables. Xa nos anos oitenta consiguen introducir o reloxo (*Dosinia exoleta*), Xusto Otero, *com.pers*, coma especie explotable para dar solución a un problema produtivo producido na zona de O Bohido, na Ría de Arousa. A utilización de artes tradicionais, raño, para a captura de novas especies pódese considerar un plan experimental. A finais dos anos 80 emítese unha Resolución permitindo a extracción de equinodermos (Orde 1 de decembro pola que se regula a recollida, explotación e circulación de equinodermos para o ano 1987-88) onde xa permiten a captura de *Holothuria forskali* e *Stichopus regalis*.

Nos anos noventa iníciase a extracción de especies coma o ourizo (*Paracentrotus lividus*), a peneira (*Haliotis tuberculata*) ou a navalla (*Ensis magnus*). Desa época data un plan de extracción do cangrexo real (*Chaceon affinis.*) mediante o Decreto 408/1990.

A utilización da figura do plan experimental continúa nos anos 2000 con especies coma as anémones (*Anemonia viridis*) ou holoturias (*Holothuria forskali*).

Pero, que é un plan experimental? A definición está regulada na Lei 11/2008 de Pesca de Galicia no seu artigo 4.11(definicións):

> *Medidas reguladoras da actividade pesqueira aplicadas nun periodo de tempo determinado e que teñen por obxecto novas especies, novas artes, modificación das existentes ou novas medidas de xestión.*

Baixo este paraugas na actualidade hai tres plans de pesca:

- Plan experimental de Polbo (DOGA 31 de maio de 2016)
- Plan experimental de nécora e camarón con arte de nasa nécora e camarón (DOGA 7 de xullo de 2015)
- Plan experimental de pesca con nasa para peixes 2016 (Resolución do 18 de xaneiro de 2016)

e catro plans de marisqueo:

- Plans de extracción con raño de 15 mm a pe e a flote da Confraría de A Coruña
- Plan de extracción de poliquetos con mergullo autónomo da confraría de A Coruña
- Plan de extracción con forquilla a flote do Banco de As Means

- Plan de extracción con forquilla a flote do Banco de Boca das Pozas.

A lexislación actual indica que os plans experimentais non poden ter unha duración superior os tres anos que se poderán prorrogar outros dous mais no caso de que os resultados obtidos non sexan definitivos. Unha vez pasado este periodo deberase emitir un resultado que permita incorporar as modificacións prantexadas á lexislación ou no caso de que os resultados non sexan satisfactorios dar por concluído o plan experimental en cuestión.

Coma se pode observar nengún dos plans experimetais en vigor inclúe especies novas.

As novas especies

Dentro deste apartado podemos comezar por dúas especies cunha distribución en Galicia moi concreta posto que están localizadas case en exclusividade na enseada de O Grove. Trátase dos murícidos *Hexaplex trunculus* e *Bolinus brandaris*.

Bolinus brandaris (cornecho espiñento)

Gasterópodo mariño de orixe mediterráneo que viu ata a enseada probablemente coa semente de bivalvos e ostras (Rafa Bañon *et al.*, 2008). Coñecido en toda Andalucía coma cañaílla (excepto en Málaga donde recibe o nome de busano). En Galicia non existe regulación para a súa captura. En andalucía ten unha talla mínima de captura de 70 mm (altura da cuncha, AC).

Capturado desde a antigüidade para a obtención do tinte púrpura na actualidade ten utilidade culinaria en varios paises mediterraneos donde chega a acadar prezos elevados (20-25 €/kg). Existen experiencias de cultivo en Portugal.

Hexaplex (*Trunculariopsis*) *trunculus* (cornecho truncado)

Gasterópodo mariño de orixe mediterraneo que chega a Galicia a través da semente de bivalvos procedente do Adriático (Quintas *et al.* 2005). Existen estudos que a consideran críptica (Arias, 2012) polo que a súa consideración de estar traslocada está en dúbida. En Andalucía, onde se consume, recibe o nome de busano (excepto na costa de Málaga que lle chaman cañailla). A talla de captura é de 60 mm en Andalucía. En Galicia non ten talla.

Ambas especies están presentes na enseada de O Grove. A mais abundante, segundo a mostraxe realizada pola consellería no ano 2013 é o cornecho truncado que non ten a demanda da famosa cañailla.

Actualmente existe un programa de erradicación das súas postas porque está demostrado que son depredadores activos de moluscos bivalvos.

Un dato curioso destas especies é a presenza dunha glándula hipobranquial que secreta un tinte. No caso da cañaílla púrpura mentras que no busano é o índigo ou añil. Ambos eran usados na antigüidade para tinción de roupa,de persoas da aristocrática e adiñeiradas, posto que o valor do líquido era elevadísimo. Dicir que para conseguir un gramo deste tinte son necesarios entre oito e doce mil individuos.

Crepidula fornicata

Gasterópodo mariño de orixe americano implantado nas costas europeas a finais do século 19 importado coa ostra americana (*Crassostrea virginica* Blanchard, 1996) (Rolan *et al*, 1985). Está considerada coma especie exótica e invasora posto que se fixa as cunchas das vieiras e as volandeiras ralentizando a súa mobilidade. En Francia existen empresas comercializadoras (ALD, Britexa) desta especie co nome comercial de "Berlingot de mer"(bolsita de mar). O comercio é local e de exportación, cara o mercado chinés e americano (restauración). A súa captura está certificada polo MSC desde xullo de 2016 segundo publica a mesma organización na súa páxina web (www.msc.org).

E unha especie abundante na Ría de Vigo (Rolan *et al.*, 1994), presente nas rías de Pontevedra, Arousa e Muros-Noia; ten a particularidade de que está incluída no CEEEI (Catalogo Español de Especies Exóticas e Invasoras, RD 630/2013) polo que, en teoría non se debera explotar, nen vender, nen transportar, so erradicar.

Crepipatella dilatata

Outro gasterópodo exótico cun orixe nas costas pacíficas de sur América. A súa presenza nas rías de Vigo, Pontevedra e Arousa está confirmada (Colin *et al.*, 2009). Na ría de Arousa temos realizado mostraxes que indican ata 1.000 individuos/m^2 (Zona de O Bao). O aspecto da vianda é semellante a especie anterior. Ten maiores posibilidades ca *Crepidula* posto que non existe unha restricción a súa captura no momento actual.

Lysmata seticaudata

E por último unha especie que esta á empezar a aparecer nas nosas costas. Un crustáceo tropical que xa tiña implantación pero que co cambio climático está a aumentar a súa presenza. Trátase do camarón monegasco (*Lysmata seticaudata*). Esta especie é moi apreciada en acuarioloxía pola súa capacidade de limpeza de anémonas de acuario, das que se alimentan. Existe unha empresa en Portugal que a cultiva para este fin.

Bibliografía

Arias A., Richter A. & Anadón N. 2012. *Current status of non-indigenous marine molluscs of the Cantabrian Sea.* EEI conference paper.

Blanchard M. 1996 *Spread of the slipper limpet Crepidula fornicata (L., 1758) in Europe. Current state and consequences*. *Scientia Marina* 61(Suppl. 2): 109-118

Colin R., Farrell P. & Cragg S. (2009) *Confirmation of the identification and establishment of the South American slipper limpet Crepipatella dilatata (Lamark 1822) (Caenogastropoda: Calyptraeidae) in Northern Spain*. *Aquatic Invasions*, 4 (2). pp. 377-380.

Quintas P., Rolán E. & Troncoso J.S. 2005. *Sobre la presencia de un ejemplar vivo de Hexaplex trunculus en la ensenada de O Grove (Ría de Arousa, Galicia)*. *Noticiario SEM*, 43: 77-78.

Bañón R., Rolán E., García-Tasende M. 2008. *First record of the purple dye murex Bolinus brandaris (Gastropoda: Muricidae) and a revised list of non native molluscs from Galician waters (Spain, NE Atlantic)*. *Aquatic Invasions*, Volume 3, Issue 3: 331-334.

Rolán E., Trigo J., Otero-Schmitt J. & Rolán-Álvarez E. .1985. *Especies implantadas lejos de su área de distribución natural*. *Thalassas*, 3:29–36.

Rolán E., Pérez-Sixto J.L. & García-Caballero R.1994. Nuevas citas de moluscos para la Ría de Vigo. *Noticiario de la Sociedad Española de Malacología*, 20:19–21.

Acede á presentación



iMare Natural: i+D en el cultivo acuícola de ortiguillas de mar y holoturias

Pedro A. Álvarez Molina y Carolina Alonso Pozas
iMare Natural S.L., Avda. de la Habana 10, 18600-Motril (Granada).
pedro.imare@gmail.com

Socios promotores y equipo actual

Los dos socios fundadores de iMare Natural (Pedro A. Álvarez Molina y Carolina Alonso Pozas) son licenciados en CC del Mar por la Universidad de Cádiz. Están estrechamente ligados al sector pesquero y acuícola andaluz para el que trabajan desde el año 2004.

Esta iniciativa empresarial nace de la necesidad que ambos socios tenían de aunar desarrollo personal y profesional. A nivel personal para poner en práctica la formación multidisciplinar que compartían, y profesional porque trabajan en el mismo sector y tienen una experiencia laboral similar, lo que les hizo pensar que podían aprovecharla con la creación de una Spin-Off vinculada a la Universidad de Granada.

Pedro A. Álvarez Molina, ha colaborado en varios proyectos de investigación acuícola y realiza estudios de doctorado junto al Profesor Félix Hidalgo Puertas. Sus actividades han estado centradas siempre en el terreno de la innovación acuícola, encaminada a la diversificación del sector hacia nuevas especies y productos.

Los estudios llevados a cabo en su origen fueron acerca del cultivo del erizo de mar, un invertebrado ajeno hace unos años al mundo de la acuicultura pero con un potencial muy alto en el mercado gourmet.

Junto al doctor Félix Hidalgo, se trabajó en un plan nacional de cultivo de erizo de mar, especialmente en el diseño de piensos en colaboración con el SAMS (Scottish Association of Marine Sciences).

Carolina Alonso Pozas, también licenciada en ciencias del mar, realizó los cursos de Doctorado en Acuicultura y Cultivos Auxiliares en la Universidad de Cádiz, además de colaborar en diversos proyectos de investigación en el Instituto Español de Oceanografía.

Siempre ha estado vinculada al sector pesquero y ha ejercido de observadora pesquera en buques de altura, además de elaborar manuales de calidad para los mismos como apoyo al control de la política pesquera.

Actualmente trabaja como Técnico Superior de Pesca al servicio de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

El equipo de iMare lo completa nuestra responsable de planta Ana Esther Ortiz Maldonado, también licenciada en ciencias del mar, con más de 20 años de experiencia en el sector acuícola donde ha trabajado estrechamente en innovación de reproducción y cultivo de lenguado y seriola. Ha trabajado además para diversos acuarios públicos y colaborado con institutos de investigación como el CSIC.

A lo largo de estos tres años y medio de andadura, se nos han presentado nuevas oportunidades en el campo de la investigación, la más notable, nuestra participación en el proyecto europeo H2020 “TASCMAR”, que tiene como objetivo la extracción de sustancias bioactivas de los invertebrados marinos con fines farmacológicos, cosméticos, nutracéuticos, etc.

Este proyecto que se inició en abril de 2015 nos ha dado la posibilidad de aumentar nuestro equipo técnico contando con Rafael Belda Poveda, Técnico en química industria con más de 7 años de experiencia en el sector acuícola y acuarología. Ha trabajado durante dos años en innovación y cultivo de camarón patiblanco y holoturia en la empresa NAQUA, Arabia Saudí. Ha innovado con sistemas biofloc y sustratos verticales para el camarón y consiguiendo con éxito la reproducción sexual de la holoturia.

Nuestro punto de partida real como emprendedores fue la participación con nuestra idea de negocio en el II Concurso Emprendimiento Universitario 2012, en el que conseguimos el primer premio en la modalidad Spin-Off. A raíz de esto, con el apoyo de OTRI Granada que fueron quienes impulsaron la creación de nuestra empresa, nacimos hace ya tres años como una Spin-Off de la UGR por nuestra vinculación al departamento de Biología Animal con la colaboración de Félix Hidalgo, y por lo tanto siempre hemos estado relacionados con la investigación y la innovación.

iMare Natural, pertenece al sector de la acuicultura. En Europa, la acuicultura representa aproximadamente el 20% de la producción de pescado y da empleo directo a unas 80.000 personas.

A pesar de que los dos socios vimos que la expansión del sector acuícola era muy superior al resto de los sectores agroalimentarios, siempre estaba presente la dificultad de encontrar cultivos alternativos a los ya tradicionales como la dorada, lubina, rodaballo y salmónidos. Es por ello que nuestro objetivo principal es el conseguir una diversificación de los cultivos marinos, tan necesario en este sector acuícola.

Así iMare Natural es un proyecto innovador con muchas perspectivas de futuro, dado que nuestros productos son pioneros en el sector acuícola nacional. Además de esta reconversión del sector acuícola andaluz por aportar nuevas actividades para la diversificación, incrementamos el valor de las especies que comercializaremos y ofrecemos un producto de alto potencial económico que rentabiliza los costos de producción.

Actividad de la empresa

iMare Natural se centra en:

- Desarrollo y optimización de técnicas de cultivo para la producción, reproducción, cría y engorde de Ortiguilla de Mar (*Anemonia sulcata*).
- Cultivo multitrófico y comercialización de Espárrago de Mar (*Salicornia europaea*).
- Investigación para el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo de otras especies de interés acuícola como el Pepino de Mar (*Holothuria tubulosa*).

El único problema de la última década española en acuicultura, es encontrar cultivos alternativos a los tradicionales, como la dorada, lubina, rodaballo y salmónidos. Así conseguiremos una diversificación de cultivos mediante nuestros novedosos productos, como reto de nuestra actividad, para la comercialización de nuevas especies de alto potencial económico, que rentabilice los costos de producción, y que son:

Ortiguilla de mar

Su importancia radica en su alta calidad nutricional, que sin aportar apenas calorías aporta componentes esenciales para nuestra salud. Es considerada una de las más abundantes fuentes naturales de proteínas y ácidos grasos esenciales como el omega 3, con múltiples aplicaciones en el campo de la salud y la dietética. Además al estar controlada su alimentación, el producto adquiere unas cualidades nutricionales superiores a las obtenidas mediante artes extractivas.

Se explota principalmente en la costa andaluza, con un aumento de capturas específicas del 40% en los últimos tres años, pero está tomando cada vez más presencia en los mercados pesqueros, produciendo insatisfacción de la demanda actual del mercado, que conlleva un notable declive y peligro de las poblaciones del litoral andaluz debido a la aparición de furtivos y sobreexplotación.

Esta situación puede ser solucionada ya que presenta muy buenas perspectivas de cultivo, gracias a su elevada capacidad de aclimatación, a las características propias de su biología en cuanto a la reproducción y a los bajos costes de alimentación, crecimiento y mantenimiento.

Espárrago de mar

Es una planta halófita, asociada a suelos salinos y que por tanto soporta el riego con agua de mar. Esta característica tiene un impacto ambiental muy positivo, ya que absorbe la salinidad de la tierra mejorando el suelo, evitando la desertificación y permitiendo desarrollar zonas que hasta el momento estaban consideradas como no aptas para el desarrollo de ningún cultivo.

Es también muy valorada por sus propiedades nutricionales, está considerada como una de las más abundantes fuentes naturales de proteínas (hasta un 45%) y minerales, además de un alto contenido en ácidos grasos esenciales. Estas propiedades quedan evidenciadas en un estudio científico, que demostró que el ganado que había sido alimentado con pienso de salicornia tenía un 50% menos de colesterol en su carne.

Mediante el cultivo acuapónico de la salicornia, se consigue integrar la producción dentro del sistema acuícola, remineralizando la materia orgánica que funciona como fertilizante natural.

Con esta técnica además se consigue incrementar un 20% la producción con respecto a las técnicas del cultivo estándar, esto sumado a los bajos costos de producción y al elevado precio que alcanza en el mercado, proporciona una gran rentabilidad en un corto periodo de tiempo.

Pepino de Mar

Es una especie muy valorada en nuestro país en la costa catalana, e internacionalmente, en los países asiáticos, donde está considerado un manjar con grandes propiedades afrodisíacas. La investigación para el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo de las holoturias, son muy esperanzadoras en cuanto a la rentabilidad económica y medioambiental, pues los pepinos de mar también se encuentran amenazadas por la sobreexplotación.

Lo destacable de nuestro proyecto es que cultivamos las especies con una tecnología limpia y responsable con el medio. Utilizamos nuevas e innovadoras técnicas naturales en acuicultura que garantizan la conservación del medio marino y de sus especies, muchas de las cuales se encuentran en peligro de conservación por la sobreexplotación y el furtivismo, ya que las especies objetivo se encuentran actualmente en las cocinas y mesas más selectas de la gastronomía nacional.

La acuicultura integrada se basa en que los desechos de una especie en cultivo son reciclados y aprovechados para convertirse en fertilizantes o aportes nutricionales para otra.

En nuestro caso, los excedentes alimenticios del cultivo de las ortiguillas son aprovechados por el espárrago de mar cuando hacemos recircular el agua saliente del tanque hacia el sustrato de la plantación acuapónica. Además el agua liberada ya de sales y de materia orgánica, tendrá una excelente calidad haciéndola nuevamente disponible para los tanques o para expulsarla al medio marino.

Del mismo modo, el agua de los tanques de cultivo con los desechos alimenticios de las anémonas, también será recirculada al tanque con las espardeñas, unas condiciones que son perfectas para esta especie, ya que se caracteriza por necesitar un sustrato fangoso rico en aportes orgánicos tanto para su crecimiento como para su desarrollo gonadal.

Así la acuaponia, aprovecha al máximo el agua, los desechos generados por el cultivo y el espacio. Convierte el proceso en un método sustentable para el medioambiente y además incrementa la rentabilidad del proyecto, ya que la producción de Espárrago de Mar con este sistema adquiere un valor comercial mayor al ser considerados como “producto ecológico” (libres de químicos como pesticidas, fertilizantes, etc.).

Evolución

iMare cuenta con dos tipos de instalaciones:

- En el inicio, iMare se estableció en unas instalaciones que se encontraban en funcionamiento para otro tipo de cultivos, por la empresa Acuicultura de Granada S.L., con la que se estableció un convenio de colaboración interno para una primera fase I+D, y que nos proporcionó la posibilidad de iniciar la actividad con una baja inversión inicial.

Se encuentran en el término municipal de Salobreña en la costa granadina, caracterizadas por una notable calidad del agua marina, rica en nutrientes y producción primaria y por su perfecto sistema de bombeo y recirculación.

Además de los tanques de cultivo y tanques reproductivos auxiliares, las instalaciones cuentan con oficinas, almacén y un laboratorio.

En esta planta, tenemos establecido dos tipos de cultivo:

- Cultivo cerrado de invertebrados: Donde se controlan los parámetros de aquellas especies más sensibles cultivadas en recirculación. Siendo objetivo principal el establecimiento de los rangos óptimos de luz, salinidad, temperatura, flujo de agua de mar y el tipo de sustrato para las especies específicas.
- Cultivo exterior de invertebrados: Las técnicas de cultivo al aire libre se utilizan para la producción de biomasa de especies como anémonas de mar, esponjas, o equinodermos. La alimentación se lleva a cabo mediante dietas de fórmula naturales y eutrofización de los tanques de producción acuícola.

- Actualmente hemos conseguido obtener una Nave de Alojamiento Empresarial que Andalucía Emprende tiene en el Centro de Apoyo al Desarrollo Empresarial (CADE) de Motril. Es aquí donde centramos nuestras labores específicas de técnicas de inducción a la reproducción, como laboratorio de producción de alimento vivo e I+D.

Son 192 m^2 de instalaciones para trabajar con Sistemas de Recirculación especialmente para las especies de invertebrados marinos sensibles. Se compone de baterías de tanques de PVC, cada una de ellas con una unidad de filtración completa compuesta por filtro de arena, skimmer, filtro biológico y enfriador / calentador. Cada tanque es de 150-200 L.

Proyectos consolidados y actuales

- Proyecto para la generación de nuevo conocimiento "**I+D+i iMare Natural Ortiguillas**", incentivado por la AGENCIA DE INNOVACIÓN Y DESARROLLO DE ANDALUCÍA y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, en ejecución del Programa Operativo FEDER Andalucía 2007-2013.
- **Proyecto europeo H2020 "TASCMAR**: Herramientas y Estrategias para el acceso de sustancias bioactivas del cultivo de invertebrados marinos y sus simbiontes".

Para consolidar el ciclo productivo a nivel acuícola, el primer paso fue desarrollar una experiencia piloto que nos ofreciera resultados de crecimiento y desarrollo.

Para estudiar la viabilidad del cultivo, iMare Natural realizó un Proyecto para la generación de nuevo conocimiento **"I+D+i iMare Natural Ortiguillas"**, incentivado por la AGENCIA DE INNOVACIÓN Y DESARROLLO DE ANDALUCÍA y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, en ejecución del Programa Operativo FEDER Andalucía 2007-2013.

El objetivo general del presente estudio fue sentar las bases para el desarrollo futuro del cultivo de la ortiguilla de mar (*Anemonia sulcata*) a escala productiva, consiguiéndose que su explotación y comercialización no dependiera del estado de las pesquerías en un momento dado y, de esta forma, reducir el impacto que dichas explotaciones puedan ejercer sobre las comunidades litorales y sobre el stock natural de la especie.

Para ello se han propuesto los siguientes objetivos concretos:

- Estudiar la evolución temporal de las poblaciones en medios confinados, valorando fundamentalmente su abundancia, tasas de crecimiento, de mortalidad y estado gonadal.
- Estudiar la alimentación así como las variables nutricionales de nuestra especie principal, ortiguilla de mar, así como de las otras especies secundarias del sistema.
- Sentar las bases para una alimentación de los individuos en condiciones de cultivo y poner a punto la composición de las dietas a partir de componentes de origen natural, enfocado a una futura instauración del cultivo ecológico.
- Evaluar el estado de las poblaciones de adultos en cultivos de carácter extensivo en medios semi-abiertos, mantenidas con dietas de origen natural.

- ❖ Evaluar la eficacia de determinadas estructuras de confinamiento en medios abiertos que puedan ser utilizadas para favorecer el cultivo de la especie.
- ❖ Analizar las posibles interrelaciones entre las distintas especies mantenidas bajo cultivo multitrófico en este sistema.

La diversificación de los cultivos marinos hacia la cría de *Anemonia sulcata* presenta muy buenas perspectivas para su cultivo gracias a:

- ❖ Elevada capacidad de reproducción y aclimatación
- ❖ Bajos costes de mantenimiento, crecimiento y alimentación
- ❖ Características propias de su biología como la reproducción asexual por segmentado (corte histológico simple del individuo).

El principal reto de nuestro estudio I+D+i estaba centrado en desarrollar a una escala productiva, todos aquellos estudios que previamente habíamos llevado a cabo en el laboratorio a pequeña escala experimental. Repetir la experiencia con una población lo suficientemente numerosa y con los medios materiales y personales específicos para desarrollar el proyecto en el ámbito empresarial.

Las actividades realizadas dentro de la experiencia piloto han sido:

1. Valoración de engorde y reproducción de la ortiguilla de mar *Anemonia sulcata* en tanques autolimpiantes de fibra de vidrio y poliéster de 50 m^3.

Para lo que se han realizado los siguientes estudios concretos:

- ◊ Estudio del número de ciclos de reproducción asexual a partir de stock de reproductores adultos capturados en el medio.

La reproducción asexual en algunos individuos se caracteriza por la ausencia de fusión de células. Ésta, permite a un organismo producir descendientes rápidamente sin perder tiempo y recursos en cortejos, búsqueda de parejas y acoplamiento. Mediante este estudio, llegamos a conocer realmente la capacidad de ciclos de reproducción asexual para nuestra población, esto nos permitirá cuantificar económicamente y maximizar los beneficios de este proceso, aplicado a nuestro cultivo.

- ◊ Estudio de la densidad de siembra. Cargas iniciales-finales

El cultivo de la ortiguilla se realizará en los tanques, mediante un sistema *platters,* o de placas flotantes, que diseñamos para maximizar la superficie disponible y potenciar una

mayor captación del alimento. Es fundamental, para la viabilidad económica del cultivo, llegar a establecer las densidades óptimas de siembra, corriente, fijación de las estructuras, así como las cargas biológicas que soporta nuestro sistema.

2. Reproducción sexual de ejemplares adultos de ortiguilla, obtención de puestas naturales y desarrollo larvario de la anémona para abastecimiento y renovación de las poblaciones de partida. *Hatchery*

Dónde se diferenció la etapa sexualmente inmadura de la madura, tanto en hembras como la espermatogénesis en machos

En este trabajo se tomó como referencia seis fases en función del grado de madurez de la gónada:

- Fase I (Reconstitución gonadal),
- Fase II (Crecimiento),
- Fase III (Premadurez),
- Fase IV (Madurez),
- Fase V (Puesta parcial) y
- Fase VI (Post-puesta).

Estudio del número de ciclos de reproducción sexual inducida, en un periodo de tiempo determinado

Este ha sido de los hitos más importes en nuestro estudio, porque aunque ha sido complicado encontrar exactamente este punto de inducción, ello nos está permitiendo hacer reproducible actualmente la producción larvaria en cualquier época del año, lo que nos permitiría ser productores de ortiguilla dentro de las época de freza y vedas establecidas por las administraciones competentes.

Tasa de supervivencia larvaria. Nutrición larvaria

3. Realización de un estudio aplicado de agricultura con agua de mar mediante el cultivo de plantas halófitas autóctonas

Al inicio de este proyecto, no habíamos tenido ninguna experiencia exitosa con el cultivo de esta planta, pero se ha conseguido establecer tanto el protocolo de germinación como el de cultivo, y ajustar éste al sistema multitrófico.

Los procesos llevados a cabo:

- Germinación de las semillas de Salicornia
- Escala temporal de crecimientos según los diferentes sistemas utilizados: Calculo del incremento de la productividad del cultivo acuapónico con respecto al cultivo tradicional.

Para ello se realizaron dos ensayos por separado, uno de ellos como cultivo en tierra y otro realizando una maqueta experimental que se ajustase lo máximo posible al diseño usado en nuestro diseño acuícola.

- Maqueta experimental de cultivo multitrófico:

A través de un sistema de bombeo eficiente y una canalización de tuberías que se diseñaron, conectamos un circuito cerrado en el que se ajustaron todos los ratios de cultivo, así como la evaluación de la eficiencia del sistema de partida.

Este sistema está compuesto por un gran acuario en el que las anémonas viven en la parte superior, un lecho sedimentario donde se localizan los pepinos de mar, así como una serie de conductos acuapónicos donde se depositan en forma de "cestillas flotantes" diferentes plantones de Salicornia en un sustrato fibra de coco/ lana de roca.

Esta actividad aumenta la rentabilidad del cultivo, dando un mayor valor comercial para ser considerado para la etiqueta de "producto orgánico".

Estamos trabajando en una colaboración científica con la Universidad de Granada. Hemos desarrollado un modelo de laboratorio de nuestras instalaciones donde se estudian y ajustan los flujos de carbono en nuestro modelo de cultivo.

- Cultivo en tierra de Salicornia europea:

Una vez los plantones fueron germinados, estos fueron plantados en tierra para estudiar todos los requerimientos físico-químicos y nutricionales de esta especie.

Actualmente nos encontramos trabajando con la UGR, y la empresa Xtreme-Biotech, testando en este tipo de ensayo una solución microbiológica capaz de aumentar la fijación de nitrógeno hasta el triple de los valores estimados, hito que de ser conseguido, tendría grandes aplicaciones biotecnológicas en el campo de la agricultura y el medioambiente.

4. Valoración de engorde y reproducción de la holoturias mediante efluentes procedentes del cultivo de la ortiguilla en tanques de cultivo *in-shore*. Acuicultura Integrada (AMTI), técnica que hemos explicado anteriormente.

En respuesta a la condición extrema de muchas pesquerías de pepino de mar se hace cada vez más necesario elaborar nuevos protocolos y sistemas de cultivo para abastecer la creciente demanda internacional.

Actualmente el mayor consumidor de pepino de mar es sin duda alguna China, al cual se exportan gran cantidad de ejemplares anualmente. Siguiéndolo en menor medida se encuentra Corea y Japón. En Andalucía las poblaciones se encuentran en grave peligro debido al furtivismo.

La *Holothuria tubulosa* es la especie más común. Ésta se comercializa en el mercado negro a bajísimos precios, cuadriplicando su valor en el mercado asiático congelada o en forma de *trepang*.

Para el engorde y reproducción de la "petaca" o "pepino de mar" mediante efluentes procedentes del cultivo de la ortiguilla en tanques de cultivo in-shore, una de las consideraciones más importantes a tener en cuenta es que en su medio natural es una especie que habita en fondos blandos a bajas profundidades. Para poder llevar la experiencia tanto en laboratorio como en el policultivo, será necesario obtener 50 reproductores de las instalaciones de "Acuicultura de Granada". Cada año se produce un reclutamiento larvario en las instalaciones, ya que acceden por la canalización de agua del exterior.

El tanque de reproductores usado es de fondo plano, agua aireada estática y con al menos 10 a 15 cm. de arena para permitir comportamiento madriguera.

Los holotúridos tienen la facultad de reproducirse sexualmente, existiendo algunas correlaciones entre los factores ambientales y una combinación de caracteres como el tamaño, la estabilidad del hábitat, la mortalidad y el suministro de larvas.

Fases del cultivo larvario

Se calculará la proporción de sexos, el índice gonadosomático y mediane el análisis histológico se describirá el desarrollo gonadal, la distribución de tallas de los ovocitos y la fecundidad.

La reproducción sexual se lleva a cabo mediante ciclos sincronizados regulados por condiciones ambientales y hormonales. El desove presenta una mayor intensidad en los meses de junio a agosto, por lo que han sido en estos periodos donde se han llevado a cabo las experiencias.

Se describen los siguientes objetivos específicos en nuestro i+d:

- Estimar la proporción de sexos de *Holothuria tubulosa*.
- Identificar y describir el ciclo de madurez gonadosomática.
- Definir la estacionalidad del proceso reproductivo.
- Relacionar el índice gonadosomático con factores ambientales (temperatura de fondo, salinidad, etc.) para evaluar su influencia en el ciclo reproductivo.
- Describir la distribución del tamaño de ovocitos a lo largo del ciclo reproductivo.
- Estimar la fecundidad real.
- Desarrollar un protocolo de reproducción.

Densidad de cultivo:

Es fundamental para la viabilidad económica del cultivo llegar a establecer las densidades optimas de siembra, corriente, fijación a las estructuras, así como las cargas biológicas que soporta nuestro sistema, (el sistema regulable de caudal, temperatura y oxígeno disuelto nos permite afrontar cargas aceptables).

Inducción al desove:

La inducción a la puesta o *spawn* se realizan con 50 ejemplares adultos de holoturia, previa aclimatación de reproductores y en cautividad. La densidad larvaria post-reproductiva dependerá del éxito de la reproducción y la fijación/metamorfosis en las placas o *settles* empleados. Estos se desarrollarán en un tanque auxiliar.

El desove se ha observado a menudo justo antes de la luna llena y luna nueva, pero también puede ser inducida por un tratamiento combinado de estrés. las hembras suelen poner en masa, aproximadamente entre 30-60 minutos después de hacerlo los machos.

- Tratamiento de choque caliente / fría.
- Estimulantes alimentos.
- Tratamiento en seco: El desove por estimulación también se puede lograr a través del completo secado.

Desarrollo embrionario. Recolecta de huevos e incubación:

Se sacan los animales del tanque, se sifonan los huevos pasando por un tamiz de 80 micras y se lavan 3 veces (sumergir y enjuagar) con agua desinfectada por UV. Se cuenta el número de huevos.

Se incuban los huevos hasta las 36 h, parámetros: salinidad 36 ppm,

25-30ºC, 400 lux, DO 7-9 ppm y agua desinfectada con UV.

Los embriones pasan a la fase gástrula a partir de las 18 h (la blástula a las 6 h) mediante una invaginación de la pared blastular en la zona ventral. A partir de aquí, el embrión sufre una elongación que lo llevara a early auricularia.

Desarrollo larvario y alimentación:

Se filtran y pasan a los tanques 20-30 animales/m^3. De las 36 h (early auricularia) a 18 días (late auricularia) la larva se mantiene en suspensión y no hay problemas para alimentar con fitoplancton (tetraselmis y chaetoceros) y mantenerlas. En la siguiente fase hay problemas para que la larva se fije al sustrato y empiece a pastar (son tiras de plástico muy poroso). La máxima supervivencia que hemos alcanzado es un 5%, pero estamos mejorando las técnicas de fijado y alimentación.

La larva comienza a alimentarse a partir del segundo día a unas 20.000 cel/mL que pasa a ser el doble a partir del día 14 cuando ya es Mid auricularia. A partir del día 19 la larva se fija y pasa por el sustrato que previamente ha sido madurado. Las estructuras *settles* se introducen en tanques maduros y se le fijan a un biofilm de microalgas, diatomeas etc. Aquí se empieza a producir la fijación.

Es en esta fase Doliolaria donde tenemos mortalidades masivas.

Puestas naturales en los tanques de la instalación. Crecimiento de los juveniles:

En la época estival se producen puestas naturales en los tanques de ensayo, tenemos un reclutamiento aproximado de 100 individuos por cada tanque de 50m^3, existiendo aproximadamente 50 individuos reproductores por tanque. El crecimiento de los alevines es bastante rápido y sabemos que pasando el punto crítico larvario, se adaptan bastante bien al cultivo.

El tiempo necesario para llevar los pepinos de mar a un tamaño comercial varía entre 10-15 meses, y la tasa de supervivencia puede variar entre 20-80%.

Nuestro objetivo fundamental ahora está en superar este cuello de botella y conseguir tener un stock controlado para incluir esta especie en nuestro catálogo productivo.

Como el proyecto Tascmar se inició en abril de 2015 e iMare interviene tanto en el suministro de invertebrados marinos y simbiontes asociados para la elaboración de una biblioteca privada para el proyecto, como en el cultivo de las especies objetivo, actualmente compatibilizamos nuestra actividad productiva con nuestras actividades de investigación i+D.

Accede a la presentación



Protocolos para la incorporación de nuevos productos marinos a la cadena alimentaria comercial

José Ángel Viñuela Rodríguez.
Xefe de Servizo de Seguridade Alimentaria, Dirección Xeral de Saúde Pública
jose.angel.vinuela.rodriguez@sergas.es

El Reglamento (CE) nº 258/1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios define los "Novel Food", o "nuevos alimentos", como los alimentos o ingredientes alimentarios que:

- No se utilizaban en cantidades significativas antes del 15 de mayo de 1997 en la alimentación humana en la Unión Europea y,
- Que entran en una de las siguientes categorías:
  - alimentos o ingredientes alimentarios que tienen una estructura molecular primaria nueva o modificada intencionadamente;
  - alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en microorganismos, hongos o algas u obtenidos a partir de éstos;
  - alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en vegetales, u obtenidos a partir de ellos, y los ingredientes alimentarios obtenidos a partir de animales, excepto los alimentos e ingredientes alimentarios obtenidos mediante prácticas tradicionales de multiplicación o de selección y cuyo historial de uso alimentario sea seguro;
  - alimentos e ingredientes alimentarios que se hayan sometido a un proceso de producción no utilizado habitualmente, que provoca en su composición o estructura cambios significativos de su valor nutritivo, de su metabolismo o de su contenido en sustancias indeseables.

Además, estos nuevos alimentos no deberán:

- suponer ningún riesgo para el consumidor;
- inducir a error al consumidor;
- diferir de otros alimentos e ingredientes alimentarios a cuya sustitución se destinen, de tal manera que su consumo normal implique desventajas para el consumidor desde el punto de vista de la nutrición.

Para ser comercializados en la Unión Europea deben ser previamente autorizados

El procedimiento de autorización de un nuevo alimento conlleva una evaluación de seguridad, previa a la autorización de su introducción en el mercado.

Estas autorizaciones son de aplicación en todos los Estados miembros de la Unión Europea; pero **sólo lo pueden comercializar las empresas destinatarias de las autorizaciones**, ya sea por el PROCEDIMIENTO GENERAL o por el PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO o de equivalencia sustancial. Además, la autorización del nuevo alimento recoge las condiciones de uso y las especificaciones del nuevo alimento, así como requisitos de etiquetado si procede.

- PROCEDIMIENTO GENERAL

¿Cómo y dónde se presenta una solicitud de autorización?

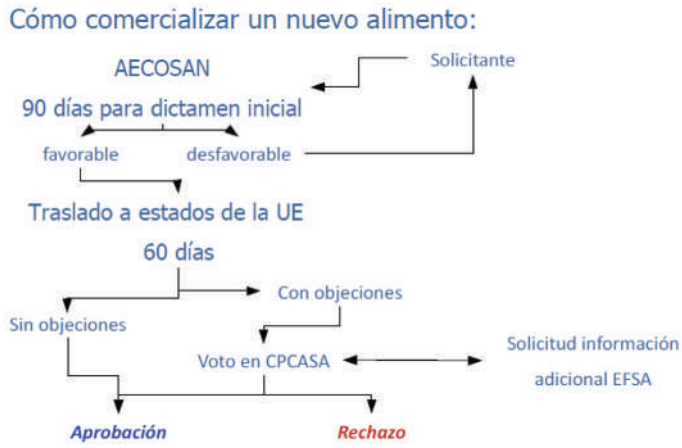
La solicitud de autorización de un nuevo alimento se realiza ante el Estado miembro de la UE donde se va a comercializar el nuevo alimento por primera vez. En España se presentaría ante la AECOSAN.

La solicitud contendrá la información necesaria, con inclusión de una copia de los estudios que se hayan realizado y cualquier otro elemento de que se disponga para demostrar que el alimento o el ingrediente alimentario cumple los criterios de:

- no suponer ningún riesgo para el consumidor;
- no inducir a error al consumidor;
- no diferir de otros alimentos e ingredientes alimentarios a cuya sustitución se destinen de tal manera que su consumo normal implique desventajas para el consumidor desde el punto de vista de la nutrición.

- así como la correspondiente propuesta de presentación y etiquetado del alimento o del ingrediente alimentario para proporcionar información adicional al consumidor final de la descripción del alimento, su procedencia, su composición, sus condiciones de utilización, a fin de garantizar que los consumidores estén suficientemente informados de la naturaleza y la seguridad del nuevo alimento, especialmente en relación con los grupos de población vulnerables.
- un resumen del dossier.

Para orientar a los solicitantes sobre cómo presentar este dossier avalando la seguridad de su producto, la Comisión Europea publicó una Recomendación de la Comisión 97/618/CE por la que se establece lo que debe incluirse en la información científica y en el informe de evaluación de la seguridad presentado por la empresa solicitante.



❖ PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO DE EQUIVALENCIA SUSTANCIAL

Dicho procedimiento simplificado se aplicará exclusivamente a:

- alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en microorganismos, hongos o algas u obtenidos a partir de estos; y
- alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en vegetales, u obtenidos a partir de ellos, y los ingredientes alimentarios obtenidos a partir de animales, excepto los alimentos e ingredientes alimentarios obtenidos mediante prácticas tradicionales de multiplicación o de selección y cuyo historial de uso alimentario sea seguro.

Se deberá demostrar que el producto en cuestión es "sustancialmente equivalente" a alimentos o ingredientes alimentarios existentes en lo que se refiere a:

- ◊ su composición,
- ◊ su valor nutricional,
- ◊ su metabolismo,
- ◊ el uso al que está destinado y
- ◊ su contenido de sustancias indeseables.

En términos generales, existen tres tipos de solicitud de dictamen sobre la equivalencia:

1. solicitud en la que el producto existente es un nuevo alimento autorizado o,
2. solicitud con respecto a un producto muy similar a un nuevo alimento autorizado o,
3. solicitud con respecto a un producto que se considera equivalente a un producto existente con historial de consumo en alimentación antes de mayo de 1997.



http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31997H0618&from=EN

En este caso, la evaluación se hace por la Autoridad Nacional Competente (ANC) del Estado miembro de la UE ante la que se presente la solicitud de equivalencia sustancial y, una vez se emita un informe de la ANC confirmando que la equivalencia sustancial ha quedado demostrada, el solicitante remitirá el dictamen a la Comisión quien tendrá 60 días para trasladárselo al resto de Estados miembros, pudiendo comercializarse el producto a partir de la obtención del informe favorable de la ANC.

Los Estados Miembros han elaborado una guía para orientar a los operadores sobre cómo deben presentar una solicitud de equivalencia sustancial:

- ◊ Guía de la UE para la presentación de datos que demuestren la equivalencia sustancial entre un nuevo alimento o ingrediente alimentario y un producto análogo existente.
- ◊ EU Guidelines for the presentation of data to demonstrate substantial equivalence between a novel food or food ingredient and an existing counterpart.

❖ A PARTIR DEL 1 DE ENERO DE 2018

Entra en vigor el Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de noviembre de 2015 relativo a los nuevos alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) no 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo y se derogan el Reglamento (CE) no 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1852/2001 de la Comisión.

Los principales cambios que contempla pueden resumirse de la siguiente manera:

- ◊ La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) realizará una evaluación científica del riesgo de los nuevos alimentos cuya autorización se solicita, mientras que la Comisión gestionará los expedientes de cada solicitante y presentará las propuestas de autorización de los nuevos alimentos que se consideren seguros.
- ◊ Se creará una Lista de la Unión de Nuevos Alimentos autorizados
- ◊ Procedimiento basado en el historial de uso alimentario seguro en un país tercero durante al menos 25 años. Si los Estados miembros o EFSA presentan objeciones de seguridad razonadas, el producto tendrá que someterse a la evaluación de seguridad por la EFSA seguido de un procedimiento de autorización en la UE.
- ◊ Se incluyen los animales enteros o sus partes
- ◊ La normativa, incluye los alimentos derivados de animales clonados hasta que se adopte legislación específica en la materia.
- ◊ También se incluyen disposiciones sobre la protección de datos. Tras la autorización de un nuevo alimento, los datos científicos nuevos y los datos protegidos no podrán utilizarse en el marco de otras solicitudes durante cinco años.
- ◊ Los nanomateriales artificiales definidos en la nueva legislación requieren una autorización como nuevo alimento antes de utilizarse en productos alimenticios.
- ◊ Este nuevo reglamento supondrá centralizar las autorizaciones de todos los nuevos alimentos que se pongan en circulación en la UE, acortando los plazos

actuales de los 3 años que se estima la puesta en el mercado de un nuevo alimento a un plazo de un año, con la consiguiente reducción del coste económico que dicha autorización supone.

Accede a la presentación



MESA DE TRABALLO: NOVOS RECURSOS MARISQUEIROS E DA ACUICULTURA (II): PRESENTACIÓN E COMERCIALIZACIÓN

D. Lucio Grassia. Escola de Hostelería IPSSAR “Pietro D’Abano”, Italia

D. Javi Olleros. Restaurante Culler de Pau (O Grove)

Escola de Hostalería “CIFP Carlos Oroza” de Pontevedra

D. Misael García del Campo, Patrón Maior da Confraría de Pescadores de Vigo

D. Carlos Mariño Balsa, Confraría de Pescadores “San Antonio” de Cambados

Dna. Manuela Buján, Portomuiños

Dna. Carmen Sánchez, Galuriña

Novos recursos marisqueiros e da acuicultura: explotación e xestión da produción

García del Campo[1] M. & Alfaya Massó[2] J.
[1]Patrón Maior da Confraría de Pescadores de Vigo. cofradiavigo@gmail.com
[2]Asistencia Técnica da Confraría de Pescadores de Vigo.

Introdución á Confraría de Pescadores de Vigo

A Confraría de Pescadores de Vigo é unha corporación de Dereito Público, sen ánimo de lucro, dotada de personalidade xurídica e capacidade de obrar, para o cumprimento dos seus fins e o exercicio das funcións que lle están encomendadas.

Actúa como órgano de consulta e colaboración coa Administración na promoción do sector pesqueiro e representa os intereses económicos, sociais e corporativos dos profesionais do sector, de acordo cos principios de observancia da legalidade, transparencia contable e democracia na súa estrutura interna e funcionamento.

Os membros da Confraría de Pescadores de Vigo, desenvolven a súa actividade no sector pesqueiro e marisqueiro nas súas distintas modalidades ou sectores de produción como son: pesca de cerco, artes menores, recursos específicos, marisqueo dende embarcación e marisqueo a pé.

Como órgano de consulta e colaboración coa Administración correspóndelle, entre outras, as funcións de orientar a todos os seus afiliados sobre as accións derivadas da aplicación da normativa concernente ao sector pesqueiro e sobre axudas, subvencións e programas establecidos pola Administración pública, elevarlle propostas sobre materias de interese pesqueiro e, en particular, sobre aquelas accións tendentes a mellorar as condicións técnicas, económicas e sociais da actividade pesqueira.

Así mesmo, na defensa dos intereses profesionais, correspóndenlle, entre outras, as funcións de xestionar as áreas da zona marítimo e marítimo-terrestre que lle foran confiadas, promover a execución de plans de capturas e establecer os plans de produción e comercialización, co fin de mellorar a calidade dos produtos e adaptar o volume da oferta as esixencias do mercado.

Para a explotación dos recursos marisqueiros, o ámbito de explotación da Confraría de Vigo comprende unha ampla franxa litoral na marxe sur da Ría de Vigo, polo que os profesionais asociados desenvolven a súa actividade principalmente na contorna dos portos de Vigo e Canido.

Plans de explotación

En Galicia, a explotación dos recursos mariños está sometida a un Plan Xeral de Explotación Marisqueira, aprobado anualmente pola Xunta de Galicia, previa solicitude de todas as entidades interesadas. Os plans de explotación son unha ferramenta de xestión esencial para explotación sustentable dos bancos marisqueiros e adoitan aprobarse de xeito consensuado entre o sector produtivo e a Administración.

Os pescadores e mariscadores participan no Plan Xeral de Explotación Marisqueira por medio de plans de explotación propios ou en conxunto con outras entidades, e ademais participan noutros plans de explotación autonómicos experimentais por especies e artes de pesca, como por exemplo polbo, nécora, camarón e centola.

Os principais plans de explotación propios que se veñen desenvolvendo na Confraría de Vigo dende hai tempo son os de ourizo *Paracentrotus lividus* (Lamark, 1816), navalla *Ensis magnus* (Schumacher, 1817) e longueirón *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758), na modalidade de mergullo; e os de percebe (*Pollicipes pollicipes* Gmelin, 1790) e marisqueo de moluscos bivalvos (ameixas e berberchos) nas modalidades a pé e dende embarcación.

A estes plans veñen sumándose nos últimos anos outros recursos mariños asentados dende sempre nos mesmos bancos marisqueiros pero anteriormente ignorados ou descoñecidos. Así no ano 2013 empezamos a explotación de anemones (*Anemonia viridis* Forsskål, 1775) e de diversas especies de algas na modalidade de mergullo, con capturas incipientes pero cunha clara tendencia crecente. Neste último ano traballamos para engadir poliquetos e holoturias (*Holothuria (Panningothuria) forskali* Delle Chiaje, 1823) ao repertorio de recursos explotables e así diversificar a produción de especies mariñas.

Novos recursos marisqueiros

A diminución das poboacións dos recursos marisqueiros clásicos, xunto á demanda de novas experiencias gastronómicas e o acceso a unha multitude de mercados e clientes, suscitou a curiosidade dos propios profesionais do sector por novos recursos mariños que puidesen complementar as súas fontes de ingresos.

Pero a incorporación de novas especies ós plans de explotación non sempre vai ser doada, xa que como toda nova actividade leva asociados unha serie de retos a nivel de xestión, loxística e de comercialización que poden frustrar a súa rendibilidade.

Se ben é certo que os plans de xestión requiren dunha avaliación inicial do recurso para autorizar a súa extracción, non sempre son coñecidas en detalle o estado das poboacións e as consecuencias da súa explotación no ecosistema. Isto vai supoñer certa incertidume na evolución das capturas e o posible colapso da pesqueira en poucos anos.

Para evitar erros do pasado cumpre un estudo minucioso do ciclo biolóxico de cada especie e do papel que desenvolve no medio, así como unha estratexia conxunta por parte de todas as confrarías á hora de planificar a extracción e as vendas, establecendo topes de captura e prezos mínimos de venda comúns. Trátase de poñer en valor estes novos recursos e garantir a súa viabilidade a longo prazo.

A extracción dunha nova especie tamén supón un reto para os propios mariñeiros, que van necesitar un período de adaptación antes de coñecer as mellores técnicas de extracción, os períodos óptimos, boas prácticas de manipulación a bordo, tratamento e presentación antes da venda.

No aspecto legal, existe certo desconcerto na Administración á hora de incorporar estas novas especies ós permisos de explotación (permex) das embarcacións ou mariscadores. Permítese nalgúns casos incorporalas a outros plans de explotación xa existentes como especies complementarias, caso das holoturias, do ourizo, e dos poliquetos co marisqueo a pé. Mentres noutros casos cumpre a expedición dun novo permex, propio do recurso, caso da anemone, peneira ou algas.

Este feito pode limitar de xeito moi significativo a incorporación de novos recursos ó abano de posibles capturas de cada barco, posto que o número máximo de permex autorizados pola Administración é de 5 para cada embarcación, e non sempre os armadores van apostar por un novo permex, en detrimento doutro mais consolidado, sen ter claro o seu rendemento económico.

No eido da comercialización, é necesario un esforzo extra para dar a coñecer os novos produtos, atopar compradores e acadar os mellores prezos de venda. Isto supón un cambio no modelo de venda tradicional das confrarías, maioritariamente mediante poxa en lonxa, e vai supoñer necesariamente a implicación das confrarías na cadea de comercialización mediante acordos coas empresas transformadoras ou accedendo directamente ao consumidor final, a través dos lineais das grandes superficies.

A incorporación de novos recursos marisqueiros semella non ter volta atrás, pero debemos esforzarnos por trazar unha liña común entre todas as partes implicadas, de modo que sexamos capaces de aproveitar todo o seu potencial sen comprometer o seu futuro.

A confraría de pescadores "San Antonio" de Cambados no Foro dos Recursos mariños e da Acuicultura das Rías Galegas

Carlos Mariño Balsa
Asistencia Técnica Confraría de Cambados
maicarril@gmail.com

A Confraría de Cambados, é unha das confrarías máis importantes de Galicia, dende o punto de vista do marisqueo e a pesca artesanal. Con preto de 700 asociados, abranque os sectores de marisqueo a pé, marisqueo a flote, recolectores de recursos específicos con técnicas de mergullo, marisqueo dende embarcación (rastros) e pesca artesanal, dende o cerco, ata artes de enmalle, anzol e arratre no interior das Rías.

Dentro dos recursos marisqueiros, cabe destacar o sector dos recolectores de vieira (*Pecten maximus*), xa que esta confraría é a responsable anualmente de xestionar a extracción deste bivalvo na Ría de Arousa, ademais, a entidade participa como socia fundadora e maioritaria de "Porto de Cambados" que é a única empresa de evisceración de vieira existente en Galicia.

A navalla (*Ensis magnus*), recolectada por megulladores e mariscadores a flote con forquilla, mediante plans experimentais en bancos do entorno de Cambados, constitúe un dos recursos específicos relevantes no ámbito da confraría.

A continuación preséntanse os valores de extracción de navalla (*Ensis magnus*), como recurso específico máis importante da Confraría de Cambados.

Como aparece reflectido no párrafo anterior, á captura de navalla nesta confraría realízase polos colectivos de mariscadores a flote (mediante forquilla) e o colectivo de megulladores (pola extracción directa do substrato).

Entreámbolos colectivos capturaron arredor de 18.000 kg desta especie en 2016 dos cales máis do 70% correspondeu á extracción mediante mergullo.

Os mariscadores de a flote capturaron 5.170 kg namentres que os mergulladores 13.174 kg.

O volumen total de vendas no 2016 foi de 160.000 € e resultou ser o maior dos últimos 10 anos.

Na seguinte táboa pódese observar unha evolución da pesquería de navalla con técnicas de mergullo desenvolvida pola confraría de pescadores neste período.

Táboa I.- Navalla extraída polo colectivo de mergulladores da Confraría de Cambados nos últimos 10 anos

ANO	KG EXTRAÍDOS	IMPORTE (€)	PREZO MEDIO (€)
2007	2.466	31.900,03	12,08
2008	2.790	35.697,31	12,13
2009	3.651	32.781,05	8,92
2010	3.500	29.994,91	8,49
2011	4148	28.990,99	7,62
2012	6793	44.938,38	6,61
2013	6.566	42.195,22	6,43
2014	6.768	53.247,78	7,87
2015	10.408	96.669,85	9,29
2016	13.174	118.444	8,99

PORTO-MUIÑOS, S.L., novos recursos marisqueiros e da acuicultura: presentación e comercialización

Manuela Buján
PORTO-MUIÑOS, S.L. Poligono o Acevedo, Parcela 14.15185.Cerceda, A. Coruña
cultivo@portomuinos.com
www.portomuinos.com

La empresa

PORTO-MUIÑOS, S.L., es una pequeña empresa creada en diciembre del año 2011 a partir de Rosa María Mirás Antel, pequeña e innovadora empresa autónoma gallega fundada en el año 1998.

Su actividad principal, y por la que es más conocida, es la recolección, cultivo, elaboración y comercialización de productos con algas marinas para la alimentación y salud del hombre.

En el año 1998 Rosa María Mirás Antel decide acondicionar unas antiguas instalaciones abandonadas propiedad de la familia en una aldea a orillas del Atlántico, en la coruñesa "Terra das Mariñas" para darle arranque a una pequeña conservera en donde se intentaría elaborar distintas preparaciones con la idea de rentabilizar los excedentes de producción de los cultivos de setas propiedad de su marido. Se pensó en dar continuidad a esta modesta e incipiente industria elaborando además productos nuevos y de calidad que pudieran encontrar un hueco en el mercado ocupado por las grandes conserveras gallegas del momento, y de aquí surgió la idea de elaborar una conserva con algas marinas alimentarias, las verduras del mar, un interesante recurso marino totalmente infrautilizado en ese momento, y así empezó la exitosa historia de la empresa que hoy en día es una de las más importantes del sector en nuestro país y tiene, además, una importante proyección internacional.

En el año 1999 salen al mercado las primeras conservas de algas, en concreto las de "wakame" (*Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873) y "espagueti de mar" (*Himanthalia elongata* (Linnaeus) S.F. Gray, 1821). En ese año no se llegó a facturar nada, solo se promocionó el producto aprovechando los canales por los que se comercializaban las setas. Desde entonces, y hasta el año 2011, el número de referencias de productos que contenían algas marinas se fue incrementando de forma paulatina y continuada, en gran medida como resultado de la ejecución de distintos proyectos de Investigación Desarrollo e Innovación en colaboración con equipos de investigación de las universidades gallegas, en especial la Universidad de A Coruña, dirigidos principalmente a la prospección de nuevos recursos naturales para uso alimentario y profesionales de la restauración, que colaboraron tanto en el desarrollo de nuevos productos como la divulgación del conocimiento y uso de los mismos.

En el año 2011 finalmente se constituye la Sociedad Limitada PORTO-MUIÑOS, S.L., que recogiendo la actividad de Rosa María Mirás Antel pretende desarrollarla a mayor escala dando pie a un renovado y ambicioso proyecto. Trabaja ahora para introducirse en un mercado global sin por ello dejar de atender el mercado nacional o local. Sus nuevas instalaciones suponen un cambio de escala y están específicamente diseñadas para integrar en ellas todas las actividades de la empresa.

Explotación sostenible y nuevos cultivos

PORTO-MUIÑOS tiene una honda preocupación por la conservación de los ecosistemas naturales de donde extrae los recursos marinos que comercializa. Esta preocupación va más allá del riguroso cumplimiento de la legislación vigente y aplicación de buenas prácticas en la recolección de los mismos. Por ello, y con la estrecha colaboración de investigadores de la Universidade de A Coruña, dedica mucho esfuerzo a la investigación y desarrollo de las técnicas de cultivo de estos recursos, siendo pionera a nivel nacional en la investigación y desarrollo de los cultivos marinos de algas. El cultivo de las algas es sin lugar a dudas la mejor garantía para la sostenibilidad de su explotación. La empresa viene desarrollando actividad de I+D en el cultivo de algas desde hace diez años y fruto de ella es la puesta en el mercado procedentes de cultivo de dos especies de algas, una de ella muy escasa en el medio natural y la otra bajo régimen de protección. Esta última especie, el "kombu de azúcar" (*Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E.Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders, 2006) permite además ser cultivada en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (IMTA), una de las técnicas con más futuro para la diversificación y sostenibilidad tanto económica como ambiental de la acuicultura marina europea.



Tradición e innovación

PORTO-MUIÑOS es una empresa con los ojos siempre puestos en la innovación culinaria pero sin perder de vista la tradición. La idea es combinar ambos aspectos para fomentar sus sinergias. La fuerte tradición conservera de Galicia, muy volcada a los recursos marinos, se ve enriquecida por la innovadora explotación de muchos de ellos que aún permanecían en el anonimato. La empresa ha sabido encontrar y aprovechar recursos infrautilizados, como las algas o "verduras del mar", y darles salida comercial en forma de productos de alta calidad culinaria, una constante en la empresa, elaborados siguiendo tanto las técnicas de procesado más tradicionales de la industria conservara gallega como desarrollando otras nuevas. Actualmente se comercializan un elenco de más de una veintena de algas marinas con cualidades culinarias que nada tienen que envidiar a las bien conocidas especies asiáticas. El elevado número de referencias y tipología de las mismas que la empresa ha desarrollado en los últimos años con las "verduras del mar" es una prueba irrefutable del éxito de esta novedosa línea comercial.



Relación de productos elaborados

❖ ALGAS

Las algas marinas son el producto estrella. La empresa comercializa actualmente 26 especies distintas, de las cuales, dos proceden de nuestros cultivos experimentales, puesto que su recolección no sería sostenible por ser especies escasas o vulnerables.

Durante estos años hemos desarrollado distintos productos procesados y elaborados en función del sector al que se dirigen, siempre con el fin de preservar su calidad y facilitar su preparación y consumo.

◊ Algas frescas, en salazón y congeladas, dirigidas al sector de la restauración.

◊ Algas deshidratadas (enteras, en copos o en polvo), dirigidas al consumidor final y a la industria alimentaria. En deshidratado hemos elaborado además varias líneas de productos con algas marinas: arroces, pastas, sales, dulces e infusiones con algas.

◊ Algas en conserva, listas para comer, dirigidas al consumidor final. Estos productos se han creado con la intención de facilitar y dar ideas al consumidor de cómo usar las algas marinas: ensaladas, tartares, pestos, salsas, tapas de setas o moluscos con algas, etc.



Otros productos

En la conservera elaboramos otros productos del mar de Galicia, algunos clásicos ya en la empresa como la hueva de erizo de mar o el hígado de rape, y otros más novedosos e innovadores como la anémona de mar, el pepino de mar o los vegetales de costa. En estos últimos años algunos de estos productos han sido objeto de reconocimiento tales como:

- ***Fresh Ideas Awards 2011***
  Al producto: Tapa de shiitake a la japonesa
  IFE the International Food&Drink Event
  Londres, Reino Unido. 13 de Marzo de 2011.
- ***Premios Biocultura 2012 Mejor Producto Bio***
  Para el chimichurri de algas Porto-Muiños
  Biocultura Barcelona, 2012.

- ***Premios Innofórum***
  1er premio Categoría "el sabor más innovador"
  Al producto Chimichurri de algas, una receta clásica con un producto innovador.
  Fórum Gastronómico Santiago de Compostela, 2012.
- ***Premios Salón de Gourmets 2013***
  Premio a la versatilidad al producto: Línea de *escamas de sal con sabores*.
  Madrid 2013

Accede a la presentación



Galuriña, elaboración de empanadas de algas ecológicas con mariscos y pescados

Carmen Sánchez Sánchez
Galuriña, Insuela 17, 15240 Esteiro, Muros, A Coruña
www.galuriña.com, galurina@gmail.com

La empresa

Radicada en la localidad de Esteiro (Muros, A Coruña), Galuriña nace de la historia, la tradición y la experiencia en el mundo de las conservas de algas y pescados de la emprendedora Carmen Sánchez. De la confluencia de todos estos factores se creó una innovadora empresa cuyo principal objetivo es ofrecer productos alimenticios de la máxima calidad que reflejan el privilegiado entorno natural en el que crecen sus ingredientes.

Galuriña ofrece a los consumidores un alimento rico, nutritivo y ecológico de la más alta calidad. Además de una masa única, sus ingredientes permiten aprovechar de modo óptimo el potencial existente en la costa gallega y, más concretamente, en la ría de Muros.

Orígenes y fundación de Galuriña

La idea surgió a principios de la década de los 90, con el descubrimiento de unos antiguos libros de una Vicaría que la familia de esta muradana tenía que recoger y archivar. Entre aquellos tomos, Carmen Sánchez encontró una receta de la masa de una empanada, en la que se especificaban los ingredientes disponibles en la zona, así como los métodos de cocina y conservación propios del siglo XIX.

La peculiaridad de la receta radica en un proceso de elaboración encaminado a proteger los alimentos cuando los pescadores y agricultores se veían obligados a permanecer fuera de casa varios días. Tal descubrimiento hizo que Carmen Sánchez se interesase por aplicar las indicaciones de aquel antiguo libro. Tras numerosas pruebas realizadas durante las tardes de invierno de 2012, finalmente dio con la combinación de ingredientes ideal, basada en la tradición de dos siglos atrás.

El resultado es una masa deliciosa que se encuentra cerca del hojaldre, pero que no llega a serlo. Crujiente y sabrosa en sí misma, su composición y proceso de elaboración le permite mantenerse fresca y deliciosa durante más días de lo que un producto de este tipo haría. Para esta masa sólo cabía, pues, utilizar los ingredientes de la más alta calidad existentes en la zona, sumando, además, el respeto por los pescadores y agricultores de antaño que utilizaron en su día este proceso de conservación duradera.

Una vez conseguida esta materia prima, Carmen Sánchez empezó, en 2012, a adquirir formación y experiencia específicas en el mundo de las conservas de algas y pescados. Estos conocimientos le permitieron experimentar con diversas composiciones y mezclas hasta dar con el producto definitivo: unas empanadas tradicionales de productos del mar, cuya base es el alga y cuyo sabor se combina con mariscos y pescados propios de la zona.

Gracias a las excelentes propiedades de conservación de la masa cuya receta se remonta al siglo XIX, Carmen Sánchez decidió apostar por incorporar los procesos de ultracongelado y envasado al vacío para sus empanadas. De este modo, se garantiza una conservación de primera calidad y prolongado en el tiempo sin perder las propiedades de este producto.

Realizadas las primeras pruebas en su entorno inmediato, que registraron un gran éxito, Carmen Sánchez decidió poner en marcha su propia empresa. Con el fin de acompañar sus productos con un diseño exclusivo, registró los modelos de empanada con el número de registro 515.552. Ya en 2015 creó el plan de empresa y puso en marcha un taller-obrador de alimentos tradicionales bajo el nombre de Galuriña.



Como se puede observar en las imágenes que acompañan a este texto, los motivos escogidos para el diseño son el mejillón, el pescado y la concha de vieira. Esta última hace

referencia a la influencia del Camino de Santiago en todo el entorno de la ría de Muros y de Galicia en su conjunto.

Tras introducir sus productos en el canal ultracongelado, Carmen Sánchez continuó su proyecto de emprendimiento buscando nuevas posibilidades de mercado. Un trabajo por el que sigue apostando firmemente y al que augura un gran futuro en el sector alimenticio.

Misión, visión y valores

La misión de Galuriña es ofrecer un producto rico, nutritivo y ecológico de alta calidad que aproveche adecuadamente el potencial de la costa gallega en general y, más en particular, de la ría de Muros. Entre los factores que hacen de las empanadas de Galuriña un producto diferenciado se encuentran los siguientes:

- Las rías gallegas son una marca de calidad en los mercados internacionales. Cuentan con una Reserva Marina y es una de las razones por las que su producto resulta muy atractivo para los mercados.
- Las condiciones que poseen sus aguas tienen una singular relevancia por la cantidad de sales nutrientes, la claridad de sus fondos y su temperatura. Estas circunstancias hacen que la ría se convierta en una piscifactoría natural. Se trata, pues, de poner en valor el producto autóctono en todo su proceso.
- En el caso concreto de las empanadas de la Galuriña, se apuesta por un producto dirigido al consumidor de alimentos procesados artesanalmente con una materia prima autóctona y calidad contrastada.

Aunque se trata de un proyecto innovador, este se nutre de la tradición para ofrecer una nueva visión. En Galicia, las algas fueron tradicionalmente aprovechadas para usos agropecuarios. Los habitantes de la zona, desde tiempos inmemoriales, las recolectaban en la costa y en la playa para, posteriormente, usarlas como abono o incluso como alimento para el ganado, al igual que se hace en otros países como Irlanda.

De ese uso tradicional se pasó, a comienzos del siglo XX, a una explotación industrial para la obtención de ficocoloides. Además, las algas también fueron utilizadas para fines farmacéuticos, científicos y militares.

En las últimas décadas, el uso de las algas ha dado un nuevo giro en el sector enfocándose a su uso para alimentación humana. Esta tendencia en alza pone a la comunidad gallega como punta de lanza, dado el elevado potencial gastronómico de este tipo de alimentos. Una

circunstancia que se debe aprovechar para dar un mayor empuje al sector del mar y productivo a través de la explotación de este valioso recurso natural.

Las empanadas ecológicas de Galuriña buscan, por tanto, responder a esta creciente demanda del uso de las algas como parte de una alimentación sana y equilibrada. Unos ingredientes que, además, proceden de un entorno natural único como la Reserva Marina de la ría de Muros.

Los productos

Los beneficios de las algas marinas

Las algas marinas conforman la base de las empanadas de Galuriña. Conocidas también como verduras de mar son organismos muy alejados de los vegetales terrestres y con un carácter propio y distintivo.

Aparte de su peculiar y original gama de colores, sabores y texturas tienen unas excelentes características nutricionales. Tanto si provienen de bancos naturales como de campos de cultivo, las algas marinas son un producto biológico, ya que en ninguno de los casos es necesario añadir sustancias que el medio natural no provea.

Las algas obtienen sus nutrientes directamente de nuestras fértiles y limpias aguas atlánticas que bañan el litoral de Galicia. Esto hace que también sean ricas en determinados nutrientes y oligoelementos esenciales difíciles de encontrar en productos alimentarios de distinta origen. Son especialmente ricas en proteínas de alto valor biológico (muy asimilables y cargadas de aminoácidos esenciales) y pobres en grasas e hidratos de carbono asimilables, por lo que son muy adecuadas en las dietas hipocalóricas.

En las algas se pueden encontrar también cantidades significativas de fibra, tan necesaria para la regulación del tránsito intestinal, diversos ácidos insaturados de la serie omega, de probada acción para rebajar las tasas de colesterol en sangre, y numerosas vitaminas hidrosolubles y liposolubles. Además son una rica fuente de oligoelementos esenciales como el calcio, potasio, magnesio, hierro y yodo, por lo que están especialmente indicadas en la alimentación infantil, en la tercera edad y en determinados regímenes y estados carenciales.

Algas de uso comestible

Entre las algas de uso comestible que se utilizan como base para la elaboración de las empanadas ecológicas de Galuriña se encuentran las siguientes. Todas ellas cuentan con unas propiedades y sabores distintivos que se detallan a continuación:

- **Wakame (*Undaria pinnatifida*)**. Aparece a finales de otoño en el momento que las aguas están frías y los días son cortos, están en las rocas poco profundas y batidas por el oleaje. Destaca su sabor a ostra, delicada textura y agradable al masticar. Como la mayoría de algas marinas es rica en fibra, vitaminas y minerales. Destaca sobre todo en un alto valor proteico y riqueza en calcio, magnesio, potasio, fósforo, hierro y vitamina C.



- **Nori (*Porphyra purpurea*)**. Aparece en primavera cuando la época es más iluminada y temperatura suave. Su recolección debe realizarse manualmente en bajamar y mediante inmersión. Por su intenso sabor a mar y excepcionales cualidades es el alga que más se consume en el mundo. Como la mayoría de algas marinas es rica en: fibra, vitaminas y minerales. Destaca sobre todo en un alto valor proteico y riqueza en fósforo, hierro y vitaminas A, B y C.



- **Espagueti de mar (*Himanthalia elongata*).** Aparece en pleno invierno en las costas limpias y batidas. Su recolección es en primavera cuando sus hojas son tiernas, sabrosas y nutritivas. La caracteriza su intenso sabor a nécora. Como la mayoría de algas ***marinas es rica*** en fibra, vitaminas y minerales. Destaca sobre todo en vitamina C y hierro asimilable. Es una de las algas más versátiles en la cocina y con más aplicaciones gastronómicas.



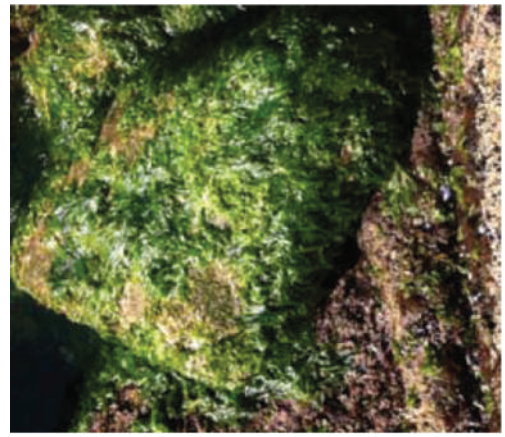
- **Caviar de mar (*Codium tomentosum*).** El Codium o Ramallo de Mar es un alga de color verde intenso, de formas redondeadas, con una carne jugosa y gelatinosa, muy común en las costas gallegas. Aparece en el mes de abril hasta noviembre. Destaca por su intenso sabor a percebe. Como la mayoría de algas marinas es rica en: fibra, vitaminas y minerales. Destaca sobre todo en: bajo contenido en grasas; sin azúcar; alto contenido en sodio, calcio, hierro y cobre; alto contenido en vitaminas A, C, B_1 y B_2. Es una de las algas más apreciadas en la cocina en la actualidad.



- **Kombu (*Laminaria ochroleuca*)**. Aparece en primavera en aguas limpias y batidas y cerca de las rocas. Se recolecta en los meses de abril a octubre. Sus hojas son tiernas y de una consistencia gruesa. Cuenta con un intenso sabor a mar y marisco. Por su riqueza en ácido glutámico, estas algas son potenciadoras del sabor y tienen una gran capacidad de espesante (ácido algínico). Tienen un alto nivel proteico. Como la mayoría de algas marinas es rica en fibra, vitaminas y minerales. Destaca sobre todo en calcio, magnesio, potasio, fósforo, yodo y vitaminass B y C.



- **Lechuga de mar (*Ulva rigida*)**. Aparece en primavera sobre aguas ricas en nutrientes y muy iluminadas. Su recolección es manual en bajamar o mediante buceo, recogiendo los individuos sanos y fijados a las rocas. Destaca por su intenso sabor a crustáceos y de textura delicada. Como la mayoría de algas marinas es rica en fibra, vitaminas y minerales y tienen un elevado nivel proteico. Destaca sobre todo en calcio, magnesio, potasio y vitamina C.



- **Musgo de Irlanda (*Chondrus crispus*)**. Aparece en primavera sobre aguas ricas en nutrientes y muy iluminadas. Su recolección es manual en bajamar o mediante buceo, recogiendo los individuos sanos y fijados a las rocas. Esta alga es principalmente para extracción de carragenina y utilizadacomo espesante (E-407) en la industria alimentaria. También se utiliza como planta medicinal por su acción antibacteriana.



Empanadas con sello ecológico

Desde Galuriña se ofrece un servicio especial a los profesionales de la hostelería (canal Horeca, empresas de catering, tiendas especializadas y delicatessen). Así, estos profesionales dispondrán de unos productos artesanales de contrastada calidad, con un diseño original, que atraen la atención de los clientes más exigentes y deleitan los paladares más exquisitos.

Una de las principales ventajas de estas empanadas es que cuentan con el sello de calidad de agricultura ecológica. Dicha certificación implica:

- Que el producto está libre de elementos químicos como plaguicidas, fertilizantes y antibióticos.
- Que se ha elaborado mediante los cultivos de temporada y la rotación de cultivos.
- Que, como mínimo, un 95% de sus ingredientes se han elaborado de manera ecológica.
- Que no contiene organismos modificados genéticamente (OMG) (y si se han incorporado de manera no intencionada, que su proporción en el ingrediente sea menor del 0,9%).
- Que el producto cumple con las normas del plan de inspección oficial: todos los operadores ecológicos han de ser inspeccionados al menos una vez al año. Se lleva a cabo una toma de muestras, análisis de la tierra, de materias primas y de producto

terminado y se exige una documentación detallada de todas las entradas y salidas de producto y de materia prima.

- ❖ Que proviene de forma directa del productor o del transformador en un envase sellado.
- ❖ Que se identifica al productor, al transformador o al vendedor y al organismo de inspección.
- ❖ Que se controla el bienestar animal y las necesidades específicas de cada especie: prácticas de cría adecuadas, fomento de las defensas inmunológicas naturales de los animales, que los animales pasen una serie de horas al día en el exterior y que su alimentación sea con piensos ecológicos.

Además de estas garantías para el consumidor, las empanadas ecológicas de Galuriña cuentan con la gran ventaja de que, gracias a su masa especial, se pueden conservar durante 18 meses. De este modo, se pueden ir consumiendo a conveniencia.

Desde Galuriña tratan de servir las cantidades y variedades que más se ajusten a las necesidades de los clientes y siempre en las condiciones más ventajosas. Por ello, sus productos se comercializan en los siguientes tres tamaños estándar y uno específico para hostelería, disponibles en seis sabores diferentes. Siempre con las algas como base de sus ingredientes se elaboran empanadas de berberecho, mejillón, atún, xarda, vegana y de pulpo de lonja (con certificado de Pesca de Rías):

a. **Maruca.** Empanada de 600 gramos, ideal como aperitivo, como centro de mesa para 4-6 personas, o como plato abundante para 2 personas. Destaca por su forma de pescado.



b. Maruquín. Empanada de unos 300 gramos, muy adecuada para un aperitivo en centro de mesa para 2 ó 3 personas, o para un plato individual abundante para 1 persona. El diseño recuerda a un mejillón.



c. Maruquiña. Empanada de unos 150 gramos, ideal como aperitivo para 1-2 personas o plato individual para 1 persona. Presenta forma de concha de vieira.



d. Plancha. Empanada de aproximadamente 1,2 kilogramos, que se elabora especialmente para el sector de la hostelería.



Plan de explotación

Como se ha podido comprobar tras la exposición anterior, Galuriña está desarrollando un proyecto realmente novedoso caracterizado por productos de primera calidad, con grandes garantías para los consumidores y aptos para seguir una dieta equilibrada. La elaboración de empanadas artesanales de algas es una actividad que, hasta la fecha, no se encuentra en el mercado.

Sin embargo, para poder desarrollar un proyecto tan innovador y ambicioso resulta imprescindible la ayuda de las administraciones para poder ampliar horizontes y asentar mercados. En este sentido, y con la voluntad de mejorar e incrementar su actividad, Carmen Sánchez presentó un Plan de explotación para obtener, por sus propios medios, la materia prima necesaria para los productos alimenticios que elabora.

La recolección de algas para el sector marinero se considera como una tarea secundaria y puede llegar a ocasionar desabastecimiento por su periodicidad. Tal y como se indicó con anterioridad, las algas tienen sus propios tiempos de recolección, por lo que un Plan de explotación garantizaría el stock suficiente para la elaboración de las empanadas ecológicas de Galuriña y abastecer, de este modo, la creciente demanda de los mercados.

Para conseguir este objetivo, esta emprendedora muradana presentó en 2016 al Grupo de Acción Costeira (GAC) Costa da Morte la aprobación y ayudas para el desarrollo de dicho plan. Esta propuesta fue desestimada por el GAC alegando que el colectivo de las algas no está considerado pesca artesanal y la certificación de ecológico no fue estimada como valor sostenible.

Además, una de las exigencias para el desarrollo del Plan de Explotación es la creación de un Plan de Evaluación del Recurso. Una acción que resulta demasiado costosa para una empresa en pleno proceso de emprendimiento. Para ello, se requeriría de la ayuda de los técnicos de la administración pública (como la Xunta de Galicia) para que realizasen la evaluación del recurso exigida para aprobar un Plan de Explotación, cuya falta de aprobación está provocando una destacable demora en el canal de venta.

Por otra parte, resulta desproporcionado que se exija un Plan de evaluación de recurso para una extracción de baja entidad e impacto. Todas las algas son recogidas manualmente y seleccionadas estableciéndose una cantidad anual de alrededor de 6.000 kilogramos.

Por tanto, se requiere de la imprescindible ayuda de las administraciones para desarrollar y ampliar un proyecto innovador que pondrá en valor el sector marítimo muradano en

particular y de Galicia en general. De hecho, ya se ha dado luz verde a Planes de explotación a la Cofradía de Muros referente al uso de las algas, siendo este muy semejante al solicitado por Galuriña, resultando este último rechazado y el anterior, aprobado.

Próximos objetivos

Tras un año de demora, la emprendedora Carmen Sánchez tiene el objetivo de seguir ampliando su mercado tanto en la comunidad autónoma como en Madrid. El producto ecológico es una de las mejores garantías de calidad para las empanadas de algas de Galuriña.

Asimismo, se pretenden incorporar más tipos de algas al relleno de las empanadas dirigidas al colectivo vegano. Además, se trabajará en cuestiones de I+D+i con el fin de crear nuevos productos de panificación de algas.

Showcooking de novos recursos marisqueiros e da acuicultura

Os preparativos...



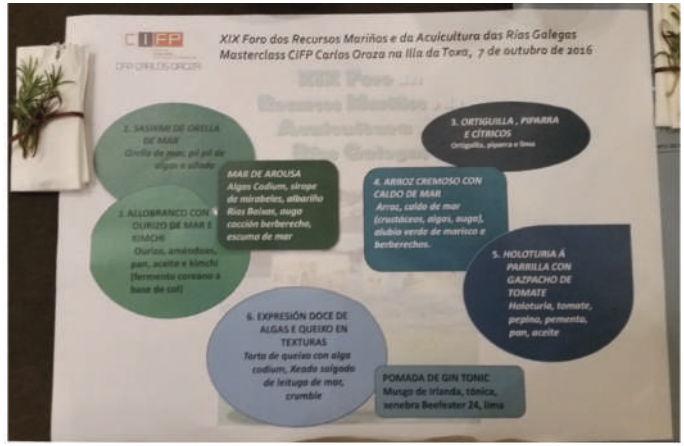
Alumn@s e profesor@s do “CIFP Carlos Oroza” de Pontevedra, cociñando e montando os pratos que van a degustar os asistentes ao Foroacui.

Cociñando en directo...



1: Vista da sala con asistentes, presentador do acto, cociñeiros e infraestrutura de seguimento das actividades do cociñado en directo. 2: De esquerda a dereita: o presentador do acto Lucio Grassia, o diretor do "CIFP Carlos Oroza" Manuel Hermo, e Javi Olleros do restaurante "Culler de pau". 3: Manuel Hermo, presentando aos alumn@s que faran o cociñado en directo dos pratos. 4: Retransmisión en directo, nas pantallas da sala, do prato de ovas de rodaballo cociñado por Javi Olleros. 5 a 7: Membros do "CIFP Carlos Oroza" cociñando, traballando, recibindo a homenaxe dos asistentes, e colocación dos servicios para os comensais.

Os pratos...















1: Mar de Arousa, **2**: Sashimi de orella de mar, **3**: Ortiguilla, piparra e cítricos, **4**: Allobranco con ourizo **5**: Holoturia a parrilla con gazpacho de tomate, **6**: Arroz cremoso con caldo de mar, **7**: Expresion doce de algas e queixo en texturas con pomada de gin tonic.

Entrantes de empanada de algas feitos por Galuriña...





PANEIS

A new record of the pearl oyster, *Pinctada radiata* (Bivalvia: Pteriidae), in the eastern Adriatic Sea (Croatia): morphological and molecular characterization

Nerlović[1] V., Quinteiro[2] J. & Rey-Méndez[2,3] M.

[1]Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52 210 Rovinj, Croatia. vedrana.nerlovic@cim.irb.hr

[2]Laboratorio de Sistemática Molecular, CIBUS, Facultade de Bioloxía, Universidade de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, A Coruña, Spain. manuel.rey.mendez@usc.es; javier.quinteiro@gmail.com

[3]Instituto de Acuicultura da Universidade de Santiago de Compostela, Spain.

Abstract

Specimens of the invasive *Pinctada radiata* collected in the Adriatic Sea (Croatia) and Aegean Sea (Greece) were compared using morphological and molecular analyses. The specimen from Adriatic Sea was collected in an aquaculture area at a depth of 5 m while the specimen from Aegean Sea was collected in a touristic area at a depth of 2 m. Both morphological characters and mitochondrial data (16SrRNA and COX1 genes) support the assignation of the sampled specimens to the species *Pinctada radiata*. The croatian *Pinctada radiata* was firstly recorded in 2008 in the northern Adriatic Sea. The considered specimen represent the first record for the central Adriatic Sea. Obtained results provided the first molecular characterization of *P. radiata* in the Adriatic Sea.

Key words

Pinctada radiata, invasive species, Adriatic Sea, Croatia, new record

Introduction

The family Pteriidae (Bivalvia: Pterioida), which includes the group of species known as "pearl oysters", is represented by three species in the Mediterranean according to Clemam (2008): *Pteria hirundo* (Linné, 1758); *Pinctada radiata* (Leach, 1814) and *Electroma vexillum* (Reeve, 1857), while Zenetos *et al*. (2004, 2005) have included two more species, namely *Pinctada margaritifera* (Linné, 1758) and *Pteria occa* (Reeve, 1957). All of these species except *P. hirundo* are alien species that have been introduced to the Mediterranean either via the Suez Canal (*P. radiata*, *P. occa*), by aquaculture activities (*P. margaritifera*, *P. radiata*), or via shipping (*E. vexillum*) (Gofas and Zenetos, 2003; Zenetos *et al*., 2003; Çevik *et al.,* 2005). *Pinctada radiata* had been first recorded in 1874 as *Meleagrina* sp. from Egypt (Monterosato, 1878), with the species seeming to have become well established in extent throughout the eastern Mediterranean (Zenetos *et al*., 2004) and Sicily (De Natale, 1982; Ricordi, 1993), in Siracusa, on the southeastern coast of Sicily (Gaglini, 1994). Accidental occurrences have been recorded in France (Zibrowius, 1979) and Italy (Vio and De Min, 1996). Aldought during 1960s and 1970s the species has been introduced for aquaculture purpose in some parts of Mediterranean, Saronikos Gulf in Greece (Serbetis, 1963; Zenetos *et al*., 2004). Zenetos *et al.* (2008) also reported the recently invaded Hellenic sites: Cyclades islands in 2006 and Crete in 2003, what support the addition mode of its introduction in Greek waters via the Suez Canal. Recently, *P. radiata* was recorded from Linosa, in the Sicily Channel (Lodola *et al.,* 2013). New data for the locality of *P. radiata* in the eastern Adriatic Sea was provided by Doğan and Nerlović (2008), in which the species is reported for the first time in Croatian waters. This paper presents the first record of *Pinctada radiata* in the central part of Croatian waters. The species was previously recorded off Pula (northern Adriatic Sea).

Materials and methods

Sampling:

Two adult specimen of *Pinctada radiata*, were collected for the analyses. One specimen was collected in Brijesta Bay (in the southern part of the Adriatic Sea: 42º54'34.1" N, 17º31'36.2" E), near an oyster (*Ostrea edulis* Linnaeus, 1758) farm in June 2016 (Fig. 1). It is a natural spawning area and the most important bivalve aquaculture area in the eastern Adriatic Sea. The specimen was attached, by strong byssus filaments to a plastic collector near farmed oysters at a depth of 11 m.

The specimen of *P. radiata* was subsequently relocated from the pergolari mesh at a depth of 5 m where it quickly and successfully adapted. It reattached, once again, by byssus to *Ostrea edulis* and lived in close association with bivalves: *Ostrea edulis*, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, *Mimachlamys varia* (Linnaeus, 1758) and *Pteria hirundo* (Linnaeus, 1758). The smaller specimen of the edible *O.edulis* was attached (cemented) onto a larger specimen of pearl oyster, *P. radiata*.



Figure 1.- The map showing where the croatian specimen of *Pinctada radiata* was found: Brijesta Bay (Croatia).

In addition, one specimen was collected in Kallithea beach (located on the east coast of Rhodes island, Greece: 36°23'03.2" N, 28°14'34.5" E) in September 2016 at the rocky beach at 2 m depth (Fig. 2). The habitat where the specimen was found is characterized by a photophilic algae community dominated with *Cistoseira* spp.



Figure 2.- The map showing where the greek specimen of *Pinctada radiata* was found: Kallithea beach (Greece).

Morphological and morphometric analyses

P. radiata have a fragile, rather thin and compressed, small to medium size shell. The common size of this oyster is usually 50-65 mm. The shell is inequivalve with the left valve more inflated, and has an almost quadrate outline. The dorsal margin is relatively long, and certainly longer than the body of the shell. The posterior margin is slightly concave and protrudes slightly beyond the tip of the anterior ear. The beaks point anteriorly, and the hinge line is with 2 small teeth in each valve. The ligament is set in a single triangular depression. The external coloration of the shell is variable. It can be uniform or with darker markings on radial rays, and is generally brownish or reddish, sometimes, green and bronze coloration has been observed. The outer surface is appressed and flattened imbricating concentric lamellae, and often moderately small radially projecting spines, mostly preserved towards the margins. The internal side has a highly iridescent nacreous area, whereas the non-nacreous margin is glossy and light brown in colour, usually with dark brown or reddish blotches corresponding to the main external rays (Nordsieck, 1969; Parenzan, 1974, 1976; Poutiers, 1998).

Morphometric measures were taken using a dial caliper with a resolution of 0.01 mm, and included shell length (SL), hinge length (HL) shell height (SH) and shell width (SW) (Fig.3). The soft tissue of specimen was retained for subsequent molecular analyses.

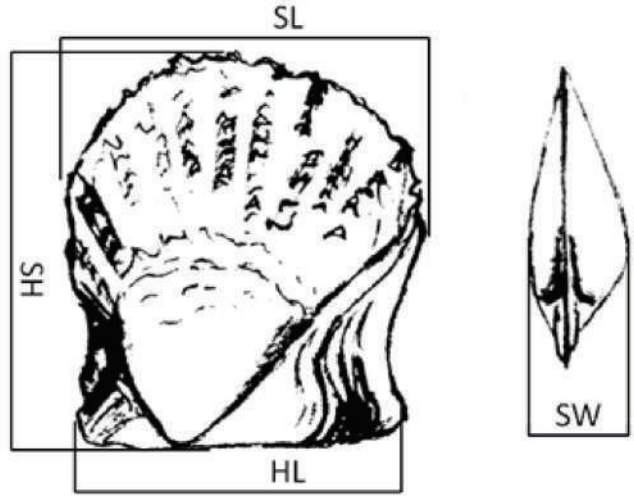


Figure 3.- Morphometric measures: shell length (SL), hinge length (HL), shell height (SH) and shell width (SW).

Genetic analyses:

The molecular identification was based on the characterization and phylogenetic of DNA sequences from the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit 1 (COX1), used in the 'Barcoding of Life' initiative, and 16S rRNA. Total DNA was extracted from 10 mg of adductor muscle by using the Mollusk EZNA Tissue kit (Omega Biotek). DNA fragments were amplified using the mitochondrial LCO1490/HCO2198 and 16Sa-5'/16Sb-3' universal primers, in a total volume of 12.5 µL, including GoTaq Green Buffer 1X (Promega); 1.5 mM Mg_2Cl, 10 mM of each dNTP; 1.5 units GoTaq enzyme (Promega) and 20 ng of isolated DNA. The thermal conditions of the PCR reaction were as follows: 3 min at 95°C; 35 cycles of 40 sec at 94°C, 40 sec at 50°C and 1min at 72°C; and 7 min at 72°C and 5min at 4°C. The sequencing reaction was performed using the BigDye Terminator Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems, Inc.). The sequencing products were separated and detected on an ABI PRISM 3730xl (DNA Sequencing Facilities USC). The sequences were edited and aligned with BioEdit.

All phylogenetic analysis were performed with MEGA 7 (www.megasoftware.net). The model that best fits the ribosomal and COX1 data sets, following the bayesian criterion, was Tamura-Nei with a gamma value of 0.36.

Results and discusion

This is the second record of the species *P. radiata* in Croatian waters after Doğan and Nerlović (2008) first reported the species in the northern part of the Adriatic Sea off Pula, which is approximately 300 nautical miles from Brijesta Bay. The specimen from Brijesta Bay (Croatia) was compared to the specimen from Kalithea beach, which is situated on the east coast of Rhodes (Greece). The morphological features of both specimens (Fig.4) corresponded with characteristics described by Nordsieck (1969), Parenzan (1974) and Poutiers (1998). The main morphometric features of the specimen of *P. radiata* sampled from Croatian waters are as follows: SL= 59.34 mm, SH= 61.37 mm, HL= 56.43 mm, SW= 19.67 mm while the specimen from Greek waters had the following morphometric features: SL= 51.06 mm, SH= 50.39 mm, HL= 43.70 mm, SW= 15.16 mm. The SH value of the specimen from the Adriatic Sea was quite high (SH= 61.37 mm) as among 84 *P. radiata* individuals reported by Deidun *et al*. (2014) only one specimen had a maximum SH value of 60.8 mm. The average length (SH) usually ranges from 50 to 65 mm, but may exceed 106 mm (Poutiers, 1998; Tlig-Zouardi and Zaouli, 1994). The specimen of *P. radiata* from Greek waters was darker in colour than

the one from the Adriatic Sea. Bellaaj-Zouari *et al.* (2012) assumed that the variability in shell shape and colour among *P. imbricata radiata* populations in Tunisia could be result of the species ability to adapt to local environmental conditions at the sampled sites (salinity, wave action, temperature, high/low tides, etc).

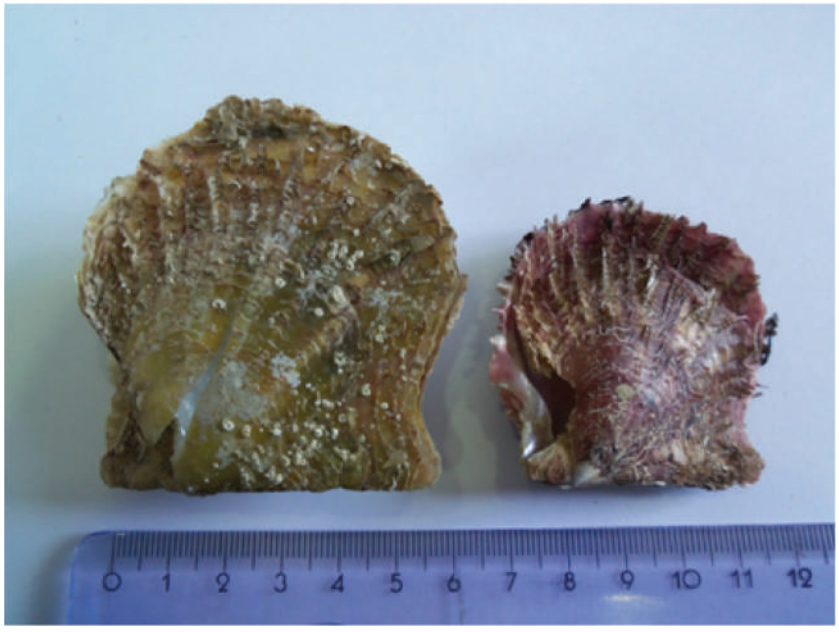


Figure 4.- Specimens of *Pinctada radiata* used in this work, from Croatia (left image) and from Greece (right image).

This species is able to attach by means of byssus threads to all varieties of hard substrata, from plastic to other living bivalves. Solid substrates, either natural (rocks, dead corals, etc) or artificial (buoys, fish nets, various submerged objects, etc), seem to be the preferred habitats (Winston *et al.,*1997; Àvila *et al.,* 1998; Poutiers, 1998; Tlig-Zouari *et al.,* 2009; Lodola *et al.*, 2013; Deidun *et al*., 2014; Holmes *et al*., 2015). The Croatian specimen was found to be attached by byssus filaments to a plastic collector near farmed oysters in close association with the following bivalves: *Ostrea edulis*, *Mytilus galloprovincialis, Mimachlamys varia* and *Pteria hirundo*. The specimen was replaced and reattached, once again, by byssus to *Ostrea edulis* and the smaller specimen of the edible *O. edulis* was cemented onto it. In contrast, the specimen of *P. radiata* from Greek waters was solitarily-attached by byssus to the host rock, which also supported a population of algae. In Tunisian waters, specimens were found attached to the following bivalves: *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758; *Ostrea edulis*; *Mytilus galloprovincialis*; the ascidian *Pyura microcosmus* (Savigny, 1816); marine seagrasses

Posidonia oceanica and *Cymodocea nodosa* rhizomes; or buried in sediment (Doğan and Nerlović, 2008; Tlig-Zaouari *et al*., 2009; Zakhama-Sraieb *et al*., 2009; Yassien *et al*., 2009). A population of *P. radiata* also occurred with a large population of *Arca noae* Linnaeus, 1758 (Deidun *et al.,* 2014). Oliverio *et al*. (1992) also recorded a sample as an epibiont on a loggerhead turtle off Lampedusa island, Italy.

In Croatian waters, the species was found at a depth of 11 m, and successfully lived after replacement at a depth of 5 m. The vertical distribution of *P. radiata* is wide; previous studies reported various depths within a range of 2 to 25 m: 2-3 m (Tlig-Zouari *et al.,* 2009; Deidum *et al.*, 2014); 5-25 m (Poutiers, 1998; Tlig-Zouardi *et al*., 2009; Lodola *et al.*, 2013); with maximum depth of around 150 m (Poutiers, 1998). The highest densities were recorded at shallow depths (5 m) on an artificial substrate placed in the open sea and exposed to strong water currents (Lodola *et al*., 2013).

Molecular Characterization

A single and ubiquitous haplotype was recovered from the two mitochondrial loci assayed, as expected from recently seated alien species carrying a low genetic diversity. The 16SrRNA alignment was 494 bp length, including the Prad1CRO16S haplotype obtained from the sampled specimens Prad1, Prad2 from Croatia and Prad3 from Greek waters. In addition 37 records of sequence data were mined from the Genbank being all currently available homologous data for the *Pinctada* genus. Similarly, the Prad1CROCOX1 haplotype was included in the COX1 data alignment 679 bp length and incorporating 123 homologous sequences.

The 16rRNA haplotype was identical to previously reported haplotypes for *Pinctata radiata.* In consequence, here analysed specimens were allocated and supported in the *Pinctada radiata* compact clade. The *P. imbricata* species constitutes the divergent sister species, although with a low bootstrapping support. The *P. fucata* is the other species included in the same clade (Fig. 5A).

The COX1 data was submitted to GeneBank BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/) and BOLD Systems (www.barcodinglife.org/). In both cases, the congruent match identification corresponds to the *Pinctada radiata* species (E value=0; 99% identity). In addition, phylogenetic reconstruction using all available COX1 data from the *Pinctada* genus supported this taxonomic identification. Thus, the Prad1CROCOX1, not previously reported haplotype, are included in a basal position within a clade containing all GenBank available *P. radiata* haplotypes (Fig. 5B). In consequence, both morphological characters and mitochondrial data (16SrRNA and COX1 genes) support the assignation of the sampled specimens to the *Pinctada radiata* species.

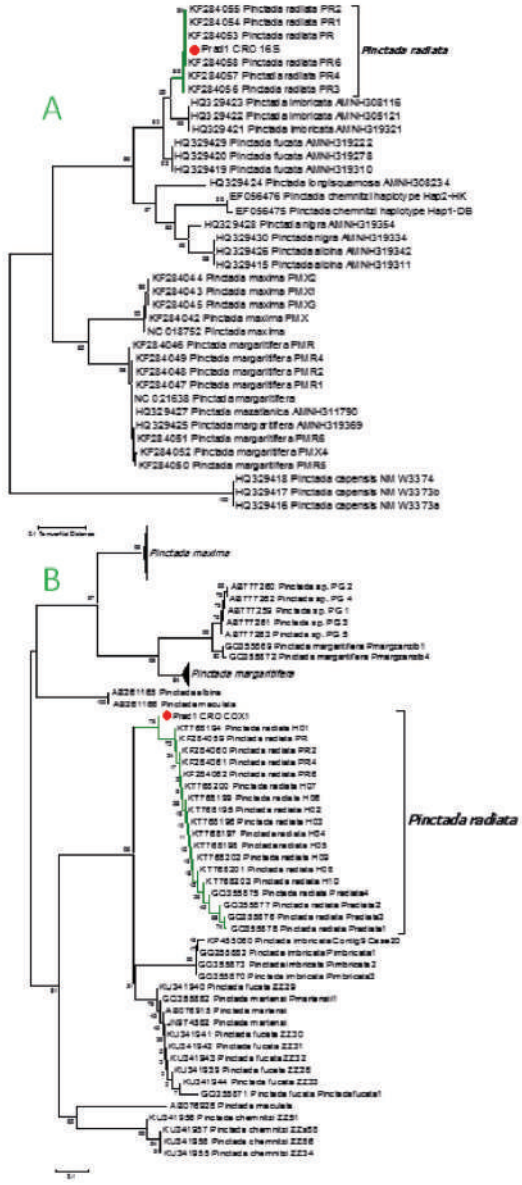


Figure 5.- Midpoint rooted phylogenetic tree based on the Neighbor-Joining method and elaborated with MEGA from 16SrRNA sequences (A) and COX1 (B) with distance calculated by the Tamura-Nei model. *Pinctada* homologous sequences available from Genbank were included in the analysis, which incorporated 16SrRNA and COX1 haplotype obtained from *Pinctada radiata* specimens (circle symbol in red color). Bootstraping (2000 replicates) clade support (>50%) is indicated by the numbers on nodes.

Brijesta Bay is a smaller cove that is situated in the productive aquaculture area of the Bay of Mali Ston in the eastern Adriatic Sea. The influence of the continent on the Bay is much stronger than that of the open sea, particularly taking into consideration the remarkable influence of the Neretva River. In India, adult *P. imbricata radiata* have been found to be tolerant of salinities. The influence of strong freshwater springs into the inner Bay of Mali Ston is an important hydrological factor that influences both hydrophysical and ecological conditions. The discovery of *P. radiata* in this area of hydrodynamic activity is consistent with information provided by other authors (Tlig-Zouari *et al.*, 2009; Derbali *et al*., 2011). According to the annual phytovolume distribution, this area of the Bay of Mali Ston has been included in the category of 'moderately eutrophicated ecosystem' (Viličić, 1989). All of these characteristics could serve as convenient conditions for the further spread of *P. radiata.* The present record might demonstrate that *P. radiata* already persists in Croatian waters. Further investigation will be required in order to confirm this statement and ascertain its validity. According to Streftaris and Zenetos (2006), *P. radiata* is considered to be one of the worst invasive species in the Mediterranean Sea, in terms of spread and impact.

Acknowledgment

We would like to thank the Lazić brothers, Vicko and Zdravko – the owners of the shellfish aquaculturen farm, Braća Lazić d.o.o. – for providing the aforementioned pearl oyster specimen for analysis. This record was supported by a HAZU donation: 0252Z06 ALKA NERLOVIĆ. HAZU (Hrvatska Akademija Znanosti i Umjetnosti): the Croatian Academy of Sciences and Arts.

Bibliography

Àvila S.P., Azevedo J.M.N., Gonçalves J.M., Fontes J., Cardigos F. 1998. Checklist of the shallow-water marine molluscs of the Azores: 1-Pico, Faial, Flores and Corvo islands. Açoreana, 8(4):487-523.

Bellaaj-Zouari A., Dkhili S., Gharsalli R., Derbali A., Aloui-Bejaoui N. 2012. Shell morphology and relative growth variability of the invasive pearl oyster *Pinctada radiata* in coastal Tunisia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom,* 92:1–11.

Clemam-Taxonomic Database on European Marine Mollusca. Museum National d'Histoire Naturelle, Dept. of Systematics & Evolution. Paris, France. http://www.somali.asso.fr/clemam/biotaxis.php

Çevik C., Doğan A., Önen M., Zenetos A. 2005. First record of the Indo-Pacific species *Electroma vexillum* (Mollusca: Bivalvia: Pterioida) in the eastern Mediterranean. JMBA2-Biodiversity Records. http://www.mba.ac.uk/jmba/jmba2biodiversityrecords.php?4996

De Natale A. 1982. Extra-Mediterranean species of Mollusca along the southern italian coasts. Malacologia, 22: 571-580.

Deidun A., Gianni F., P Cilia D., Lodola A., Savini D. 2014. Morphometric analyses of a *Pinctada radiata* (Leach, 1814) (Bivalvia: Pteriidae) population in the Maltese Islans *J. Black Sea/Mediterranean Enviroment,* 20(1): 1-14.

Doğan A., Nerlović V. 2008. On the occurrence of *Pinctada radiata* (Mollusca: Bivalvia: Pteriidae), an alien species in Croatian waters. *Acta Adriat*. 49(2): 155-158.

Gaglini A. 1994. Qualcosa di antico, qualcosa di nuovo: brevi considerazioni su Rissoa scillae, Rissoa sciutiana, Nesis prima, Chauvetia candidissima, *Pinctada radiata*. *B. Malacol.* 30(1-4): 67-72.

Gofas S., Zenetos A. 2003. Exotic molluscs in the Mediterranean basin: current status and perspectives. *Oceanogr. Mar. Biol., Annu. Rev.* 41: 237–277.

Holmes A.M., Oliver P.G., Trewhella S., Hill R., Quigley D.T.G. 2015. Trans-Atlantic rafting of inshore mollusca on macro-litter: American molluscs on British and Irish shores, new records. *Journal of Conchology*, 42(1):41-49.

Lodola A., Nicolini L., Savini, D., Deidun A., Occhipinti-Ambrogi A. 2013. Range expansion and biometric features of *Pinctada imbricata radiata* (Bivalvia: Pteriidae) around Linosa Island, Central Mediterranean Sea (Italy). *Ital. J. Zool.* 80(2): 303-312.

Monterosato T.A. di. 1878. Enumerazione e sinonima delle conchiglie Mediterranee (Enumeration and synonymy of the Mediterranean Bivalves). *Giornale di Scienze Naturali ed Economiche di Palermo*, 13: 61-115.

Nordsieck F. 1969. Die europäischen Meeresmuscheln (Bivalvia) vom Eismeer bis Kapverden, Mittelmeer und Schwarzes Meer. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 256 pp.

Oliverio M., Gerosa G., Cocco M. 1992. First record of *Pinctada radiata* (Bivalvia, Pteriidae Epibiont) on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Chelonia, cheloniidae). *Bollettino Malacologico* 28:149-152.

Parenzan P. 1974. *Carta d'identità delle conchiglie del Mediterraneo*.Vol. II. Bivalvi. Prima parte Bios Taras Ed. Taranto, 277 pp.

Parenzan P. 1976. *Carta d'identità delle conchiglie del Mediterraneo*. Vol. II. Bivalvi. Seconda parte Bios Taras Ed. Taranto, 264 pp.

Poutiers J.M. 1998. Bivalves (Acephala, Lamellibranchia, Pelecypoda). In: K.E.Carpenter & V.H. Niem (Editors). FAO species identification guide for fishery purposes. *The living marine resources of the Western Central Pacific*. Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves and gastropods. FAO, Rome, 1: 123-362.

Ricordi P. 1993. Segnalazione di *Pinctada radiata* (Leach, 1814) per il Tirreno meridionale. *Notiziario S.I.M.* 11: 41-42.

Serbetis C. 1963. L'acclimatation de la Meleagrina (*Pinctada*) *margaritifera* (Lam.) en *Grèce. Rapp. Comm. int. Medit*, 17:271-272.

Streftaris N., Zenetos A. 2006. Alien marine species in the Mediterranean- the 100 "Worst Invasives" and their impact. *Mediterranean Marine Science*, 7(1):87-118.

Tlig-Zouari S., Zaouali J. 1994. Reproduction de *Pinctada radiata* (Leach, 1814, Mollusque, Bivalve) dans les iles Kerkennah (Tunisie). *Marine Life* 4: 41-45.

Tlig-Zouari S., Rabaoui L., Irathni I., Fguiri H., Ben Hassine O.K. 2009. Distribution, habitat and populations' densities of the exotic species *Pinctada radiata* (Mollusca, Bivalvia) along the north and east of Tunisian coast. *Cah. Biol. Mar*. 50: 131-142.

Viličić D. 1989. Phytoplankton population density and volume as indicators of eutrophication in the eastern part of the Adriatic Sea. *Hydrobiologia* 174, 117-132.

Vio E., De Min., R. 1996. Contributo alla conoscenza dei molluschi marini del Golfo di Trieste (Contribution to the knowledge of marine molluscs in the Gulf of Trieste). *Atti Mus. Civ. Stor. Nat*., Trieste, 47: 173-233.

Winston J.E., Gregory M.R., Stevens L.M. 1997. Encrusters, epibionts and other biota associated with pelagic plastics: a review of biogeographical, environmental, and conservation issues. In: *Marine debris: sources, impacts,and solutions.* Springer Series on Environmental Management (ed. by Coe, J. M. \Rogers, D. B.). New York, USA: Springer-Verlag, 81-97.

Yassien M.H., El-Ganainy A.A., Hasan M.H. 2009. Shellfish fishery in the North Western part of the Red Sea. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 1:97–104.

Zakhama-Sraieb R., Ramzi Sghaier Y., Charfi-Cheikhrouha, F. 2009. On the occurrence of *Bursatella leachii* De Blainville, 1817 and *Pinctada radiata* (Leach, 1814) in the Ghar El Melh lagoon (NE Tunisia). *Aq. Inv.* 4 (2): 381-383.

Zenetos A., Gofas S., Russo G. & Templado J. 2003. CIESM *Atlas of Exotic Species in the Mediterranean*, Volume 3: Molluscs. F. Briand (Ed.). Monaco: CIESM Publishers, 376p.

Zenetos A., Gofas S., Russo G., Templado G.J. 2004. Vol. 3. Molluscs. In: CIESM *Atlas of Exotic Species in the Mediterranean* (ed. by Briand F) Monaco: CIESM Publishers, 376 pp.

Zenetos A., Cinar M.E., Pancucci-Papadopoulou M.A., Harmelin J.G., Furnari G., Andaloro F., Bellou N., Streftaris N., Zibrowius H. 2005. Annotated list of marine alien species in the Mediterranean with records of the worst invasive species. *Mar. Sci.* 6(2): 63-118.

Zenetos A., Vassilopoulou V., Salomidi M., Poursanidis D. 2008. Additions to the marine alien fauna of Greek waters (2007 update). JMBA2 - *Biodiversity Records published on-line* Volume 1 (e91): 8 pp.

Zibrowius H. 1979. Serpulidae (Annelida Polychaeta) de l'Océan Indien arrives sur des coques de bateaux à Toulon (France, Méditerranée) (Serpulidae (Annelida Polychaeta) introduced from Indian Ocean to the Mediterranean, France (Toulon) via shipping). Rapp. P.-v. Reun. (Monaco), 25/26(4): 133-134.

A new record of the pearl oyster, *Pinctada radiata* (Bivalvia: Pteriidae), in the eastern Adriatic Sea: morphological and molecular characterization

Vedrana Nerlović[1], Javier Quinteiro[2] & Manuel Rey-Méndez[2]

[1]Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52 210 Rovinj, Croatia. E-mail: vedrana.nerlovic@cim.irb.hr

[2]Laboratorio de Sistemática Molecular, CIBUS, Facultade de Bioloxía, Universidade de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, A Coruña, Spain. E-mail: manuel.rey.mendez@usc.es; javier.quinteiro@gmail.com

INTRODUCTION: The family Pteriidae (Bivalvia: Pterioida), which includes the group of species known as "pearl oysters", is represented by three species *in* the Mediterranean according to Clemam (2008): *Pteria hirundo (Linné, 1758); Pinctada radiata (Leach,* 1814) and *Electroma vexillum (Reeve, 1857)*, while Zenetos *et al. (2003, 2005)* have included two more species, namely *Pinctada margaritifera* (Linné, 1758) and *Pteria occa (Reeve, 1957).* All of these species except *P. hirundo* are alien species that have been introduced to the Mediterranean either via the Suez Canal (*P. radiata, P. occa), by aquaculture activities (P. margaritifera, P. radiata)* or via shipping *(E. vexillum)* (Gofas & Zenetos, 2003; Zenetos *et al., 2003*; Çevik *et al., 2005). Pinctada radiata* had been first recorded in 1874 as *Meleagrina* sp. from Egypt (Monterosato Di, 1878) with the species seeming to have become well established in extent throughout the eastern Mediterranean (Zenetos *et al., 2003) including Sicily (De Natale, 1982).* Accidental occurrences have been recorded in France (Zibrowius, 1979) and Italy (Vio & De Min, 1996). New data for the locality of *P. radiata* in the Adriatic Sea was provided by Dogan & Nerlovic (2008) in which the species is reported for the first time in Croatian waters. This paper presents the second record of the species *Pinctada radiata* in the Croatian part of the Adriatic Sea.

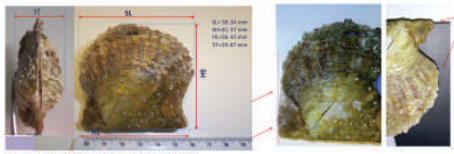


Figure 1.- *Pinctada radiata*, specimen Prad1.



Figure 2.- The map showing the investigated area.

MATERIAL AND METHODS: The most recent discovery, a solitary adult specimen of *Pinctada radiata*, was collected in Brijesta Bay (in the southern part of the Adriatic Sea: 42°54'34.1" N, 17°31'36.2" E), near an oyster (*Ostrea edulis*) farm in June 2016 (Figure1). It is a natural spawning area and the most important bivalve aquaculture area in the eastern Adriatic Sea. The specimen was attached, by strong byssus filaments to a plastic collector near farmed oysters at a depth of 11 m (Figure 2) . The individual specimen of *P. radiata* was subsequently relocated from the pergolari mesh at a depth of 5 m where it quickly and successfully adapted. It reattached, once again, by byssi to *Ostrea edulis* and lived in close association with bivalves: *Ostrea edulis, Mytilus galloprovincialis, Mimachlamys varia and Pteria hirundo*. The smaller specimen of the edible *O.edulis* was attached (cemented) onto a larger specimen of pearl oyster, *P. radiata*.

The molecular identification was based on the characterization and phylogenetic of DNA sequences from the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit 1 (COX1) used in the 'Barcoding of Life' initiative and 16S rRNA. DNA extraction was done by using the Mollusk EZNA Tissue kit (Omega Biotek). DNA fragments were amplified using the mitochondrial LCO1490/HCO2198 and 16Sa-5'/16Sb-3', in a total volume of 12.5 uL, including GoTaq Green Buffer 1X (Promega); 1.5 mM Mg2Cl, 10 mM of each deoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs); 1.5 units GoTaq enzyme (Promega) and 20 ng of isolated DNA. The thermal conditions of the PCR reaction were as follows: 3 min at 95°C; 35 cycles of 40" sec at 94°C, 40 sec at 50°C and 1min at 72°C; and 7 min at 72°C and 5min at 4°C. The sequencing reaction was performed using the BigDye Terminator Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems, Inc.). The sequencing products were separated and detected on an ABI PRISM 3730xl (DNA Sequencing Facilities USC). Sequence were edited and aligned with BioEdit.

All phylogenetic analysis were performed with MEGA 7 (www.megasoftware.net). The model that best fits the ribosomal and COX1 data sets, following the bayesian criterion, was Tamura-Nei with a gamma value of 0.36.

RESULTS AND DISCUSIÓN:

Diagnostic characters: Shell rather thin and small to medium sized, relatively inflated, subquadrate in outline (Figure 1) with a short and ill-defined posterior ear which is not drawn out into a wing-like process. Dorsal margin relatively long, anterior margin protruding only slightly or not at all beyond the tip of anterior ear. Outer surface of shell, when not worn, with densely set, appressed and flattened, imbricating concentric scales and moderately small, radially projecting spines mostly preserved towards the margins. Hinge line with 2 small teeth in each valve: 1 rounded anterior tubercule just in front of the umbo, and 1 posterior ridge situated behind the ligamental area and almost parallel to dorsal margin.A small accessory ridge sometimes present above the posterior tooth of right valve. Colour: outside of shell variable, uniform or with darker markings or radial rays, mostly of reds and browns, but sometimes of green and bronze coloration. Internal nacreous area highly iridescent. Non-nacreous margin glossy light brown with dark brown or reddish blotches corresponding to the main external rays [Figure 1] .

Molecular Characterization: The 16SrRNA alignment was 494bp length, including the data obtained from the sampled specimen Prad1, and 37 records of sequence data mined from the Genbank being all currently available homologous data for the *Pinctada* genus. In the case of the COX1 data the alignment was 679 bp length and incorporating 123 homologous sequences

The 16rRNA sequence from Prad1 specimen was identical to previously reported haplotypes for *Pinctata radiata*. In consequence, Prad1 was allocated and supported in the *Pinctada radiata* compact clade. The *P. imbricata* species constitutes the divergent sister species, although with a low bootstrapping support. The *P. fucata* is the other species included in the same clade (Fig. 3.A).

The *COX1* data was submitted to GeneBank BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/) and BOLD Systems (www.barcodinglife.org/). In both cases, the congruent match identification corresponds to the *Pinctada radiata* species (E value=0; 99% identity). In addition, phylogenetic reconstruction using all available COX 1 data from the *Pinctada* genus supported this taxonomic identification. Thus, the Prad1, not previously reported haplotype, are included in a basla position within a clade containing all GenBank available *P. radiata* haplotypes.

In consequence, both morphological characters and mitochondrial data (16SrRNA and COX1 genes) support the assignation of the sample specimen Prad1 to the *Pinctada radiata* species.

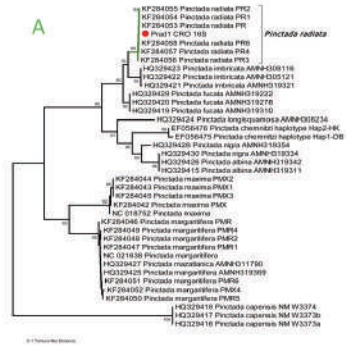


Fig. 3. Midpoint rooted phylogenetic tree based on the Neighbor-Joining method and elaborated with MEGA from 16SrRNA sequences (A) and COX1 (B) with distance calculated by the Tamura-NEI model. *Pinctada* homologous sequences available from Genbank were included in the analysis, which incorporated 16S rRNA and COX1 sequences obtained from Pinctada radiate Prad1 specimen (circle symbol in red color). Bootstraping (2000 replicates) clade support (>50%) is indicated by the numbers on nodes.

References:

- Clemam-Taxonomic Database on European Marine Mollusca. 2008. Museum National d'Histoire Naturelle, Dept. of Systematics & Evolution. Paris, France. http://www.somali.asso.fr/clemam/biotaxec.php
- Çevik, C., A. Doğan, M. Ören & A. Zenetos. 2005. First record of the Indo-Pacific species *Electroma vexillum (Mollusca: Bivalvia: Pteriidae)* in the eastern Mediterranean. *IMBA2 - Biodiversity Records.* http://www.mba.ac.uk/jmba/pdf/mba2biodiversityrecords.php?4096
- De Natale, A. 1982. Extra-Mediterranean species of Mollusca along the southern Italian coasts. Malacologia, 22: 571-580.
- Doğan A. & Nerlović V. V. 2008. On the occurrence of Pinctada radiata (Mollusca: Bivalvia: Pteriidae), an alien species in Croatian waters. Acta Adriat. 49(2): 155-158.
- Gofas, S & A. Zenetos. 2003. Exotic molluscs in the Mediterranean basin: current status and perspectives. Oceanogr. Mar. Biol., Annu. Rev, 41: 237–277.
- Monterosato Di, T. A. 1878. Enumerazione e sinonimia delle conchiglie Mediterranee (Enumeration and synonymy of the Mediterranean Bivalves). Giornale di Scienze Naturali ed Economiche di Palermo, 13: 63-115.
- Poutiers, J.M. 1998. Bivalves (Acephala, Lamellibranchia, Pelecypoda). In: K.E.Carpenter & V.H. Niem (Editors). FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves and gastropods. FAO, Rome, 1: 123-362.
- Vio, E. & R. De Min. 1996. Contributo alla conoscenza dei molluschi marini del Golfo di Trieste (Contribution to the knowledge of marine molluscs in the Gulf of Trieste). Atti Mus. Civ. Stor. Nat., Trieste, 47: 173-233.
- Zenetos , A., S. Gofas, G. Russo & J. Templado 2003. CIESM Atlas of Exotic Species in the Mediterranean. Vol. 3. Molluscs. In: F. Briand (Editor). CIESM Publishers, Monaco, 376 pp.
- Zenetos , A., M.E. Cinar, M.A. Pancucci-Papa -dopoulou, J.G. Harmelin, G. Furnari, F.Andaloro, N. Bellou, N. Streftaris & H. Zibrowius. 2005. Annotated list of marine alien species in the Mediterranean with records of the worst invasive species. Mar. Sci., 6(2): 63-118.
- Zibrowius, H. 1979. Serpulidae (Annelida Polychaetalde rl'Doland Indien arrives sur des coques de bateaux à Toulon (France, Méditerranée) (Serpulidae (Annelida Polychaeta) introduced from Indian Ocean to the Mediterranean, France (Toulon) via shipping). Rapp. P.-v. Reun. (Monaco), 25/2604): 133-136.

Acknowledgment: We would like to thank the Lasić brothers, Vielo and Zdravko – the owners of the shellfish aquaculture farm, Brata Lasić d.o.o. – for providing the aforementioned pearl oyster specimen for analysis. This re cord was supported by a HAZU donation: 025/2016 ALKA N ERLOVIĆ. HAZU (Hrvatska Akademija Znanosti i Umjetnosti): the Croatian Academy of Sciences and Arts.

Avances en la descripción del ciclo de vida temprano de la ostra de roca *Striostrea prismatica* (Gray 1825)

Lodeiros [1,2,3] C., Loor [1] A., Márquez[1] A., Jormil [1] R. & Sonnenholzner [1] S.

[1]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, CENAIM-ESPOL, Santa Elena. Ecuador. cesarlodeiroseijo@yahoo.es

[2]Investigador Prometeo, Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, Ecuador.

[3]Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Apartado Postal 245, Cumaná 6101, Venezuela.

Resumen

La Ostra de Roca *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) es una especie de las costas del Pacífico tropical y subtropical americano, con un interés socioeconómico importante y sus bancos naturales muestran síntomas de sobrexplotación y agotamiento, por lo que las actividades de acuicultura son necesarias para establecer una restauración ecológica de su bancos y producción de la ostra. Sin embargo, poco es el conocimiento sobre su biología con fines prácticos para las actividades de acuicultura. Mediante técnicas de reproducción inducida y producción de juveniles de moluscos bivalvos, en condiciones controladas de laboratorio, se desarrollaron varios bioensayos en el CENAIM-ESPOL, con los cuales se registró fotográficamente y analizó las etapas de la fertilización, desarrollo embrionario y larvario, metamorfosis y asentamiento, y desarrollo postlarvario, construyéndose una sinopsis cronológica y morfológica del ciclo de vida temprano de la ostra. Nuestro análisis concluye que la Ostra de Roca alcanza su etapa de larva competente para la metamorfosis en unos 30 días, lo cual es un desarrollo, en tiempo, atípico de moluscos bivalvos, particularmente tropicales. Se discute la posibilidad de que, con la optimización del cultivo larvario (dietas, densidad, factores ambientales, etc.), el desarrollo larvario, en tiempo, podría ser menor.

Palabras clave

Desarrollo embrionario, desarrollo larvario, semilla, Pacífico, *Crassotrea iridescens.*

Introducción

La ostra de Roca *Striostrea prismatica* (Fig.1), cuya sinonimia más reciente es *Crassotrea iridescens* (Hanley, 1854), es una de las especies más grandes de la familia ostreidae (>250 mm en longitud dorso-ventral) que se encuentra habitando fijada a rocas en la zona infralitoral y sublitoral, particularmente entre 3 y 6 m de profundidad a lo largo de la costa tropical y subtropical del este del océano Pacífico, desde el norte de Perú hasta Baja California Sur (Coan & Valenctich, 2012). Aunque su uso data de tiempos inmemorables como alimento, ornamento y confección de herramientas por su grande y gruesa concha, la explotación actual es desarrollada por comunidades locales de la franja costera, donde es extraída para el consumo directo, venta en mercados y en forma de ceviches y otros platos con atractivo turístico.



Figura 1.- Espécimen de *Striostrea prismatica* con el cuerpo blando separado mostrando cierto desarrollo gonádico.

Los estudios realizados en esta especie son escasos y han sido dirigidos particularmente a su reproducción (Ruíz-Durá, 1974; Cuevas-Guevara & Martínez, 1979; Hernández-Covarrubias *et al*., 2013; Meléndez-Galicia *et al.,* 2015; Loor & Sonnenholzner, 2016), su

posible uso como especie centinela de la contaminación por metales pesados (Pérez-Osuna *et al*., 1995) y toxinas por mareas rojas (Band *et al.,* 2010), así como algunos censos poblacionales (Vélez-Barajas, 1996; Gonzabay, 2014), los cuales, junto con informaciones de un mayor esfuerzo pesquero para la extracción, con evidencias de una disminución de la talla de las ostras extraídas, conducen a sugerir que la mayoría de las poblaciones se encuentran en estado de sobrexplotación y/o agotamiento, suponiendo un riesgo de extinción como recurso pesquero y con ello implicaciones socioeconómicas y ecológicas graves. En vista de ello, el CENAIM-ESPOL y gracias al financiamiento de la SENESCYT, recientemente ha generado una serie de investigaciones en función de producir organismos bajo condiciones de laboratorio con miras de restaurar ecológicamente algunos recursos pesqueros en vías de agotamiento y adelantar procesos de diversificación de la acuicultura en Ecuador. Uno de los aspectos primordiales para cumplir con los objetivos antes señalados es el conocimiento básico del ciclo de vida temprano, el cual no se encuentra totalmente establecido para *S. prismatica*, tan solo Argüello-Guevara *et al*. (2013) genera información pertinente sobre el desarrollo embrionario. El presente estudio es un aporte al conocimiento básico del desarrollo larvario de la ostra de roca o nativa *S. prismatica*, lo cual permitirá avanzar en investigaciones futuras para la producción masiva de semillas de la especie.

Materiales y métodos

El presente aporte está basado en recopilación de información de uso académico, generada por Loor (2012), y ensayos de investigaciones en curso para el desarrollo de una técnica de producción de semillas de *S. prismatica* en el CENAIM-ESPOL. Todas las investigaciones se realizaron a través de la reproducción inducida siguiendo las recomendaciones en Argüello-Guevara *et al*. (2013). Los procesos de reproducción se realizaron con agua de mar filtrada hasta 0,45 µm y tratada con UV, el desarrollo embrionario (sin aireación) se realizó en tanques de 1.000 L y, el larvario, con aireación continua y control de la temperatura (promedios larvarios entre 26 y 29°C, DS<2,0) y salinidad (promedios 32 y 33 UPS, DS<0,5). A intervalos diarios o cada dos días se realizó el recambio total del agua de los tanques de cultivo, las larvas fueron recolectadas con mallas Nytex® de 40-150 µm, según la evolución de su crecimiento, y concentradas en contenedores de menor capacidad (2 a 30 L, de donde se tomaron 4 muestras de 1 mL, previa homogeneización, para cuantificar y analizar los embriones y larvas en un microscopio óptico (Olimpus CX31) a 40 y 100X, mediante capturas fotográficas (cámara Lanoptik MDX501), lo cual permitió la identificación de las etapas del proceso embrionario y larvario, así como la determinación de la supervivencia y el crecimiento de los mismos. El cultivo larvario fue alimentado a partir de la etapa de larva

D con una dieta binaria de *Isochrysis galbana* Parke, 1949 y *Chaetoceros gracilis* F. Schütt, 1895, en proporción de 3:1 los primeros 7 días y 1:1 el resto del desarrollo larvario, en concentración desde 6 al inicio hasta 60 células/µL al final del estudio. Al momento de la observación de más del 50% de larvas competentes (pie y mancha ocular), las larvas concentradas fueron transferidas a contenedores de 50 L para ser disgregadas en diferentes sustratos de la concha de *Crassostrea gigas* (250-300 µm) y de *S. prismatica* (40-50 mm), así como láminas de plástico (40-50 mm).

Resultados y discusión

La gónada de *S. prismatica* se reparte por toda la zona del manto y la glándula digestiva (Fig. 1) lo cual supone un tejido extenso que en etapa de desarrollo es una importante proporción del cuerpo blando del animal, conteniendo elevadas cantidades de huevos. Aunque no se han realizado estudios exhaustivos de fecundidad de la especie, en las experiencias realizadas (con organismos menores de 170 mm), se ha observado que se podrían expulsar hasta 55,1 millones de huevos de 46-49 µm, sugiriendo una gran capacidad prolífera de la especie.

Hasta el momento se han realizado 7 reproducciones inducidas con >90% de sus huevos fecundados, desarrollándose con éxito la embriogénesis y los primeros días del desarrollo larvario; no obstante, en la mayoría de los desarrollos larvarios se manifestaron mortalidades elevadas, asociados a la presencia de bacterias tipo *Vibrio*, siendo solo 3 de los desarrollos larvarios exitosos, los cuales se integraron a los resultados de Loor (2012) para resumir, a continuación, de forma general, la descripción del desarrollo embrionario y larvario de *S. prismatica*, con notas de la observación de postlarvas y juveniles.

Como la mayoría de los bivalvos, la ostra de roca *S. prismatica,* expulsa gametos que fecundan y desarrollan larvas planctónicas hasta que se hacen competentes para su metamorfosis, cementándose a un sustrato duro y pasando a una fase bentónica. El desarrollo embrionario se encuentra descrito por Argüello-Guevara *et al*. (2013), quienes exponen que tras la expulsión, los gametos que entran en contacto con el medio externo para dar inicio a la fecundación, la cual puede ocurrir en 30 min, tiempo en que aparece el primer cuerpo polar, seguida de la segmentación que da origen a las 2 primeras células. Al transcurrir 1h acontece la segunda división celular, para que luego los blastómeros se dividan en 4 células, y así las subsecuentes divisiones entre las 6-8 h para dar origen a la mórula y la blástula. El estado de gástrula aparece a las 10 h desarrollándose en una larva trocófora a las 12 h, para a las 22-24 h resultar en una larva D de aproximadamente 67,9±2,34 µm de largo (axis dorsal-ventral),

la cual ya posee capacidad de alimentarse. Nuestros estudios de la observación de la embriogénesis corroboran la descripción de Argüello-Guevara *et al.,* (2013).

Se pudo constatar que *S. prismatica* posee un desarrollo larvario que dura unos 30-32 días, el cual puede caracterizarse como prolongado comparativamente con el que acontece en otros bivalvos, particularmente del trópico. Por ejemplo, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) obtiene larvas competentes a los 15 días (Velasco *et al.,* 2010) y *Crassostrea cortezien-sis* (Hertlein, 1951) a los 15-20 días, dependiendo de factores que modulan el crecimiento larvario (J.M. Mazón, CIBNOR, México, comunicación personal). Adicionalmente, bajo las mismas condiciones de cultivo para la producción de semillas en el CENAIM-ESPOL el de-sarrollo larvario de *C. gigas* dura menos de la mitad del tiempo (13-14 días) que el alcanzado para *S. prismatica* en el presente estudio. Esta estrategia reproductiva de desarrollos larvarios extensos aumenta la capacidad de dispersión de la especie en el medio ambiente, pero disminuye el éxito de colonización, dado que las larvas permanecen más tiempo siendo vul-nerables a la depredación y afección por cambios de los factores ambientales, antes de fijarse y desarrollar la metamorfosis. Por otra parte, y en términos de producción de semillas, un de-sarrollo larvario largo aumenta los costos de producción. Una hipótesis alternativa, es que el desarrollo larvario de *S. prismatica* es de menor tiempo, ya que aún no se han optimizado las condiciones de cultivo, y las larvas en los experimentos desarrollados hasta ahora han estado sometidas a estrés por niveles no óptimos de factores de producción (densidad, calidad de agua, dietas, etc.), por lo que estudios de desarrollos embrionarios y larvarios para optimizar el cultivo podrían conducir a disminuir el tiempo de la obtención de larvas competentes para la fijación observadas en nuestros ensayos. En la actualidad, el CENAIM-ESPOL se encuentra realizando dichos estudios.

Tras la embriogénesis y el paso de la trocófora a larvas D, éstas van adquiriendo su forma más redondeada apareciendo las larvas veliger ya sin la formación recta de la parte dorsal de la concha a los 3-4 días y en el día 8-9 la primera manifestación del umbo (fase de larva umbonada temprana, 94,9±12,12 µm), las larvas siguen desarrollándose lentamente para adquirir en el día 21 la fase umbonada tardía, alcanzando tallas de 192,3±15,34 µm. Al mes las larvas se vuelven competentes para la metamorfosis desarrollando un pie y mancha ocular, alcanzando tallas de 315,0±35,45, cuando ocurre la metamorfosis. A los 35 días, aunque muy pocas, se desarrollaron postlarvas de unas 500 µm con branquias rudimentarias y a los 45 días con branquias más desarrolladas con morfología juvenil, alcanzando tallas cercanas a 1 mm (Fig. 2). Hasta ahora no existen estudios que caractericen en tiempo el desarrollo de juveniles, aunque ensayos preliminares en el CENAIM-ESPOL muestran que en laboratorio con un suministro de unas 150.000 células microalgales (60 células/µL de *I. galbana* y 90 células/µL de *C. gracilis*), se obtiene una tasa de crecimiento de 6,8 mm/mes. Por otra parte se conoce que en poblaciones de las costas del pacífico mexicano *S. prismatica*

se convierten en adultos (primera talla de madurez sexual) a los 87-91 mm. La ostra de roca *S. prismatica*, como su nombre vulgar lo indica se cementa preferiblemente en rocas de las costas intermareales o submareales preferiblemente entre 3 y 6 m, en zonas que soportan altas energías, y crecen hasta tallas de 190 mm (Coan y Valentich, 2012), aunque también son encontradas fijas a otras conchas de la misma especie. En las ventas para consumo en forma de ceviche de ostras de la costa de Ecuador (Fig. 3), hemos encontrado organismos de 250 mm, e incluso los lugareños indican que las hay más grandes.

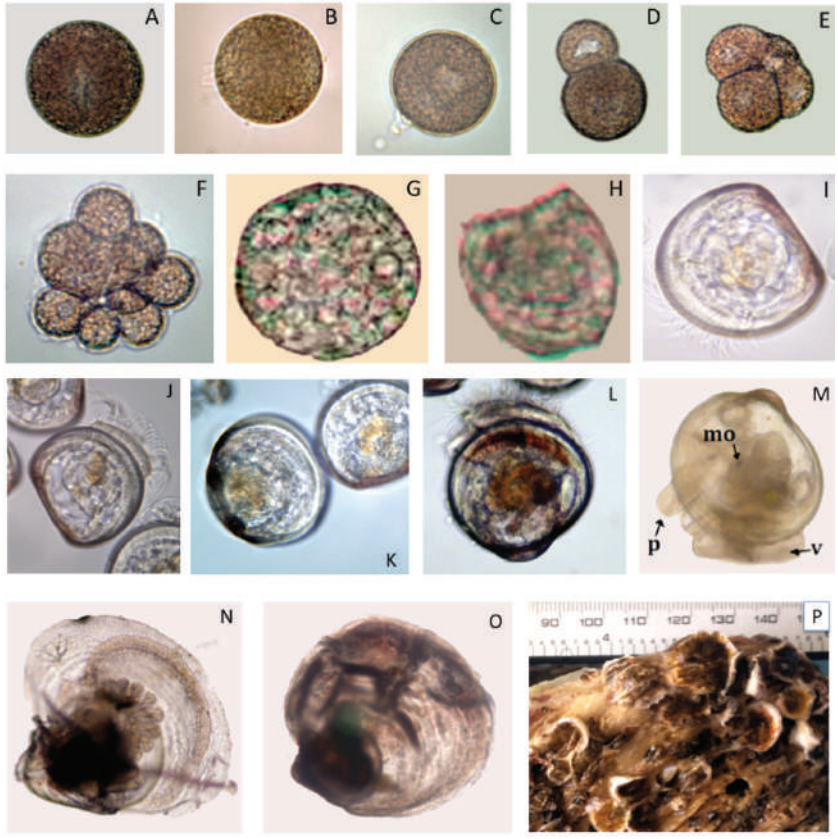


Figura 2.- Ciclo de vida temprano de *Striostrea prismatica*. Desarrollo embrionario: A=óvulo, B=óvulo en fecundación por espermatozoo, C=óvulo fecundado con la aparición del primer cuerpo polar (30 min), D=primera división celular, E=segunda división celular (2h), F= tercera división celular, G=blástula (8h). Desarrollo larvario: H=trocófora (12h), I=larva D (22-24h), J= larva veliger aún con forma D (3-4 días), K=larva veliger redondeada (5-6 días), L=larva umbonada (8-9 días), M=larva pediveliger competente (29-32 días: p=pie, mo=mancha ocular, v= velo), N=postlarva de 35 días, O=juvenil de 45 días, P= juvenil obtenido en fijación de concha proveniente de bancos naturales (se estima una edad de unos 3 meses).



Figura 3.- Venta de ostras *Striostrea prismatica* para el consumo en forma de ceviche en locales en la costa de Atacame, Provincia de Esmeraldas, Ecuador.

Conclusiones

Nuestro análisis concluye que la Ostra de Roca *Striostrea prismatica* alcanza su etapa de larva competente para la metamorfosis en unos 30 días, lo cual es un desarrollo, en tiempo, atípico de moluscos bivalvos, particularmente tropicales. Dado que el análisis para determinar el desarrollo larvario de *S. prismatica* se realizó con resultados a partir de

desarrollos larvarios cuantitativamente poco exitosos, se recomienda buscar la optimización del cultivo larvario y ratificar o ajustar los tiempos de alcance de las diferentes etapas larvarias.

Agradecimientos

El trabajo se ha realizado como parte del proyecto de investigación *Desarrollo de protocolo de domesticación para el uso sostenible de nuevas especies marinas para consumo de alimento y repoblación de bancos naturales*, financiado por la SENESCYT. César Lodeiros participó en el estudio durante su vinculación al CENAIM-ESPOL a través del proyecto Prometeo de la SENESCYT, Ecuador.

Bibliografía

Argüello-Guevara W., Loor A. & Sonnenholzner S., 2013. Broodstock conditioning, spawning induction, and early larval development of the Tropical rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray1825). *Journal of Shellfish Research* 32, 665–670.

Band C.J., Bustillos J., López, D., Gárate I., Núñez E. & Hernández J.J., 2010. Ecological physiological studies of *Gymnonidium catenatum* in the Mexican Pacific: a Review. *Mar, Drugs* 88(6): 1935-1961.

Coan E. V. & Valentich-Scott P., 2012. Bivalve seashells of tropical west America. *Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Northern Peru*. Santa Barbara, CA: Santa Barbara Museum of Natural history Monographs Number 6.

Cuevas-Guevara C.A. & Martínez A., 1979. Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein 1951, *C. palmula Carpenter* y *S. prismatica* Hanley, de San Blas, Nayarit, México (Bivalvia: Ostreidae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología* 6: 81–98.

Gonzabay R., 2014. Incidencia de la pesca artesanal en las poblaciones de la Ostra Nativa (*Crassostrea iridescens*) en los arrecifes rocosos de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador. *Trabajo de grado. Maestría en Ciencias*: Manejo sustentable de biorecursos y medio ambiente. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil. 122 pp.

Hernández-Covarrubias V., Patiño-Valencia J. & Aguirre H., 2013. Inferencia multimodelo: cálculo de la talla media de madurez de ostión de roca *Striostrea prismatica* en Nayarit, México. *Ciencia Pesquera,* 22(1): 11-18.

Loor A., 2012. Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y larvicultura de la ostra nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854). *Trabajo de Grado. Lic. Biología*. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador. 100 pp.

Loor A. & Sonnenholzner S., 2016. Reproductive cycle of the rock oyster, *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) from two locations on the southern coast of Ecuador. *Aquaculture Research*, 47: 1432-1442.

Meléndez-Galicia C., Estrada-Navarrete F., Hernández-Covarrubiass V., Arellano-Torres A. & Hernández-Montaño D., 2015. Madurez gonádica del ostión de roca *Crassostrea iridescens*, de la costa de Michoacán, México. *Ciencia Pesquera,* 23(1): 25-36

Pérez-Osuna F., Frias-Espiricueta M. & Osuna-López J., 1995. Trace metal concentrations in relation to season and gonadal maturation in the oyster *Crassotrea iridescens*. *Marine Environmental Research*, 40 (1):19-31.

Ruíz-Durá M.F., 1974. Estudio histológico comparativo de los ciclos gonádicos de *Ostrea corteziensi*s Hertlein, *Crassostrea virginica* Gmelin, & *Crassostrea iridescen*s Hanley. *Simposio sobre Acuicultura en América Latina*. Montevideo, Uruguay. 26 de noviembre a 2 de diciembre de 1974. SE/18p.

Velasco L.A., Vega D., Acosta E. & Barros J., 2010. Reproducción artificial de la ostra del mangle *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828 en el Caribe colombiano. *Rev. Intropica*, 5: 47-55.

Vélez-Barajas J.A., 1996. Pesquería de ostión de piedra. En: Casas-Valdez M. & Ponce-Díaz G. (eds.). *Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur*. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. México, pp: 113-120.

Avances en la descripción del ciclo de vida temprano de la ostra de roca *Striostrea prismatica* (Gray 1825)

Lodeiros César[1,2,3], Loor Alfredo[1], Márquez Adrian[1], Revilla Jormil[1], Sonnenholzner Stanislaus[1]

[1]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, CENAIM-ESPOL, Ecuador
[2]Investigador Prometeo, Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, Ecuador
[3]Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Apartado Postal 245, Cumaná 6101, Venezuela

Introducción

La ostra de Roca *Striostrea prismatica* (Gray 1982) Fig.1, cuya asignación inicial reciente es *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854) es una de las especies más grandes de la familia ostreidae (<250 mm en longitud dorso-ventral) que se encuentra habitando fijada a rocas en la zona infralitoral y sublitoral, particularmente entre 3 y 6 m de profundidad a lo largo de la costa tropical y subtropical del este del océano Pacífico, desde el norte de Perú hasta Baja California Sur (Mora 1990, Coan y Valentich 2012). Aunque sus usos datan de tiempos inmemoriales como alimento, ornamento y confección de herramientas por su grandeza y gruesa concha, la explotación actual es desarrollada por comunidades locales de la franja costera, donde es extraída para el consumo directo, venta en mercados y en forma de collares y otros objetos artesanales. Los estudios realizados en esta especie son escasos y han sido dirigidos particularmente a su reproducción (Rúa-Durá 1974, Cura-a-Cisneros y Martínez 1999, Hernández-Gómez-Ibáñez 2013, Meléndez-Galicia et al. 2015, Loor A y Sonnenholzner S. 2016), aspectos básicos como especie centinela de la contaminación por metales pesados (Pérez-Osuna et al. 1998) y en huevos rojos (Bard et al. 2018), así como algunos comos poblacionales (Valdez-Iturriaga 1996, Gonzabay 2004), los cuales, junto con información del ecosistema, evidencian la necesidad de la realización de la línea base de estas especies, conducente a lograr que la mejor inclusión de las poblaciones en cautiverio en agricultura, aportando un riesgo de extinción como recurso pesquero y/o ello implicaciones socioeconómicas y ecológicas graves. En vista de ello, el CENAIM-ESPOL y gracias al financiamiento de la SENESCYT, recientemente ha generado un serie de investigaciones en función de producir organismos bajo condiciones de laboratorio con mínimo de restauración ecológicamente algunos rangos parámetros en vías de aprendizaje y adelantar procesos de diversificación de la acuicultura en Ecuador. Uno de los aspectos primordiales para cumplir con los objetivos antes señalados es el conocimiento básico del ciclo de vida temprano, el cual no se encuentra totalmente establecido para *S. prismatica*, tan solo la guía de Arellano et al. 2013 genera la información pertinente sobre el desarrollo embrionario. El presente estudio es un aporte al conocimiento básico del desarrollo larvario de la ostra de roca o ostra del *S. prismatica*, lo cual permitirá avanzar en investigaciones futuras para la producción masiva de semillas de la especie.

Materiales y métodos

El presente aporte está basado en recopilación de información de un académico generado por Loor (2012) y ensayos de investigaciones al curso para el desarrollo de una técnica de reproducción de semillas de *S. prismatica* en el CENAIM-ESPOL. Todas las investigaciones se realizaron a través de la reproducción inducida siguiendo las recomendaciones en Arguello et al. 2015. Los procesos de reproducción se realizaron con agua de mar filtrada hasta 0,45 µm y tratada UV, el desarrollo embrionario (sin aireación) se realizó en tinajas de 300 l. Ly el larvario con aireación continua y evento de la temperatura promedio larvarios entre 26 y 29 °C, DO>5,0 y salinidad promedio 32 y 33 UPS, DS<0,5 A. Intervalos diarios o cada dos días se realizó el recambio total del agua de los tinajas de cultivo, las larvas fueron recolectadas en mallas tyler de 40-450 µm, según la uniformidad se encontraron y encontradas en anteriores de mayor capacidad (2 a 30 L, de donde se tomaron 4 muestras del mismo, para la homogenización, para cuantificar y analizar las los embriones y larvas en un microscopio óptico (Olympus CX31) a 40 y 100X, mediante captura fotográficas (cámara Lumpix MDR203), lo cual permitió la identificación de las etapas del proceso embrionario y larvario, así como la determinación tasa de la supervivencia y el crecimiento de los mismos. El cultivo larvario fue alimentado aportando la mezcla de las algas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* en proporción de 3:1 los primeros 7 días y 1:1 el resto del desarrollo larvario, a concentración diaria de 1 a 8 células/µl, al final del estadio. Al momento de la observación densidad de 50 % de las células en el cultivo de algas fue de 1 a 2 células/µl, la cual permitió asegurar en investigaciones futuras para la producción masiva de semillas de la especie.

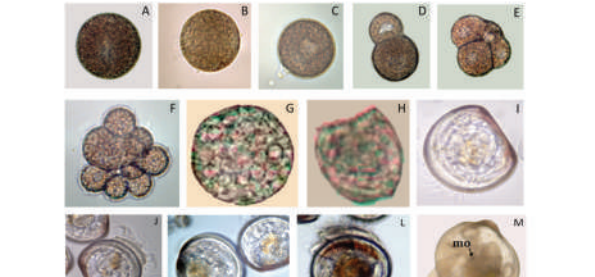


Figura 1. Especímenes de *Striostrea prismatica* con el manto blanco expandido mostrando el sitio de estudio gonádicos.



Figura 2. Venta de ostra *Striostrea prismatica* para el consumo en forma de ceviche en locales en la costa de Atacames, Provincia de Esmeraldas, Ecuador.

Figura 3. Ciclo de vida temprano de *Striostrea prismatica*. Desarrollo embrionario: A=ovulo, B=ovulo en fecundación por espermatozoos, C=ovulo fecundado con la aparición del primer cuerpo polar (20 min), D=primera división celular, E=segunda división celular (2h), F=tercera división celular, G=Mórula (4h), Desarrollo larvario: H=Trocófora (12h), I=larva D (22-24h), J=larva veliger con umbrella D (3-4 días), K=larva veliger umbonada (5-6 días), L=larva umbonada (8-9 días), M=larva pediveliger competente (20-22 días; p=pie, mo=músculo ocular, v=velo), N=Pediveliger de 35 días, O=juvenil de 45 días, P=Juvenil obtenido en fijación de concha proveniente de huevos naturales de cuatro años de antes 5 meses.

Resultados y discusión

La gónada de *S. prismatica* se reparte por toda la zona del manto y la glándula digestiva (Fig. 1) lo cual supone un sesgo a tener que en etapa de desarrollo gonadal importante proporción del cuerpo blando del organismo, contuviendo elevada cantidad de huevos. Aunque estudios exhaustivos de fecundidad de la especie no se han realizado, la cuantificación de gametos de varias de las especímenes realizadas (un organismos menores del 70 mm), muestran que se han más 55,1 millones de huevos de 44–49 µm, sugiriendo una gran capacidad reproductiva de la especie.

Hasta los momentos se han realizado 7 reproducciones inducidas con >90% de sus huevos fecundados, desarrollando con ello las embriogénesis y hasta el momento las obtenidas larvas fijadas en la zona infralitoral y sublitoral, particularmente entre 3 y 6 m de profundidad a lo largo de la costa tropical y subtropical del este del océano Pacífico, desde el norte de Perú hasta Baja California Sur (Mora 1990, Coan y Valentich 2012). Aunque sus usos datan de tiempos inmemoriales como alimento, ornamento y confección de herramientas por su grandeza y gruesa concha, la explotación actual es desarrollada por comunidades locales de la franja costera, donde es extraída para el consumo directo, venta en mercados y en forma de collares y otros objetos artesanales. Los estudios realizados en esta especie son escasos y han sido dirigidos particularmente a su reproducción (Rúa-Durá 1974, Cura-a-Cisneros y Martínez 1999, Hernández-Gómez-Ibáñez 2013, Meléndez-Galicia et al. 2015, Loor A y Sonnenholzner S. 2016), aspectos básicos como especie centinela de la contaminación por metales pesados (Pérez-Osuna et al. 1998) y en huevos rojos (Bard et al. 2018), así como algunos comos poblacionales (Valdez-Iturriaga 1996, Gonzabay 2004), los cuales, junto con información del ecosistema, evidencian la necesidad de la realización de la línea base de estas especies, conducente a lograr que la mejor inclusión de las poblaciones en cautiverio en agricultura, aportando un riesgo de extinción como recurso pesquero y/o ello implicaciones socioeconómicas y ecológicas graves. En vista de ello, el CENAIM-ESPOL y gracias al financiamiento de la SENESCYT, recientemente ha generado un serie de investigaciones en función de producir organismos bajo condiciones de laboratorio con mínimo de restauración ecológicamente algunos rangos parámetros en vías de aprendizaje y adelantar procesos de diversificación de la acuicultura en Ecuador. Uno de los aspectos primordiales para cumplir con los objetivos antes señalados es el conocimiento básico del ciclo de vida temprano, el cual no se encuentra totalmente establecido para *S. prismatica*, tan solo la guía de Arellano et al. 2013 genera la información pertinente sobre el desarrollo embrionario. El presente estudio es un aporte al conocimiento básico del desarrollo larvario de la ostra de roca o ostra del *S. prismatica*, lo cual permitirá avanzar en investigaciones futuras para la producción masiva de semillas de la especie.

Conclusiones y recomendaciones

Nuestro análisis concluye que la Ostra de Roca *Striostrea prismatica* alcanza su etapa de larva umbonada para la maternidad en 8 días, lo cual es un desarrollo, en tiempo, igual a los moluscos bivalvos, particularmente tropicales. Dado que el análisis para determinar el desarrollo larvario de *S. prismatica* se realizó con resultados a partir del desarrollo larvario cuantitativamente poco extenso, se recomienda la biología de la reproducción del ciclo larvario realizarse ajustar los tiempos de alcance de las diferentes etapas larvarias.

Agradecimientos

El trabajo se ha realizado como parte del proyecto de investigación *Desarrollo de protocolo de domesticación para el ostión de las costas ecuatorianas especie nativa para consumo de cultivo y repoblación de bancos naturales*, financiado por la SENESCYT, Gran Ladislao participo en el establecimiento de la evaluación del CENAIM-ESPOL a través del proyecto Prometeo de la SENESCYT, Ecuador.

Referencias

Arguello-Guevara W., Loor A., & Sonnenholzner S. 2015. Broodstock conditioning, spawning induction, and early larval development of the Tropical rock oyster Striostrea prismatica (Gray 1825). Journal of Shellfish Research 34, 865–870.

Bard J.C., J. Bautista, D. Gómez, I. Gaona, E. Núñez & S. Hernández. 2010. Ecological physiological studies of *Crassostrea corteziensis* in the Mexican Pacific: a review. Mar. Ecol. 9: 1935-1961.

Cuevas-Guevara, C.A. & A. Martínez. 1979. Estudio genético de *Crassostrea corteziensis* Hertlein 1951, *C. palmula* Carpenter y *S. prismatica* Hanley, de San Blas, Nayarit, México (Bivalvia: Ostreidae). Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología 6: 81–98.

Giese, A.C., Pearse, J.S. 1974. Introduction: general principles. In: Giese, AC., Pearse, J.S.Eds. Reproduction of Marine Invertebrates, Vol. I. Academic Press, New York, pp. 1–49.

Gonzabay R., 2004. Incidencia de la poza amarilla en los poblaciones de la Ostra Nativa (*Crassostrea iridescens*) en los estuarios noreste de Manglar, Provincia de Santa Elena, Ecuador. Trabajo de grado. Maestría en Ciencias Manejo sustentable de humedales y medio ambiente. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil. 122 pp.

Hernández-Gómez-Ibáñez, N.I., Pablo-Valenciaga & H. Aguirre. 2013. Influencia del inmediato cálculo de la talla media de madurez de ostión de roca (*Striostrea prismatica*) en Nayarit, México. Ciencias Pesqueras 22(1): 11-18.

Loor A., Sonnenholzner S. 2016. Reproductive cycle of the rock oyster, *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) from two locations on the southern coast of Ecuador. Aquaculture Research, 47: 1632-1642.

Loor A. 2012. Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y larvicultura de la ostra nativa (*Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854) Trabajo de Grado Lic. Biología. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador. 100 pp.

Jaén S., Ecora S., Bruno C., Bermar S. 1980. Una contribución a la ecología del Golfo de Nicoya. Universia 15:35-57.

Meléndez-Galicia C., Estrada-Navarrete S., Hernández-Covarrubias Y. Arellano-Gomes A., Hernández-Montaño D. 2015. Madurez gonádica del ostión de roca (*Crassostrea iridescens*) de la costa de Michoacán, México. Ciencia Pesquera 23(1):33-46.

Pérez-Osuna F., Páez-Espinosa M., Osuna-López. 1995. Trace metal concentrations in relation to season and gonadal maturation in the oyster *Crassostrea iridescens*. Marine Environmental Research. 40 (1):59-81.

Rúa-Durá MF. 1974. Estudio biológico comparativo de los ciclos gonádicos de *Ostrea corteziensis* Hertlein, *Crassostrea virginica* Gmelin y *Crassostrea iridescens* Hanley. Simposio sobre Acuicultura en América Latina. Montevideo, Uruguay. 26 de noviembre a 2 de diciembre de 1974. 30 Hp.

Velasco L.A., Vega D., Acosta E., Barros J. 2010. Reproducción artificial de la ostra del mangle *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828 en el Caribe colombiano. Rev. Intropica, 5: 47-55.

Vélez-Barajas I.A. 1996. Pesquería de ostras de piedra. En: M. Cota-Valdez y G. Pérez-Díaz (eds.). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. México, pp. 113-128.

Primeiro premio ao mellor panel

Calidad comercial de distintas especies de *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) potencialmente cultivables en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI) en recirculación (RAS)

Casais E., Couce A., Alamrousi A. & Cremades J.
Universidade da Coruña, Grupo de investigación en Bioloxía Costeira (BioCost), Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA). As Carballeiras s/n, Campus de Elviña. 15071 A Coruña, Spain.
javier.cremades@udc.es

Resumen

Las macroalgas marinas tienen un papel fundamental en la acuicultura multitrófica integrada (AMTI) por ser los únicos organismos capaces de extraer nutrientes inorgánicos como el CO_2, nitratos y fosfatos que tienden a acumularse en estos sistemas, sobre todo en aquellos que trabajan en recirculación de agua. En la presente comunicación se describe la calidad comercial y rentabilidad de cultivo de cuatro especies de *Ulva* Linnaeus que podrían ser usadas en sistemas AMTI en recirculación de agua (RAS). A pesar de las similitudes morfológicas que presentan estas especies, existen grandes diferencias tanto en porcentaje de materia seca como en la composición química, teniendo especial relevancia la riqueza en proteínas, cenizas, macro-minerales y oligoelementos. *Ulva ohnoi* es la especie que posee las mejores características para su aplicación en sistemas de cultivo AMTI-RAS.

Palabras clave

Macroalgas marinas, *Ulva*, AMTI, RAS, Península Ibérica.

Introducción

Actualmente, la producción comercial de especies de *Ulva* Linnaeus está ganando mucha importancia en sistemas de acuicultura multitrófica integrada en recirculación de agua (AMTI-RAS). Las especies de *Ulva* son muy adecuadas para su uso en estos sistemas por muy diversas razones: i) gran plasticidad ecofisiológica, ii) capacidad para crecer en medios muy ricos en nitrógeno y fósforo, iii) alta tasa de crecimiento y iv) posibilidad de reproducción asexual por simple fragmentación. Todas estas características se resumen en una fácil producción y gran capacidad de biofiltración en este tipo de sistemas (Luo *et al*., 2012). Por otra parte, no se deben olvidar las crecientes aplicaciones de la producción obtenida de estas especies, preferentemente en el campo de la nutrición animal y humana, sobre todo cuando la producción proviene de sistemas integrados ricos en nutrientes (Valente *et al*., 2006; Bolton *et al*., 2009). A pesar de ello, poco se sabe acerca de las variaciones en la calidad comercial de las distintas especies de este género susceptibles de ser utilizadas en dichos sistemas. El objetivo de este trabajo es conocer la calidad comercial y rentabilidad de cultivo de cuatro de las especies de *Ulva* que, por sus características morfológicas (biotipo laminar), gran abundancia y amplia repartición geográfica (tanto especies atlánticas como mediterráneas), podrían ser las especies de elección en nuestro país para su cultivo en dichos sistemas.

Materiales y métodos

Las especies seleccionadas fueron: *Ulva australis* Areschoug, *U. fasciata* Delile, *U. ohnoi* Hiraoka & Shimada y *U. rigida* C. Agardh. Los inóculos utilizados para iniciar el cultivo de estas especies fueron identificados a nivel molecular mediante secuenciación (*rbc*L barcode). La producción de biomasa, para la realización de los análisis, se realizó mediante la utilización de tanques de cultivo de 180 L, irradianza de 300 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperíodo 12:12 y 18ºC de temperatura. El medio de cultivo empleado fue agua de mar enriquecida con NO_3 (20 ppm de

N), PO_4 (0,5 ppm de P) y oligoelementos. Los cultivos se mantuvieron en suspensión mediante flujo constante de aire, procedente del fondo del tanque. Se realizó un cambio de medio semanal, igualando las densidades de algas de cada tanque en función de la menor biomasa muestreada. El período de cultivo fueron dos meses; al final del experimento se recogieron 200 g de biomasa escurrida por centrifugación de cada especie, que fueron posteriormente lavados en agua destilada y secados en estufa a 45ºC hasta peso constante. Los análisis químicos de la biomasa de cada especie fueron realizados por los laboratorios del Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología de la Universidad Politécnica de Cataluña.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos dejan de manifiesto que existen importantes diferencias en la calidad comercial y rentabilidad de la cosecha de las distintas especies de *Ulva* con respecto al porcentaje de materia seca, contenido en proteínas, macrominerales y oligoelementos.

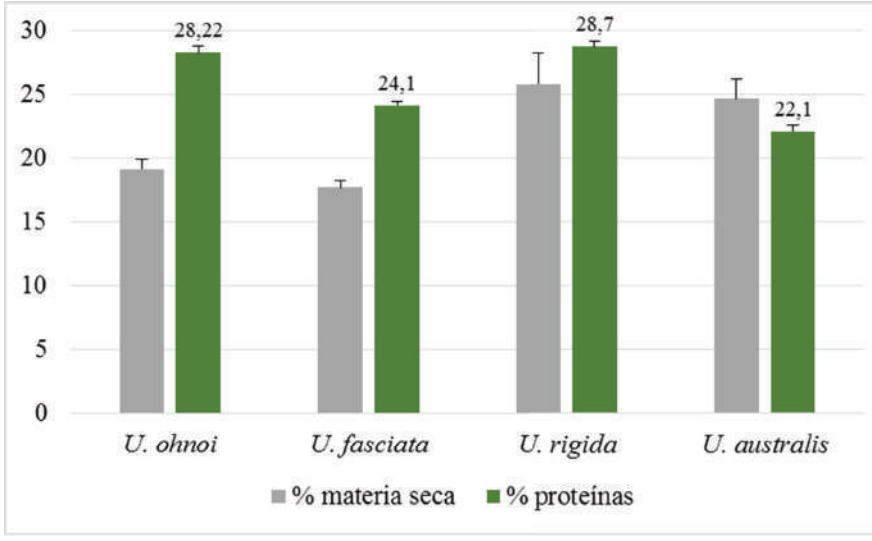


Figura 1.- Porcentaje de materia seca y proteínas en las distintas especies de *Ulva*.

Como se puede observar en la figura 1, la materia seca de *U. ohnoi* y *U. fasciata* es significativamente menor que la de *U. rigida* y *U. australis*, en otras palabras, las primeras son especies menos rentables desde el punto de vista productivo, particularmente *U. fasciata*. Por lo que respecta al contenido en proteínas, en la figura 1 se puede observar que *U. ohnoi*

y *U. rigida* tienen valores significativamente mayores que *U. fasciata* y *U. australis*. Es importante destacar que el contenido en proteínas de las cuatro especies cultivadas en un medio enriquecido en nitrógeno es en todos los casos superior al 22%, un valor relativamente alto y más estable que el que se suele referir para la biomasa de *Ulva* en la literatura, donde podemos encontrar valores muy bajos, del orden del 7%, hasta valores del 44% (Holdt y Kraan, 2011). Se debe puntualizar que el contenido en proteínas de las fuentes bibliográficas debe tomarse con cautela, tanto por el método utilizado para su cálculo como la posibilidad de incluir en él formas de nitrógeno no proteico (Milledge & Harvey, 2016).

Con respecto al contenido en macrominerales y oligoelementos es de destacar que las especies de *Ulva* son muy ricas en sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo, hierro, manganeso y zinc (Figs. 2-5), además muestran una buena relación Na:K (Fig. 2), por lo que su consumo no produce hipertensión. Se puede observar también grandes diferencias entre las especies en lo referente a su riqueza en los distintos elementos. *Ulva ohnoi* es una de las especies más ricas en la mayoría de ellos, mientras que *U. fasciata* destaca sobre todo por su riqueza en magnesio (Fig. 3). Se observan particularmente grandes diferencias entre especies en su riqueza en fósforo, hierro y manganeso (Figs. 4 y 5), siendo *U. ohnoi*, seguida de *U. rigida*, especies mucho más ricas que *U. fasciata* y *U. australis* en estos últimos elementos. Finalmente se puede destacar que todas las especies son igualmente ricas en zinc.

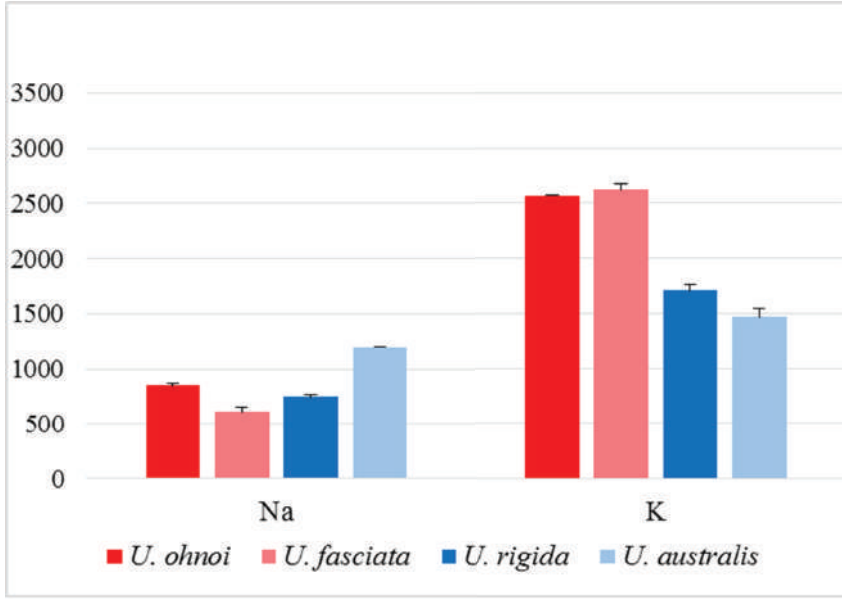


Figura 2.- Riqueza en Na y K (mg/g ms) en las distintas especies de *Ulva*.

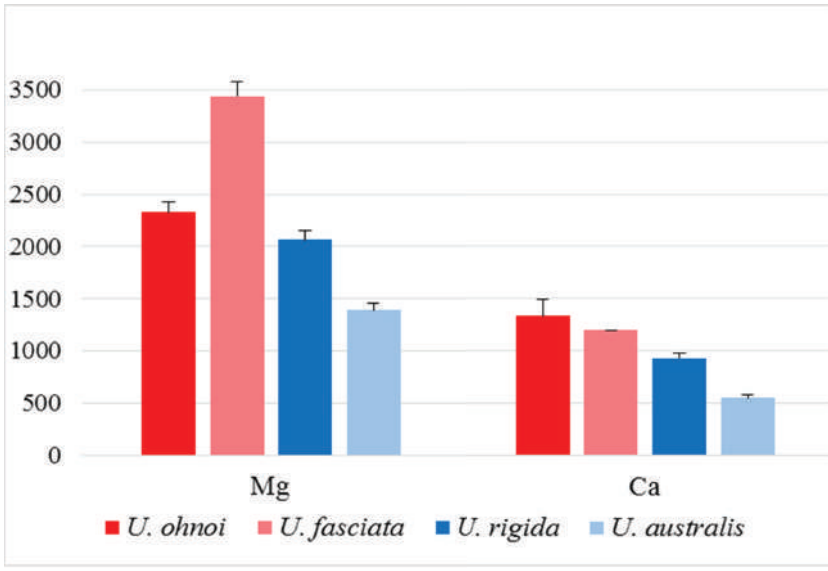


Figura 3.- Riqueza en Mg y Ca (mg/g ms) en las distintas especies de *Ulva*.

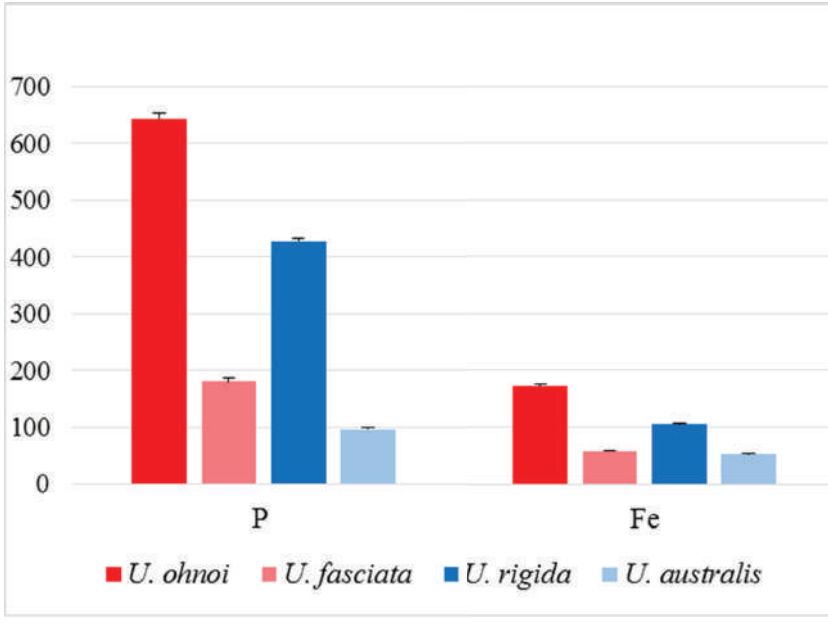


Figura 4.- Riqueza en P y Fe (mg/g ms) en las distintas especies de *Ulva*.

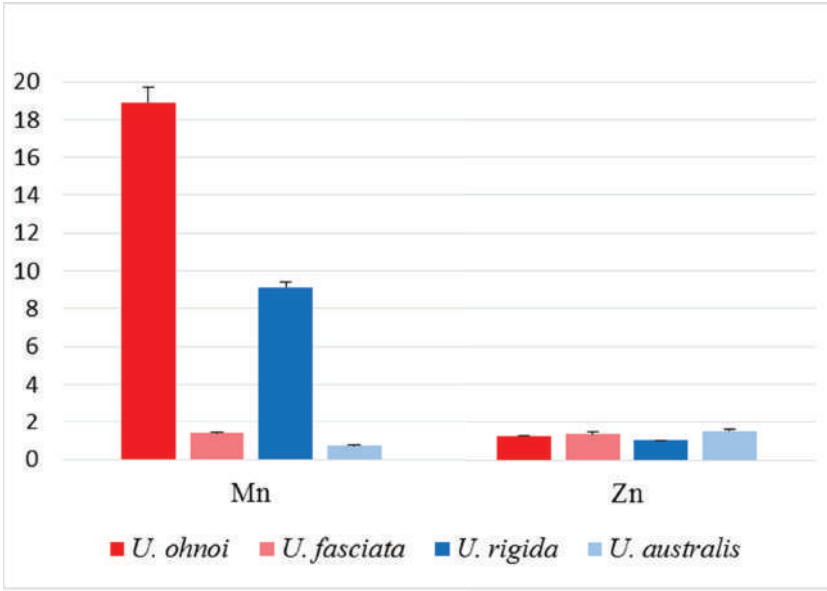


Figura 5.- Riqueza en Mn y Zn (mg/g ms) en las distintas especies de *Ulva*.

Conclusiones

Las cuatro especies de *Ulva* cultivadas en este experimento bajo unas mismas condiciones y en un medio muy rico en nutrientes, semejante al que se podría encontrar, por ejemplo, en un sistema de producción de peces en recirculación de agua, muestran una gran variabilidad en su porcentaje de materia seca y composición química. Es de destacar especialmente que el desarrollo de estas especies en aguas ricas en fuentes de nitrógeno hace que ellas sean también ricas en proteínas y de forma constante. Este hecho tiene gran relevancia en la valorización de la biomasa obtenida en estos cultivos para su empleo en la alimentación animal y humana. Por último, los resultados obtenidos en conjunto con respecto a su composición química permiten concluir que, *a priori*, *Ulva ohnoi* es la mejor candidata como biofiltro para su uso en este tipo de sistemas.

Agradecimientos

Este trabajo es una contribución al proyecto: IntegRAS: "Optimización del diseño y manejo de sistemas de cultivo multitróficos en recirculación peces-macroalgas (AGL2013-41868-R)", financiado por el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 (MINECO).

Bibliografía

Bolton J.J., Robertson-Andersson D.V., Shuuluka D. & Kandjengo L. 2009. Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. *J. Appl. Phycol*. 21: 575-583.

Holdt S.L. & Kraan S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol*. 23:543–597.

Luo M.B. Liu F. & Xu Z.L. 2012. Growth and nutrient uptake capacity of two co-occurring species, *Ulva prolifera* and *Ulva linza*. *Aquat. Bot.* 100: 18-24.

Milledge J.J. & Harvey P.J. 2016. Golden tides: problem or golden opportunity? The valorisation of *Sargassum* from beach inundations. *J. Mar. Sci. Eng*. 4, 60, doi: 10.3390/jmse4030060.

Valente L.M.P., Gouveia A., Rema P., Matos J., Gomes E.F. & Pinto I.S. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 252: 85-91.

ForoAcui

Calidad comercial de distintas especies de *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) potencialmente cultivables en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI) en recirculación (RAS)

Casais E., Couce A., Alamrousi A. & Cremades J.

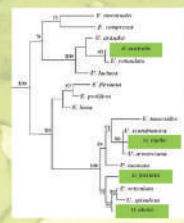
Universidade da Coruña, Grupo de Investigación en Biología Costera (BioCost, Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA)
Ao Carballeiras s/n, Campus de Elviña, 15071 A Coruña. Spain. e-mail: javier.cremades@udc.es

Introducción

Las especies de *Ulva* son muy adecuadas para su uso en sistemas de AMTI-RAS por su gran capacidad de biofiltración y las recientes aplicaciones de la producción obtenida de estas especies preferentemente en el campo de la nutrición animal y humana, sobre todo cuando la producción proviene de sistemas ricos en nutrientes. A pesar de ello, poco se sabe acerca de las variaciones en la calidad comercial de las distintas especies de este género susceptibles de ser utilizadas en dichos sistemas. Por ello, el objetivo de este trabajo es conocer la calidad comercial y rentabilidad de cultivo de cuatro de las especies de *Ulva* que, por sus características morfológicas (biotipo laminar), gran abundancia y amplia repartición geográfica (tanto especies atlánticas como mediterráneas), podrían ser las especies deelección en nuestro país para su cultivo en dichos sistemas.

Material y métodos

Las especies seleccionadas fueron: *Ulva australis* Areschoug, *U. fasciata* Delile, *U. ohnoi* Hiraoka & Shimada y *U. rigida* C. Agardh. Los inóculos empleados para iniciar el cultivo de estas especies fueron identificados a nivel molecular mediante la secuenciación (*rbcL* barcode). La producción de biomasa, para la realización de los análisis, se realizó mediante la utilización de tanques de cultivo de 180 L, irradianza de 300 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, fotoperiodo 12:12 y 18ºC de temperatura. El medio de cultivo fue agua de mar enriquecida con NO_3 (20 ppm de N), PO_4 (0,5 ppm de P) y oligoelementos. Los cultivos se mantuvieron en suspensión mediante un flujo constante de aire, procedente del fondo del tanque. Se realizó un cambio de medio semanal, igualando las densidades algales de cada tanque en función del tanque que presentaba una menor biomasa. Los análisis químicos de la biomasa de cada especie fueron realizados por los laboratorios del Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología de la Universidad Politécnica de Cataluña (UPC), colaboradora del proyecto.









Resultados y discusión

Existen importantes diferencias en la calidad comercial y rentabilidad de la cosecha de las distintas especies de *Ulva* con respecto al porcentaje de materia seca, contenido en proteínas, macro-minerales y oligoelementos.

La Fig. 1 muestra cómo la materia seca de *U. ohnoi* y *U. fasciata* es significativamente menor que la de *U. rigida* y *U. australis*; mientras que en contenido en proteínas de *U. ohnoi* y *U. rigida* tienen valores significativamente mayores que los de *U. fasciata* y *U. australis*.

Se debe resaltar que el contenido en proteínas de las cuatro especies cultivadas en un medio enriquecido en nitrógeno supera en todos los casos el 20%, y es significativamente más alto y estable que el que se suele referir para la biomasa de *Ulva* procedente de poblaciones naturales.

Además, las especies de *Ulva* son muy ricas en Na, K, Ca, Mg (Figs. 2-3), destacando una buena relación Na/K.

Son ricas también en P, Fe, Mg y Zn (Figs. 4-5). *U. ohnoi* es una de las especies más ricas en la mayoría de ellos, mientras que *U. fasciata* destaca sobre todo por su riqueza en magnesio.

Se observan particularmente grandes diferencias entre especies en su riqueza en P, Fe y Mn, siendo *U. ohnoi*, seguida de *U. rigida*, mucho más ricas que *U. fasciata* y *U. australis* en estos elementos.

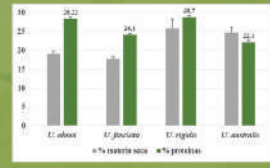
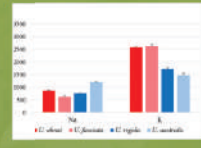
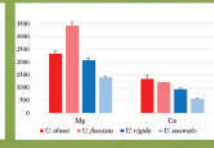
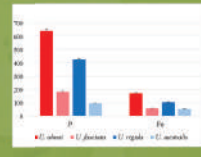


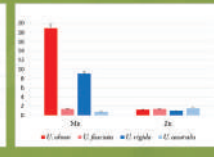
Figura 1.- Porcentaje de materia seca y proteínas en las distintas especies de *Ulva*.





Figuras 2 y 3.- Porcentaje de Na, K, Mg y Ca (mg/g ms) en las distintas especies de *Ulva*.





Figuras 4 y 5.- Porcentaje de P, Fe, Mn y Zn (mg/g ms) en las distintas especies de *Ulva*.

Conclusiones

- Las cuatro especies de *Ulva* cultivadas en este experimento, bajo unas mismas condiciones en medio muy rico en nutrientes, muestran una gran variabilidad en su porcentaje de materia seca y composición química.
- El desarrollo de estas especies en aguas enriquecidas en nitrógeno aumenta considerablemente su riqueza en proteínas, hecho de gran relevancia en la valorización de su biomasa en la alimentación animal y humana.
- Los resultados obtenidos en conjunto permiten concluir que *U. ohnoi* es la mejor candidata como biofiltro para su uso en este tipo de sistemas.

Agradecimientos

Este trabajo es una contribución al proyecto: IntegRAS: "Optimización del diseño y manejo de sistemas de cultivo multitróficos en recirculación peces-macroalgas (AGL2013-41868-R)", financiado por el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 (MINECO).

Segundo premio ao mellor panel

Comparativa de luz L.E.D. versus luz fluorescente en el cultivo de microalgas. Evaluación del coste energético por célula producida

Lastres[1] M., Carragal[1] R., González[1] P., López[1] A., Potel[1] I., Figueira[1] I., Cid[1] E., Andrés[1] C., Casais[1] E., Da Costa[2] F., Nóvoa[3] S. & Martínez-Patiño[3] D.

[1]IGAFA. - Instituto Galego de Formación en Acuicultura. C/ Niño do Corvo, s/n. Illa de Arousa. 36626 Pontevedra. igafa@xunta.es
[2]Novostrea Bretagne, Route du Vieux Passage, Banastère (Sarzeau) – 56370, Francia
fizdacosta37@gmail.com
[3]CIMA-Ribadeo Muelle do Porcillán s/n. Ribadeo. 27700 Lugo.
cecumar@xunta.gal

Resumen

El presente trabajo aborda la utilización de indicadores propios (Coste Energético por Célula "CEC", Células por Potencia Instalada "CPI" y Factor de Comparación de la Producción "FCP"), diseñados para poder interpretar y comparar los resultados en la producción de fitoplancton empleando las clásicas luminarias de tipo fluorescente (Osram Lumilux 840 de 36W) frente a otras comerciales de tipo LED (Matel Fluoled 18W y Ecolux Iris 18W).

Partiendo de luces de diferente tipo y calidad lumínica, con potencias instaladas diferentes, se ha logrado determinar valores de referencia para cuatro especies de microalgas (*Tetraselmis suecica, Isochrysis galbana, Diacronema lutheri* y *Skeletonema costatum*), que presentan diferentes tasas de división y por tanto tiempos de cultivo distintos.

En el estudio se ha comprobado que producir fitoplancton con iluminación LED es más eficiente energéticamente, y se ha obtenido una herramienta útil para determinar (en términos de tiempo de uso) el periodo necesario para rentabilizar la sustitución de un sistema de luz fluorescente (Helm *et al*. 2006) por otro de tipo LED. De este modo, y bajo las condiciones de cultivo empleadas se necesitarían entre 110 y 495 días de uso para poder amortizar el coste de sustitución de los equipos fluorescentes tradicionales, por las nuevas, de tipo LED ensayadas.

Palabras clave

Luz LED, luz fluorescente, microalgas, coste energético.

Introducción

Se aborda desde el presente estudio, la posibilidad de reducir el consumo energético en la producción de microalgas manteniendo la capacidad productiva de las instalaciones. Este planteamiento pretende reducir el impacto ambiental de las actividades acuícolas en instalaciones que abordan la producción de fotoautótrofos (Vásquez-Villalobos *et al*. 2013), procurando fomentar la sostenibilidad y el uso responsable de los recursos, contribuyendo en la medida de lo posible a una reducción de los factores que inducen el calentamiento global en el planeta.

Teniendo en cuenta que uno de los principales costes energéticos de la producción de microalgas se destina a la emisión de luz en las longitudes de onda útiles para los procesos fotosintéticos que han de llevar a cabo las células, habría que considerar que las lámparas fluorescentes constan de un tubo de vidrio fino que contiene en su interior diversas sustancias químicas compuestas, llamadas “fósforos” (a pesar de que normalmente no contengan el fósforo como elemento químico), que emiten luz visible al recibir una radiación ultravioleta. Dicho tubo contiene además una pequeña cantidad de vapor de mercurio y un gas inerte, habitualmente argón o neón, a una presión más baja que la presión atmosférica. En cada extremo del tubo se encuentra un filamento hecho de tungsteno, que al calentarse al rojo contribuye a la ionización de los gases y por tanto a la emisión de radiación luminosa hacia el exterior.

Por su parte, los LED (Light Emitting Diode), son componentes eléctricos semiconductores, también llamados diodos, que son capaces de emitir luz al ser atravesados simplemente por una corriente de pequeña intensidad. Este efecto se denomina electroluminiscencia y simplifica su estructura haciendo innecesaria la presencia de filamentos o gases inertes como en los fluorescentes. El material emisor semiconductor, es distinto dependiendo del color que emita. Estos equipos disponen además de un cátodo, un ánodo y una lente, normalmente de material epoxi, que protege el material semiconductor. Dependiendo de la combinación de los elementos químicos presentes, el material semiconductor que lo compone pueden producir un amplio rango de longitudes de onda dentro del espectro cromático, (el material semiconductor de los LED's que emiten, por ejemplo, en color rojo e infrarrojo está compuesto por arseniuro de galio y aluminio), dando como resultado diferentes colores y posibles diferencias en la eficiencia fotosintética final por parte de la célula receptora.

Desde que se ha producido la incorporación de las luces LED (Light Emitting Diode) en diferentes aplicaciones de uso convencional, existen en el mercado luminarias tipo led (Ecolux Iris led y Matel Fluoled) que todavía no se han ensayado convenientemente en instalaciones para la producción industrial de microalgas (Kim 2015).

En este estudio se pretende mostrar los resultados comparativos de estas nuevas luces frente a las fluorescentes convencionales (Osram Lumilux 840).También se pretende proporcionar datos del consumo energético necesario por célula en varias de las principales especies utilizadas en un criadero.

Materiales y métodos

En el interior de una cámara isoterma con un sistema de aire acondicionado que permite el mantenimiento de las condiciones térmicas en un rango de 20±2°C, se llevaron a cabo experiencias de cultivo para un total de cuatro especies fitoplanctónicas: *Tetraselmis suecica (Ts), Isochrysis galbana (Ig), Diacronema lutheri* (*syn*. *Pavlova lutheri*) (*Dlu*)*, Skeletonema costatum (Skc*).

Para obtener el aislamiento lumínico se diseñó un sistema de estanterías opacas para evitar la incidencia de cualquier otra luz en la zona de experimentación.

En todos los casos se probaron los tres tipos de luz simultáneamente, de modo que se utilizó una estantería por cada tipo de luz ensayada.

Dos luces son de tipo LED:

- Matel Fluoled de 29 mm de diámetro, 120 cm, 18 W, 1.800 lúmenes, color de luz 6.400°K, un ángulo de apertura de 120° y con una vida útil de 50.000 horas.
- Ecolux Iris led de 29 mm de diámetro, 120 cm, 18 W, 1.800 lúmenes, color de luz 6.000°K, un ángulo de apertura de 180° y una vida útil de 40.000 horas.

Y una tercera luz de tipo fluorescente:

- Osram Lumilux 840 de 29 mm de diámetro, 120 cm, 36 W, 3.350 lúmenes, color de luz 4.000°K, ángulo de apertura de 360° y una vida útil de 20.000 horas.

La medición de la temperatura del agua en el interior de los cultivos se realizó de forma continua, utilizando un equipo sumergible, marca HOBO©, modelo Water Temp Pro v2 (U22-001) con una histéresis de un dato por minuto y una precisión de ±0,21°C.

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces esféricos de vidrio de tipo borosilicato con una capacidad de 6 L. Se utilizó aireación en continuo y se mantuvieron en todos los casos bajo un fotoperiodo de 24:0.

Se utilizó agua de cultivo filtrada (mediante filtro de cartucho PALL de 0,5 µm nominal), con una salinidad de 35±1 g/L. Se midió el volumen del agua de cultivo mediante probeta de polipropileno autoclavable de 2 L con una precisión de 2.000:20 mL, y se esterilizaron todos los elementos del reactor mediante autoclave (121°C ±0,36°C, durante 20 minutos).

Los reactores se enriquecieron (Lastres *et al*., 2009), 24 horas después del autoclavado, utilizando la formulación clásica y dosis del medio Walne (dosis 1 mL/L de solución de macronutrientes y oligoelementos; 0,1 mL/L de solución de vitaminas; y 1 mL/L de solución de silicato sódico al 5%, en el caso de las diatomeas), en condiciones de esterilidad en el interior de la cabina de flujo laminar Telstar modelo AV-100 (filtros HEPA/ULPA H14 con una eficiencia de filtración > 99,999% DOP Clase 10). En los casos en los que los cultivos fueron de larga duración se repusieron nutrientes en las mismas dosis, en el día diez, para evitar el colapso de los mismos.

El inóculo se realizó a partir de cultivos axénicos de 200 mL mantenidos en matraz erlenmeyer de 250 mL.

Para intentar que todos los botellones partiesen de la misma población inicial se realizó un proceso previo, consistente en la mezcla y homogeneización en matraz erlenmeyer de 1 L de capacidad (en condiciones de esterilidad), utilizando tres cepas de 200 mL cada una.

Posteriormente se procedió al reparto de 100 mL en cada reactor como inóculo inicial. Para ello se utilizó una probeta esterilizada de vidrio de borosilicato de 250 mL con una precisión de ±1,5 mL.

Los ensayos de los tres tipos de iluminación se realizaron en seis reactores de forma simultánea, utilizando una réplica para cada tipo de luz en las instalaciones del Instituto Galego de Formación en Acuicultura. Se realizaron contajes diarios empleando el método de recuento celular con cámara hematocitómetro tipo Neubauer (Lavens *et al* 1996). Las muestras se extrajeron diariamente en condiciones estériles en la cabina de flujo laminar. El recuento celular se realizó al microscopio óptico, cada veinticuatro horas.

Para hacer una comparativa del Coste Energético por Célula producida (CEC), se desarrollaron las siguientes expresiones:

$$CEC = \frac{Ppr \,.tcult}{\rho \times V}$$

- **CEC =** Consumo Energético Celular (µW/cel)
- **Ppr =** Potencia en producción (µW/h)
- **tcult =** tiempo de cultivo (h)
- **ρ** = Densidad celular (cel/µL)
- **V =** Volumen de cultivo (µL)

Este indicador nos permite expresar el consumo energético en µW por cada célula producida en un determinado momento del cultivo, teniendo en cuenta los tiempos de producción necesarios para cada especie o para cada tipo de luz. De este modo pueden compararse luminarias de diferente tipo, y especies con requerimientos de luz distintos.

$$CPI = \frac{\rho max}{Pot}$$

Por otro lado, se utiliza la expresión del número de Células máximo producido para una Potencia Instalada determinada (CPI), de modo que se pueda relacionar la intensidad luminosa de cada tipo de luz con las densidades máximas alcanzadas.

- CPI = Células por Potencia Instalada (cel/ µW)
- ρmax = Densidad celular máxima (cel/µL)
- Pot = Potencia instalada (µW/µL)

Finalmente, expresamos el Factor de Comparación de Producción (FCP), debido a que interesa determinar la cantidad de células que cada tipo de luz consigue producir en un momento determinado. De este modo es posible comparar la respuesta de cada una de las especies, incluso cuando presentan diferentes tasas de división y tiempos de espera distintos hasta alcanzar la fase estacionaria.

$$FCP = \frac{\rho}{Pot \times tcult}$$

- FCP = Factor de Comparación de Producción (cel/µW.día)
- ρ = Densidad celular alcanzada en el cultivo (cel/µL)
- Pot = Potencia instalada (µW/µL)
- tcult = tiempo de cultivo (días)

La comparación de las concentraciones celulares de los cultivos microalgales con los distintos tipos de luz, se realizó mediante el test no paramétrico H de Kruskal-Wallis para más de dos muestras, y para el contraste dos a dos se usó el test de contraste de dos muestras independientes U de Mann-Whitney.

Resultados y discusión

En la Tabla I se exponen las densidades de inicio, utilizadas para cada especie de modo que se puedan facilitar posteriores ensayos de cultivo con otras luces y/o fabricantes:

Se muestran también las gráficas de evolución de los cultivos para cada especie, de modo que se puedan apreciar las diferencias respecto a la luz utilizada.

Tabla I.- Densidades iniciales por especie.

	Densidades iniciales (c/µL)
Isochrysis galbana	52,4
Diacronema lutheri	24,8
Tetraselmis suecica	13
Skeletonema costatum	12,3

Para *Isochrysis galbana* (Fig. 1) se observa que el reactor con luz fluorescente Osram Lumilux alcanza mayores concentraciones que aquellos iluminados con luces tipo LED en los primeros días de cultivo. Al día 10 de cultivo alcanzan aproximadamente la misma densidad en cada reactor, en torno a las 16.000 c/µL. Sin embargo, a medida que se supera este día, se comprueba cómo el reactor con luz tipo LED Matel18W mantiene un crecimiento óptimo hasta alcanzar una densidad de 40.000 c/µL a día 25 de cultivo, entrando a continuación en fase estacionaria o de meseta. Por el contrario, tanto el reactor con luz Lumilux36W como el Ecolux18W no llegan a alcanzar esta densidad, sino que obtienen su máximo alrededor de 20.000 c/µL, entrando en fase estacionaria a los 20-23 días.

Ecolux18W a día 20 consigue una densidad 40% menor respecto a Matel18W, mientras que Lumilux36W, alcanza un 27% menos de densidad celular.

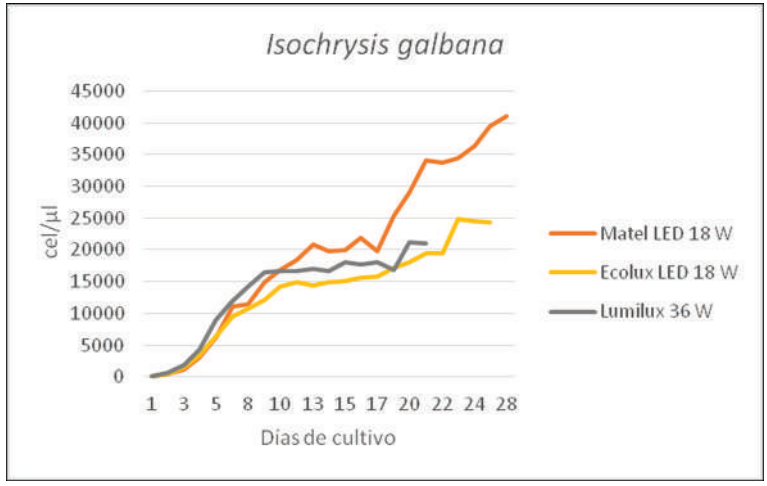


Figura 1.- Evolución del cultivo de *Isochrysis galbana*.

En *Diacronema lutheri* (*syn*. *Pavlova lutheri*) (Fig. 2), se puede apreciar que el reactor con luz fluorescente Osram Lumilux36W alcanza mayores concentraciones (40.000 c/µL a día 23 de cultivo), que aquellos iluminados con luces tipo LED durante todo el ensayo. A pesar de esta situación, los tres reactores describen una curva de crecimiento similar.

El reactor con luminaria Lumilux36W, mantiene un incremento de la densidad celular desde el día 11 al 20 de cultivo, entorno a un 15-22% superior con respecto a las luces Matel18W y Ecolux18W. Aunque hay que recordar que esa lámpara tiene 36W frente a los 18W de las luces LED empleadas.

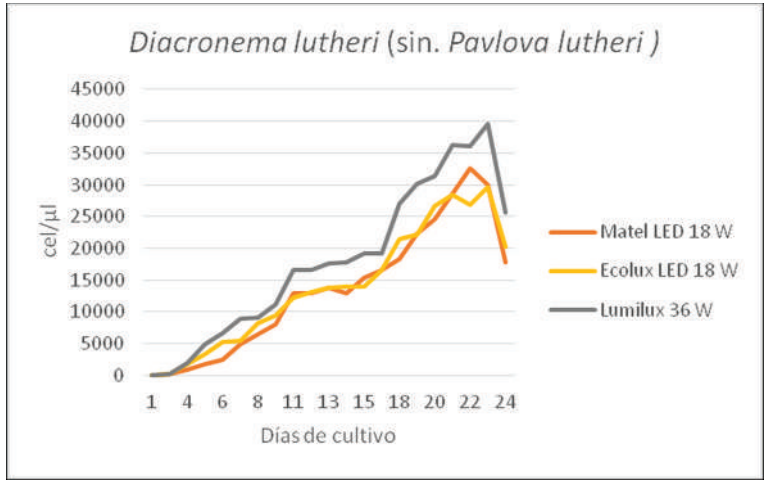


Figura 2.- Evolución del cultivo de *Diacronema lutheri* (*syn. Pavlova lutheri*).

Con *Tetraselmis suecica* (Fig. 3), se aprecia que el botellón con luz fluorescente Osram Lumilux36W alcanza mayores concentraciones (a día 13 de cultivo en torno al 10-12%), que aquellos iluminados con luces tipo LED en la mayor parte del tiempo de cultivo. Sin embargo,el día 16 el reactor con luz Lumilux36W entra en fase estacionaria alcanzando una densidad de 5.600 c/µL. Mientras que el reactor con luz Matel18W continúa su crecimiento hasta alcanzar una densidad de 6.860 c/µL el día 24 de cultivo, lo que representa finalmente un incremento del 18% respecto a la Lumilux36W.

El reactor con luz Ecolux18W alcanza una densidad de 4.860 c/µL y entra en fase estacionaria a partir del día 20 de cultivo.

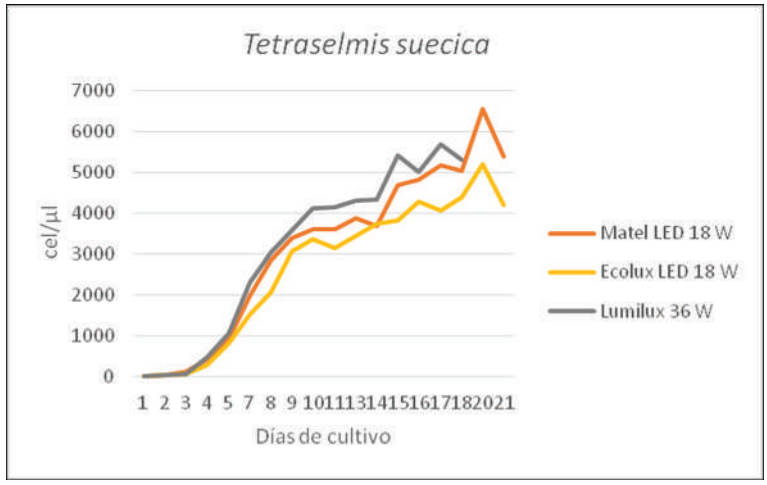


Figura 3.- Evolución del cultivo de *Tetraselmis suecica*.

En *Skeletonema costatum* (Fig. 4), se puede apreciar una fase de adaptación muy prolongada en el tiempo en todos los reactores, desconociendo los motivos exactos que causan esta situación. A partir del día 7 todos los reactores inician la fase exponencial. El reactor con luz Matel18W alcanza una densidad máxima de 3.280 c/µL el día 13 de cultivo, lo que supone un incremento del 30% respecto a la máxima densidad alcanzada con luz Lumilux36W. Al día 9 de cultivo, parece que se atenúa esta diferencia, pasando a ser de un 12%.

Ecolux18W es la luz que presenta un peor comportamiento en esta especie, ya que su máxima densidad celular es un 57% inferior a la densidad máxima obtenida por la luz Matel18W.

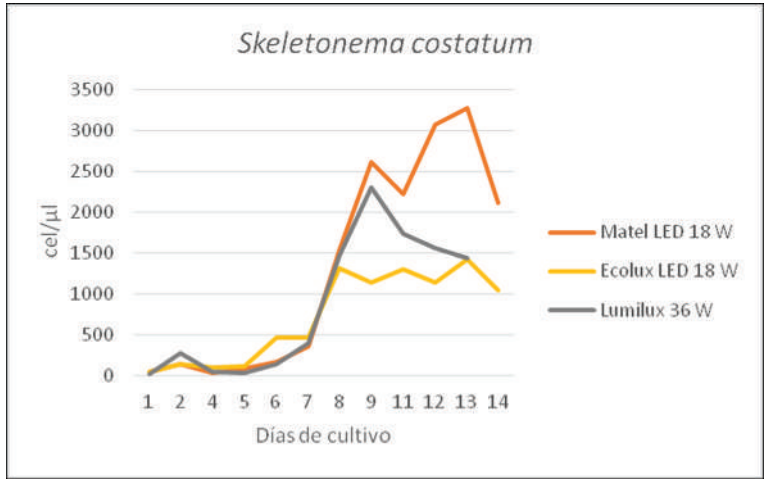


Figura 4.- Evolución del cultivo de *Skeletonema costatum*.

A partir de la expresión del CEC (Coste Energético por Célula) hemos podido comparar entre las tres luces seleccionadas, el coste energético necesario para producir una célula en los diferentes momentos de cultivo, y para cada especie. A continuación se aportan estos datos acompañados de las correspondientes tablas, donde se muestra la densidad celular obtenida a mitad de cultivo (fase exponencial) y en el máximo alcanzado (fase estacionaria).

Tabla II.- Coste Energético por Célula y densidad alcanzada para la especie *Isochrysis galbana.*

	***Ig* CEC (µW/cel)**				***Ig* Densidad (cel/µL)**		
Día	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)	Día	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)
10	**0,102980**	0,120670	0,206946	10	16780	14320	16700
20	**0,118926**	0,190939	0,326963	20	29060	18100	21140

Tabla III.- Coste Energético por Célula y densidad alcanzada para la especie *Diacronema lutheri.*

	***Dlu* CEC (µW/cel)**				***Dlu* Densidad(cel/µL)**		
Día	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)	Día	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)
11	**0,147121**	0,156316	0,230121	11	12920	12160	16520
20	0,140946	**0,129438**	0,220408	20	24520	26700	31360

Tabla IV.- Coste Energético por Célula y densidad alcanzada para la especie *Tetraselmis suecica.*

	Ts CEC (µW/cel)				Ts Densidad (cel/µL)		
Día	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)	Día	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)
10	0,533333	0,561039	0,803721	10	3240	3080	4300
20	0,723013	0,774888	1,299248	18	4780	4460	5320

En las tablas II a V, se observan los costes energéticos (destacados en negrita los más bajos) de las cuatro especies de microalgas, con las tres luces ensayadas. A partir de estos datos se puede deducir, en general, que la iluminación tipo LED es más eficiente para

producir cualquiera de las cuatro especies probadas. Singularmente, la luz Matel18W LED es la más eficiente de las tres, en todos los ensayos. A pesar de que en estas mismas tablas se pueda observar que no siempre se alcancen las máximas densidades con luces LED, hemos de recordar que la potencia instalada de fluorescentes siempre fue el doble de la aportada con LEDs.

Tabla V.- Coste Energético por Célula y densidad alcanzada para la especie *Skeletonema costatum.*

	***Skc* CEC (µW/cel)**				***Skc* Densidad (cel/µL)**		
Día	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)	Día	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)
8	**0,874937**	1,047273	1,893699	8	1580	1320	1460
13	**0,684878**	1,581972	3,120000	13	3280	1420	1440

En el caso de Matel18W con la misma potencia es posible producir el doble o incluso el triple de células que con Lumilux36W. Por su parte, Ecolux18W parece dar los mejores resultados con luz LED para *Diacronema lutheri* (*syn. Pavlova lutheri*).

Parece además que se aprecia, para el caso de la diatomea ensayada, que entre ambas luces LED, la que presenta mejores resultados es Matel18W, que consigue el doble de densidad final respecto a Ecolux18W.

Utilizando la CPI (número de Células por Potencia Instalada), se puede determinar el rendimiento en el momento de máximas densidades poblacionales, respecto a la potencia empleada con cada tipo de luz:

Tabla VI.- CPI para los tres tipos de luz empleados.

CPI (cel/µW)	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)
Ig	5694,44	3463,89	1468,06
Dlu	4538,89	4111,11	2752,78
Ts	952,78	675,00	388,89
Skc	455,56	197,22	159,72

Con la FCP (Factor de Comparación de Producción) podemos decir cuántas células se logra producir con cada W útil, considerando los diferentes tiempos de producción necesarios:

Tabla VII.- FCP para las cuatro especies de microalgas ensayadas.

FCP (cel/µW/día)	Matel (18W)	Ecolux (18W)	Lumilux (36W)
Ig	203,37	150,60	73,40
Dlu	206,31	178,74	119,69
Ts	39,70	33,75	24,31
Skc	35,04	15,17	17,75

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó comparando los equipos entre sí y no la potencia instalada. Por tanto, hay que entender estos resultados en el contexto de luminarias que tienen 36 W (Lumilux), frente a las de 18 W (Matel y Ecolux).

Teniendo esto en cuenta, en *Isochrysis galbana* sólo se han detectado diferencias significativas el día 4 de cutlivo, con una mayor concentración celular en los cultivos con Lumilux36W. Las diferencias de concentración entre los dos botellones de la luz Matel18W hacen que la variabilidad sea elevada dentro de este tipo de luz y no sean significativas las diferencias con los otros tipos empleados.

En *Diacronema lutheri* (*syn. Pavlova lutheri*) se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) los días 4, 9, 15, 19, 20, 21 y 23, siendo significativamente mayor la concentración celular en los cultivos microalgales cultivados con Lumilux36W con respecto a los otros dos tipos de luz.

En *Tetraselmis suecica* la concentración microalgal obtenida con Lumilux36W es significativamente mayor ($P < 0,05$) que la obtenida con las otras dos luces los días 5 y 10. En estos dos días no se observaron diferencias significativas entre las luces LED ($P > 0,05$). En los días 11, 13, 15 y 18 de cultivo se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la concentración celular alcanzada con los tres tipos de luces, siendo Lumilux36W > Matel18W >Ecolux18W.

En *Skeletonema costatum* la concentración celular con Matel18W es significativamente mayor ($P < 0,05$) con respecto a los otros dos tipos de luz en los días 12 y 13 de cultivo.

Conclusiones

Partiendo de luces de diferente tipo y calidad lumínica, con potencias instaladas diferentes, hemos logrado determinar valores de referencia para cada especie, de modo que se disponga de una herramienta útil de comparación para la toma de decisión respecto al tipo de luminaria que se ajuste más a las necesidades de diferentes instalaciones para la producción de fitoplancton.

Tras este estudio, se comprueba que producir fitoplancton con iluminación LED es más eficiente energéticamente, tal como muestran los resultados de los indicadores utilizados, en la tabla VIII.

Tabla VIII.- Resumen de indicadores por especie y tipo de iluminación.

	Ig			Dlu			Ts			Skc		
	MATEL 18W	ECO-LUX 18W	LUMI-LUX 36W	MATEL 18W	ECO-LUX 18W	LUMI-LUX 36W	MATEL 18W	ECO-LUX 18W	LUMI-LUX 36W	MATEL 18W	ECO-LUX 18W	LUMI-LUX 36W
CEC MÁX. µW/cel	0,118926	0,190939	0,326963	0,140946	0,129438	0,220408	0,723013	0,774888	1,299248	0,684878	1,581972	3,120000
FCP cel/ µW.día	203,37	150,60	73,40	206,31	178,74	119,69	39,70	33,75	24,31	35,04	15,17	17,75
CPI cel/ µW	5694,44	3463,89	1468,06	4538,89	4111,11	2752,78	952,78	675,00	388,89	455,56	197,22	159,72

- CEC = Consumo Energético Celular (µW/cel)
- FCP = Factor de Comparación de Producción (cel/µW.día)
- CPI = Nº de células por potencia instalada (cel/ µW)

A efectos prácticos hay que tener en cuenta que es posible la sustitución de cualquiera de las tres luminarias entre sí, sin que se requiera inversión en instalación, ya que son compatibles utilizando el mismo soporte. Teniendo en cuenta las diferencias de coste entre los diferentes tubos y los resultados de rendimiento, se puede decir que la sustitución de tubos fluorescentes por Matel18W se amortizaría en 110 días y la sustitución por lámparas Ecolux18W requeriría unos 495 días (empleando para el cálculo una referencia de precio actual de energía de 0,11 €/Kwh "http://tarifasgasluz.com"), y un coste de lámpara de 2,32 € para Lumilux36W, 9,10 € para Matel18W y 21,78 € para Ecolux18W.

Agradecimientos

Las experiencias de este estudio fueron realizadas con financiación del Programa Operativo Fondo Social Europeo Galicia 2007-2013, Eixe 3, tema prioritario 72, a través de la Acción denominada "Cultivo intensivo de especies de interés marisqueiro"

Subproxecto II: "Aplicación das técnicas de cultivo de semente de moluscos bivalvos en instalacións tipo minicriadeiro".

Las operaciones técnicas referidas a la instalación y mantenimiento de los sistemas de iluminación fueron realizadas por José Luis Rodriguez-Ureba y Óscar Fandiño Doeste, a los que agradecemos el interés e indicaciones que en todo momento aportaron para el adecuado diseño de los sistemas empleados.

Bibliografía

Helm M.M., Bourne N. & Lovatelli A. (comp./ed.) 2006. *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. FAO Documento Técnico de Pesca. Nº. 471. Roma, FAO.

Kim Se-kwon. 2015. *Handbook of marine microalgae biotechnolgie advances*. Edit. Academic Press.

Lastres M, Andrés M.C., Rosende A., Villar V., Blanquet I., Alexandre J. & Forte S. 2009. *Manual de Aquacultura Interfor* 2 CD Multimedia. Programa Interreg IIIA. Edit. Forpescas, Lisboa.

Lavens P. &, Sorgeloos P. (eds.) 1996. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Rome, FAO.

Vásquez-Villalobos V., Artega P., Chanamé K. & Esquivel A. 2013. Modelamiento matemático y por redes neuronales artificiales del crecimiento de *Spirulina sp*. en fotobiorreactor con fuente de luz fluorescente e iluminación en estado sólido. *Sientia Agropecuaria. (PE)* 4: 199-209.


XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MAR
IGAFA
CIMA
COMPARATIVA DE LUZ L.E.D. VERSUS LUZ FLUORESCENTE EN EL CULTIVO DE MICROALGAS. EVALUACIÓN DEL COSTE ENERGÉTICO POR CÉLULA PRODUCIDA
Lastres, M., Carrogal, R., González, P., López, A., Patel, I. , Figueira, I. , Cid, E. Andrés, C., Casais, S., Da Costa, F. , Nóvoa, S. & Martínez-Patiño, D.
IGAFA. - Instituto Galego de Formación en Acuicultura. C/ Niño de Corvo, s/n. Illa de Arousa. 36626 Pontevedra. igafa@xunta.es
Novostrea Bretagne, Route du Vieux Passage, Bunuitère (Sarzeau) – 56370, Francia. fladecosta27@gmail.com
CIMA-Ribadeo Muelle do Porcillán s/n. Ribadeo. 27700 Lugo. cecumar@xunta.gal
RESUMEN
RESULTADOS Y DISCUSIÓN
MATERIAL Y MÉTODOS
CONCLUSIONES
AGRADECIMIENTOS
BIBLIOGRAFÍA

Caracterización de la fracción proteica de ensilados biológicos de residuos de *Micropogonias furnieri* Desmarest, 1823

Fernández Herrero A., Vittone M. & Salomone A.
Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, INIDEP.
Paseo Victoria Ocampo N°1, Mar del Plata, Argentina.
aherrero@inidep.edu.ar

Resumen

Para contribuir con el aprovechamiento integral de las capturas pesqueras y revalorizar los residuos y subproductos generados, se propone la elaboración de ensilados biológicos, a partir de residuos de corvina rubia (*Micropogonias furnieri*). Se caracterizó la fase proteica a fin de estimar su valor nutritivo como potencial insumo en la formulación de dietas para animales de cría, entre ellos rumiantes en lactación y vacuno lechero. En la elaboración del ensilado se utilizó sacarosa: 10% y yogur, con porcentajes: 5% (A) y 10% (B). El proceso se realizó a 29ºC durante 30 días. El pH se estabilizó a los 7 días en 4,5. La composición proximal de la materia prima (MP) fue: proteína 16,84%; ceniza 6,65%; extracto etéreo 3,62% y humedad 74,08%. El contenido de proteína (11,79–11,76%), ceniza (3,77–3,94%); extracto etéreo (2,77–3,05%) y humedad (72,01-1,22%) en los ensilados A y B respectivamente, es menor al registrado en la materia prima (MP). Los Índices de Aminoácidos Esenciales (IAAE) revelan al triptófano como el aminoácido limitante, seguido por la fenilalanina; para los rumiantes, los aminoácidos lisina y metionina se hallan en cantidades suficientes. Los Índices de Eficiencia Proteica (PER) estimados de acuerdo a Alsmeyer *et al.* (1974) y Lee *et al.* (1978), variaron entre 2,72-5,34 para el ensilado A y, 3,10–5,60 para el ensilado B. Los dos ensilados mostraron un perfil electroforético similar, al día 30 prevalecen péptidos menores a 10 kDa. Ambos ensilados alcanzaron una hidrólisis (GH%)

cercana al 20%. Los ensilados obtenidos, pueden considerarse como una excelente fuente de proteína by-pass en rumiantes, siendo suficiente el uso de 10% de sacarosa y 5% de yogur para obtener el ensilado biológico. Su utilización redunda en grandes ventajas tanto para la industria ganadera como para la pesquera, estimulando una asociación simbiótica donde la primera obtiene una fuente proteica de alta calidad y la segunda logra el aprovechamiento integral de las especies pesqueras revalorizando sus residuos o subproductos pesqueros.

Palabras clave

Ensilado biológico, índice de aminoácidos esenciales, índice de eficiencia proteica, grado de hidrólisis, peso molecular.

Introducción

Entre las alternativas de tratamiento y valorización de residuos o subproductos pesqueros se halla la producción de ensilado, siendo un producto con un contenido proteico de alto valor biológico para su utilización en la formulación de raciones para la alimentación animal. Hay varios parámetros que se utilizan para la evaluación de los aportes nutricionales de una proteína, entre los que se incluyen el "índice químico» o "índice de aminoácidos esenciales" (IAAE) y el "índice de eficiencia proteica" (Protein Efficiency Ratio: PER). En particular, los requerimientos proteicos de los rumiantes dependen de la calidad de la proteína en referencia a sus sitios de digestión, esto es: proteína degradable y no degradable a nivel ruminal (proteína "pasante" o "by- pass"). Las fuentes de proteína "by- pass" se definen como aquellas que contienen 50% o más de la proteína digestible del alimento que escapa a la fermentación ruminal. Las de uso frecuente a nivel mundial son las harinas de pescado, de carne y hueso, de plumas hidrolizadas; el poroto de soja tostado, la harina de soja tratada con formaldehído y los subproductos de la destilería, secos o húmedos. Las necesidades de aminoácidos en vacuno lechero sólo se han determinado genéricamente para la lisina y la metionina, aunque en algunas condiciones, la arginina y la histidina también pueden ser limitantes para la producción de leche, tanto el NRC2001(Nutrient Requirements of Dairy Cattle) como el INRA (2007) recomiendan el aporte de 2,4 y 7,2% del total de la proteína metabolizable como metionina y lisina respectivamente, manteniendo una relación de 3 a 1 entre ambas (NORMAS FEDNA, 2009).

Se elaboraron ensilados biológicos obtenidos por fermentación láctica a partir de residuos de corvina rubia (*Micropogonias furnieri*), la cual representa uno de los principales recursos costeros de la Provincia de Buenos Aires, cuya pesca se efectúa a lo largo de todo el litoral Atlántico y en el Río de La Plata, destacándose la zafra en invierno; la industria de procesamiento de corvina genera residuos que pueden llegar a más del 50% respecto del peso total (principalmente cabezas y vísceras). El objetivo de este estudio fue caracterizar la fase proteica de ensilados biológicos, obtenidos por fermentación láctica, a fin de estimar su valor nutritivo como potencial insumo en la formulación de dietas para animales de cría, como rumiantes en lactación y vacuno lechero.

Materiales y métodos

❖ Materiales

Se utilizó como materia prima (MP), residuos (cabezas y vísceras) de corvina rubia (*M. furnieri*), procedente de las plantas fileteadoras de la ciudad de Mar del Plata, Argentina; los residuos fueron transportados al Laboratorio de Tecnología de los Productos Pesqueros del INIDEP, donde se trituraron en una picadora marca FREIRE con una placa perforada (orificios de 4 mm). Como agente fermentativo, se utilizó yogur natural Marca YOGS de la Empresa SANCOR (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus);* sacarosa como sustrato y ácido sórbico como antimicótico.

❖ Preparación del ensilado

Se elaboraron dos ensilados por duplicado con: sacarosa (10%), ácido sórbico (0,25%) y dos proporciones de yogur 5 y 10% (ensilados A y B respectivamente); se mantuvieron a 29ºC durante 30 días. Se registró el pH con varillas de pH Marca Merck.

❖ Caracterización de la fracción proteica de la materia prima y ensilados

Se realizaron análisis bioquímicos, en la MP y en los ensilados al final del proceso; proteínas por el método Kjeldahl (N*6,25); contenido de agua y cenizas según AOAC (1995) y el extracto etéreo según Randall (1974); el análisis de aminoácidos totales se realizó en Laboratorio Privado. Teniendo en cuenta el contenido de aminoácidos esenciales (AAE), se determinaron distintos parámetros nutricionales en los ensilados:

◊ El “índice químico» o “Índice de Aminoácidos Esenciales” (IAAE) de acuerdo con Sgarbieri (1987), compara el contenido de aminoácidos esenciales entre

la prueba y una proteína estándar. En este trabajo se utilizó como estándar los requerimientos de AAE que describe la FAO/WHO/UNU (1985) para niños entre 2-5 años y, los requisitos de aminoácidos para rumiantes según el National Research Council (NRC, 2001).

◊ El Índice de Eficiencia Proteica (Protein Efficiency Ratio: PER) se calculó de acuerdo a Alsmeyer *et al.* (1974) y Lee *et al*. (1978), utilizando las siguientes ecuaciones (Tabla I):

Tabla I.- Ecuaciones para el cálculo del PER**.**

N° Ecuación	Ecuación
1	-0,684 + 0.456 [Leu] – 0,047 [Pro]
2	-0,468+0,454[Leu]–0,104[Tyr]
3	-1,816+0,435[Met]+0,780[Leu]+0,211[His]–0,944[Tyr]
4	0,08084[X7]–0,1094
5	0,06320 [X10]–0,1539
	X7 = Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+Lys / X10 = X7+His+Arg+Tyr.

El seguimiento de la hidrólisis de proteínas durante la fermentación láctica se evaluó por el grado de hidrólisis (GH) con el método de Pezoa & Mellado (1979), con ligeras modificaciones (Fernández Herrero, *et al.* 2015).

La distribución del perfil proteico de la MP y ensilados se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), al 12% para el gel separador y al 4% para el gel concentrador, utilizando Tris-Glicina 1X como buffer de corrida (Laemmli, 1970) con modificaciones (Salomone, 2016).

Resultados y discusión

El pH se estabilizó a los 7 días en 4,5 y se mantuvo hasta los 30 días del ensayo.

La composición proximal (en base húmeda) de la MP fue: proteína 16,84 %; ceniza 6,65 %; extracto etéreo 3,62% y humedad 74,08%. El contenido de proteína (11,79 – 11,76%), ceniza (3,77–3,94%); extracto etéreo (2,77–3,05 %) y humedad (72,01–71,22%) en los ensilados A y B respectivamente, es menor al registrado en la MP. Similar comportamiento fue hallado para ensilados biológicos de atún y tilapia (Spanopoulos Hernández *et al.,* 2010)

y, para *M. hubbsi* (Fernández Herrero *et al.,* 2015). El IAEE varía dependiendo del estándar de referencia. Los IAAE revelan al triptófano como el aminoácido limitante, seguido por la fenilalanina, mientras que el resto de los aminoácidos están presentes en cantidades suficientes o superiores al valor requerido (Tabla II)

Tabla II.- Aminoácidos esenciales (AAE) de los ensilados (A y B) de corvina rubia (expresado en g/100g de proteína) e "Índice de Aminoácidos Esenciales" (IAAE).

AAE	Ensilados		Ref.1	Ref.2	IAAE			
	A	B			A	B	A	B
	(g/100g)		(g/100g)		RP1	RP1	RP2	RP2
Treonina	5,43	5,19	3,4		1,60	1,53		
Histidina	2,63	2,64	1,9	-	1,38	1,39		
Arginina	6,45	3,83	-		-	-		
Metionina	3,31	3,49	2,5	2,4	1,32	1,40	1,38	1,45
Valina	6,79	7,48	3,5		1,94	2,14		
Triptófano	0,08	0,09	1,1		0,07	0,08		
Fenilalanina	4,41	4,42	6,3		0,70	0,70		
Isoleucina	5,17	6,04	2,8	-	1,85	2,16		
Leucina	9,08	9,52	6,6		1,38	1,44		
Lisina	6,79	6,63	5,8	7,2	1,17	1,14	0,94	0,92

Ref.1 - AAE de acuerdo con FAO/WHO/UNU (1985); RP1: IAAE calculados de acuerdo a Ref.1; Ref.2 – AAE de acuerdo a NRC (2001); RP2: IAAE calculados de acuerdo a Ref.2.

Los valores de PER (Tabla III) son similares o mayores a los reportados por Schuchardt (2005) para harina de pescado y, similares a los reportados por Ovissipour *et al.* (2009) para hidrolizados de vísceras de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y esturión persa (*Acipenser persicus*).

Tabla III.- Índice de Eficiencia Proteica (PER) de los ensilados (A y B) comparados con los obtenidos en hidrolizado de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*); hidrolizado de esturión persa (*Acipenser persicus*) y harina de pescado (HP).

N° Ecuación (Tabla 1)	PER				
	A	B	Atún	Esturión	HP
1	2,72	3,15	-	2,40	2,68
2	3,44	3,62	2,89	2,52	2,74
3	5,34	5,60	5,38	6,45	3,02
4	3,20	3,35	2,85	3,16	2,84
5	3,14	3,10	3,33	3,14	2,87

Los dos ensilados mostraron un perfil electroforético similar, al día 30 prácticamente desaparecen las bandas proteicas más pesadas y prevalecen péptidos menores a 10 kDa, consistente con el avance de la fermentación láctica y el Grado de Hidrólisis proteica (% GH) llegó en ambos ensilados, a un valor cercano al 20%.

Conclusiones

La composición en aminoácidos, el Índice de Aminoácidos Esenciales (IAAE), el Índice de eficiencia Proteica (PER), el Grado de Hidrólisis (GH), así como el tamaño de los péptidos (menor a 10 kDa), demuestran el alto valor nutritivo de los ensilados que se originan a partir del residuo de corvina rubia producidos mediante fermentación ácidoláctica. Los ensilados obtenidos, pueden considerarse como una excelente fuente de proteína by-pass en rumiantes, siendo suficiente el uso de 10% de sacarosa y 5% de yogur para obtener el ensilado biológico. Su utilización redunda en grandes ventajas tanto para la industria ganadera como para la pesquera, estimulando una asociación simbiótica donde la primera obtiene una fuente proteica de alta calidad y la segunda logra el aprovechamiento integral de las especies pesqueras revalorizando sus residuos o subproductos pesqueros.

Agradecimientos

Los autores agradecen al técnico Pablo Casagrande del INIDEP-Mar del Plata, por el procesamiento de los residuos de corvina rubia.

Bibliografía

Alsmeyer R.H., Cunningham A.E. & Happich M.L. 1974. Equations predicting PER from amino acid analysis. *Food Technology*, 28(7), 34–40.

AOAC. 1995. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16 th Edition. (Ed.) P. A. Cunniff. Arlington, Virginia. USA.

FAO/WHO/UNU.1985. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724, pp. 116–129.

Fernández Herrero A., Vittone M., Salomone A. & Manca, E. 2015. Biological silage of *Merluccius hubbsi*. Amino acid composition, degree of hydrolysis and peptides size. Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research. Vol.3 (6). 57-62.

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoin des animaux, valeurs des aliments: Table INRA 2007. Quae Editions. Versailles, France.

Laemmli U.K. 1970. Cleave of structural proteins during assembly of head of bactiophage T4, *Nature*, 227:680-685.

Lee Y.B, Elliot J.G., Rickansrud D.A. & Mugberg E.C. 1978. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. *J. Food Sci*. 43:1359–62.

National Research Council (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7ª Ed.). National Academy Press, Washington, D.C. 401 pp.

Normas FEDNA. *Necesidades nutricionales para rumiantes de leche*. 2009. Edita: Fund. Española para el Desarr. de la Alimentación Animal. Ed.Peninsular S.L.Madrid. 89 pp.

Ovissipour M., Abedian A.M., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R., & ShahirI H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115, 238–242.

Pezoa V.G. & Mellado M.S. 1979. Estudo das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática de estratos dos componentes do aparelho digestivo de corvina (*Micropogonias furnieri*) e castanha (*Umbrina canosai*). In: Pezoa, V. G. & Mellado, M. S. Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado. Rio Grande: Ed. FURG. 5-38.

Randall, E.L. 1974. Improved method for fat and oil analysis by a new process of extraction. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*. 57, 1165–1168.

Salomone A. 2016. Optimización de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida para la determinación de perfiles proteicos en hidrolizados por vía enzimática y en ensilados biológicos. *Inf. Inv. INIDEP*. N°14/2016. Mar del Plata. 6 pp.

Schuchardt D. 2005. Requerimientos nutricionales en bocinegro (*Pagrus pagrus*). Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 244 pp.

Sgarbieri V.C. 1987. Alimentacao e Nutricao: fator de saude e desenvolvimento. Campinas: Editora da UNICAMP; São Paulo: Almed. 387 p.

Spanopoulos Hernández M., Ponce Palafox J.T., Barba Quintero G., Ruelas Inzunza J.R., Tiznado Contreras M.R., Hernández González C. & Shirai K. 2010. Producción de Ensilados Biológicos a partir de desechos de pescado, del ahumado de Atún de aleta amarilla (*T. albacares*) y del fileteado de Tilapia (*Oreochromis sp*), para la alimentación de especies acuícolas. *Rev. Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 9, N° 2. 167-178.

Caracterización de la fracción proteica de ensilados biológicos de residuos de *Micropogonias furnieri*

Fernández Herrero, A.L. [1]; Vittone, M. ; Salomone, Andrea

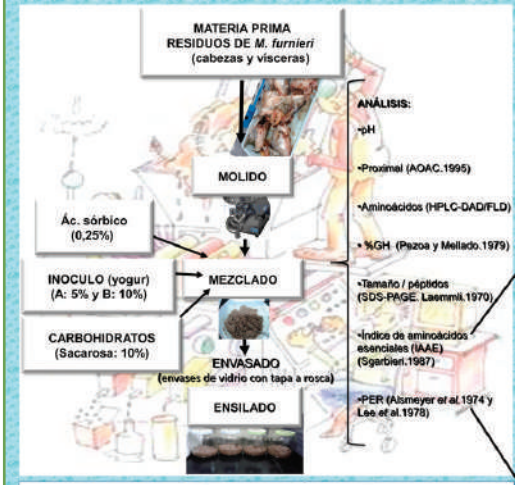
Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, INIDEP.
Paseo Victoria Ocampo N°1, Mar del Plata, Argentina. [1] aherrero@inidep.edu.ar

Introducción

Entre las alternativas de tratamiento y valorización de residuos o subproductos pesqueros se halla la producción de ensilado; es un producto con un contenido proteico de alto valor biológico para su utilización en la formulación de raciones para la alimentación animal. Hay varios parámetros que se utilizan para la evaluación de los aportes nutricionales de una proteína, entre los que se incluyen el "Índice de aminoácidos esenciales" (IAAE) y el "Índice de eficiencia proteica" (Protein Efficiency Ratio: PER). En particular, los requerimientos proteicos de los rumiantes dependen de la calidad de la proteína en referencia a sus sitios de digestión, esto es: proteína degradable y no degradable a nivel ruminal (proteína "pasante" o "by- pass"). Las fuentes de proteína "by- pass" se definen como aquellas que contienen 50% o más de la proteína digestible del alimento que escapa a la fermentación ruminal. Las de uso frecuente a nivel mundial son las harinas de pescado, de carne y hueso, de plumas hidrolizadas; el poroto de soja tostado, la harina de soja tratada con formaldehído y los subproductos de la destilería, secos o húmedos. Las necesidades de aminoácidos en vacuno lechero sólo se han determinado genéricamente para la lisina y la metionina, aunque en algunas condiciones, la arginina y la histidina también pueden ser limitantes para la producción de leche, se recomienda el aporte de 2,4 y 7,2% del total de la proteína metabolizable como metionina y lisina, respectivamente (NRC.2001) Se elaboraron ensilados biológicos, obtenidos por fermentación láctica a partir de residuos de corvina rubia (*Micropogonias furnieri*); la cual representa uno de los principales recursos costeros de la Provincia de Buenos Aires-Argentina, cuya pesca se efectúa a lo largo de todo el litoral Atlántico y en el Río de La Plata, destacándose la zafra en invierno; la industria de procesamiento de corvina genera residuos que pueden llegar a más del 50% respecto del peso total (principalmente cabezas y vísceras). El objetivo de este estudio fue caracterizar la fase proteica de ensilados biológicos, obtenidos por fermentación láctica, a fin de estimar su valor nutritivo como potencial insumo en la formulación de dietas para animales de cría, como rumiantes en lactación y vacuno lechero.

Materiales y Métodos

Se utilizó como materia prima, residuos (cabezas y vísceras) de corvina rubia (*M. furnieri*) procedentes de las plantas fileteadoras de la ciudad de Mar del Plata. Se elaboraron dos ensilados (A y B) con dos proporciones de yogur (5 y 10 %); sacarosa (10 %) y ácido sórbico (0,25 %). Se trabajó a 29°C durante 30 días.



Resultados

•El pH se estabilizó a los 7 días en 4,5. La composición proximal (base húmeda) de la MP fue: proteína 16,84 %; ceniza 6,65 %; extracto etéreo 3,62 % y humedad 74,08 %. El contenido de proteína (11,79 – 11,76 %), ceniza (3,77 – 3,94 %); extracto etéreo (2,77 – 3,05 %) y humedad (72,01 – 71,22 %) en los ensilados A y B respectivamente, es menor al registrado en la MP. Similar comportamiento fue hallado para ensilados biológicos de atún y tilapia (Spanopoulos Hernández *et al.* 2010) y, para *M. hubbsi* (Fernández Herrero *et al.* 2015).

•El IAEE varía dependiendo del estándar de referencia. Los IAAE revelan al triptófano como el aminoácido limitante, seguido por la fenilalanina, mientras que el resto de los aminoácidos están presentes en cantidades suficientes o superior al valor requerido (Tabla I).

•Los valores de PER (Tabla II) son similares o mayores a los reportados por Schuchardt (2005) para harina de pescado y, similares a los reportados por Ovissipour *et al.* (2009) para hidrolizados de vísceras de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y esturión persa (*Acipenser persicus*).

•Los dos ensilados mostraron un perfil electroforético similar, al día 30 prácticamente desaparecen las bandas proteicas más pesadas y prevalecen péptidos menores a 10 kDa, consistente con el avance de la fermentación láctica y; el Grado de hidrólisis proteica (% GH) llegó, en ambos ensilados, a un valor cercano al 20%.

Tabla I. Aminoácidos esenciales (AAE) del ensilado de *M. furnieri* e Índice de aminoácidos esenciales (IAAE)

AAE	Ensilados		Ref.1	Ref.2	IAAE			
	A	B			A	B	A	B
	(g/100g)		(g/100g)		RP1	RP1	RP2	RP2
Treonina	5,43	5,19	3,4		1,60	1,53		
Histidina	2,63	2,64	1,9	-	1,38	1,39		
Arginina	6,45	3,83	-		-	-		
Metionina	3,31	3,49	2,5	2,4	1,32	1,40	1,38	1,45
Valina	6,79	7,48	3,5		1,94	2,14		
Triptófano	0,08	0,09	1,1	-	0,07	0,08		
Fenilalanina	4,41	4,42	6,3		0,70	0,70		
Isoleucina	5,17	6,04	2,8		1,85	2,16		
Leucina	9,08	9,52	6,6		1,38	1,44		
Lisina	6,79	6,63	5,8	7,2	1,17	1,14	0,94	0,92

Ref.1 - AAE de acuerdo con FAO/WHO/UNU (1985); RP1: IAAE calculados de acuerdo a Ref.1; Ref.2 – AAE de acuerdo a NRC (2001); RP2: IAAE calculados de acuerdo a Ref.2.

Tabla II. Índice de Eficiencia Proteica (PER) de los ensilados (A y B) comparados con los obtenidos en hidrolizado de Atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*); hidrolizado de Esturión persa (*Acipenser persicus*) y harina de pescado (HP).

	PER				
N° Ecuación	A	B	Atún	Esturión	HP
1	2,72	3,15	-	2,40	2,68
2	3,44	3,62	2,89	2,52	2,74
3	5,34	5,60	5,38	6,45	3,02
4	3,20	3,35	2,85	3,16	2,84
5	3,14	3,10	3,33	3,14	2,87

N° Ecuación:
1 = -0,684 + 0,456 [Leu] – 0,047 [Pro]. **2** = -0,468 + 0,454[Leu] – 0,104[Tyr]
3 = -1,816 + 0,435[Met] + 0,780[Leu] + 0,211[Hist] – 0,84[Tyr]; **4** = 0,08084 [X7] – 0,1094
5 = 0,06320 [X10] – 0,1539. **X7** = Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+Lys; **X10** = X7+His+Arg+Tyr.

Conclusiones

La composición en aminoácidos, el índice de aminoácidos esenciales (IAAE), el índice de eficiencia proteica (PER), el grado de hidrólisis (GH), así como el tamaño de los péptidos (menor a 10 kDa), demuestran el alto valor nutritivo de los ensilados que se originan a partir del residuo de corvina rubia producidos mediante fermentación ácido-láctica. Los ensilados obtenidos, pueden considerarse como una excelente fuente de proteína by-pass en rumiantes, siendo suficiente el uso de 10% de sacarosa y 5% de yogur para obtener el ensilado biológico. Su utilización redunda en grandes ventajas tanto para la industria ganadera como para la pesquera, estimulando una asociación simbiótica donde la primera obtiene una fuente proteica de alta calidad y la segunda logra el aprovechamiento integral de las especies pesqueras revalorizando sus residuos o subproductos pesqueros.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Téc. Pablo Casagrande del INIDEP-Mar del Plata, por el procesamiento de los residuos de corvina rubia.

Bibliografía

Alsmeyar R. H. Cunningham A. E. & Happich, M. L. 1974. Equations predicting PER from amino acid analysis. Food Technology, 28(7), 34–40. **AOAC. 1995.** Official methods of analysis of. AOAC International. 16 th Edition. (Ed.) P. A. Cunniff. Arlington: Virginia. USA. **FAO/WHO/UNU.1985.** Energy and protein requirements. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University. Geneva, Series No. 724, pp. 116–120. **Fernández Herrero, A.; Vittone, M.; Salomone, A. & Manca, E. 2015.** Biological stage of *Merluccius hubbsi*, Amino acid composition, degree of hydrolysis and peptides size. Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research. Vol 3 (6), 57-62. **Laemmli, U.K. 1970.** Cleave of structural proteins during. assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227 680-685. **Lee, Y.B; Elliot, J.G.; Rickansrud, D.A. & Mugberg, E.C. 1978.** Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. J. Food Sci. 43:1359–62. **National Research Council (NRC), 2001.** Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7th Ed.) National Academy Press. Washington, D.C. 401 pp. **Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. 2009.** The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Food Chemistry, 115, 238–242. **Pezoa, V.G. & Mellado, M.S. 1979.** Estudio das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática de extratos dos componentes do aparelho digestivo de corvina (*Micropogonias furnieri*) e castanha (*Umbrina canosai*). In: Pezoa, V. G. y Mellado, M. S. Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado. Rio Grande: Ed. FURG. 5-30. **Schuchardt, D. 2005.** Requerimientos nutricionales en bonimegre (*Pagrus pagrus*). Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 244 pp. **Sgarbieri, V.C. 1987.** Alimentação e Nutrição fator de saúde e desenvolvimento. Campinas: Editora da UNICAMP. São Paulo: Almed. 387 p. **Spanopoulos Hernández, M.; Ponce Palafox, J.T.; Barba Quintero, G.; Rueda Irizunza, J.R.; Tamado Contreras, M.R.; Hernández González, C. & Shirai, K. 2010.** Producción de Ensilados Biológicos a partir de desechos de pescado, del ahumado de Atún de aleta amarilla (*T. albacares*) y del fileteado de Tilapia (*Oreochromis* sp), para la alimentación de especies acuícolas. Rev. Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 9. N° 2. 167-178.

Caracterización de una población de coquina (*Donax trunculus*, L. 1758) en la playa de Bastiagueiro, A Coruña

Catoira[1] J.L., Seoane[2] P., Martínez[3] D., Ojea[3] J., Méndez[4] J. & No[5] E.

[1]Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Delegación Territorial de A Coruña, Casa do Mar, 15006 A Coruña, España. jose.catoira.gomez@xunta.es

[2]Cofradía de pescadores de A Coruña. Dársena de Oza, Local AR098, 15006 A Coruña

[3]Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA). Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Muelle de Porcillán s/n, 27700 Ribadeo (Lugo)

[4]Grupo Xenomar, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, Campus de A Coruña, 15701 A Coruña

[5]Centro de Investigaciones Marinas (CIMA). Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Pedras de Corón s/n, Apdo 13, 36620 Vilanova de Arousa

Resumen

Después de realizadas prospecciones para la comprobación de la presencia de la especie *Donax trunculus* en varias playas al sur de la provincia de A Coruña, se estudió una población de coquina asentada en la playa de Bastiagueiro (A Coruña), determinando sus características. Para ello, se calcularon y compararon las biometrías de los individuos recolectados, determinando su densidad y biomasa, el estado genético e histológico y se analizó la granulometría del sedimento en la zona muestreada.

Palabras clave

Coquina, *Donax trunculus,* Biometría, caracterización sedimentaria.

Introducción

Dentro del proyecto *Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia*, se prospectaron varias zonas donde era conocida la presencia de la especie *Donax trunculus*. Fueron seleccionadas tres playas: Estorde (Corcubión), Carnota (Lira) y Bastiagueiro (Oleiros).

La producción de coquina en las playas de Estorde y Carnota llegó a ser relevante a principios de la década del presente siglo, siendo los porcentajes de capturas de estas zonas con relación al resto de Galicia los siguientes: En el año 2001 las capturas de las dos zonas constituyeron el 27,09% del total (Estorde el 10,32% y Carnota el 16,77%). En 2002 representaron el 30,18% del total (11,17% y 19,01%, respectivamente). Al tratarse de dos zonas de producción constatada en años anteriores, se realizó una prospección en cada una de ellas, utilizando raños con sobrecopo, concluyendo la inutilidad de un muestreo intensivo en ambas, por la escasez de ejemplares encontrados en las prospecciones. Es significativo el hecho de la desaparición de las poblaciones de coquina en estas dos zonas a partir del accidente del buque Prestige, causante del vertido que afectó sensiblemente a dichas playas (en la estadística oficial no figuran datos de producción a partir de 2003).

La prospección previa sobre la playa de Bastiagueiro aconsejó la caracterización de la población por lo que se realizó, durante el año 2014, el muestreo de la población de coquina allí asentada.

La playa de Bastiagueiro se encuentra al SE de la ría de la Coruña. Tiene una extensión de 580 metros de largo por 100 metros de ancho, caracterizándose por ser una playa rectilínea, presentando un perfil de suave pendiente. Está localizada entre dos cantiles desembocando al oeste una pequeña cuenca fluvial: arroyo de Bastiagueiro.

Los vientos predominantes en primavera y verano son del NE, mientras que para otoño e invierno son del SW. El oleaje más probable procede del WNW y NW, presentando

valores extremos en invierno, mínimos en verano y moderados en primavera y otoño, como corresponde a su grado de exposición.

Materiales y métodos

Se eligió una estrategia de muestreo regular estratificado, realizando cuatro transectos horizontales sobre distintos niveles de marea en la zona intermareal e infralitoral (0,91 m el día 12 de mayo, 0,54 m el día 15 de mayo y 0,31 m el día 15 de julio y 0,18 el 12 de agosto, respectivamente). Esta estrategia de muestreo, de transectos paralelos a la costa, ha sido utilizada por otros investigadores (Ocaña *et al.*, 2013; Biotope y P2A développement consultores, 2007).

En el intermareal se utilizó una calicata de PVC de 0,25 m^2, con 14 puntos de muestreo por transecto espaciados unos 35 m entre cada punto, que fueron localizados por medio de un GPS Garmin 76, al igual que en la zona infralitoral, donde se utilizó una embarcación dotada con un tubo de aspiración submarino manejado por un buceador, que utilizaba una calicata de aluminio de 0,16 m^2, siendo su contenido recogido a bordo con ayuda de un tamiz de 5 mm de malla (Fig. 1 y 2).





Figura 1.- Tubo de aspiración submarina **Figura 2.-** Recogida a bordo en tamiz

Las muestras de sedimento fueron obtenidas a lo largo de los transectos intermareales (7 puntos por transecto, cada 70 m) utilizando un box-corer de 11 cm de Ø, hasta unos 15 cm de profundidad, localizando todos los puntos con el GPS (Fig. 3).

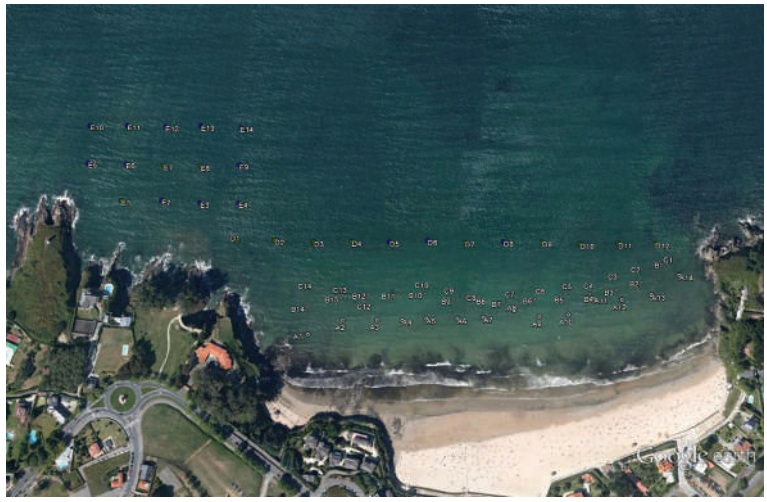


Figura 3.- Situación de los puntos de muestreo.

Las muestras de coquina fueron inmediatamente procesadas en laboratorio, obteniendo peso fresco y biometrías (calibre Mitutoyo y balanza semianalítica Salter de 0,1 mm y 0,01 g de precisión respectivamente), atendiendo a las normas de medición del "Etude globale sur la Telline en Camargue" (BIOTOPE; P2A Développement, 2007), manteniéndolas en agua de mar hasta su envío al Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo para su estudio histológico (muestras del mes de mayo). A partir de una prospección previa de la playa se suministraron muestras al Departamento de genética de la Universidad de A Coruña para su determinación genética.

Las muestras de sedimentos fueron secadas y enviadas al CIMA de Vilaxoán para su procesado, siendo etiquetadas y referenciada su localización (Datum VGS 84).

La superficie de ocupación de la población de coquina y su representación, fueron calculados mediante el programa AUTOCAD y GVSIG Valencia, calculando la superficie de ocupación de la población en la playa en 36.900 m^2.

Para el procesado de datos se utilizó el programa Arousa: estimación de stock de recursos vivos (Parada y Molares, 2009) y la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010.

Para el análisis histológico se realiza la toma de datos biométricos de los individuos y se abren separando concha y vianda. A continuación se diseccionan separando la gónada-masa visceral del resto. La gónada se guarda en fijador Davidson manteniéndola en el fijador 24 horas. Finalizada la fijación las muestras se introducen en un procesador de tejidos que

deshidrata las muestras, pasándolas por baños en alcoholes de graduación creciente desde 70º hasta alcohol absoluto, xileno y por último parafina. Para la realización de cortes histológicos se realiza la inclusión de las muestras en bloques de parafina, para posteriormente realizar cortes de 5 micras de grosor con un micrótomo. Por último se tiñen con Hematoxilina-Eosina. Los cortes se observan al microscopio y se determina la fase del ciclo gametogénico en que se encuentran los individuos.

Resultados

En el primer muestreo (transecto A) se obtuvieron 28 individuos, un bajo número para la superficie total muestreada (3,5 m^2) como era previsible por el bajo coeficiente de marea. El tiempo empleado fue de 1 h 45´. En el segundo muestreo (transecto B) se obtuvieron 54 individuos, empleando 2 h. El tercer muestreo (transecto C) produjo 19 individuos, a pesar de ser el coeficiente más alto de marea y utilizar 2 h 15´ (Tabla I). La distribución de tallas se muestra en la figura 4.

En estos transectos del intermareal no se encontraron especies comerciales acompañantes, como corresponde a la especificidad de la especie. En el infralitoral, muestreado con dragado por succión, el resultado fue negativo, obteniendo únicamente un único ejemplar de *D. trunculus* e individuos de ameixola (*Mactra stultorum=M. corallina*) y chirla (*Chamelea gallina*) en baja densidad. Esta última especie comparte hábitat con *D. trunculus*, aunque en niveles inferiores de marea, conforme a lo observado por Escalante y Cañavate (2009) en la costa de Huelva y por Çolakoglu (2014), que cita a *C. gallina* como la especie acompañante más abundante en Marmara.

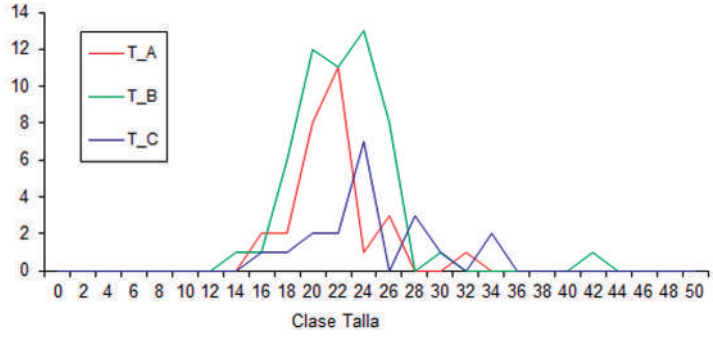


Figura 4.- Histograma de frecuencia de tallas por transectos

Tabla I.- Datos obtenidos en Bastiagueiro (donde N es el nº de individuos, Sm^2 es la superficie muestreada, X_M la talla máxima, X_m la talla mínima, W_M el peso máximo y W_m el peso mínimo).

Transecto	Fecha	Talla X	Peso W	N	S m^2	X_M	X_m	W_M	W_m
Prospección	01/04/2014	21,77±3,94	1,59±0,93	81	~4	32,06	13,54	4,49	0,40
A	12/05/2014	20,66±3,01	1,30±0,63	28	3,5	30,25	15,21	3,78	0,48
B	15/05/2014	21,26±3,91	1,45±1,17	54	3,5	40.28	13,83	9,16	0,44
C	14/07/2014	23,58±4,72	2,08±1,34	19	3,5	33,29	15,91	5,25	0,59
Infralitoral	12/08/2014	23,74	1,45	1	2,24	-	-	-	-
Total		21,64±3,93	1,56±1,03	183	-	40,28	13,54	9,16	0,40

Se observa una alometría negativa para la relación talla-peso (b: 2,779 para la curva del total de muestras) al igual que lo observado por Çolakoglu (2014) en Turquía. La relación de la talla o longitud antero-posterior con el peso (datos totales, n=183) refleja, para una talla de 25 mm un peso superior a 2,2 g, mientras que la equivalencia en peso para la talla mínima de 35 mm es de más de 5 g (Fig. 5).

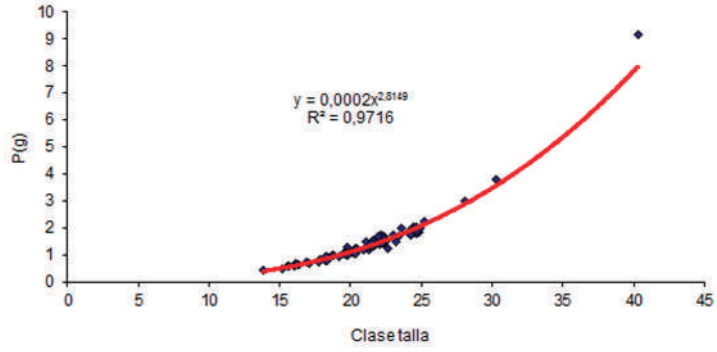


Figura 5.- Relación talla-peso

Las relaciones lineales de la talla con la altura y con el espesor presentan unas modelizaciones biométricas que hacen corresponder una media de 15,61 mm de altura y 8,42 mm de espesor para una talla de 25 mm, mientras que para la talla de 35 mm las correspondencias son de 21,36 mm y 11,65 mm, respectivamente.

La población estudiada en Bastiagueiro presenta un patrón de distribución vertical, registrando las mayores densidades en las franjas Centro-E y Centro-W, como se muestra en la figura 6. Por otra parte, al analizar los transectos, se alcanza el valor máximo de densidad en el estrato intermedio (transecto B: 22,4 g/m^2), al igual que lo observado por Ocaña *et al.* (2013) en la costa sur oriental de Cuba para *Donax denticulatus*.



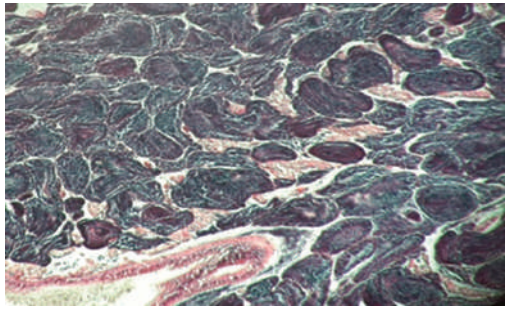
Figura 6.- Distribución de densidades por zonas

La biomasa total sobre la superficie de ocupación fue estimada en 541,4 kg, con un promedio de 14,69 g/m^2 y de 9,62 ind./m^2, correspondiendo a la biomasa extraíble comercial una cantidad de 32,2 kg.

Con los datos obtenidos no se puede concluir la existencia de un gradiente batimétrico de distribución de tallas, a pesar de la mayor talla media encontrada en el transecto inferior, puesto que existe una diferencia de dos meses entre los muestreos de los transectos A y B con el C. Sin embargo, toda la bibliografía consultada coincide en la apreciación de este gradiente. Gaspar *et al.* (2001) confirma, para la costa del Algarve portuguesa, la existencia de una distribución diferencial entre clases de talla y la profundidad: individuos más pequeños en aguas someras y de mayor talla a más profundidad. Esta segregación espacial entre jóvenes y adultos también es encontrada por Zeichen *et al.* (2002) en la costa sur del Adriático, al igual que Ansell & Lagardère (1980) en la isla de Oléron, y Vaccarella *et al.* (1998) en la costa adriática de Albania.

De la observación histológica analizada en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo, se puede afirmar que los individuos estaban en fase de madurez y puesta, estando maduros

incluso los de menor talla (Fig. 7 y 8). Debe tenerse en cuenta que las tallas mínimas analizadas en este estudio corresponden a valores de 14 mm.



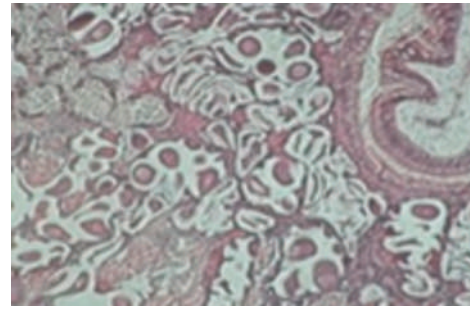


Figura 7.- Corte histológico gónada masculina 4x. **Figura 8.-** Corte histológico gónada femenina 4x.

El sex-ratio fue de 1,2:1, y los valores de los índices de condición (1) y gonadal (2) fueron de 17,28 ± 2,35 y 4,66 ± 1,01, respectivamente. Estos índices fueron calculados con las siguientes fórmulas:

- IC: (peso vianda/peso total)*100 (1)
- ICG: (peso gónada/peso total)*100 (2)

Los resultados coinciden con lo observado por Martínez *et al.* (1993) en la ría del Barquero, en donde señalan, para una población de *D trunculus*, que los folículos aparecen siempre en gametogénesis, maduros o con gametos residuales, no presentando descanso gonadal. Asimismo, Martínez *et al.* (2003), en la misma ría del Barquero, establecen que los ejemplares más pequeños en los que se ha podido observar gametos maduros corresponden a la talla de 12 mm, estableciendo la talla mínima de maduración en 28 mm. Esta precocidad es señalada asimismo por Gaspar *et al.* (1999), apuntando para la costa sur de Portugal que *D. trunculus* alcanza la madurez durante el primer año de vida. Otros autores (JACUMAR) consideran también para *D. trunculus* en Vilarrube (Cedeira) un período largo de madurez y un corto período de reposo.

Convendría reflexionar sobre el futuro de mercado de la especie en Galicia en la actual tesitura. La reglamentación comercial para el Mediterráneo, Francia y otros países establece en 25 mm la talla mínima de extracción. Sin embargo, otros autores, como García Martín *et al.* (2007) aconsejan aumentar la talla mínima actual al menos a 38 mm e interrumpir totalmente la extracción de este recurso en Galicia hasta que estudios posteriores confirmen su recuperación. Esta situación presta especial relevancia a los resultados del proyecto en el que se encuadra este estudio.

Se realizó un análisis de diversidad genética en la UDC, siendo comparada esta población de Bastiagueiro con otra situada en Lombo das Navallas (ría del Barquero), sin encontrar diferencias en los niveles de variabilidad genética (Nantón *et al.*, 2014).

El análisis granulométrico fue realizado en el CIMA de Vilaxoan. Los sedimentos de la playa de Bastiagueiro están bien seleccionados (el tamaño del grano es muy homogéneo y la distribución suele ser unimodal), lo que indica que el ambiente sedimentario es exigente con el tipo de grano que puede permanecer.

La clasificación granulométrica en los transectos A y B son muy semejantes, estando mayoritariamente constituidas por arenas medias y finas, encontrando un mayor porcentaje de arenas gruesas y muy gruesas en el margen derecho del transecto C, que se desplaza hacia el componente más fino en el margen izquierdo.

La predominancia de arenas medias y finas se muestra en la distribución del tamaño del grano del sedimento (Fig. 9).

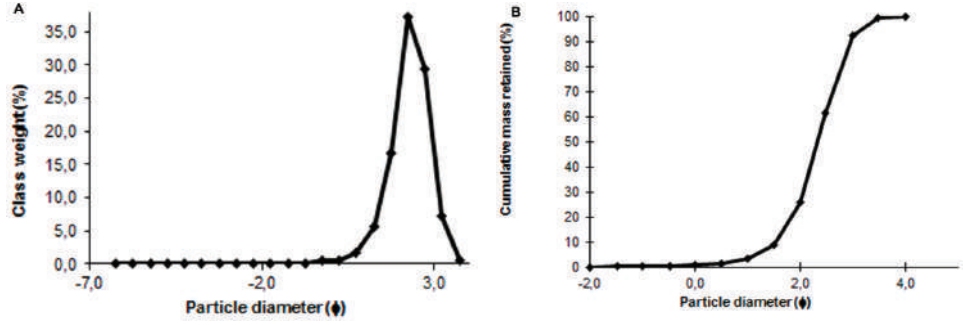


Figura 9.- (A) Distribución del tamaño de partículas. (B) Curva acumulativa de la dis tribución del grano.

La curva acumulativa es típicamente sigmoidal, como corresponde a un ambiente marino bien clasificado:

Es destacable la observación, durante el muestreo en Bastiagueiro, de la extrema velocidad de enterramiento de *D. trunculus*, sin duda favorecida por la calidad del sedimento, como lo exponen varios autores: De la Huz *et al.* (2002) asocian la facilidad de enterramiento de juveniles al tipo y tamaño del grano sedimentario, señalando en poblaciones de *D. trunculus* en playa América su sensibilidad hacia el sustrato, siendo el grano óptimo para el enterramiento las arenas finas y medias. La Valle *et al.* (2011) describe la importante relación del sustrato en que se asienta *D. trunculus* con su capacidad de enterramiento rápido y eficiente,

determinando un diámetro de partícula de 2,00 phi como tamaño del grano predominante en la distribución y densidad de la especie, que es exclusiva de biocenosis de arena fina superficial. Guillou & Bayed (1991) encuentran las densidades más elevadas de *D. trunculus* en sedimentos con tamaños de grano entre 190 y 230 µm y mínima abundancia en sedimentos con tamaño de grano menor de 160 µm. En la figura 10 se ha representado la distribución granulométrica por transectos, observándose la afinidad de los dos transectos superiores (A y B), con la predominancia ya citada de arenas medias y finas, siendo más irregular el transecto C del intermareal inferior, que presenta ciertas diferencias con los anteriores, sobre todo marcadas en ciertas estaciones, como la CS1 y CS2, que se corresponden con el margen inferior derecho de la playa, y en la que están representados los mayores valores para las fracciones más gruesas del sedimento. Claramente, a partir de las siguientes estaciones de este transecto, hacia el W de la playa, se incrementan notablemente los porcentajes de arenas finas y muy finas en comparación con los transectos superiores.

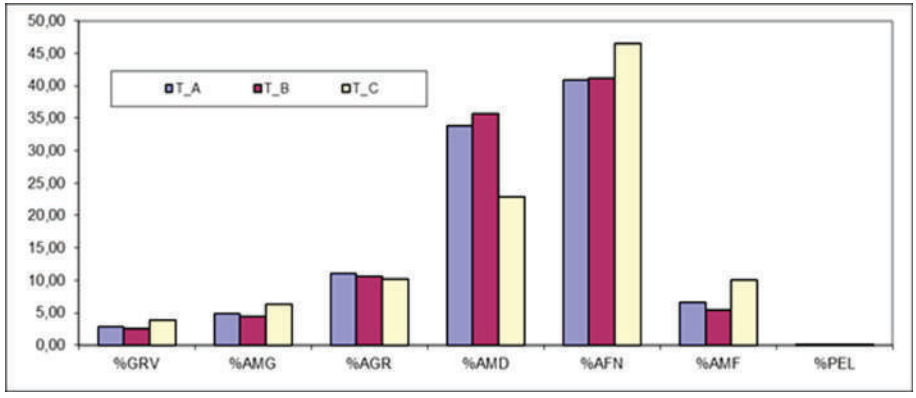


Figura 10.- Distribución granulométrica para los transectos A, B y C (GRV: gravas, AMG: arenas muy gruesas, AGR: arenas gruesas, AMD: arenas medias, AFN: arenas finas, AMF: arenas muy finas, PEL: pelitas).

Conclusiones

Se ha caracterizado la población de *D. trunculus* en la playa de Bastiagueiro, que presenta similitudes notables con alguna de las sometidas a estudio en el proyecto *Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia*, tanto en su estructura poblacional como en la clasificación sedimentaria.

Se puede considerar que se trata de una población de juveniles que no consigue alcanzar en general tallas superiores a los 30 mm y que se encuentra restringida a una franja intermareal de discreta superficie (< 40.000 m^2).

Por medio de operaciones de cultivo se pretende determinar el comportamiento de una población obtenida de este banco, experimentando su viabilidad en diferentes sistemas de cultivo y analizando el crecimiento, para la comprobación de mortalidad en tallas que superen la comercial.

Agradecimientos

Este trabajo se encuadra en el proyecto de investigación coordinado PGIDIT-CIMA 13/08 "Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia", financiado por la Consellería do Medio Rural e do Mar de la Xunta de Galicia.

Bibliografía

Ansell A.D. & Lagardère F. 1980. Observations on the Biology of *Donax trunculus* and *D. vittatus* at Ile d´Oléron (French Atlantic Coast). *Mar. Biol.* 57: 287-300.

Biotope, 2PA Développement, 2007. Étude global sur la telline en Camargue-Parc Naturel Régional de Camargue *Donax trunculus* (Linne, 1767). Rapport Intermédiaire de la Campagne d´automne. *Contract BIOTOPE/P2A Développement-Parc Naturel de Camargue*, juin 2007.

Çolakoglu S. 2014. Populatios Structure, Growth and Production of the Wedgw Clam *Donax trunculus* (Bivalvia:Donacidae) in the West Marmara Sea, Turkey. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 14: 221-230.

De la Huz R., Lastra M. & López J. 2002. The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of *Donax trunculus* L. (Bivalvia:Donacidae). *J. Sea Res.* 47(2), 85-95.

Escalante O.M. & Cañavate J.M. 2009. Las pesquerías de bivalvos en la costa de Huelva. *XII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. O Grove, oct-2009.

García Martín O., Espinosa J., Ávarez Fariña P., Hernández Córdova G.A., Maneiro Moneira I. & Carril Villar R. 2007. Fijación de bases científicas para establecer la talla mínima de marisqueo en almejas, berberecho y coquina. Informe final del Convenio de colaboración del Instituto de Acuicultura de la USC con el Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación.

Gaspar M.B., Ferreira R. & Monteiro C.C. 1999. Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Molusca:Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fish. Res*., 41:309-316

Gaspar M.B., Chícharo L.M., Vasconcelos P., García A., Santos A.R. & Monteiro, C.C. 2001. Depth segregation phenomenon en *Donax trunculus* (Bivalvia:Donacidae) populations of the Algarve coast (Southern Portugal). *Sci. Mar*., 66(2):111-121

Guillou & Bayed. 1991.Contraintes du milieu sur les populations de *D. trunculus* L. *et D. venustus* Poli du litoral atlantique marocain. *Oceanol. Acta* 14 (3): 291-298

JACUMAR (varios autores). 2009. Cultivo de nuevas especies de moluscos bivalvos de interés en hatcheries. Informe final Jacumar. Planes Nacionales de Cultivos Marinos.

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

Martínez D., Rodríguez Moscoso M.E., Arnáiz R. Alonso de Landa J.L, Camiño J.M., Álvarez L.M., Loureiro J.M. & López M.F. 1993. Ciclo reproductor de coquina, *Donax trunculus*, relaciones con su contenido en proteínas, glucógeno, lípidos y ácidos grasos poliinsaturados. *Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura:* 347-352.

Martínez Patiño D., Novoa Vázquez S., Ojea Martínez J. & Rodríguez Moscoso E. 2003. Talla de primera maduración sexual de la coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758) en un banco natural de la ría del Barquero (NO Galicia). *IX Congreso Nacional de Acuicultura*, mayo 2003,Cádiz. Nantón A., Catoira J.L., Teijeiro O.E., Cerdeira J.D., Ojea J., Nóvoa S., Martínez-Patiño D. & Méndez J. 2014. "Análisis genético en la coquina *Donax trunculus* de dos localidades gallegas mediante marcadores microsatélite". *XVII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. O Grove.

Ocaña F.A., Apin Y.C. & Cala Y.R. 2013. Dinámica poblacional de *Donax denticulatus* (Bivalvia:Donacidae) en playa Carenero, costa sur oriental de Cuba. *Rev. Biol. Trop.* (*Int. J. Trop. Biol.*) Vol 61 (4): 1637-1646.

Parada J.M. & Molares J. 2009. Estimación de stock de recursos vivos.

Vaccarella R., de Giosa E., Troplinj B. & Paparella P. 1998. Exploitation of beds of truncate Donax *Donax trunculus* L. along Adriatic coast of Albania. *Rapp. Comm. Int. Mar Medit.*, Mónaco 35(2): 498-499

Zeichen M.M., Agnesi S., Mariani A., Maccaroni A. & Ardizzoni G.D. 2002. Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalve:Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy). *Estuarine, Coastal and shelf Science*. 54: 971-982

Caracterización de una población de coquina (*Donax trunculus*, L. 1758) en la playa de Bastiagueiro, A Coruña.

Catoira[1] J.L., Seoane[2] P., Martínez[3] D., Ojea[3] J., Méndez[4] J. y No[5] E.

[1] Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Delegación Territorial de A Coruña, Casa do Mar, 15006 A Coruña, España. E-mail: jose.catoira.gomez@xunta.es
[2] Cofradía de pescadores de A Coruña. Dársena de Oza, Local AR098, 15006 A Coruña
[3] Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA). Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Muelle de Porcillán s/n, 27700 Ribadeo (Lugo)
[4] Grupo Xenomar, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, Campus de A Coruña, 15701 A Coruña
[5] Centro de Investigaciones Marinas (CIMA). Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Pedras de Corón s/n, Apdo 13. 36620 Vilanova de Arousa

Introducción

Dentro del proyecto CIMA: *Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia*, se prospectaron varias zonas donde era conocida la presencia de la especie *Donax trunculus*. Fueron seleccionadas tres playas: Estorde (Corcubión), Carnota (Lira) y Bastiagueiro (Oleiros).
La producción de coquina en las playas de Estorde y Carnota llegó a ser relevante a principios de la década, siendo los porcentajes de capturas de estas zonas con relación al resto de Galicia los siguientes: En el año 2001 las capturas de las dos zonas constituyeron el 27,09 % del total (Estorde el 10,32 % y Carnota el 16,77 %). En 2002 representaron el 30,18 % del total (11,17 % y 19,01 %, respectivamente). Al tratarse de dos zonas de producción constatada en años anteriores, se realizó una prospección en cada una de ellas, utilizando raños con sobrecopo, concluyendo la inutilidad de un muestreo intensivo en ambas, por la escasez de ejemplares encontrados en las prospecciones. Es significativo el hecho de la desaparición de las poblaciones de coquina en estas dos zonas a partir del accidente del buque Prestige, causante del vertido que afectó sensiblemente a dichas playas (en la estadística oficial no figuran datos de producción a partir de 2003).
La prospección previa sobre la playa de Bastiagueiro aconsejó la caracterización de la población por lo que se realizó durante el año 2014 el muestreo de la población de coquina allí asentada.



Figura 1.- Localización de los puntos de muestreo

Metodología

Se eligió una estrategia de muestreo regular estratificado, realizando cuatro transectos horizontales sobre distintos niveles de marea en la zona intermareal e infralitoral. En el intermareal se utilizó una calicata de PVC de 0,25 m², con 14 puntos de muestreo por transecto espaciados unos 35 m entre cada punto, que fueron localizados por medio de un GPS Garmin II Plus, al igual que en la zona infralitoral, donde se utilizó una embarcación dotada con un tubo de aspiración submarino manejado por un buceador, que utilizaba una calicata de aluminio de 0,16 m², siendo su contenido recogido a bordo con ayuda de un tamiz de 5 mm de malla (Fig 2). Las muestras de sedimento fueron obtenidas a lo largo de los transectos intermareales (7 puntos por transecto, cada 70 m) utilizando un box-corer de 11 cm de Ø, hasta unos 15 cm de profundidad, localizando todos los puntos con el GPS (Fig 1)

Las muestras de coquina fueron inmediatamente procesadas en laboratorio, obteniendo peso fresco y biometrías, con calibre Mitutoyo y balanza analítica Salter de 0,01 mm y 0,01 g de precisión respectivamente, según método de BIOTOPE (2007)

La superficie de ocupación de la población de coquina y su representación, fueron calculados mediante el programa AUTOCAD y GVSIG Valencia, calculando la superficie de ocupación de la población en la playa en 36.900 m²

Para el procesado de datos se utilizó el programa Arousa: estimación de stock de recursos vivos (Parada y Molares, 2009) y la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010



Figura 2.- Muestreo infralitoral

Resultados y discusión

La población estudiada en Bastiagueiro presenta un patrón de distribución vertical, registrando las mayores densidades en las franjas Centro-E y Centro-W (Fig. 3). La biomasa total sobre la superficie de ocupación fue estimada en 541,4 Kg, con un promedio de 14,69 g/m2 y de 9,62 ind/m2, correspondiendo a la biomasa extraible comercial una cantidad de 32,2 Kg. Las relaciones lineales de la talla con la altura y con el espesor presentan unas modelizaciones biométricas que hacen corresponder una media de 15,61 mm de altura y 8,42 mm de espesor para una talla de 25 mm, mientras que para la talla de 35 mm las correspondencias son de 21,36 mm y 11,65 mm, respectivamente.



Figura 3.- Densidades por zona (número de individuos/m²)

Tabla I.- Datos obtenidos en la prospección y muestreo en la playa de Bastiagueiro (donde N es el nº de individuos, Sm² es la superficie muestreada, X_M la talla máxima, X_m la talla mínima, W_M el peso máximo y W_m el peso mínimo)

Transecto	Fecha	Talla X	Peso W	N	S m²	X_M	X_m	W_M	W_m
Prospección	01/04/2014	21,77±3,94	1,59±0,93	81	~4	32,06	13,54	4,49	0,40
A	12/05/2014	20,66±3,01	1,30±0,63	28	3,5	30,25	15,21	3,78	0,48
B	15/05/2014	21,26±3,91	1,45±1,17	54	3,5	40,28	13,83	9,16	0,44
C	14/07/2014	23,68±4,72	2,08±1,34	19	3,5	33,29	15,91	5,25	0,59
Infralitoral	12/08/2014	23,74	1,45	1	2,24	-	-	-	-
Total		21,64±3,93	1,56±1,03	183	-	40,28	13,54	9,16	0,40

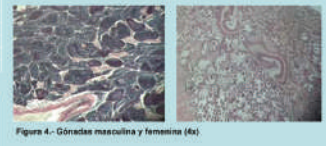


Figura 4.- Gónadas masculina y femenina (4x)

De la observación de la muestra histológica analizada en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo, se puede afirmar que los individuos estaban en fase de madurez y puesta, estando maduros incluso los de menor talla (Fig. 4).
El sex-ratio fue de 1,2:1, y los valores de los índices de condición (1) y gonadal (2) fueron de 17,28 ± 2,35 y 4,66 ± 1,01, respectivamente. Estos índices fueron calculados con las siguientes fórmulas: IC: (peso vianda/peso total)*100 (1) e ICG: (peso gónada/peso total)*100 (2)
Se realizó un análisis de diversidad genética en la UDC, siendo comparada esta población de Bastiagueiro con otra situada en Lombo das Navallas (ría del Barquero), sin encontrar diferencias en los niveles de variabilidad genética (Nantón et al, 2014).
El análisis granulométrico fue realizado en el CIMA de Vilaxoan. Los sedimentos de la playa de Bastiagueiro están bien seleccionados (el tamaño del grano es muy homogéneo y la distribución suele ser unimodal), lo que indica que el ambiente sedimentario es exigente con el tipo de grano que puede permanecer. La clasificación granulométrica en los transectos A y B son muy semejantes, estando en su mayor parte constituidas por arenas medias y finas, encontrando un mayor porcentaje de arenas gruesas y muy gruesas en el margen derecho del transecto C, que se desplaza hacia el componente más fino en el margen izquierdo de la playa.
Es destacable la observación, durante el muestreo en Bastiagueiro, de la extrema velocidad de enterramiento de *D. trunculus*, sin duda favorecida por la calidad del sedimento, como lo exponen varios autores: De la Huz et al. (2002) asocian la facilidad de enterramiento de juveniles al tipo y tamaño del grano sedimentario, señalando en poblaciones de *D. trunculus* en playa América su sensibilidad hacia el sustrato, siendo el grano óptimo para el enterramiento las arenas finas y medias. La Valle et al. (2011) describe la importante relación del sustrato en que se asienta *D. trunculus* con su capacidad de enterramiento rápido y eficiente, determinando un diámetro de partícula de 2,00 phi como tamaño del grano predominante en la distribución y densidad de la especie, que es exclusiva de biocenosis de arena fina superficial.

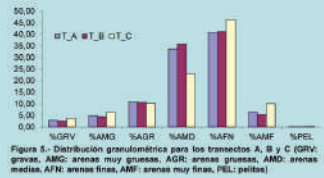


Figura 5.- Distribución granulométrica para los transectos A, B y C (GRV: gravas, AMG: arenas muy gruesas, AGR: arenas gruesas, AMD: arenas medias, AFN: arenas finas, AMF: arenas muy finas, PEL: pelitas)

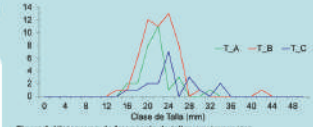


Figura 6. Histograma de frecuencia de tallas por transectos

Conclusiones

Se ha caracterizado la población de *D. trunculus* en la playa de Bastiagueiro, que presenta similitudes notables con alguna de las sometidas a estudio en el proyecto *Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia*, tanto en su estructura poblacional como en la clasificación sedimentaria. Se puede considerar que se trata de una población de juveniles que no consigue alcanzar en general tallas superiores a los 30 mm y que se encuentra restringida a una franja intermareal de discreta superficie (< 40.000 m²).
Por medio de operaciones de cultivo se pretende determinar el comportamiento de una población obtenida de este banco, experimentando su viabilidad en diferentes sistemas de estabulación y analizando el crecimiento y la mortalidad para la comprobación de la supervivencia hasta tallas que alcancen la comercial.

Agradecimientos

Este trabajo se encuadró en el proyecto de investigación coordinado PGIDIT-CIMA 13/08 "Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia", financiado por la Consellería do Medio Rural e do Mar de la Xunta de Galicia.

Bibliografía

BIOTOPE. Life Développement. 2007. Étude globale sur la faune en Camargue/Parc Naturel Régional de Camargue. Donax trunculus (Linné, 1767). Contrat BIOTOPE/PDA (développement). Parc Naturel de Camargue, juin 2007.

De la Huz, R., M. Lastra y J. López. 2002. The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of Donax trunculus L. (Bivalvia: Donacidae). J. Sea Res. 47(3), 89-98.

Nantón, A., Cabrero, J.L., Tojeiro, O.E., Cardazo, J.D., Ojea, J., Novoa, S., Martínez Patiño, D. y Méndez, J. 2014. "Análisis genético en la coquina Donax trunculus de dos localidades gallegas mediante marcadores microsatélite". XVII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas. O Grove.

Parada, J.M. y Molares, J. 2009. ARousA. Estimación de stock de recursos vivos.

La Valle, P., Nicoletti, M., Gnasso Finale, M., Arduzzone, G.D. 2011. Donax trunculus (Bivalvia: Donacidae) as a potential biological indicator of grain-size variations in beach sediment. Ecological Indicators 11 (2011) 1426-1436

XIX Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas. 2016, Outubro 6-7, Illa da Toxa,O Grove.

Caracterización genética preliminar de *Spondylus limbatus* G.B. Sowerby II, 1847, de la costa ecuatoriana

Lamas[1] A., Quinteiro[1] J. & Rey-Méndez[1,2] M.

[1]Laboratorio de Sistemática Molecular. Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular. Universidade de Santiago de Compostela, CIBUS, Campus Vida, 15782-Santiago de Compostela, A Coruña.

[2]Instituto de Acuicultura da Universidade de Santiago de Compostela, Spain.
manuel.rey.mendez@usc.es

Resumen

Spondylus limbatus G.B. Sowerby II, 1847 comúnmente llamada "almeja burra", es una especie atractiva para la pesca comercial que ha tenido un papel económico, político y cultural importante en comunidades costeras del Pacífico Oriental Tropical. Se ha llevado a cabo la obtención de secuencias mitocondriales para su utilización como marcadores moleculares. Durante el trabajo experimental se ha observado la presencia de un pigmento de coloración marrón, presente en el tejido del manto, cuya naturaleza se desconoce, que coaisla con el ADN y tiene efecto inhibitorio en la PCR. Basándose en las secuencias disponibles correspondientes al gen 16S rRNA, el género *Spondylus* es probablemente monofilético, y la especie *Spondylus limbatus* G. B. Sowerby II, 1847 se agrupa como especie hermana de *Spondylus tenuis* Schreibers, 1793. Bajo la hipótesis de una vicarianza debido a la elevación del Istmo de Panamá y su calibración con esta datación, se estima una tasa de mutación para esta secuencia del 0,6%. Los resultados obtenidos han permitido diseñar y evaluar exitosamente los cebadores SponCOX1F/2R para la obtención de secuencias parciales del gen COX1, que complemente los datos obtenidos y que representan los primeros datos moleculares descritos para *Spondylus limbatus.*

Palabras clave

Spondylus limbatus, vicarianza, tasa de mutación, especies hermanas.

Introducción

Los moluscos bivalvos de la familia Spondylidae se encuentran representados por un solo género, *Spondylus* Linnaeus, 1758. Integra individuos conocidos comúnmente como "escarlopas" u "ostras espinosas" y comprende cerca de 76 especies alrededor del mundo (Lamprell, 2006) presentes en la actualidad, y una especie fósil *Spondylus aucklandicus* (Benton, 1993). Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los océanos, pero son más frecuentes en aguas tropicales y subtropicales. En la costa oeste de América el género *Spondylus* se distribuye principalmente en el Pacífico Oriental Tropical, desde el Golfo de California (México) hasta Ecuador. Sin embargo, puede colonizar las costas de Perú como resultado de eventos del Niño (Keen, 1971; Sandweiss, 1992; Poutiers, 1995).

La familia Spondylidae presenta una concha de tamaño medio-grande, fuertemente esculpida con costillas radiales y espinosas, aurículas pequeñas y sin muesca bisal (Coan & Valentich-Scott, 2012). Son monomiarios y presentan una gran área cardinal de la bisagra en la valva derecha, una bisagra con dos grandes dientes en cada valva, un ligamiento hundido profundamente en una ranura triangular y en los adultos muestran dos crestas crurales adyacentes al ligamiento (Keen, 1971).

Los Bivalvos son organismos que han invadido una gran variedad de ambientes marinos. Su habilidad para dispersarse ha tenido consecuencias ecológicas y evolutivas favoreciendo "la divergencia simultánea de numerosas líneas con ascendencia común, en la formación de grupos con características adaptativas diferentes" (Simpson, 1953). Como resultado de su potencial genético y adaptativo, ha surgido una alta variabilidad de expresiones morfológicas y divergencias evolutivas. Esta amplia diversidad fenotípica existente, asociada a la incertidumbre de los procesos causales, ha dificultado la determinación taxonómica y el soporte de las propuestas filogenéticas en el grupo (Johnson *et al.*, 2001). Los integrantes del grupo de los Bivalvos han sido reclasificados en varias ocasiones a casi todos los niveles, lo cual ha derivado en confusiones filogenéticas y problemas de nomenclatura (Therriault *et al.*, 2004; Coan & Valentich-Scott, 2008).

Spondylus limbatus G.B. Sowerby II, 1847 comúnmente llamada "almeja burra", es una especie atractiva para la pesca comercial que ha tenido un papel económico, político y cultural importante en comunidades costeras del Pacífico Oriental Tropical. Actualmente, debido a su disminución del tamaño poblacional, esta especie se encuentra bajo protección especial en México. A pesar de su importancia, es poco lo que se conoce acerca de las relaciones evolutivas de esta especie. El presente trabajo se centra en el estudio de la especie *Spondylus limbatus* de la costa de Ecuador, con intención de caracterizar marcadores genéticos y aportar datos moleculares para una inferencia novedosa y preliminar de su posición filogenética.

Material y métodos

Recolección de muestras: con los permisos pertinentes se obtuvieron muestras de tejido del manto de 22 individuos pertenecientes a la especie *Spondylus limbatus* G.B. Sowerby II, 1847 procedentes de la Península de Sta. Elena en la costa ecuatoriana. Estas muestras fueron debidamente etiquetadas, refrigeradas durante el transporte y, posteriormente, preservadas en etanol al 96% y almacenadas a -20ºC hasta su análisis.

Aislamiento de ADN: de cada individuo se emplearon, aproximadamente, entre 10-30 mg de tejido y la extracción del ADN total se llevó a cabo mediante el paquete comercial: "E.Z.N.A.® Mollusc DNA Kit (OMEGA biotek)", siguiendo la metodología indicada por el fabricante. La estimación de la cantidad de ADN se llevó a cabo mediante lectura espectrofotométrica. Para ello, se diluye 1/10 una porción del material y se mide la absorbancia a 280 y a 260 nm para determinar la relación A260/280, utilizando como blanco 5 µL de tampón de elución del paquete comercial citado.

Con el fin de comprobar si el ADN se encuentra fragmentado, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, se cargan 5 µL de un marcador molecular 1-15 Kpb y 5 µL de cada muestra. A continuación, se dejan correr las muestras durante 15 minutos a 120V. Los fragmentos amplificados se visualizaron por fluorescencia de ácidos nucleicos utilizando el reactivo "RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology)" y un transiluminador UV "Vilber Lourmat".

Cebadores y diseño de cebadores: para la amplificación mediante PCR del gen ARN ribosomal 16S (16S rRNA) se utilizaron los cebadores 16Sa-5' y 16Sb-3' (Palumbi, 1998). Otros cebadores evaluados se localizarían en el gen mitocondrial COX1, incluyendo el juego LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) y el juego BIV-COIF/BIV-COIR

(Matsumoto, 2003). Asimismo, se ha procedido al diseño de cebadores dirigidos a la secuenciación del gen COI, a partir del genoma mitocondrial de todas las especies de Pectínidos presentes en la base de datos GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), con la herramienta en línea OligoArchitect (Sigma-Aldrich), obteniéndose los cebadores SponCOX1-1F (5'-CCWTTRATGTTGGGGACWCCTGATATAAG-3') y SponCOX1-2R (GTAAACAWGTGATGMCCCCAMACAAT).

Amplificación de secuencias: para valorar las concentraciones de magnesio y de ADN más apropiadas, se realizan PCRs de ajuste rutinarios para cada nuevo juego de cebadores a utilizar, tanto del gen COX1 como del 16S rRNA. El volumen de reacción fue de 12,5 µL constituido de la siguiente manera: 1 µL de ADN genómico (diluciones: 1/50, 1/10 y 1); 2,5 µL GoTaq Colorless Flexi Buffer (5x); 0,25 µL PCR Nucleotide Mix BT (40 mM); 0,75-1,75 µL $MgCl_2$ (concentraciones: 1,5 mM; 2,5 mM y 3,5 mM); 0,9375 µL cebador FOR (20 mM); 0,9375 µL del cebador REV (20mM), 6,0625 µL H_2O destilada y 0,0625 µL (5 unidades/µL) de GoTaq Flexi DNA polimerasa. Se empleó un termociclador "GeneAmp® PCR System 9700" siguiendo el siguiente protocolo: una desnaturalización a 95ºC durante 3 minutos seguidos de 40 ciclos integrados por una desnaturalización a 95ºC durante 1 minuto, un alineamiento a 50ºC durante 30 segundos, y una extensión a 72ºC por 30 segundos. Se realizó una extensión final a 72ºC durante 5 minutos.

Para los cebadores alternativos el protocolo a seguir fue: una desnaturalización a 95ºC durante 2 minutos seguidos de 40 ciclos integrados por una desnaturalización a 95ºC durante 40 segundos, una fusión a 50ºC, para BIVCOIF/R y a 60ºC, para SponCOX1F/2R, durante 40 segundos, y una extensión a 72ºC por 30 segundos. Se realizó una extensión final a 72ºC durante 5 minutos. Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se visualizan los resultados tal y como se ha descrito con anterioridad.

En las extracciones de ADN destaca la presencia de un pigmento marrón. Para su eliminación se prueba una filtración a través de membrana en tubos de tamaño de poro 100 kDa (Amicon Ultra 0,5 mL). Se escogen dos muestras de ADN con elevada pigmentación (individuos 15 y 20). Se filtra un volumen total de 475 µL (150 µL de ADN y 325 µL de agua destilada). Se realiza una segunda extracción del ADN de los individuos 15 y 20 mediante el paquete comercial: "PCR Clean-Up Gel Extraction. Nucleospin Gel and PCR Clean-Up". Alternativamente, para la separación de dicho pigmento se realiza un gel de agarosa al 1,5%. Se cargan 5 µL de las muestras de los individuos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 15 y 20 (de elevada pigmentación) junto con el marcador molecular citado y se dejan correr durante 15 minutos a 120V. A continuación, mediante el paquete comercial "E.Z.N.A.® Poly-Gel DNA Extraction Kit (OMEGA biotek)" se purifica el ADN de estos individuos siguiendo las instrucciones del fabricante.

Secuenciación y edición de secuencias: las amplificaciones de las secuencias de los diferentes individuos que resultaron positivas, fueron purificadas eliminando los cebadores y el exceso de nucleótidos trifosfato (dNTP's), empleando el paquete comercial Exo-SAP-IT (Affimetrix), y secuenciadas con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermofisher Sci.) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para cada reacción de secuenciación se utiliza un volumen final de 10 µL constituido de la siguiente manera: 2,75 µL Ready Reaction Mix (1 µL BigDyeMix y 1,75 µL Seq. Buffer), 1 µL de cebador (3,2 pmoles), 3 µL de ADN molde (50-100 ng) y 3,25 µL de H_2O. La secuenciación se lleva a cabo en ambas direcciones, directa e inversa. La reacción de secuenciación consistió en un ciclo de 4' a 96ºC seguido de 30 ciclos de 10'' a 50ºC y 5'' a 60ºC. Una vez obtenidos los productos de secuenciación se añaden 15 µL de formamida y son secuenciados en el servicio de secuenciación de la Universidad de Santiago de Compostela en un equipo 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los cromatogramas obtenidos son revisados y editados con BioEdit versión 7 (Hall, 1999).

Análisis de secuencias: las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con secuencias homólogas depositadas en el Genbank, estimándose las relaciones filogenéticas mediante i) la selección del modelo evolutivo más ajustado a los juegos de datos bajo el criterio bayesiano, ii) el cálculo de distancias genéticas en base al modelo seleccionado y iii) reconstrucción filogenética con el algoritmo de neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) y el software MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2015).

Resultados y discusión

Amplificación: se ha llevado a cabo una correcta extracción de ADN, obteniendo el ADN íntegro y con un peso molecular aproximado de entre 20.000 y 15.000 pb (Fig.1). Se ha obtenido una concentración media de 95,86 (D.E. = 68,49) µg/mL de ADN y una relación A260/280 variable entre 1,5 y 1,8. En contraste, ha sido detectada una pigmentación marrón, presente en células del manto y que ha sido coaislada con el ADN.

Una correcta amplificación del ADN del individuo 3 usando los cebadores dirigidos al gen 16S rRNA, se ha obtenido en condiciones favorables correspondientes a una dilución de ADN 1/10 y una concentración de magnesio 1,5 mM (Fig. 2). Se observa que, aquellas muestras de ADN con menor pigmentación o ausencia de este dan una amplificación de tamaño esperable, aunque acompañada de dímeros de cebadores. La mayoría de las muestras presentan el efecto inhibitorio de la pigmentación que impide la obtención del producto de

PCR. De las soluciones evaluadas, sólo ha mostrado efectividad la purificación del ADN a partir de una banda extraída del gel de agarosa conteniendo la mayoría de ADN de alto peso molecular, y tras su separación de la mancha de pigmento que migra de forma más rápida en electroforesis de agarosa.

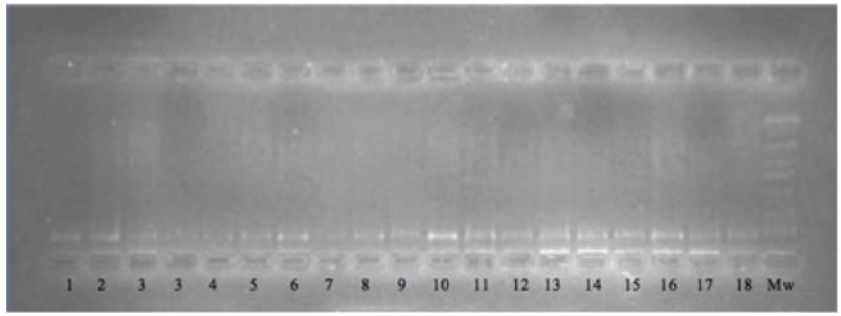


Figura 1.- Electroforesis en gel de 1,5% de agarosa de una muestra de los extractos obtenidos de ADN, permitiendo verificar su integridad con tamaño superior a los 15 Kpb y la ausencia de degradación.

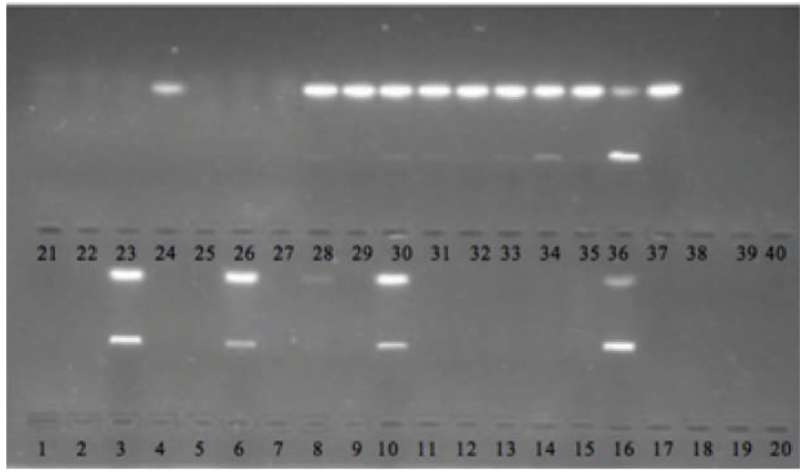


Figura 2.- Electroforesis en gel de agarosa 2,5%, para la visualización de los resultados de amplificación con los cebadores 16Sa/16Sb, a partir de distintas muestras de ADN (1-27) y de ADN purificado del gel (28-37).

Los resultados de la filtración a través de dispositivos con una membrana de tamaño de poro de 100 kDa han sido negativos. El pigmento no se ha eluído debido a su elevado peso molecular, de manera que se ha mantenido en solución junto con el ADN.

La amplificación de este ADN purificado con los cebadores "universales" LCO1490 y HCO2198 no ha sido eficiente. Estos cebadores, que han mostrado su utilidad en invertebrados, no son aplicables a este taxón. En consecuencia, se han evaluado juegos de cebadores alternativos BIV-COIF/BIV-COIR (Matsumoto, 2003) y SponCOX1F/2R.

Se observan resultados favorables en la evaluación de la amplificación con los cebadores diseñados (SponCOX1F/2R). Sin embargo, la amplificación con los cebadores BIVCOIF/ BIV-COIR muestra una elevada inespecificidad que, probablemente, pudiese ser reducida modificando las condiciones de PCR (Figura 3). En consecuencia, los cebadores SponCOX1F/2R serán los primeros candidatos para su aplicación en análisis poblacionales y en la obtención de un marcador de "barcoding" en el gen COX1.

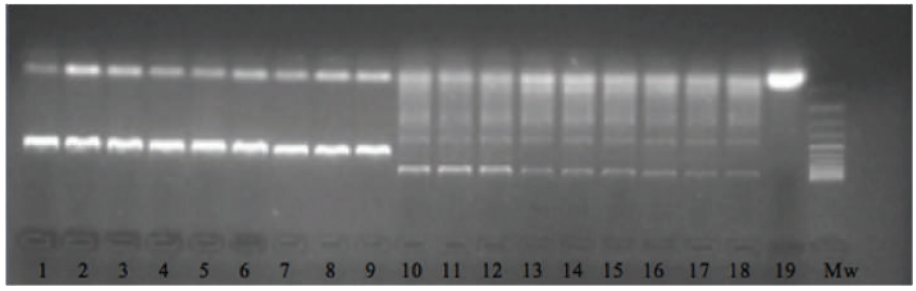


Figura 3.- Evaluación de la amplificación pacial dentro del gen COX1, con los cebadores SponCOX1F/2R (1-9); BIV-COIF/BIV-COIR (10-18), (19, control negativo).

Análisis de secuencias: se obtuvo una secuencia parcial del gen 16S rRNA de 525 pb y flanqueda con los cebadores 16Sa-5' y 16Sb-3' correspondiente a un individuo de *Spondylus limbatus*. La utilización de esta secuencia con la herramienta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) permite obtener 50 secuencias con los mayores valores de similitud respecto a secuencias depositadas en el GenBank. El alineamiento y filtrado de dichas secuencias permite obtener un alineamiento final de 630 pb de longitud e incluyendo 21 especies, a partir del cual se realiza el análisis de relaciones filogenéticas entre dichas especies.

La secuencia con mayor valor de similitud con la secuencia de la especie obtenida corresponde a *Spondylus ictericus*, mientras que la distancia genética aumenta significativamente entre especies no congenéricas (Tabla I).

Tabla I.- Estimaciones de la distancia genética entre secuencias. Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias en MEGA6. El análisis incluyó 21 secuencias. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos perdidos.

Spondylus limbatus 1	
EU379477 Spondylus ictericus	0.037
KC821506 Spondylus spinosus haplotype Mediterranean 1	0.136 0.110
EU379478 Spondylus nicobaricus	0.102 0.111 0.092
JX227728 Spondylus gaederopus isolate Kelyfos 1	0.130 0.121 0.094 0.086
KC429260 Spondylus ambiguus voucher BivAToL274	0.045 0.038 0.111 0.137 0.139
HM630445 Scaeochlamys squamata isolate J381	0.478 0.495 0.521 0.478 0.526 0.463
HM600754 Spondylus squamosus isolate HPC	0.111 0.111 0.084 0.053 0.102 0.112 0.495
KP300571 Spondylus wrightianus	0.150 0.158 0.146 0.165 0.141 0.158 0.496 0.138
JF339093 Spondylus victoriae	0.150 0.158 0.146 0.165 0.141 0.158 0.496 0.138 0.000
KR827548 Chlamys islandica	0.477 0.493 0.486 0.433 0.504 0.462 0.069 0.461 0.476 0.476
KF982789 Chlamys hastatacomplete sequence	0.442 0.458 0.451 0.450 0.496 0.428 0.069 0.427 0.411 0.411 0.045
KP300565 Swiftopecten swiftii	0.439 0.454 0.435 0.460 0.478 0.399 0.069 0.411 0.424 0.424 0.045 0.045
KC429259 Propeamussium sp. VLG2013 voucher BivAToL179	0.466 0.493 0.492 0.493 0.536 0.437 0.275 0.442 0.462 0.462 0.286 0.256 0.254
JF339132 Complicachlamys wardiana isolate 1	0.526 0.544 0.550 0.506 0.555 0.510 0.053 0.523 0.524 0.524 0.093 0.094 0.085 0.279
JF339120 Laevichlamys wilhelminae	0.507 0.524 0.492 0.488 0.496 0.480 0.085 0.491 0.455 0.455 0.126 0.118 0.109 0.289 0.037
HM630470 Laevichlamys sp. AA2011 isolate J369	0.422 0.437 0.474 0.435 0.466 0.408 0.030 0.437 0.438 0.438 0.069 0.046 0.061 0.255 0.061 0.085
JF339092 Propeamussium alcocki	0.493 0.518 0.541 0.499 0.543 0.488 0.372 0.474 0.470 0.470 0.343 0.334 0.332 0.102 0.379 0.405 0.366
FJ263642 Patinopecten caurinus	0.412 0.427 0.426 0.450 0.469 0.374 0.061 0.402 0.415 0.415 0.061 0.030 0.022 0.233 0.094 0.118 0.038 0.319
EU379470 Propeamussium dalli	0.102 0.110 0.068 0.084 0.094 0.119 0.492 0.076 0.128 0.128 0.485 0.450 0.434 0.466 0.520 0.488 0.473 0.513 0.424
AB103394 Mizuhopecten yessoensisgene	0.468 0.484 0.463 0.489 0.509 0.427 0.094 0.439 0.453 0.453 0.061 0.061 0.022 0.253 0.110 0.135 0.085 0.323 0.045 0.462

El modelo evolutivo seleccionado bajo el criterio bayesiano, e implementando en el programa MEGA6 para la reconstrucción filogenética, es el modelo de Tamura-Nei con el parámetro $\alpha = 0{,}35$; de una distribución gamma para la heterogeneidad en la tasa mutacional a lo largo de la secuencia (Tamura *et al.*, 2004).

El género Spondylus se agrupa monofiléticamente en un clado con un 100% de valor de soporte o "bootstrapping" (Felsenstein, 1985). Dentro de este se observan dos grupos, a pesar de que el valor soporte no es muy elevado. Por un lado, el grupo formado por las especies: *Spondylus limbatus*, *Spondylus ictericus* y *Spondylus ambiguus*; y por otro lado las especies: *Spondylus wrightianus*, *Spondylus victoriae*, *Spondylus squamosus*, *Propeamussium dalli* (probablemente representando un error experimental taxonómico), *Spondylus nicobaricus*, *Spondylus spinosus* y *Spondylus gaederopus*. La especie evolutivamente más próxima a *Spondylus limbatus* es *Spondylus ictericus*. La denominación hoy aceptada para este último taxón es *Spondylus tenuis Schreibers*, 1793, con distribución ceñida al Mar Caribe y Golfo de México. También *Spondylus ambiguus* Chenu, 1844 es sinónimo de *Spondylus tenuis*. Aunque es necesario una reconstrucción filogenética con más datos y genes más variables, la posición filogenética observada indicaría una probable relación de especies hermanas entre *S. limbatus* y *S. tenuis* (Fig. 4). Este es el común escenario observado en el área y para taxa marinos, con especies hermanas separadas por el evento vicariante de elevación del Istmo de Panamá, hace 3,5 millones de años (Avise, 1994).

Analizando la distancia genética observamos que entre *S. limbatus* y *S. tenuis* (GB: *S. ictericus*) su menor valor corresponde a 0,037. En consecuencia, una calibración aproximada de la tasa de mutación para esta secuencia parcial del gen 16S rRNA sería de 0,6% cada

millón de años. Un valor muy aproximado al medio (1%) del ADN mitocondrial, teniendo en cuenta que el gen ribosomal es el que presenta una de las tasas de mutación más lentas de los genes mitocondriales (Avise, 1994).

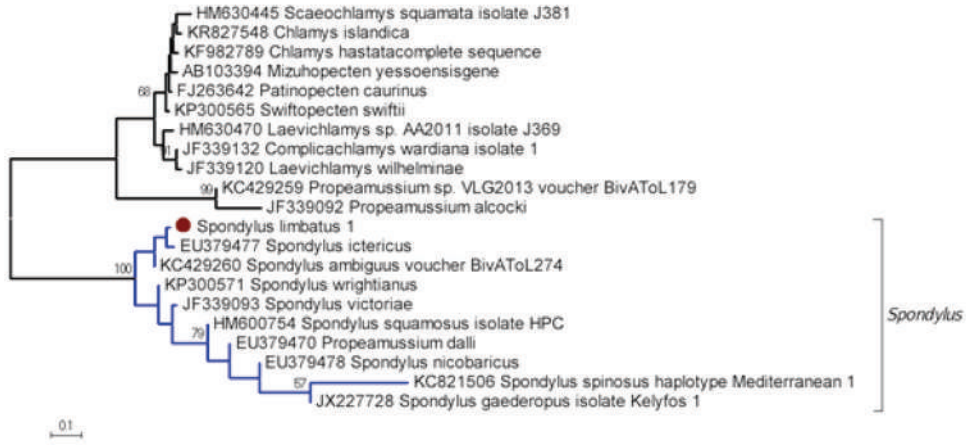


Figura 4.- Relaciones evolutivas de los taxones. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 2,23939649. Al lado de las ramas se muestra el porcentaje de replicas de los árboles (2000 réplicas). El árbol está dibujado a escala, las longitudes de las ramas se encuentra en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Tamura-Nei y se encuentra en las unidades del número de sustituciones de base por sitio (Tamura & Nei, 1993). La tasa de variación entre los sitios fue modelada con una distribución gamma (parámetro de forma = 0,35). El análisis incluyó 21 secuencias nucleotídicas. Todas las posiciones con un valor menor al 95% de cobertura fueron eliminadas, es decir, con menos de un 5% de gaps de alineamiento. Se analizaron un total de 384. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA6.

Conclusiones

1. *Spondylus limbatus* presenta un pigmento de coloración marrón en el manto, cuya naturaleza se desconoce, que coaisla con el ADN y tiene efecto inhibitorio en la PCR. Su peso es superior a los 100 kDa, siendo visible y separable por vía electroforética en gel de agarosa. Se comporta como un ADN de tamaño medio y tiene la misma carga que este. Para la obtención de ADN es necesario evitar este pigmento, por lo que es recomendable su obtención a partir del tejido muscular que no lo presenta.

2. Basándose en las secuencias disponibles, el género *Spondylus* es probablemente monofilético, y la especie *Spondylus limbatus* G. B. Sowerby II, 1847 se agrupa como especie hermana de *Spondylus tenuis* Schreibers, 1793 (siendo hoy sinónimos no aceptados: *Spondylus ambiguus* Chenu, 1844 y *Spondylus ictericus* Reeve, 1856).
3. Bajo la hipótesis de una vicarianza debido a la elevación del Istmo de Panamá y su calibración con esta datación, se estima una tasa de mutación del 0,6%, esperable para esta secuencia ribosomal mitocondrial.
4. Los resultados han permitido diseñar y evaluar exitosamente los cebadores SponCOX1F/2R para la obtención de secuencias parciales del gen COX1, que complementan los datos obtenidos y que representan los primeros datos moleculares descritos para *Spondylus limbatus*.

Agradecimientos

Al Dr. José Melena Cevallos, profesor de la Universidad Península de Santa Elena (UPSE) de Ecuador, por proporcionar los ejemplares de *Spondylus limbatus* utilizados para la realización de este trabajo.

Bibliografía

Avise J.C. 1994. *Molecular markers natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall. 398pp.

Benton M. 1993. *The Fossil record 2*. London: Chapman & Hall. 13: 252.

Coan E.V. & Valentich-Scott P. 2008. *Three nomenclatural notes on panamic bivalves*. The Festivus. 4: 49-54.

Coan E.V. & Valentich-Scott P. 2012. *Bivalve seashells of tropical west America: Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Northern Perú*. Publisher: Santa Barbara Museum of Natural History: 1st edition. 1258pp.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783-791.

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biogical sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series,* 41: 95-98.

Johnson M.P., Allocock A.L., Pye S.E., Chambers S.J. & Fitton D.M. 2001. The effects of dispersal mode on the spatial distribution patterns of intertidal molluscs. *Journal of Animal Ecology*, 70: 641-649.

Keen M. 1971 *Sea Shell of tropical best America. Marine mollusks from Baja California to Peru,* Standford University Press 2nd Ed. USA. 1064 pp.

Kumar S., Stecher G. & Tamura K. 2015. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0.

Lamprell K. 2006. *Spiny oyster: a revision of the living Spondylus species of the world.* Brisbane: Jean Lamprell. 119 pp.

Matsumoto M. 2003. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorphia Bivalvia from mtDNA COI Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 273: 429-440.

Palumbi S.R. 1998. Nucleic acid II: the polymerase chain reaction. *Molecular systematics.* D.M. Hillis C. Mortiz and B.K. Mable. Sunderland, Mass., Sinauer Associates: 205-247.

Poutiers J.M. 1995. Moluscos. In: W. Fischer F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, and V.H. Niem, editors. *Guía FAO para la identificacion de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro-Oriental. Vol. 1: Invertebrados.* Rome: Food and Agriculture Organization. 646 pp.

Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution,* 4: 406-425.

Sandweiss D.H. 1992. The archeology of Chincha fisherman: specialization and status in Inka Peru. Pittsburgh: *Bulletin of Carnegie Musseum of Natural History*. 29 pp.

Simpson G.G. 1953. *The major features in evolution*. Columbia Univesity Press, New York, USA. 434 pp.

Tamura K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution,* 10: 512-526.

Tamura K., Nei M. & Kumar,S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 101: 11030-11035.

Tamura K., Stecher, G. Peterson D., Filipski A. & Kumura S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 *Molecular Biology and Evolution,* 30: 2725-2729.

Therriault T.W., Docker M.F., Orlova M.I., Heath D.D. & MacIsaac H.J. 2004. Molecular resolution of the family Dreissenidae Mollusca: Bivalvia with emphasis on Ponyo-Caspian species, including first report of *Mytilopsis leucophaeata* in the Black Sea basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30: 479-489.

Caracterización genética preliminar de *Spondylus limbatus* G.B. Sowerby II, 1847, de la costa ecuatoriana

Lamas A., Quinteiro J., Rey-Méndez M.

Laboratorio de Sistemática Molecular, Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular, Universidade de Santiago de Compostela, CIBUS, Campus Vida, 15782-Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.



Introducción

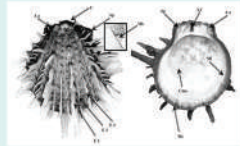
Los moluscos bivalvos de la familia Spondylidae se encuentran representados por un solo género, *Spondylus* Linnaeus, 1758, integra individuos conocidos comúnmente como 'escalopas' o 'ostras espinosas' y comprende cerca de 76 especies alrededor del mundo (Lamprell, 2006) presentes en la actualidad, y una especie fósil *Spondylus paulolucidus* P. Marshall, 1921. Se encuentran distribuidos en todos los océanos pero especialmente en aguas tropicales y subtropicales. En la costa oeste de América el género *Spondylus* se distribuye principalmente desde el Golfo de California (México) hasta Ecuador. Puede colonizar las costas de Perú como resultado de eventos de El Niño (Keen, 1971; Sandweiss, 1992; Penders, 1995).

La familia Spondylidae presenta una concha de tamaño medio-grande, fuertemente ecualpida con costillas radiales y espinosas, auriculas pequeñas y sin muesca bisal (Coan y Valentich-Scott, 2012). Son monomiarios y presentan una gran área cardinal de la bisagra en la valva derecha, bisagra con dos grandes dientes en cada valva, un ligamento bastante profundamente en una ranura triangular y los aductores marcados cerca a los anteriores del ligamento (Keen, 1971).

Los bivalvos son organismos que han invadido una gran variedad de ambientes marinos. Su habilidad para dispersarse ha tenido consecuencias ecológicas y evolutivas fundamentales. La dispersión planktónica de numerosas formas con ascendencia común, en la formación de grupos con características adaptativas diferentes (Simpson, 2015). Como resultado de su potencial genético y adaptativo, ha surgido una alta variabilidad de morfologías y divergencias evolutivas. Esta amplia diversidad fenotípica existente, asociada a la incertidumbre de las relaciones causales, ha dificultado la determinación taxonómica y el soporte de las propuestas filogenéticas en el grupo (Johnson et al., 2008). Los integrantes del grupo de los bivalvos han sido reclasificados en varias ocasiones a raíz todos los niveles, lo cual ha dificultado en confusiones filogenéticas y problemas de nomenclatura (Steindachner et al., 2008; Coan y Valentich-Scott, 2008).

La especie *Spondylus limbatus* (ahora *barrai*) ha tenido una gran importancia económica, política y cultural en comunidades costeras del Pacífico tropical. Ha sido de gran atracción para la pesca comercial, su concha se ha utilizado como moneda de intercambio, denominada 'mullo de los incas'. Era una ofrenda sagrada en rituales de fertilidad y también se ha usado como objeto de ornamentación.

Actualmente, debido a su disminución del tamaño poblacional, esta especie se encuentra bajo protección especial. A pesar de su importancia, es poco lo que se conoce acerca de las relaciones evolutivas de esta especie. El presente trabajo se centra en el estudio de la especie *Spondylus limbatus* de la costa de Ecuador, con intención de caracterizar marcadores genéticos y aportar datos moleculares para una inferencia taxonómica y preliminar de su posición filogenética.



Valva izquierda de Spondylus representada con sus características estructurales. Aa: Auricula anterior, Ap: Auricula posterior, U: Umbo, Mb: muesca bisal (sin muesca bisal para Spondylus). EL: Espinas primarias, ES: Espinas secundarias, ET: Espinas terciarias, LC: ligamento de la Charnela, Ma: bisagra exterior, Mi: bisagra interior. Cma: cicatriz muscular aductor.



Conchas de *Spondylus* como ornamentación de los incas.

Materiales y Métodos

Con los permisos pertinentes se obtuvieron muestras de tejido del manto de 22 individuos pertenecientes a la especie *Spondylus limbatus* procedentes de la Península de Santa Elena (Ecuador). El ADN total fue aislado a partir de 10-50 mg de tejido del manto utilizando el kit E.Z.N.A. Mollusc (Omega Bio-tek). La estimación de la cantidad de ADN se llevó a cabo mediante lectura espectrofotométrica. Se realizó también una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con el fin de comprobar la integridad del ADN extraído.

A continuación se llevan a cabo diferentes amplificaciones mediante PCR del gen 28S ribosomal 18S y del gen mitocondrial COI1. a partir de diferentes juegos de primers. Para el gen 16S rRNA se realizaron varias amplificaciones con el fin de determinar las condiciones. Se realizaron de amplificación en cuanto a concentración de ADN y magnesio utilizando los primers 16sa.5' y 16b.5' (Palumbi, 1996). Para el gen COI1 fueron utilizados varios juegos de primers: LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994), REV-COR/REV-COR (Matsumoto, 2003) y el juego de cebadores SpanCOI3.1F/SpanCOI3.2R diseñados a partir del genoma mitocondrial de todas las especies de Pectinidos presentes en el GenBank. Tras las amplificaciones se realizan posteriores electroforesis para visualizar los resultados.

Se observa la presencia de un pigmento marrón en la solución de ADN extraído que se intenta eliminar mediante: filtración a través de membranas de tamaño de poro 100 KDa, una segunda extracción del ADN y mediante una purificación del ADN a partir de fragmentos de gel de agarosa mediante el kit comercial E.Z.N.A. Poly-Gel DNA Extraction Kit (Omega-Biotek).

Las amplificaciones de los diferentes individuos que resultaron positivas fueron purificadas eliminando las cebadores y nucleótidos libres empleando el kit Exo-SAP-IT (Affymetrix), y secuenciadas con el Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Sci.). Los cromatogramas obtenidos son revisados y editados con BioEdit versión 7 (Hall, 1999).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con secuencias homólogas depositadas en el GenBank, estableciendo las relaciones filogenéticas mediante la selección del modelo evolutivo más ajustado a los juegos de datos bajo el criterio bayesiano, el cálculo de distancias genéticas en base al modelo seleccionado y la reconstrucción filogenética con el algoritmo de Neighbor-Joining, y el software MEGA versión 6 (Tamura et al. 2013).



Resultados y Discusión

Se llevó a cabo una correcta extracción obteniéndose un ADN íntegro con tamaño de entre 15-20 Kpb, una concentración media de 95.86 µg/mL y una relación A260/280 variable entre 1.5 y 2.0.

Se pudo conseguir una mejor amplificación de las muestras de ADN con una menor pigmentación, de manera que este pigmento probablemente ejerza un efecto inhibitorio de la PCR.

Se escogió el ADN del individuo 5, por presentar una baja pigmentación, usando cebadores diseñados al gen 16S rRNA. Se observan que solamente 6 muestras han amplificado y éstas se corresponden con unas condiciones favorables de una dilución de ADN 1:300 y una concentración de magnesio de 1.5 mM (Figura 1, 1-17).

Se logra separar el pigmento por purificación del ADN a partir de fragmentos de gel de agarosa y se lleva a cabo una amplificación en la que se puede observar que todas amplifican, indicando el efecto inhibitorio de dicho pigmento y, aunque débilmente, se utilizarán para la posterior secuenciación (Figura 1. 28-36).

Para la amplificación del gen COI1 se han utilizado cebadores universales (LCO1490/HCO2198) que no han dado resultados positivos por lo que se han evaluado dos juegos de primers alternativos. Un juego de primers diseñado específicamente para esta especie que han dado una correcta amplificación (Figura 2. 1-9). Un segundo juego de primers específico para bivalvos que muestran una elevada inespecificidad que probablemente pudiese ser reducida modificando las condiciones de PCR (Figura 2. 10-18).

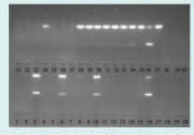


Figura 1. Visualización de los resultados de amplificación con los cebadores 16sa-5'/16sb-3'. a partir de muestras de: ADN sin purificar (1-17) y ADN purificado (28-36).

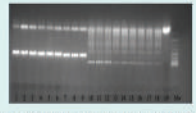


Figura 2. Evaluación de la amplificación del gen COI1 con los cebadores SpanCOI3F/2R (1-9) y REV-COR/REV-COR (10-18).

Se llevó a cabo la secuenciación del gen 28S ribosomal 18S del individuo 1 y se obtuvo una secuencia parcial de 525 pb y flanqueada con los cebadores 16sa-5' y 16sb-3'. Esta secuencia se alinea con 58 secuencias depositadas en el GenBank, y que presentan los mayores valores de similitud obteniéndose un alineamiento final de 618 pb para 23 especies. A partir de éste se realizará análisis de relaciones filogenéticas entre estas especies.

El modelo evolutivo seleccionado bajo el criterio bayesiano, es el modelo de Tamura-Nei con un parámetro α=0.35 de una distribución gamma para la heterogeneidad de la tasa de mutación a lo largo de la secuencia.

Se elabora una tabla de distancias genéticas donde se observa un menor valor entre la especie *Spondylus limbatus* y *Spondylus ictericus* con un valor de 0.437. Este valor aumenta significativamente entre especies no congenéricas (Tabla 1).

Se lleva a cabo una reconstrucción filogenética mediante el algoritmo Neighbor-Joining y se obtiene un árbol donde se observa que el género *Spondylus* se agrupa monofiléticamente con un valor del 100% de valor de bootstrapping, frente de éste se observan dos grupos. Un primer grupo formado por las especies: *Spondylus limbatus*, *Spondylus ictericus* y *Spondylus ambiguus*. Por otro lado se encuentran agrupadas las especies: *Spondylus wrightianus*, *Spondylus ictericus*, *Spondylus squammosus*, *Propamussium diegi* (**probablemente representando un error taxonómico**), *Spondylus nicobaricus*, *Spondylus spinosus* y *Spondylus gaederopus* (Figura 3).

La especie ecuatoriana más próxima a *Spondylus limbatus* es *Spondylus ictericus*, hoy en día denominada *Spondylus barrai*, cuya distribución se sitúa al Mar Caribe y al Golfo de México. Es probable que estas dos especies sean especies hermanas separadas por el evento ocurrente de elevación del Istmo de Panamá hace 3.5 millones de años (Knox, 1994).

Por último se ha estimado una calibración aproximada de la tasa de mutación para esta secuencia parcial del gen 28S ribosomal 18S y se corresponde con un 0.6% cada millón de años. Este es un valor muy aproximado al modelo del 28S ribosomal (del 1%), teniendo en cuenta que el gen ribosomal es el que presenta una de las tasas de mutación más lentas de los genes mitocondriales (Knox, 1994).

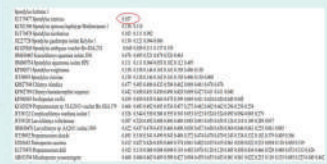


Tabla 1. Estimaciones de la distancia genética entre las 23 secuencias. Mayor similitud entre *Spondylus limbatus* y *Spondylus ictericus*.



Figura 3. Representación de las relaciones evolutivas de los taxones. Agrupación monofilética del género *Spondylus* con distinción de dos grupos. *Spondylus limbatus* especie hermana de *Spondylus ictericus* (*Spondylus barrai*).

Referencias

Avise, J. C. (1994). *Molecular markers natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall.

Coan, E. V. & Valentich-Scott, P. (2008). Three nomenclatural notes on panamic bivalves. *The Festivus*. 4: 50-54.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Johnson, M. P., Allcock, A. L., Fox, S. E., Chambers, S. J. & Piertney, S. B. (2006). The effects of dispersal mode on the spatial distribution patterns of intertidal molluscs. *Journal of Animal Ecology*. 75: 642-649.

Keen, M. (1971). *Sea Shells of tropical West America. Marine mollusks from Baja California to Peru*. Stanford University Press: 2nd Ed. USA. 1064 pp.

Lamprell, K. (2006). *Spiny oysters: a revision of the living Spondylus species of the world*. Brisbane: Ivan Lamprell. 119 pp.

Matsumoto, M. (2003). Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorphia (Bivalvia) from mtDNA COI sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27(3): 429-440.

Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acid II: the polymerase chain reaction. *Molecular systematics*. D. M. Hillis, C. Moritz and B. K. Mable. Sunderland, Mass., Sinauer Associates: 205-247.

Penders, J. M. (1995). Moluscos. In: H. Fischer, J. Knapp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, and V. H. Niem., editors. *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca pacífico centroriental. Vol. 1. Invertebrados*. Rome: Food and Agriculture Organization. 646 pp.

Sandweiss, D. H. (1992). *The archeology of Chinchorro fishermen: specialization and status in late Peru*. Pittsburgh, Bulletin of Carnegie Museum of Natural History. 28 pp.

Simpson, G. G. (1953). *The major features in evolution*. Columbia University Press, New York, USA. 434 pp.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Thiriault, T. M., Docker, M. F., Orlova, M. I., Heath, D. D. & MacKenzie, R. J. (2006). Molecular resolution of the family Dreissenidae (Mollusca: Bivalvia) with emphasis on Ponto-Caspian species, including first report of *Mytilopsis leucophaeata* in the Black Sea basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40: 479-489.

Caracterización molecular de recursos marinos de interés comercial en Ecuador: estudios preliminares

Quinteiro[1] J., González-Henríquez[2] N., Tomalá-Reyes[3] S., Flores-Suárez[3] D., Balón-Lainez[3] K., Rodríguez-Pozo[3] J., Cornejo[3] M.H., Chavarría-Viteri[3] J., Melena-Cevallos[3] J. & Villón[3] J.J.

[1]Departamento de Bioquímica e Bioloxia Molecular. CIBUS, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15706, Santiago de Compostela, A Coruña, España.
javier.quinteiro@usc.es

[2]Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, España.

[3]Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Santa Elena. Ecuador

Palabras clave

Anadara spp., *Ucides occidentalis*, *Cardisoma crassum*, *Opisthonema* spp., filogenia, COX1, 16S rRNA, Ecuador

Introducción

La identificación de especies marinas utilizando métodos taxonómicos tradicionales está a menudo entorpecida por controversias taxonómicas. El concepto relativamente nuevo del código de barras genético en la perspectiva marina es de interés, ya que esta técnica molecular puede ser útil en la evaluación de especies crípticas muy extendidas en el medio marino. Otras ventajas incluyen estudios de la diversidad biológica, genética de la conservación y la detección de especies exóticas u organismos no nativos en el medio marino. La

caracterización genética es uno de los puntos de partida para lograr objetivos de conservación de las especies, mantener la máxima cantidad de diversidad genética, así como una herramienta útil para la gestión de los recursos explotados, para ayudar a establecer los sistemas de uso y manejo de las especies. La utilización de secuencias de ADNmt específicas para la identificación rápida de especímenes no es nueva, sin embargo lo que es innovador del Código de Barras de ADN es que propone usar información dentro de una misma región génica, el gen COX1 del ADNmt, en todos los taxones y con condiciones de secuenciación estandarizadas. Los esfuerzos mundiales de códigos de barras de ADN en el hábitat marino incluyen Marbol, FishBol, CeDAMar, CMarZ, Tiburón-BOL, PeBOL, etc. Este trabajo es un estudio preliminar para la caracterización de las especies de interés comercial de Ecuador, se diseñaron primers específicos para cada grupo y se realizó una primera inferencia de las relaciones filogenéticas, en cada una de las especies estudiadas, mediante las secuencias parciales de los genes COX1 y 16SrRNA.

Materiales y métodos

A partir de tejidos de los organismos se ha procedido al aislamiento del ADN total (Tabla I) mediante los Kit Omega Bio-Tech (The E.Z.N.A.® Mollusc DNA Kit; The de los genes mitocondriales COX1 y 16S rRNA, con cebadores universales LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al*., 1994) y 16S rRNA (Palumbi *et al*., 1991), se realizó mediante los protocolos descritos en Quinteiro *et al.* (2015). Las secuencias nucleotídicas del 16S rRNA y las del fragmento del gen COX1, fueron alineadas entre sí utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA versión 5 (Tamura *et al*., 2011) y estimadas las relaciones filogenéticas mediante el cálculo de distancias y reconstrucción filogenética con el algoritmo de Neighbor-Joining con el software MEGA versión 6 (Tamura *et al.,* 2013). Las secuencias recortadas y alineadas fueron verificadas con la base de datos de GenBank (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), utilizando el software en línea Nucleotide Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Se diseñaron cebadores específicos usando las secuencias del gen COX1 en cada una de los géneros y/o especies estudiadas (Tabla II). Las secuencias consenso parciales amplificadas con los cebadores específicos diseñados en el gen COX1 del ADNmt, se han utilizado para reconstruir las relaciones filogenéticas de las especies de los géneros *Anadara* y *Opisthonema*. En el caso de *Cardisoma crassum* y *Ucides occidentalis*, se han utilizado las secuencias consenso de 16S rRNA debido a la falta de secuencias del COX1 disponibles en las bases de datos de las especies congenéricas, lo que impide su aplicación a la inferencia de las relaciones filogenéticas.

Tabla I.- Listado de organismos estudiados.

ANADARA			OPISTHONEMA			UCIDES	CARDISOMA
ASIM M197	ATUB - GMO111	AGRA M169	OLIBM 695 M	OBULSELS 284 A	OMEDSELS 297	UOCC-GMO258	CCRA EEL 424
ASIM M198	ATUB - MACH181	AGRA M175	OLIBM 696 M	OBULSELS 287	OMEDSELS 298 A	UOCC -GMO274	CCRA EEL 433
ASIM M199	ATUB - MACH191		OLIBM 700 A	OBULMSA 649	OMEDSELS 358	UOCC-GBA488	CCRA EEL 439
ASIM GMO251	ATUB - ESME393				OMEDSELS 368	UOCC-GBA496	CCRA EEL 453
	ATUB - ESME412				OMEDSELS 383	UOCC-GBA497	CCRA EEL 460
						UOCC-GBA508	CCRA SEPA 639
							CCRA SEPA 642
							CCRA SEPA 646

Tabla II.- Nuevos cebadores/*primers* específicos diseñados.

ESPECIES	PRIMERS ESP.	SECUENCIAS 5''	TM Tª
Anadara spp.	ANA-COX1-1F	5' GTGCTGGRACTGGTTGGACT-3'	61
	ANA-COX1-2R	5'-CACCTCCACCTTGAGGACGA-3'	63
Opisthonema spp.	OPIS-COX1-1F	5'-CCWCCTGCAATYTCACAATACCA-3'	62
	OPIS-COX1-2R	5'-TTCTGGGTGGCCAAAGAATCAG-3'	62
Ucides occidentalis	UCI-COX1-1F	5'-AGTAGTTACAGCCCACGCCTT-3'	61
	UCI-COX1-2R	5'-ACTCCGGCTAAATGAAGGGAG-3'	61
Cardisoma crassum	CCRA-COX1-1F	5'-GGAAATTGGCTCGTACCCCT-3'	60
	CCRA-COX1-2R	5'-GCTGCTARGGGTGGGTAAAC-3'	61

Resultados y discusión

Opisthonema spp.

La amplificación con los primers COX1F/COX2R (Quinteiro, unpubl.), generó un fragmento de, aproximadamente, 1800 pb conteniendo la secuencia completa del gen mitocondrial COX1. A partir de este fragmento se elaboró un alineamiento de 462 nucleótidos de longitud, incluyendo secuencias propias de *O. bulleri* (N=2), *O. medirastre* (N=4) y *O. libertate* (N=2). Además, se incluyeron un total de 23 secuencias parciales disponibles

en el Genbank para estas especies, conteniendo la única especie congenérica atlántica, *O. oglinum*. No ha sido posible considerar en este análisis a la especie endémica de Galápagos, *O. berlangai.*

Las tres especies congenéricas analizadas con distribución pacífica, se agrupan monofiléticamente con un elevado soporte de replicación (98%) (Fig. 1). Sin embargo, no se obtiene una clarificación de las relaciones entre estas especies, pudiendo deberse a una rápida y simultánea especiación de ellas y a la no inclusión de *O. berlangai* en el análisis. Como especie hermana de este grupo pacífico se sitúa *O. oglinum*, con distribución atlántica y mostrando una divergencia esperable para la separación interoceánica.

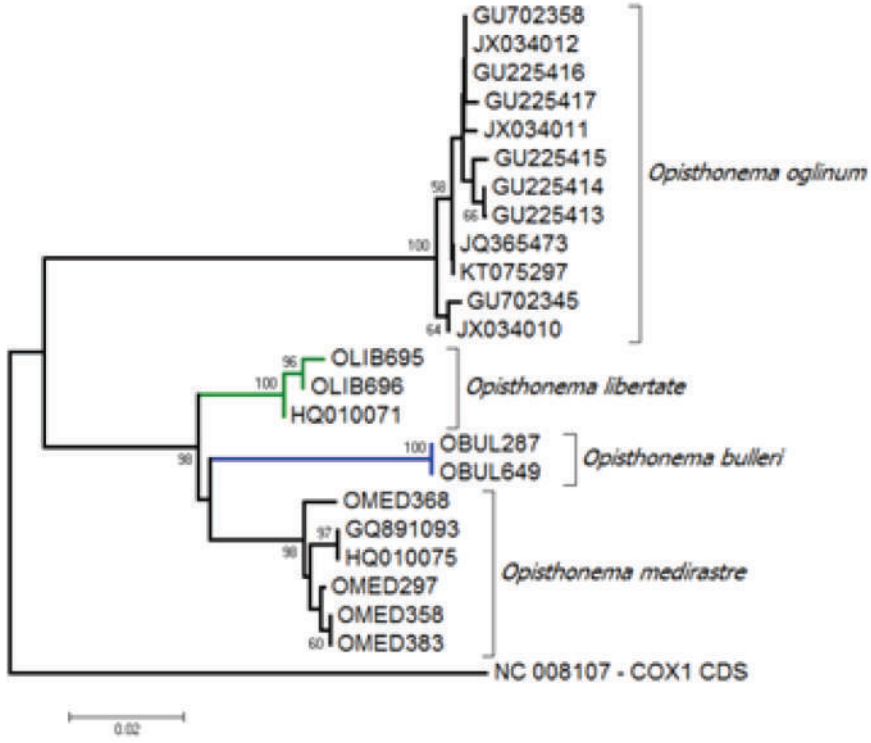


Figura 1.- Árbol filogenético obtenido con el programa MEGA mediante el método de Neighbor-Joining y basado en secuencias parciales del gen mitocondrial COX1. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei (1993), siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluido *Dorosoma cepedianum* (NC 008107-COX1 CDS). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), ocultándose los valores inferiores al 50%.

Anadara spp.

La secuenciación del fragmento amplificado con los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer et al., 1994), ha permitido obtener un alineamiento de 661 pb de secuencias parciales de gen mitocondrial COX1 en 3 individuos de *A. similis* y 5 de *A. tuberculosa*. Se han incluido datos homólogos disponibles en el Genbank para *A. grandis* y *A.similis,* tomando a *A. notabilis* como especie externa (*outgroup)*.

La divergencia entre las especies *Anadara similis* y *Anadara tubeculosa* es elevada, superior al 10%. Los individuos de ambas especies se agrupan monofiléticamente en sendos clados divergentes y bien soportados con valores de replicación del 100% (Fig. 2). *Anadara grandis* se sitúa como especie hermana de ambos taxa, utilizándose *A. notabilis* como grupo externo más próximo a las especies consideradas. La clasificación actual de *A. grandis* (Huber, 2015) como *Larkinia grandis* (Broderip & Sowerby, 1829) es incongruente con su posición en el árbol, donde se encuentra incluida entre las especies del género *Anadara.*

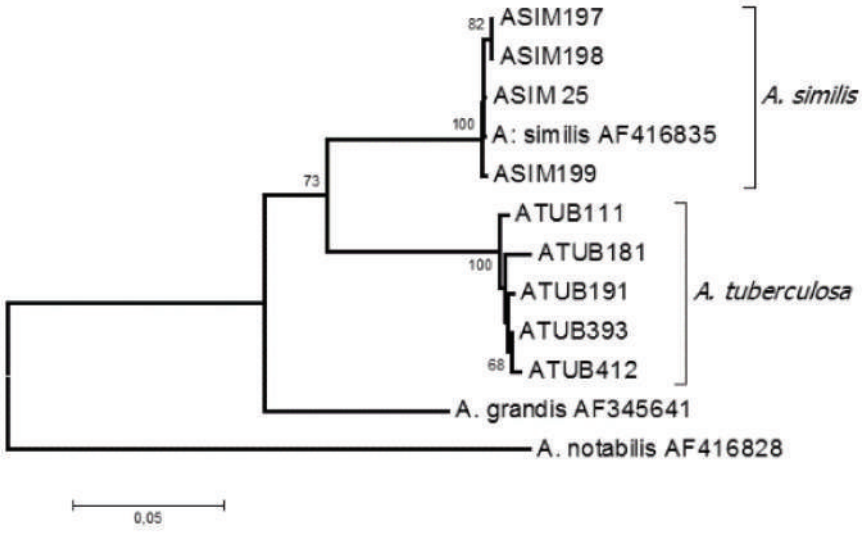


Figura 2.- Árbol filogenético obtenido con el programa MEGA mediante el método de Neighbor-Joining y basado en secuencias parciales del gen mitocondrial COX1. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei (1993), siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluido *A. notabilis*. El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), ocultándose los valores inferiores al 50%.

Cardisoma crassum (Smith, 1870)

La amplificación con los cebadores 16Sa-5' y 16Sb-3' (Palumbi *et al.*, 1996), permitieron obtener un alineamiento parcial de 522 pb del gen 16S rRNA para 8 individuos de dos localidades en *Cardisoma crassum* (CCRAEL424; CCRAEL433; CCRAEL439; CCRAEL453; CCRAEL460; CCRAPA639; CCRAPA642; CCRAPA646). En esta secuencia sólo se detectan dos sitios polimórficos, con transiciones entre bases púricas y generando tres haplotipos distintos. La incorporación de datos homólogos de las especies de *Cardisoma* disponibles en el Genbank ha permitido elaborar un alineamiento de 529 pb y 29 secuencias, incluyendo así las otras 3 especies congenéricas: *C. armatum*, *C. carnifex* y *C. guanhumi*, y *Discoplax gracilipes* como grupo externo (Fig. 3).

La secuencia parcial del gen COX1, amplificada con los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994), ha permitido obtener un alineamiento de 658 pb de longitud para los 8 individuos de *C. crassum*, siendo la primera secuencia disponible de esta especie para este marcador fundamental (Código de barras "barcoding"). Sin embargo, la ausencia de secuencias homólogas para las especies congenéricas impide su aplicación a la inferencia filogenética.

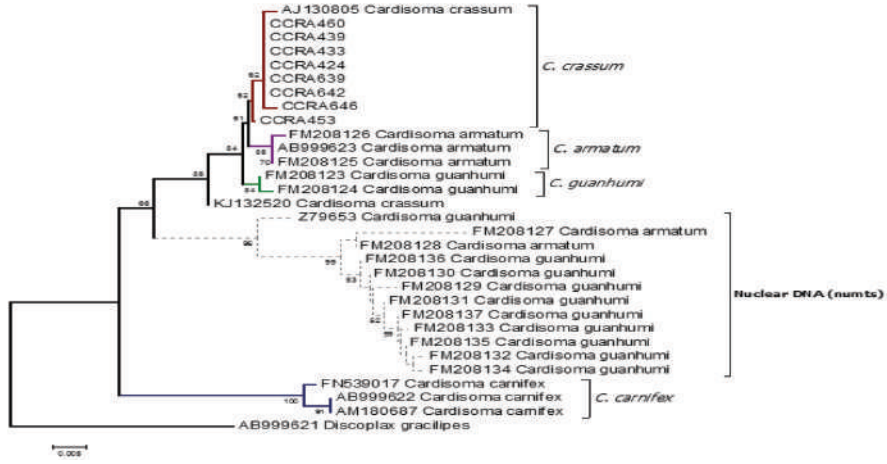


Figura 3.- Árbol filogenético obtenido con el programa MEGA mediante el método de Neighbor-Joining y basado en secuencias parciales del gen mitocondrial 16S rRNA. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei (1993), siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluido *Discoplax gracilipes* (AB999621). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), ocultándose los valores inferiores al 50%.

Ucides occidentalis (Ortmann, 1897)

La amplificación con los cebadores 16Sar-5' y 16Sbr-3' (Palumbi *et al.,* 1996), ha permitido la obtención de un alineamiento de 530 pb de longitud incluyendo 6 individuos de dos localidades en *Ucides occidentalis* (UOCCGMO258; UOCCGMO274; UOCCGBA488; UOCCGBA496; UOCCGBA497; UOCCGBA508).

Se han obtenido 5 haplotipos diferentes que se agrupan con otros haplotipos previamente descritos (Ordinola, 2012) para Tumbes (Perú). Como clado hermano se sitúan los haplotipos de la única especie congenérica, *Ucides cordatus,* mostrando la relación de especies hermanas con distribuciones aisladas por el Istmo de Panamá (Fig. 4).

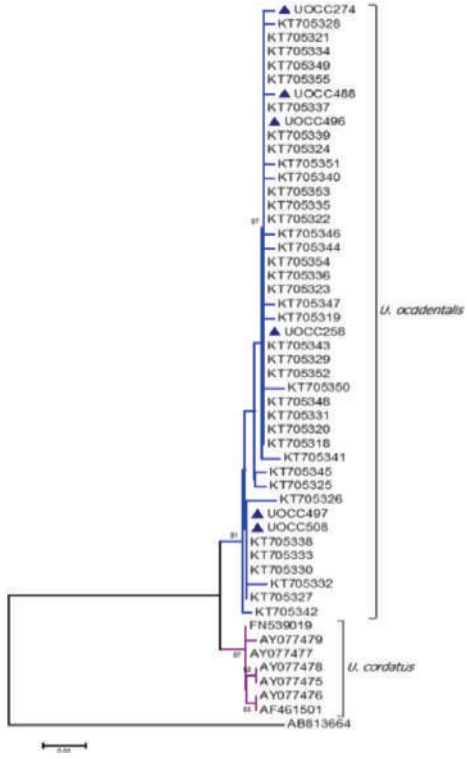


Figura 4.- Árbol filogenético obtenido del programa MEGA mediante el método de Neighbor-Joining y basado en secuencias parciales del gen mitocondrial 16SrRNA. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei (1993), siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluido *Uca herradurensis* (AB813664). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), ocultándose los valores inferiores al 50%.

Conclusiones

- Las tres especies congenéricas de Opisthonema (*O. bulleri, O. libertate, O. medirastre*) se agrupan monofiléticamente, pero no se observa una clarificación en la relaciones filogenéticas entre éstas tres especies, pudiendo deberse a una rápida y simultánea especiación de ellas o a la no inclusión de la especie endémica de Galapagos, por lo que es necesario incluir muestras de la especie *O. berlangai* en próximos trabajos para poder hacer los análisis.

- La divergencia entre las especies *Anadara similis* y *Anadara tuberculosa* es elevada, se agrupan monofiléticamente en clados divergentes con valores de replicación del 100%. *Anadara grandis* se sitúa como especie hermana de ambos taxa, por lo que resulta incongruente su clasificación actual como *Larkinia grandis*.
- Se comprobó la dificultad de la secuencia 16S rRNA para definir relaciones filogenéticas recientes entre las especies próximas (monofileticas) de *Cardisoma*. La ausencia de secuencias homólogas del gen COX1 para las especies congenéricas, impidió su aplicación para hacer la inferencia filogenética en este trabajo.
- Se obtuvieron 5 haplotipos diferentes para *Ucides occidentalis*, que se agruparon con otros previamente descritos para Tumbes (Perú). Como clado hermano se sitúan los haplotipos de la única especie congenérica, *Ucides cordatus*, mostrando la relación de especies hermanas con distribuciones aisladas por el Istmo de Panamá.

Agradecimientos

Al Programa PROMETEO (SENESCYT, Gobierno de Ecuador). A la Universidad Estatal Península de Santa Elena (CIBPA, CIAP, laboratorios de biología y microbiología), y al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la ESPOL (Escuela Politécnica del Litoral). A los Laboratorios, SISMOL de la Universidad de Santiago de Compostela y BIOMOL de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Bibliografía

Folmer O. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotecnology*, 3(5): 249-299.

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, Series 41: 95-98.

Huber M. 2015. *Compendium of bivalves* **2.** Harxheim: ConchBooks. 907 pp.

Ordinola, A. 2012. Diversity and population genetic structure of mangrove crab (*Ucides occidentalis*) in the Tumbes region. Obtenido de http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Palumbi S.R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics*, 2nd ed., Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (eds.) Pp. 205-247. Sinauer Associates Inc.

Quinteiro J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Pérez-Martín R.I., Rey-Méndez M. & Mackie I.M. 1998. Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in species Identification of Canned Tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:1662-1669.

Quinteiro J., Manent P., Assunção P., Medina C. & Sarmiento R. 2015. *Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas*. Edit. González N. & Rey-Méndez M. BIOMOL Revisión Nº 1. Marzo 2015.

Tamura K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution,* 10:512-526.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731-2739.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Sudhir K. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution,* 30 (12): 2725–2729.

Caracterización molecular de recursos marinos de interés comercial en Ecuador: estudios preliminares

Quinteiro, J.[1], González-Henríquez, N.[2], Tomalá-Reyes, Sh.[1], Flores-Suárez, D.[1], Balón-Lainez, K.[1], Rodríguez-Pozo, J.[1], Cornejo, M.H.[1], Chavarría-Viteri, J.[1], Melena-Cevallos, J.[1], Villón, J.[1]

Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Santa Elena. Ecuador[(1)]
Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canarias, Islas Canarias, España[(2)]
Departamento de Bioquímica e Biología Molecular. Universidade de Santiago de Compostela España[(3)]







Introducción

La Identificación de especies marinas utilizando métodos taxonómicos tradicionales está a menudo entorpecida por controversias taxonómicas. El concepto relativamente nuevo del código de barras genético en la perspectiva marina es de interés ya que esta técnica molecular puede ser útil en la evaluación de especies crípticas muy extendidas en el medio marino. Otras ventajas incluyen estudios de la diversidad biológica, genética de la conservación y la detección de especies exóticas u organismos no nativos en el medio marino. La caracterización genética es uno de los puntos de partida para lograr objetivos de conservación de las especies, mantener la máxima cantidad de diversidad genética, así como una herramienta útil para la gestión de los recursos explotados, para ayudar a establecer los sistemas de uso y manejo de las especies. La utilización de secuencias de ADNmt específicas para la identificación rápida de especímenes no es nueva, sin embargo lo que es innovador del Código de Barras de ADN es que propone usar información dentro de una misma región génica, el gen COX1 del ADNmt, en todos los taxones y con condiciones de secuenciación estandarizadas. Los esfuerzos mundiales de códigos de barras de ADN en el hábitat marino incluyen Marbol, FishBol, CeDAMar, CMarZ, iBarcode-BOL, PeBOL, etc.
En este trabajo preliminar para la caracterización de las especies de interés comercial de Ecuador, se ha realizado una primera inferencia de las relaciones filogenéticas en cada una de las especies estudiadas mediante las secuencias parciales de los genes COX1 y 16SrRNA.

Material y métodos

A partir de los tejidos de los organismos se ha procedido al aislamiento del ADN total mediante el Kit Omega Bio-Tech (Tissue y Mollusc) Tabla 1. La amplificación y secuenciación de fragmentos de los genes mitocondriales COX1 y 16SrARN con cebadores universales LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) y 16SrARN (Palumbi *et al.*, 1991), se realizó mediante los protocolos descritos en Quinteiro *et al.*, 2015. Las secuencias nucleotídicas del 16SrARN y las del fragmento del gen COX1, fueron alineadas entre sí utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011) y estimadas las relaciones filogenéticas mediante el cálculo de distancias y reconstrucción filogenética con el algoritmo de Neighbor-Joining con el software MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias recortadas y alineadas fueron verificadas contra la base de datos de GenBank (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) utilizando el software en línea Nucleotide Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Se diseñaron cebadores específicos usando las secuencias del gen COX1 en cada una de los géneros y/o especies estudiadas Tabla 2. Las secuencias consenso parciales amplificadas con los cebadores específicos diseñados en el gen COX1 del ADNmt, se han utilizado para reconstruir las relaciones filogenéticas de las especies de los géneros *Anadara*, *Opisthonema*. En el caso de *Cardisoma* y *Ucides*, se han utilizado las secuencias consenso de 16S rRNA debido a la falta de secuencias del COX1 disponibles en las bases de datos de las especies congenéricas, lo que impide su aplicación a la inferencia de las relaciones filogenéticas.

Tabla 1.- Listado de organismos estudiados

Tabla 2: Nuevos cebadores/primers específicos diseñados

RESULTADOS

Opisthonema



La amplificación con los primers COX1F/COX2R (Quinteiro, unpubl.) generó un fragmento de aproximadamente 1800pb conteniendo la secuencia completa del gen mitocondrial COX1. A partir de este fragmento se elaboró un alineamiento de 462 nucleótidos de longitud, incluyendo secuencias propias de *O. bulleri* (N=2), *O. medirastre* (N=4) y *O. libertate* (N=2). Además, se incluyó un total de 23 secuencias parciales disponibles en el Genbank para estas especies, conteniendo la única especie congenérica atlántica, *O. oglinum*. No ha sido posible considerar en este análisis a la especie endémica de Galápagos, *O. berlangai*.
Las tres especies congenéricas analizadas con distribución pacífica se agrupan monofiléticamente con un elevado soporte de replicación (98%) Figura 1. Sin embargo, no se obtiene una clarificación de las relaciones entre éstas 3 especies, pudiendo deberse a una rápida y simultánea especiación de ellas y a la no inclusión de *O. berlangai* en el análisis. Como especie hermana de este grupo pacífico se sitúa *O. oglinum*, con distribución atlántica y mostrando una divergencia esperable para la separación interoceánica.

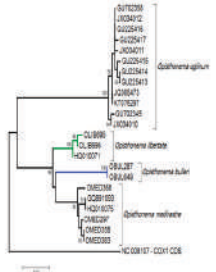


Figura 1. Árbol filogenético obtenido con el programa MrBAYES mediante el método de Neighbor-Joining a basado en secuencias parciales del gen mitocondrial COX1. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei, siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluida *Dactylus quadricornis* (NC 006327 COX1 CDS). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (1000). Acotándose los valores inferiores al 50%.

Cardisoma crassum



La amplificación con los cebadores 16Sa-5' y 16Sb-3' (Palumbi *et al.*, 1991), permitieron obtener un alineamiento parcial de 522 pb del gen 16S rRNA para 8 individuos de 2 localidades en *Cardisoma crassum* (CCRAEL424; CCRAEL433; CCRAEL439; CCRAEL453; CCRAEL460; CCRAPA639; CCRAPA642; CCRAPA646). En esta secuencia sólo se detectan 2 sitios polimórficos, con transiciones entre bases púricas y generando 3 haplotipos distintos. La incorporación de datos homólogos de las especies de *Cardisoma* disponibles en el Genbank ha permitido elaborar un alineamiento de 529 pb y 29 secuencias, incluyendo así las otras 3 especies congenéricas: *C. armatum*, *C. carnifex* y *C. guanhumi*, y *Discoplax gracilipes* como grupo externo. Figura 3
La secuencia parcial del gen COX1, amplificada con los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994), ha permitido obtener un alineamiento de 658 pb de longitud para los 8 individuos de *C. crassum*, siendo la primera secuencia disponible de esta especie para este marcador fundamental (Código de barras "barcoding"). Sin embargo, la ausencia de secuencias homólogas para las especies congenéricas impide su aplicación a la inferencia filogenética.

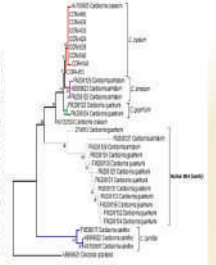


Figura 3. Árbol filogenético obtenido con el programa MrBAYES mediante el método de Neighbor-Joining a basado en secuencias parciales del gen mitocondrial 16SrRNA. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei, siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluida *Uca heteroleptis* (AB813664). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000) acotándose los valores inferiores al 50%.

Anadara



La secuenciación del fragmento amplificado con los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer et al., 1994), ha permitido obtener un alineamiento de 661 pb de secuencias parciales de gen mitocondrial COX1 en 3 individuos de *A. similis* y 5 de *A. tuberculosa*. Se han incluido datos homólogos disponibles en el Genbank para *A. grandis* y *A.similis* tomando a *A. notabilis* como especie externa "*outgroup*".
La divergencia entre las especies *Anadara similis* y *Anadara tuberculosa* es elevada, superior al 10%. Los individuos de ambas especies se agrupan monofiléticamente en sendos clados divergentes y bien soportados con valores de replicación del 100% Figura 2. *A. grandis* se sitúa como especie hermana de ambos taxa. *A. notabilis* se ha utilizado como grupo externo más próximo a las especies consideradas. La clasificación actual de *A. grandis* (Huber M. 2015) como Larkinia grandis (Broderip & G. B. Sowerby I, 1829) es incongruente con su posición en el árbol, donde se encuentra incluida entre las especies del género *Anadara*.

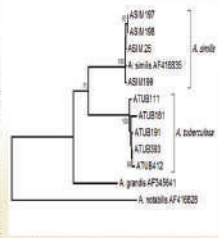


Figura 2. Árbol filogenético obtenido con el programa MrBAYES mediante el método de Neighbor-Joining a basado en secuencias parciales del gen mitocondrial COX1. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei, siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluida *A. notabilis*. El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), acotándose los valores inferiores al 50%.

Ucides occidentalis



La amplificación con los cebadores 16Sar-5' y 16Sbr-3' (Palumbi et al., 1998), ha permitido la obtención de un alineamiento de 530 pb de longitud incluyendo 6 individuos de 2 localidades en Ucides occidentalis (UOCCGMO258; UOCCGMO274; UOCCGBA488; UOCCGBA496; UOCCGBA497; UOCCGBA508).
Se han obtenido 5 haplotipos diferentes que se agrupan con otros haplotipos previamente descritos (Ordinola, 2012) para Tumbes, Perú. Como clado hermano se sitúan los haplotipos de la única especie congenérica *Ucides cordatus* mostrando la relación de especies hermanas con distribuciones aisladas por el Istmo de Panamá (Figura 4).
Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei, siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo "outgroup" fue incluido *Uca herradurensis* (AB813664). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000) ocultándose los valores inferiores al 50%.



Figura 4. Árbol filogenético obtenido del programa MEGA mediante el método de Neighbor-Joining a basado en secuencias parciales del gen mitocondrial 16SrRNA. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei, siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluida *Uca heteroleptis* (AB813664). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), acotándose los valores inferiores al 50%.

Bibliografía

Palumbi, S. (1996). "PCR-primers for amplification of mitochondrial 12s ribosomal RNA, cytochrome b and ND5." Molecular Marine Biology and Biotechnology: 205-206.
Folmer, O., et al. (1994). "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates." Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5): 294-299.
Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
Huber, M. (2015). Compendium of Bivalves. 2. Hackenheim, ConchBooks. 907 pp.
Ordinola, S. (2012). Diversidad y estructura genética de cuatro especies de manglares cada cuatro: cangrejos (Ucides occidentalis) y de dos "pumpo negro" (Mytella spp.) en el norte del Perú. Tesis para optar el título de Biólogo con mención en Biología Marina. Universidad Nacional Agraria La Molina. 120 pp.
Quinteiro J., Rodríguez-Castro, M., Rodríguez-Ruiz, M., Rodríguez-Suárez, M., Rey-Méndez, M., Sanjuán, A., Seijo, J.C. (2015). Length Polymorphism in Mitochondrial Genes to Species Identification of Commercial Tuna. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46:8382-8395.
Quinteiro J., Mariscal R., Rodríguez M., Rodríguez C., Lamelas M. Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas. ISBN: Servicio Pub. N. Bay Publicaciones SC. BOMARE, Biocentro Nº 1, Marzo 2015.
Palumbi, S. R. (1996). The polymerase chain reaction. Molecular systematics. D. M. Hillis, C. Moritz and B. K. Mable. Sunderland, Mass., Sinauer Associates: 205-247.
Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology Evolution; 28(10):2731-9. doi: 10.1093/molbev/msr121. Epub 2011 May 4.
Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12), 2725–2729.

Agradecimientos:
Al Programa PROMETEO SENESCYT. A la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), CIAP, Laboratorio de Biología y Microbiología, a el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la ESPOL (Escuela Politécnica del Litoral), A las Laboratorio, GENÓMICA de la Universidad de Santiago de Compostela y BIOMAR de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria por el asesoramiento y apoyo científico de los trabajos.

Characterization of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* strains isolated from cultured sea bass

Fernández-Álvarez C., Torres-Corral Y. & Santos Y.
Departamento de Microbiología y Parasitología, Edificio CIBUS-Facultad de Biología e Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
clara.fernandez.alv@gmail.com

Abstract

Furunculosis is a bacterial fish disease caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* with a widespread distribution and negative economic impact on cultured fish. This work reports on the characterization of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains isolated from diseased seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) farmed in Spain, based on phenotypic, biochemical, serological and chemotaxonomic tests. Reference strains of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated from different fish species were used as positive controls for comparative purposes. Phenotypic tests demonstrated that strains isolated from sea bass showed a phenotypic profile similar to that shown by strains isolated from salmonids and non-salmonid fish. All the isolates from sea bass were sensitive to all the antimicrobial agents used, except to oxytetracycline and pteridine. Slide agglutination and Dot Blot analysis showed that antigens from all strains isolated from sea bass and reference strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* reacted with the anti-*A. salmonicida* TO96 7.1 serum. Analysis of cellular fatty acid content, lipopolysaccharides and proteins (using SDS-PAGE and MALDI-TOF techniques) corroborated that *A. salmonicida* constitutes a homogeneous group. Infectivity trials conducted in sea bass, turbot and rainbow trout demonstrated that bacteria isolated from sea bass were virulent at doses ranging from $2x10^7$ to $2x10^4$ CFU per fish.

Key words

Characterization, *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*, SDS-PAGE, Fatty acids, MALDI-TOF.

Introduction

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* is a Gram-stain negative bacterium causing typical furunculosis, a bacterial fish disease that affects salmonid and non-salmonid fish, producing important economic losses in the aquaculture sector (Austin & Austin, 2007). This pathogen can penetrate fish through three major routes: lesions on the skin, gills as well as through the intestinal epithelia of fish, disseminating throughout the tissues and producing lesions in the skin, exophthalmia, haemorrhages in gills, muscle and internal organs, septicaemia and acute mortality in susceptible fish (Austin & Austin, 2007). In 2016, Fernández-Álvarez *et al*., described for the first time the isolation of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* from sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in a farm located in the Mediterranean coast of Spain. Sea bass, *Dicentrarchus labrax*, is one of the most economically important species in the marine aquaculture sector. In the last decades, sea bass farming has significantly increased in Spain and in Mediterranean areas. As a consequence, the number of outbreaks of bacterial diseases has also increased. The aim of this work was the characterization of the bacteria isolated from diseased sea bass farmed in Spain. The characterization was based on phenotypic, biochemical, serological and chemotaxonomic tests.

Material and methods

- Bacterial strains

Ten strains isolated from sea bass cultured in a fish farm of the Mediterranean coast of Spain were used in this study (Table I). Reference strains of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* from the American Type Culture Collection (ATCC) and strains isolated from different fish species of our own collection, were used as positive controls and for comparative purposes. Stock cultures of the strains were stored at -30ºC in Microbank™ commercial

medium (Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada) until passage on trypticase soy agar supplemented with 1% of NaCl (TSA-1) at 18±1ºC during 2-3 days for characterization studies.

❖ Phenotypic characterization

Bacterial strains isolated from sea bass were characterized using morphological, physiological and biochemical standard tests, and API 20E (BioMérieux, Madrid, Spain) as previously described (Santos *et al*., 1993).

Table I.- Sea bass isolates and reference strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* used in this study.

Bacteria	**Source**	**API 20E**
Strains isolated from sea bass		
SK164/12.1	*Dicentrarchus labrax*	6006104
SK164/12.2	*D. labrax*	6006104
SK164/12.3	*D. labrax*	6006104
SK164/12.4	*D. labrax*	6006104
SK164/12.5	*D. labrax*	6006104
SK181/12.1	*D. labrax*	4006104
SK181/12.2	*D. labrax*	4006104
SK181/12.3	*D. labrax*	4006104
SK181/12.4	*D. labrax*	4006104
SK181/12.5	*D. labrax*	4006104
Reference strain		
A. salmonicida subsp. *salmonicida* TO96 7.1	*Scophthalmus maximus*	6006104
A. salmonicida subsp. *salmonicida* MT416	*Salmo salar*	2006104
A. salmonicida subsp. *salmonicida* AsV09.2.15	*Oncorhynchus mykiss*	2006104
A. salmonicida subsp. *salmonicida* ATCC33658	*S. salar*	6006104

Sea bass isolates were also evaluated for their halotolerance by its growth on nutrient agar containing different concentrations of NaCl (0 to 10%). Susceptibility to antimicrobials was evaluated by the agar diffusion tests following the procedures of the Clinical and Laboratory Standards Institute document M42-A (CLSI, 2006). Antimicrobial agents (Oxoid and BD) and concentrations used were: ampicillin (10 µg), amoxicillin (25µg), flumequine (30µg), oxytetracycline (30µg), enrofloxacin (5µg), florfenicol (30µg), thrimethoprim-sulfametoxazole

(25 µg), oxolinic acid (2 µg) and pteridine (150 µg). The quality control strain *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, was used as positive control in all the assays. All incubations were carried out at 18±1ºC.

❖ Serological characterization

The serological characterization was performed using the slide agglutination and Dot Blot assay as previously described (Fernández-Álvarez *et al*., 2016). The tests were carried out using whole cell (formalin inactivated bacterial suspensions) and "O" antigens (100ºC h^{-1} treated bacterial suspensions) adjusted to contain 10^9 cells mL^{-1} and rabbit whole cell antiserum raised against the strain TO96 7.1 of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* produced in our laboratory as described by Santos *et al.* (1995).

❖ Chemotaxonomic analysis

The fatty acid profile of all strains used in the study was performed in duplicate in different cultures of the same bacterium following the standardized procedures for the Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID Inc., Newark, DE, USA).

Proteomic analysis of all strains used in the study was performed by MALDI-TOF mass spectrometry analysis as previously described by Fernández-Álvarez *et al*. (2016). The peak lists generated from each strain were imported, analysed by standard pattern matching using BioTyper 3.0 software (Bruker Daltonics, GmbH) and results were expressed using the criteria proposed by the manufacturer. The identification was considered reliable at the species level, if the score value was higher than 2. The SPECLUST software was used to process the spectra obtained for each bacterial sample, to determine the characteristic common peak masses (m/z) of the strains. Mass range of 2.000-10.000 m/z was used for spectral analysis. Similarities were calculated using curve-based (Pearson Product Moment Correlation Coefficient, PPMCC), as well as band-based (Jaccard similarity coefficient) measures and single-linkage. For cluster analysis IBM SPSS statistics V22 was used.

Lipopolysaccharides (LPS) from all strains used in the study were obtained following the method described by Hitchcock & Brown (1983). Total membrane proteins were obtained as described (Santos *et al*., 1995). Protein concentration was quantified using the fluorimeter Qubit® 2.0 and the Qubit® Protein Assay Kit system. The LPS and proteins were analysed by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) using the Bio-Rad Mini Protean II slab cell system. Standard protein markers from Bio-Rad (Laboratories, Richmond, California) were used as controls. Proteins were stained with Comassie brilliant blue R-250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), and LPS were silver stained by using the Silver Stain Plus method (Bio-rad).

Immunoblot analysis of LPS and proteins were performed basically as described by Towbin *et al.* (1979) using serum against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain TO96 7.1 and goat anti-rabbit immunoglobulin G-alkaline phosphatase conjugate (Bio-Rad) as primary and secondary antibodies. Bands were visualized after incubation of the membrane in 0,1 M carbonate buffer (pH 9,8) containing tetrazolium blue (Sigma) (0.3mg mL^{-1}) and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate toluidine salt (BCIP) (0.15 mg mL^{-1}) (Fermentas International Inc., Ontario, Canada).

❖ Pathogenicity assays

For pathogenicity assay, healthy sea bass (average weight of 7.5±0.1 g), turbot (5.0±0.1 g) and rainbow trout (14.5±0.5 g), from different fish farms located in Galicia (Spain) were used. Turbot and sea bass were reared in separate 500 L tanks, aerated and supplied with sand-filtered seawater at 32‰ of salinity at 16±1ºC. Rainbow trout were maintained in 500 L tanks supplied with aerated freshwater at 16±1ºC. Fish were fed on commercial diet. For challenge, fish were anaesthetised by immersion in tricaine methane sulfonate (MS-222, Sigma) (60 mg L^{-1}, Neiffer & Stamper, 2009) and intraperitoneally injected with 0.1 ml of bacterial suspension of two strains isolated from sea bass (strains SK 164/12.1 and SK181/12.1) containing between $2x10^8$ to $2x10^5$ CFU mL^{-1} (10 fish per dose), following the methodology described by Fernández-Álvarez *et al*. (2016). Colony forming units (CFU) were enumerated by the plate dilution method. Fish mortalities were considered caused by the inoculated strain, only if the bacterium was recovered in pure culture from organs of dead or dying fish.

Results and discussion

Phenotypic tests demonstrated that all the bacteria isolated from sea bass tested were Gram-stain-negative, non-motile rods, catalase and oxidase positive and fermentative. All isolates were able to grow on medium containing concentrations up to 3% NaCl, however, no growth was observed when higher concentrations of salt were used. Moreover, all the isolates from sea bass as well as the reference strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* gave the typical profiles described for *A. salmonicida* in the API-20E identification system (7 strains: 6006104, 5 strains: 4006104 and 2 strains: 2006104) (Table I). The agar diffusion tests showed that all the isolates from sea bass were sensitive to all the antimicrobial agents used, except to oxytetracycline and the vibriostatic agent pteridine (O/129). Only two *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* reference strains (ATCC33658 and AsV09.2.15) were sensitive to oxytetracycline. The appearance of resistance to oxytetracycline among *A. salmonicida*

strains has been previously described (Adams *et al*., 1998). Therefore, phenotypic tests demonstrated that strains isolated from sea bass showed a profile similar to that shown by strains isolated from other salmonid and non-salmonid fish.

Slide agglutination and Dot Blot assays showed that antigens from all strains isolated from sea bass and reference strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* reacted with the anti-*A. salmonicida* TO96 7.1 serum, confirming the existence of high serological homogeneity within the strains.

The cellular fatty acid content (%) of all sea bass isolates and reference strain of A. *salmonicida* subsp. *salmonicida* was characterized by the presence of straight chain saturated (% ranging from 31.43 to 33.75) and monounsaturated fatty acids (% ranging from 13.52 to 16,04). The major fatty acids (those present at levels higher that 1%) were C12:0; C14:0; C16:0; C17:0; C17:1ω8c; C18:1ω7c. Comparison of the fatty acid methyl esters profiles of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates from sea bass with those of the MIDI data base allowed the correct identification of the strains at species level.

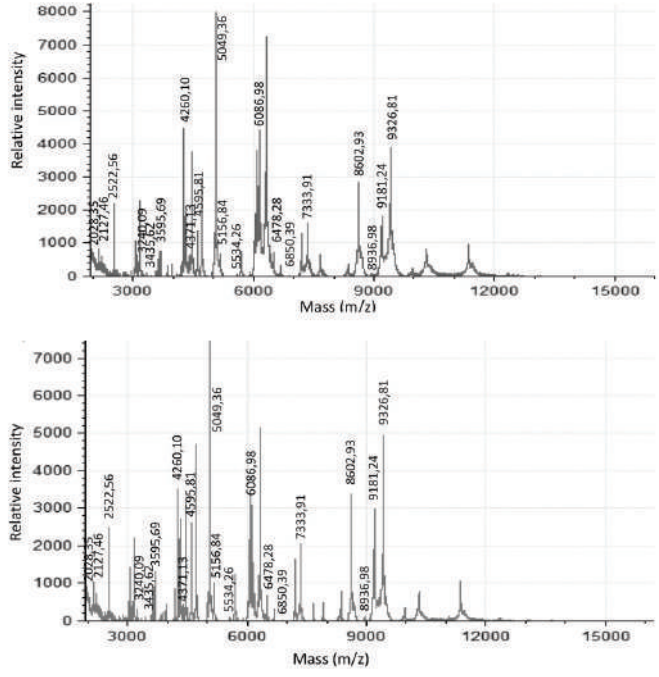


Figure 1.- MALDI-TOF MS spectral profiles of the strains of *A. salmonicida* subsp. salmonicida a) ATCC33658 and b) strain isolated from sea bass.

The MALDI-TOF MS technique and the BioTyper 3.0 software correctly identified all strains isolated from sea bass as *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (score values ranging from 2.1 ± 0.07 to 2.39 ± 0.08). Proteomic profiles of strains isolated from sea bass were identical to those obtained with all the reference strains of the subspecies *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* used for comparative purpose (Fig. 1). Proteomic fingerprints and the characteristic peaks are shown in Fig. 1. Cluster analysis of the protein profiles, showed that all the reference strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* and the isolates from sea bass, grouped together on the basis of the similarity (88%) of their mass spectra profile (data not shown). Similarities calculated using PMCC Jaccard measures resulted in comparable identification results.

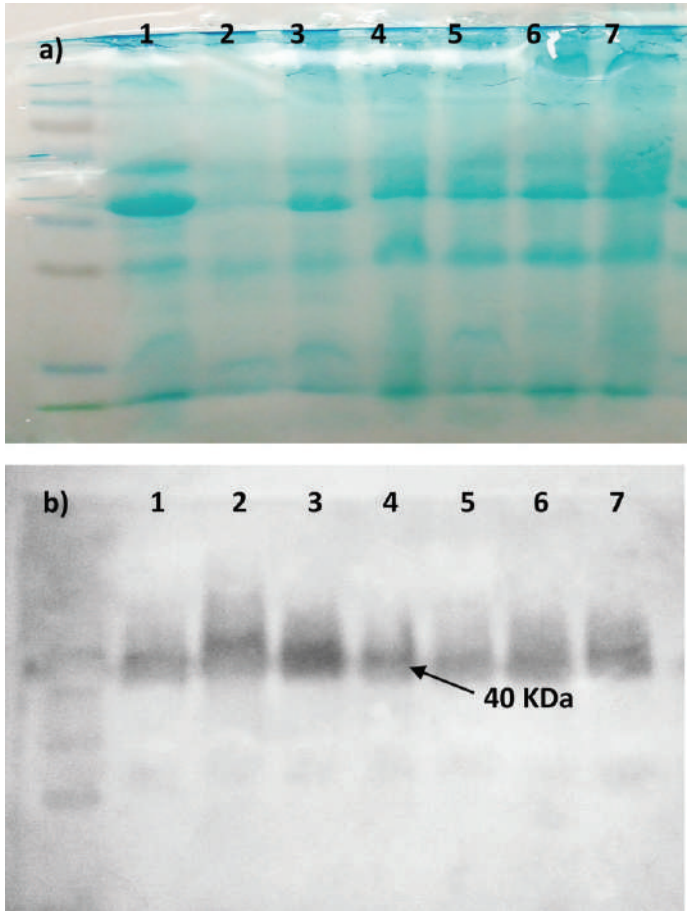


Figure 2.- SDS-PAGE of proteins (a) and Western blot analysis of lipopolysaccharides (b) of *A. salmonicida* subsp. salmonicida strains.

The membrane protein profiles of all strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* were analysed by SDS-PAGE and immunoblot. The electrophoretic analysis showed the existence of homogeneity among all strains of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* used in this study, with protein bands ranging from 12 to 156 kDa (Fig. 2). The reference strain of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC33658 showed an identical pattern. The immunoblot analysis revealed that cell envelope preparations of all *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* reacted with rabbit serum against the strain TO96 7.1 of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, showing a characteristic major band of 40KDa (data not shown). The immunoblot analysis of LPS demonstrated that all the strains used in this study showed an identical profile regardless of their isolation source (Fig. 2).

Bibliography

Adams C.A., Austin B., Meaden P.G. & McIntosh D. 1998. Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida. Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11): 4.194-4.201.

Austin B. & Austin D.A. 2007. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish.* Springer. 552pp.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline; Clinical and Laboratory Standards Institute: 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006. CLSI document M42-A (ISBN 1-56238-611-5).

Fernández-Álvarez C., Gijón D., Álvarez M.& Santos Y. 2016. First isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in Spain. *Aquac. Rep*. 4: 36-41.

Hitchcock P.J. & Brown T.M., 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gel. *J. Bacteriol.* 154: 269-272.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Neiffer D.L. & Stamper M.A., 2009. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *ILAR J.* 50 (4): 343-360.

Santos Y., Romalde J.L., Bandín I., Magariños B., Núñez S., Barja J.L.& Toranzo A.E. 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 116: 111-120.

Santos Y., Pazos F., Bandín I. & Toranzo A.E. 1995. Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2 and O3. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2.493-2.498.

Towbin H., Stahelin T. & Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 76**:** 4.350-4.354.

Characterization of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains isolated from sea bass cultured in Spain

Fernández-Álvarez[1] C., Torres-Corral Y. and Santos[1*] Y.

[1]Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología Edificio CIBUS and Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela. clara.fernandez.alv@gmail.com; ysabel.santos@usc.es

Abstract

Furunculosis, caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*, is a infectious disease with widespread distribution and the negative economic impact on wild and cultured fish. This work described the characterization of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains isolated from diseased seabass, *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in Spain, based on phenotypic, biochemical, serological, molecular and chemotaxonomic tests. Reference strains of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* from the ATCC (American Type Culture Collection) and from our own collection were used as positive controls for comparative purposes. Phenotypic tests demonstrated that strains isolated from sea bass showed a phenotypic profile similar to that shown by strains isolated from salmonids and non-salmonid fish. All the isolates from sea bass were sensitive to all the antimicrobial agents used, except to oxytetracycline and pteridine. Slide agglutination and Dot Blot analysis showed that antigens from all strains isolated from sea bass and reference strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* reacted with the anti-*A. salmonicida* TO96 7.1 serum. The detection by polymerase chain reaction (PCR) of a region of 422 bp of a gene implicated in the functioning of the ferric siderophore receptors (*fstA* gene) allowed to confirm the identification of the isolates from sea bass and reference strains as *Aeromonas salmonicida*. Analysis of cellular fatty acid content, lipopolysaccharides, and proteins (using SDS-PAGE and MALDI-TOF techniques) corroborated that *A. salmonicida* constitutes a homogeneous group. Infectivity trials conducted in sea bass, turbot and rainbow trout demonstrated that the isolated bacteria were virulent at doses ranging from $2x10^7$ to $2x10^4$ CFU per fish.

Materials & Methods

Strains used in this study

- **Control strains:** ATCC33658, As199.2.15, MT426, TO967.1
- **Isolates characterized in this study** 10 strains isolated from sea bass

1 Culture of the pathogen



Characterization of the pathogen

2 Phenotypic & Serological characterization

- API 20E (BioMerieux)
- Halotolerance (0-10% NaCl)
- Susceptibility to antimicrobials authorized for use in aquaculture)
- Slide agglutination
- Dot blot

3 Chemotaxonomic characterization

- SDS- PAGE (proteins and lipopolysaccharides)
- Immunoblot analysis
- MALDI-TOF MS

4 Molecular characterization

- Conventional PCR: amplification of *fstA* gene





DNA Amplification



Electrophoretic analysis

5 Pathogenicity assay

Intra-peritoneal injection with 0.1 mL of 10^8, 10^7, 10^6, 10^5 cells/mL



Strains SK181/12 and SK164/12 of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated from sea bass



10 fish per dose

Differences in survival between groups

Results

- **API20E**



A. Salmonicida subsp. *salmonicida* isolated from sea bass (API20E profiles : 6006604 and 4006604)

Control strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (API20E profiles: 6006604 and 2006604)

Fig 1. API20E profiles of the control strains of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC33658 and the strain SK181/12 isolated from sea bass

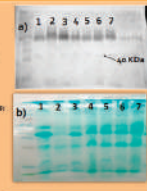


Figure 4. Western blot analysis of lipopolysaccharides (a) and SDS-PAGE of proteins (b) of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains. Line 1, ATCC33658; Lines 2 to 7, isolates from sea bass.



Fig 2. Dot blot analysis of the isolates included in this study, using the anti-*A. salmonicida* TO96 7.1 serum.

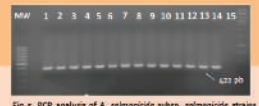


Fig 5. PCR analysis of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains using Fer-3 and Fer-4 primers. Lanes: MW, molecular weight marker (Thermo scientific); Line 1 to 4, Control strains; 5 to 14, Sea bass isolates; 15, Negative control.

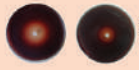


Fig 3. Antimicrobial susceptibility of the isolates from sea bass against florfenicol and enrofloxacin

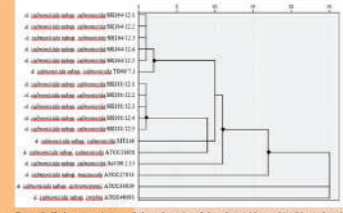


Figure 6. Phyloproteomic tree of the subspecies of *A. salmonicida* used in this study using Pearson Product Moment Correlation Coefficient (PPMCC) and single linkage. The scale above the dendrogram indicates the relative distance used in the clustering analysis. Solid circles indicate that the corresponding nodes are also recovered using Jaccard similarity coefficient and single linkage.

Conclusions

- *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated from sea bass showed similar profiles to the strains isolated from other salmonid and non- salmonid fish, forming an homogeneous group.
- Strains isolated from sea bass were virulent for this and other important cultured fis species sucha as rainbow trout and turbot.

Contribución al estudio de la biodiversidad microbiana marina en la región de Safi en el atlántico marroquí

Elkhalfi[1] B., Laghriab[1] M., Hdia[1]J., Rodríguez-Castro[2] J., Quinteiro[2] J., Rey-Méndez[2,3] M. & Soukri[1] A.

[1]Laboratorio de Fisiopatología, Genética Molecular y Biotecnología. Facultad de Ciencias Ain Chock, Universidad Hassan II Casablanca. Marruecos.

[2]Laboratorio de Sistemática Molecular, Depto. de Bioquímica e Bioloxía Molecular, CIBUS Universidade de Santiago de Compostela, España.

[3]Instituto de Acuicultura da Universidade de Santiago de Compostela, España.

Resumen

Marruecos, con 2.934 km de costa atlántica y 512 km de costa mediterránea, con variedad de bioclimas y una escasa catalogación de la biodiversidad microbiana marina, es un área de gran interés para realizar cualquier tipo de iniciativa para obtener datos sobre los patrones de diversidad bacteriana. En este trabajo se utilizaron métodos clásicos, sencillos y económicos, tanto microbiológicos como de biología molecular, para el aislamiento e identificación de bacterias marinas en la región de Safi. Se aislaron un total de 35 bacterias de las cuales se identificaron dos por métodos clásicos de microbiología y diez mediante métodos moleculares, mostrándose la capacidad y potencial de esta sencilla y económica metodología para el diseño de estudios del microbioma marino en las costas marroquíes.

Palabras clave

Biodiversidad microbiana marina, Marruecos, Safi, análisis moleculares.

Introducción

Los océanos cubren el 71% de la superficie del planeta y tienen un rol vital en la regulación del clima, albergando una importante biodiversidad, en gran medida no catalogada. Es por ello que son el objeto de cada vez más numerosos estudios de microbioma a través de la metagenómica. Sin embargo, tales estudios no son, actualmente, generalizables a toda la geografía oceánica, por lo que aproximaciones clásicas, más modestas y locales, constituyen todavía una primera perspectiva y una fuente valiosa de información. Se han identificado aproximadamente unas 20.000 especies de plantas marinas (macroalgas y fanerógamas) y un número mucho más reducido de microorganismos (bacterias, cianobacterias, protozoos, flagelados, microalgas, protistas y virus), pero hasta el momento más del 99% de las bacterias marinas aún no se ha sido descubiertas, por lo que cualquier iniciativa de catalogación, independientemente de su capacidad analítica, es de interés. En particular, las condiciones específicas de Marruecos, con 2.934 y 512 km de costa atlántica y mediterránea, respectivamente, presentando una notable gama de bioclimas, y una escasez de catalogaciones de la biodiversidad microbiana, hacen de la costa marroquí un área de gran interés para el estudio aquí planteado. El objetivo principal de este trabajo es contribuir al conocimiento de la diversidad microbiana marina de la costa atlántico marroquí, mediante el aislamiento e identificación por métodos clásicos, sencillos y económicos, tanto microbiológicos como de biología molecular, con el fin de obtener datos preliminares sobre los patrones de diversidad bacteriana.

Materiales y métodos

Muestreo

Se realizó una campaña de recogida de muestras de agua marina de la costa atlántica en cuatro sitios cerca de la ciudad de Safi (S1: 32°18’58.47’’N y 9°15’03.15’’W; S2: 32°21’36”N y 9°17’59.999” W; S3: 32°30’27”N y 10°9’8”W; S4: 32°27’8.287”N y 9°52’55.927”W) (Fig. 1), en diferentes épocas del año (verano e invierno) y a continuación se realizó un fraccionamiento por filtración (0,2 µm-200 µm).

La recogida de muestras de agua fue realizada en frascos de vidrio estéril transparentes, con tapa de rosca, boca ancha y con capacidad de 1L. En el lugar de recogida se afloja la tapa y el papel de protección, manejándolos como una unidad y evitando que se contamine la

tapa o el cuello del frasco. Después introducimos el frasco con la boca hacia abajo hasta una profundidad de 30 cm y a contracorriente del flujo entrante, permitiendo la entrada de agua hasta que quede 1/3 del volumen libre y tapándolo antes de sacarlo del agua.



Figura 1.- Localización de la zona de toma de muestras en la ciudad de Safi (Marruecos).

Estudio bacteriológico

El análisis bacteriológico se inició con la recuperación de las bacterias mediante filtración de 200 mL de agua de mar en un filtro MF-Millipore 0,45 µm, con un sistema de filtración THOMAS modelo N°607 CD 22 (Fig. 2). Las bacterias de la muestra son retenidas por el filtro, que se deposita en un medio de cultivo marino (Difco Marine Broth and Agar). A continuación se aíslan (Fig. 3) e identifican las bacterias mediante la determinación de sus características morfológicas y bioquímicas, utilizando la galería API®20E de Biomerieux y la coloración Gram (Fig. 4).

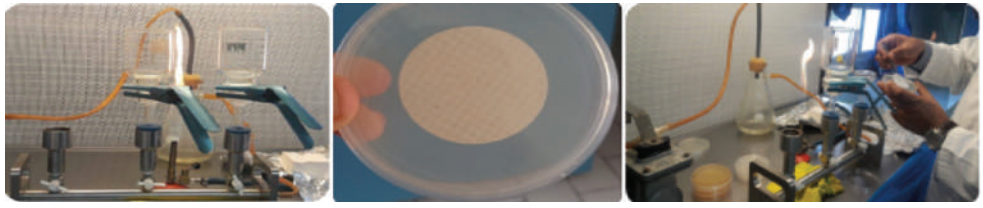


Figura 2.- Sistema de filtración del agua de mar y filtros utilizados para retener bacterias.

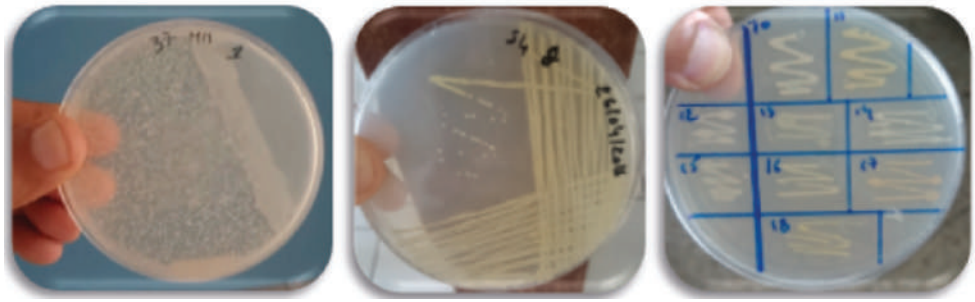


Figura 3.- Aislamiento y purificación de bacterias.

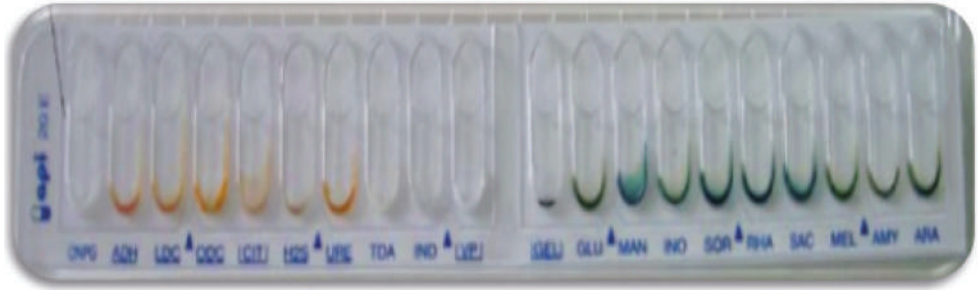


Figura 4.- Identificación de bacterias por coloración Gram y galería API 20E.

Análisis de ADN

La extracción del ADN se realiza por el método del fenol-cloroformo (Sambrook et al., 1989), a partir de colonias aisladas, comprobándose su integridad por electroforesis en gel de agarosa. Se cuantifica espectrofotométricamente en Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), a través de la determinación de la absorbancia a 260 nm. Mediante PCR se obtiene un fragmento correspondiente al gen 16S rRNA, de utilización estándar en barcoding e identificación taxonómica bacteriana, con los cebadores universales 8F y U1492R (Weisburg et al., 1991). La PCR se llevó a cabo en un volumen de 12,5 µL, incluyendo tampón de la taq DNA polymerase de Promega 1x; $MgCl_2$ 1,5mM; Mix dNTPs 0,8mM; cebadores (F/R) 0,4µM y taq DNA polymerase 0,02U/µl.

El perfil de PCR incluyó 35 ciclos con una temperatura de fusión de los cebadores fijada en 55°C: 95°C 2’ / (94°C 40” / 55°C, 40” / 72°C 1’) x35 / 72°C 10’ / 4°C 5’.

Los productos de PCR generados fueron secuenciados siguiendo los protocolos estandarizados para el kit BigDye (Applied Biosystems) en un secuenciador 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), en el servicio de secuenciación de la USC.

Los cromatogramas fueron corregidos con Finch TV y las secuencias fueron analizadas buscando homologías significativas en el GenBank mediante BLAST.

Resultados y discusión

Identificación con API® 20E

Se aislaron un total de 35 bacterias, de las que 26 son Gram-negativas y 9 Gram-positivas. Los primeros resultados cualitativos obtenidos por la galería API® 20E han permitido identificar únicamente dos especies de bacilos Gram-negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae: *Pantoea* spp y *Enterobacter cancerogenus*.

La especie *Enterobacter cancerogenus* (sin.: *Enterobacter taylorae*), es muy común en el medio natural y aunque puede formar parte de la flora simbiótica humana, presenta capacidad patogénica (Abbott, 1999). Presenta resistencia a diversos antibióticos (Stock y Wiedemann, 2002), siendo responsable de diversas patologías graves (Abbott y Janda, 1997; Garazzino *et al.*, 2005).

Identificación molecular

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR generadas y localizadas dentro del 16S rRNA, presentan una longitud situada a 500 pb (Fig.5).

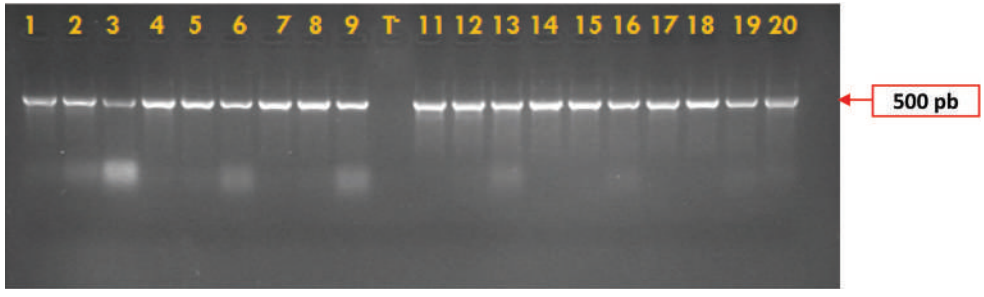


Figura 5.- Resultados de la PCR en gel de agarosa.

La búsqueda de homologías y la evaluación comparativa de las secuencias obtenidas ha permitido identificar 10 taxa bacterianos (Tabla I).

Tabla I.- Relación de especies identificadas mediante secuenciación.

Clase	Gram	Especies
Bacilli	Positivo	*Planococcus maritimus*
	Positivo	*Staphylococcus haemolyticus*
	Positivo	*Bacillus firmus*
Gamma proteobacteria	Negativo	*Cobetia marina*
	Negativo	*Pseudoalteromonas* sp
	Negativo	*Alteromonas hispanica*
	Negativo	*Enterobacter cancerogenus*
	Negativo	*Psychrobacter maritimus*
	Negativo	*Pantoea agglomerans*
	Negativo	*Vibrio litoralis*

La mayoría de las bacterias aisladas pertenecen a la clase Gammaproteobacteria, este resultado concide con los de Fuhrman y Hagström (2008).

Planococcus maritimus, Bacillus firmus y *Staphylococcus haemolyticus* son bacterias de la clase Bacilli, son comunidades bentónicas costeras y menos comunes en zonas pelágicas (Zinger *et al.*, 2011). La presencia de *Planococcus maritimus* en zonas pelágicas se explica por sus adaptaciones a diferentes condiciones, encontrándose en temperaturas entre 4 y 41ºC y a pH entre 6 y 8 (Jung-Hoon *et al.*, 2003), tales bacterias marinas se caracterizan por la síntesis de un raro glicocarotenoide, el Metil glucosil-3,4-dehidro-apo-8'-lycopenoato, que se conoce por su actividad antioxidante y que puede usarse en las preparaciones farmacéuticas y médicas (Shindo *et al.*, 2008).

Bacillus firmus es una bacteria marina de las comunidades bentónicas que se puede encontrar tanto en medios terrestres como acuáticos, estos Bacillus que tienen la capacidad de crecer en un intervalo de pH de 8 a 11, son capaces de producir antibióticos diferentes de los de bacterias terrestres tales como 3-amino-3-desoxi-D-glucosa (Arthur *et al.*, 1980).

Staphylococcus haemolyticus es una especie responsable de infecciones humanas, especialmente abscesos, infecciones urinarias y septicemia. La presencia de esta especie en el agua de mar es probablemente debida a la actividad biológica humana en el medio marino

El resto de las bacterias, de la clase Gram negativas (*Pseudoalteromonas* sp.*, Psychrobacter maritimus, Pantoea agglomerans, Cobetia marina Alteromonas hispanica, Enterobacter*

cancerogenus y *Vibrio litoralis*) son ubicuas en el medio marino, tanto en las comunidades pelágicas como en las bentónicas (Zinger *et al.*, 2011), lo que facilita su aislamiento.

En general todas las bacterias aisladas tienen actividades que permiten usarlas con finalidades biotecnológicas.

Conclusiones

En este trabajo, de las 35 bacterias aisladas hemos identificado dos con métodos clásicos de microbiología y otras 10 mediante métodos moleculares, además de confirmar las identificación por métodos clásicos, quedando 23 bacterias por identificar que están en proceso de análisis.

Se muestra aquí la capacidad y potencial de esta sencilla y económica metodología para una evaluación preliminar de la variedad de microorganismos marinos. La aplicación de esta metodología a muestras similares permitirá aportar datos para el diseño de estudios del microbioma marino en las costas de Marruecos.

Bibliografía

Abbott S. 1999. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia. In: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolken R.H., editors. *Manual of clinical microbiology,* 7th ed. ASM Press, Washington, DC. pp 475-480.

Abbott S.L. & Janda J.M. 1997. *Enterobacter cancerogenus* ("*Enterobacter taylorae*") infections associated with severe trauma or crush injuries. *Am. J. Clin. Pathol.* 107:359–361.

Arthur A.G., Robert B., Robert A.B. & Terry A.K. 1980. Bioenergetic Properties of Alkaline-tolerant and Alkalophilic Strains of *Bacillus firmus*. *Journal of General Microbiology*. 119: 79-86.

Fuhrman J.A..& Hagström Å. 2008. Bacterial and archaeal community structure and its patterns. In: Kirchman D.L. (ed). *Microbial Ecology of the Oceans*, 2nd edn. Wiley-Blackwell: New York. pp 45-90.

Garazzino S., Aprato A., Maiello A., Massé A., Biasibetti A., De Rosa F.G. & Di Perri G. 2005. Osteomyelitis caused by *Enterobacter cancerogenus* infection following a traumatic injury: case report and review of the literature. *J .Clin Microbiol.* 43(3):1459-1461.

Jung-Hoon Y., Norbert W., Kook H.K., Tae-Kwang O. & Yong-Ha P. 2003. *Planococcus maritimus* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat in Korea. International *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 2013–2017.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Shindo K., Endo M., Miyake Y., Wakasugi K., Morritt D., Bramley P.M., Fraser P.D., Kasai H. & Misawa N. 2008. Methyl Glucosyl-3,4-dehydro-apo-8'-lycopenoate, a Novel Antioxidative Glyco-C30-carotenoic Acid Produced by a Marine Bacterium *Planococcus maritimus*. *J. Antibiot*. 61(12): 729–735.

Stock I. & Wiedemann B. 2002. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus, Enterobacter gergoviae*, and *Enterobacter sakazakii* strains. *Clin. Microbiol. Infect*. 8: 564–578.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. & Lane DJ. 1991. "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *J. Bacteriol.* 173(2): 697–703.

Zinger L., Amaral-Zettler L.A., Fuhrman J.A., Horner-Devine M.C., Huse S.M., Welch D.B.M., Martiny J.B.H., Sogin M., Boetius A. & Ramette A. 2011. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. PLoS ONE. 6: e24570.

XIX FORO
DOS RECURSOS MARIÑOS E DA ACUICULTURA DAS RÍAS GALEGAS

Contribución al estudio de la biodiversidad microbiana marina en la región de SAFI en el atlántico marroquí

B. Elkhalfi[1], M. Laghriab[1], J. Hdia[1], J. Rodriguez-Castro[2], J. Quinteiro[2], M. Rey-Méndez[2], A. Soukri[1].

[1] Laboratorio de Fisiopatología, Genética Molecular y Biotecnología. Facultad de Ciencias Ain Chock, Universidad Hassan II Casablanca. Marruecos.

[2] Laboratorio de Sistemática Molecular, Depto. de Bioquímica e Bioloxía Molecular, CIBUS Universidade de Santiago de Compostela, España.

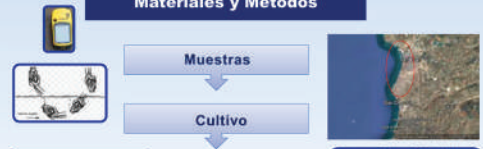
Introducción

Los océanos cubren el 71% de la superficie del planeta y tienen un rol vital en la regulación del clima. Pueden parecer espacios de vida muy pobres en comparación con las zonas terrestres, pero en realidad tienen una mayor biodiversidad. Se han identificado aproximadamente unas 20.000 especies de plantas marinas (macroalgas y fanerógamas) y un número mucho más reducido de microorganismos (bacterias, cianobacterias, protozoos, flagelados, microalgas, protistas y virus), pero hasta el momento más del 99% de las bacterias marinas aún no se han descubierto y queda en los océanos un vasto mundo por explorar. Vistos los datos sobre la biodiversidad microbiana marina y las condiciones específicas de Marruecos, que tiene 2.934 kilometros de costa atlántica y 512 km de costa mediterránea presentando una notable gama de bioclimas, es de gran interés catalogar la biodiversidad microbiana existente ya que hasta ahora no hay muchos trabajos realizados sobre la diversidad específica y genética.

Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es contribuir al conocimiento de la diversidad microbiana marina del atlántico marroquí, mediante el aislamiento y la identificación por métodos microbiológicos clásicos y biología molecular, con el fin de evaluar el efecto ambiental en el estado evolutivo de la población microbiana marina.

Materiales y Métodos



Muestras

Cultivo



Aislamiento y purificación



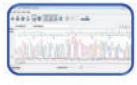
Identificación

Molecular

PCR

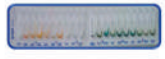


Cloning, secuenciación



Clasica

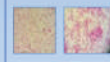
Coloración Gram
Galeria API 20 E



Resultados

Identificación microbiológica

Coloración Gram



35 bacterias
26 bacterias Gram-negativas
y 9 bacterias Gram-positivas



Los primeros resultados obtenidos por la galería API 20E han encontrado dos especies pertenecientes a la familia de *Enterobacteriaceae*: *Pantoea spp* *Enterobacter taylorae.*

- Bacilos Gram-negativos que pertenecen al género de *Proteobacteria* y la familia *Enterobacteriaceae.*



Identificacion molecular



Una banda de **500pb** amplificada con los primers universales **16S** RNA

Clase	Gram	Especies
Bacilli	Positivo	*Planococcus maritimus*
	Positivo	*Staphylococcus haemolyticus*
	Positivo	*Bacillus firmus*
Gamma proteobacterie	Negativo	*Cobetia marina*
	Negativo	*Pseudoalteromonas*
	Negativo	*Alteromonas hispanica*
	Negativo	*Enterobacter cancerogenus*
	Negativo	*Psychrobacter maritimus*
	Negativo	*Pantoea agglomerans*
	Negativo	*Vibrio litoralis*

Conclusiones

En este trabajo, se han identificado 35 bacterias por métodos clásicos de microbiología y 10 por métodos moleculares.

Estos trabajos se continuarán realizando para elaborar un catálogo de microorganismos marinos de la costa marroquí.

Los resultados servirán para poder evaluar el impacto del cambio climático en la biodiversidad microbiana marina de la zona estudiada.

Cultivo suspendido de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* en la Bahía de Ayangue, Ecuador: influencia de los factores ambientales

Lodeiros[1,2,3] C., Rodríguez-Pesantes[1] D., Márquez[1] A., Revilla[1] J. & Sonnenholzner[1] S.

[1]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, CENAIM-ESPOL, Santa Elena. Ecuador. cesarlodeirosseijo@yahoo.es

[2]Investigador Prometeo, Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, Ecuador.

[3]Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Apartado Postal, 245, Cumaná 6101, Venezuela.

Resumen

La ostra del pacífico, ostra japonesa u ostra rizada *Crasssotrea gigas* (Thunberg,1793) es una especie que recientemente se está cultivando en Ecuador, sin embargo, se tiene poco conocimiento sobre su crecimiento y efecto de los factores ambientales. Se analiza el crecimiento y la influencia de los factores ambientales en dos cohortes de *C. gigas* confinadas en cestas japonesas suspendidas de un *long line*, en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador. Las semillas o juveniles (84,8±0,11 y 7,3±0,11 mm, para la cohorte I-iniciada en agosto 2014 y la II en marzo 2015, respectivamente) se mantuvieron en crecimiento durante 8 y 9 meses cuando se realizaron muestreos, en los primeros meses intramensuales y luego mensuales y bimensuales de la longitud dorso-ventral y las biomasas secas de la concha y tejidos blandos; paralelamente se determinaron de forma continua la temperatura, y semanalmente la salinidad y el seston en sus componentes total y de biomasa fitoplanctónica (clorofila *a*), así como el *fouling* sobre la concha. Los resultados muestran que la temperatura, particularmente la variabilidad intradiaria es un factor importante en la zona que podría afectar el crecimiento de *C. gigas* bajo condiciones de cultivo. Independientemente de ello, las tasas de crecimiento de *C. gigas* fueron elevadas,

concluyendo que pueden alcanzar tallas comerciales en menos de 1 año, generando una gran factibilidad biológica de cultivo. Se recomiendan estudios en función de minimizar el estrés ambiental y optimizar las técnicas de cultivo en función de coadyuvar al desarrollo del mismo.

Palabras clave

Ostra japonesa, crecimiento, moluscos, ostreidae, Pacífico americano.

Introducción

La ostra del pacífico, ostra japonesa u ostra rizada *Crassostrea gigas* (Thunberg,1793) es uno de los moluscos más importantes en términos de acuicultura global, con más de 600.000 t producidas en el 2014 (FAO 2016). La adaptabilidad de esta especie a factores influyentes en la fisiología de los invertebrados marinos (temperatura, salinidad, etc.) le ha permitido crecer en diferentes latitudes y varios sistemas (estuarios, lagunas, mares y costa afuera), además de haber sido introducida en más de 70 países para ser cultivada (Miossec *et al*., 2009). En las costas del Pacífico americano ha sido introducida en USA, México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Chile, alcanzado un estatus comercial, al menos de forma continua, en USA, México y Chile.

En Ecuador, mediante iniciativas de la Subsecretaría de Acuicultura del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, con apoyo del CENAIM-ESPOL, recientemente se ha iniciado un programa con las comunidades costeras para el desarrollo del cultivo *C. gigas* en *long line*, obteniendo resultados alentadores, por lo que ha sido considerada como una de las principales especies para la diversificación de la acuicultura en Ecuador. Sin embargo pocos han sido los estudios publicados sobre el comportamiento de esta especie bajo cultivo, tan solo Lombeida (1997) muestra información del crecimiento de *C. gigas,* pero en reservorios y piscinas utilizadas para el cultivo de camarones.

La presente investigación es un aporte al conocimiento sobre el crecimiento y la influencia de factores ambientales en *C. gigas* bajo cultivo suspendido en aguas ecuatoriales, donde existen cambios ambientales importantes debido a la mezcla de aguas provenientes de varios fenómenos oceanográficos, lo cual condiciona la fisiología del crecimiento de la ostra.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena (1°59'1.59" S; 80°45'35.15" W), en una línea de cultivo (*long line*) experimental, y de donde se suspendieron 2 lotes de semillas producidas en diferentes épocas siguiendo los protocolos establecidos por el CENAIM-ESPOL, denominandose como cohorte I, aquellas semillas que comenzaron el cultivo en el mar en agosto 2014 y cohorte II en marzo 2015, con longitudes dorso ventrales de 4,8±0,11 y 7,3±0,11 mm, respectivamente. Las semillas de las cohortes fueron confinadas en varias cestas japonesas (*pearl nets*: inicialmente de 3 mm luz de malla, incrementándose a medida que el cultivo evolucionaba) a una densidad equivalente a la cobertura del 25-30% de la base de la cesta, para ello se hicieron desdobles en los primeros meses de forma intramensual y luego intermensual, con recambios de las cestas japonesas, disminuyendo el número de individuos por cesta cuando se requirió. Las cestas en lotes de 4 a 6 fueron protegidas con un saco confeccionado con malla de pesca de sardina, en función de evitar la incidencia de depredadores, principalmente de peces de la familia Balistidae (Sonnenholzner *et al.,* 2016).

En cada desdoble se tomaron muestras de 5 individuos en 3 réplicas. Las cestas restantes se mantuvieron a las mismas condiciones y sirvieron como réplicas de sustitución de las experimentales.

A las ostras de cada réplica se les determinó la longitud en el axis dorso-ventral, utilizando un vernier digital de 0,01 mm de precisión, así como la biomasa seca de los tejidos blandos con una balanza analítica (0,001 g de precisión), luego de un proceso de deshidratación por tratamiento al calor en una estufa a 60ºC, hasta lograr peso constante. De igual manera se determinó el peso de la concha y del material y organismos depositados en la misma (*fouling*).

Para contrastar el crecimiento de la ostra con los factores ambientales, semanalmente se colectaron (por triplicado) muestras de agua entre 1-0,5 m de la superficie en la zona de cultivo con la ayuda de una embarcación y un recipiente plástico de 12 L, teniendo cuidado de no alterar el ambiente de cultivo, de donde se obtuvieron submuestras para la determinación de la salinidad mediante un refractómetro de 1‰ de apreciación, así como muestras de agua previamente filtrada con una malla de 153 µm de tamaño de poro, para eliminar el macroplancton, la cual posteriormente fue transferida a botellas plásticas oscuras (2 L) para ser trasladada al laboratorio, con la finalidad de estimar la biomasa fitoplanctónica mediante la concentración de clorofila *a* y el seston total. Estos análisis se realizaron reteniendo las partículas de las muestras en filtros Whatman GF/C de 1,2 µm de diámetro de poro, utilizando un equipo de filtración al vacío Millipore. Para la determinación de la clorofila *a* se empleó el método espectrofotométrico y la del seston se realizó mediante técnicas gravimétricas

siguiendo las recomendaciones de Strickland & Parsons (1972). La temperatura se registró continuamente cada 30 min o 1h utilizando un termógrafo electrónico (Hobo, Onset, USA).

Resultados

El crecimiento en longitud de la concha fue generalmente continuo en ambas cohortes, con cierta paralización en el mes de septiembre 2014 en la cohorte I, la cual alcanzó en sus 7 meses de cultivo experimental los 67,6±5,43 mm. En la cohorte II el receso de crecimiento fue en el mes de junio y septiembre 2015, alcanzando a los 7 meses de cultivo 61,6±3,03 mm y en sus 9 meses de cultivo los 77,8±7,24 mm (Fig. 1A). En ambas cohortes la masa de la concha tuvo un crecimiento lento en sus primeros 4-5 meses de cultivo, para luego acelerar su crecimiento obteniendo las ostras de la cohorte I valores de masa seca de 18,2±1,71 g en sus 7 meses de cultivo experimental y 15,1±1,99 g y 25,1±1,64 g a los 7 y 9 meses de cultivo en las ostras de la cohorte II (Fig. 1B).

Las masas de los tejidos blandos mostraron cambios más notables que los de la concha (Fig. 1C). En la cohorte I existieron cambios bruscos (incrementos y disminución de la masa) al principio del crecimiento en el periodo agosto-septiembre 2014, para luego incrementar notablemente hasta noviembre 2014 cuando disminuyó, manteniéndose con valores bajos hasta finales de enero, donde la masa de los tejidos incrementa hasta el final del experimento, obteniendo masas de 1,1±0,24 g. La cohorte II incrementa en sus masas de tejido blando de forma exponencial durante los primeros 3 meses (hasta finales de mayo 2015), cuando el crecimiento se detiene hasta principios de agosto 2015, para luego incrementar con elevadas tasas de crecimiento en el mes de agosto para llegar a masas de 0,9±0,06 g, posteriormente se mantiene en los 3 subsiguientes meses y decae en el último mes a 0,8±0,08 g.

En la cohorte I la masa del *fouling* sobre la concha fue aparente al cuarto mes de cultivo (diciembre 2014) con valores de 0,7±0,12 g, manteniéndose en el subsiguiente mes para luego incrementar y alcanzar 3,7±1,21 g; de forma similar en la cohorte II, la masa del *fouling* fue aparente en el segundo mes de cultivo (finales de abril 2015) con valores de 0,4±0,11 g manteniéndose baja en los tres subsiguientes meses para incrementar hasta finales de septiembre 2015 (2,1±0,44 g) y luego reducir y mantenerse con valores de 2 g (Fig. 2A). El % de la masa del *fouling* acumulado con respecto a la masa de la concha, siguió más o menos la tendencia del *fouling* acumulado, excepto en los primeros meses cuando los valores fueron elevados por no haberse desarrollado la concha. Los valores estuvieron en un intervalo de 12-22% y 3,5-27% para la cohorte I y II, respectivamente (Fig. 2B).

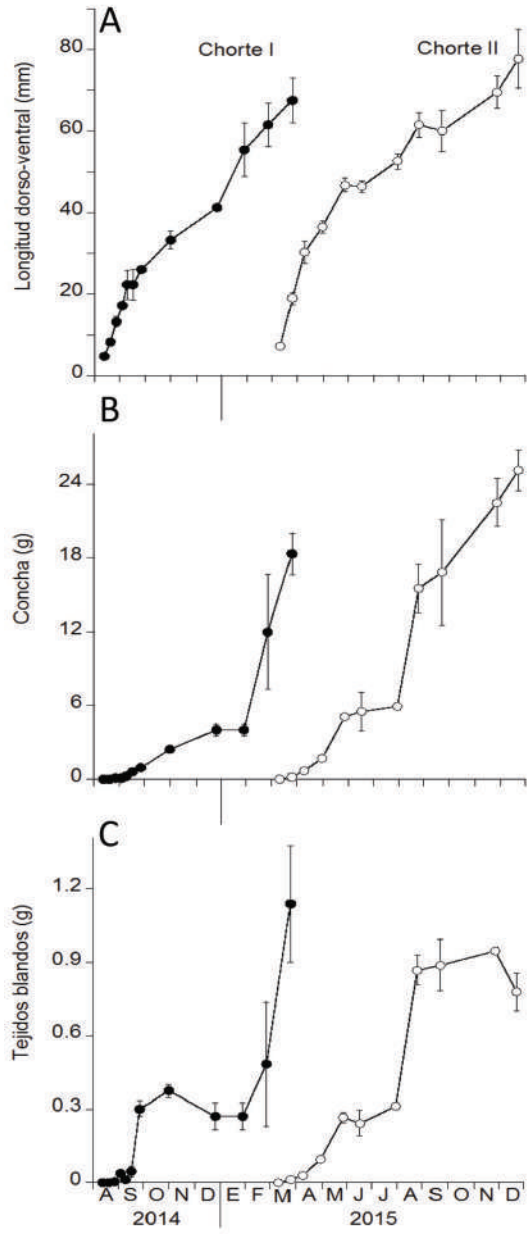


Figura 1.- Crecimiento en longitud antero-posterior (A) y masas secas de las conchas (B) y tejidos blandos (C) de la Ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

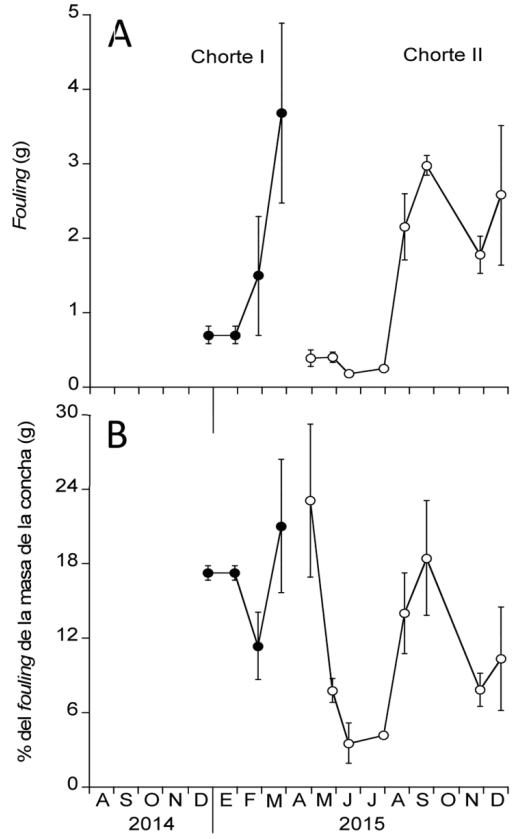


Figura 2.- Masa total del *Fouling* (A) y su porcentaje relativo a la masa de la concha (B) de la Ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

La temperatura, de forma general, incrementó de unos 23-24ºC desde el inicio del experimento en agosto 2014 hasta mayo 2015 cuando se alcanzó las temperaturas máximas cercanas a los 28ºC, para disminuir hasta unos 24 ºC en agosto y mantenerse entre 24-25ºC en septiembre y octubre. La temperatura vuelve a incrementar hasta cerca de los 28ºC a finales del experimento en diciembre 2015 (Fig. 3A). La variabilidad intradiaria de la temperatura alcanzó más de 6ºC (mediados de marzo 2015); la mayor variabilidad intradiaria se manifestó en el mes de septiembre 2014 (1-4,75ºC), entre finales de enero y principios de febrero 2015 (1-4,2ºC), de finales de febrero hasta agosto 2015 (0,7-6,1ºC) y de mediados a finales de junio con un intervalo de 2,3-4,5ºC (Fig. 3B).

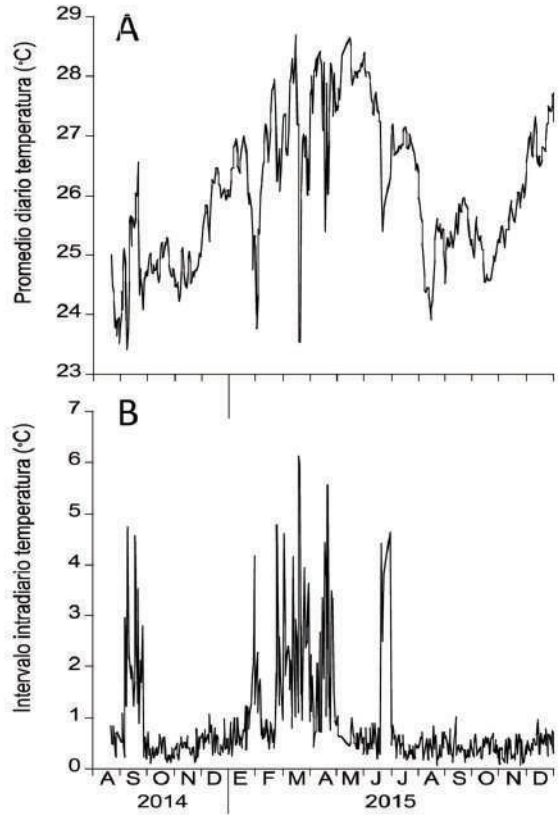


Figura 3.- Promedio diario (A) y variabilidad intradiaria (B) de la temperatura en el sitio del cultivo de la la Ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

El seston total (Fig. 4A) muestra una gran variabilidad en el periodo del experimento sin mostrar una tendencia general notable, sus valores estuvieron en un intervalo de 2,5-14,5 mg/L. De igual manera, la biomasa fitoplanctónica estimada por clorofila *a*, no mostró un patrón definido (Fig. 4B). Generalmente los valores de la biomasa fitoplanctónica estuvieron por encima de los 2 µg/L de clorofila *a* a través de todo el periodo experimental, con valores máximos (3 a 5 µg/L) en los meses de agosto hasta mediados de diciembre 2014.

La salinidad mantuvo un intervalo entre los 32 y 35, con cierta tendencia a bajar de 35 en mediados de octubre a 32,5 a mediados de diciembre 2014, para incrementar y mantenerse durante los subsiguientes 3 meses en 34 y luego mantener fluctuaciones hasta el final del experimento entre 32-34 (Fig. 4C).

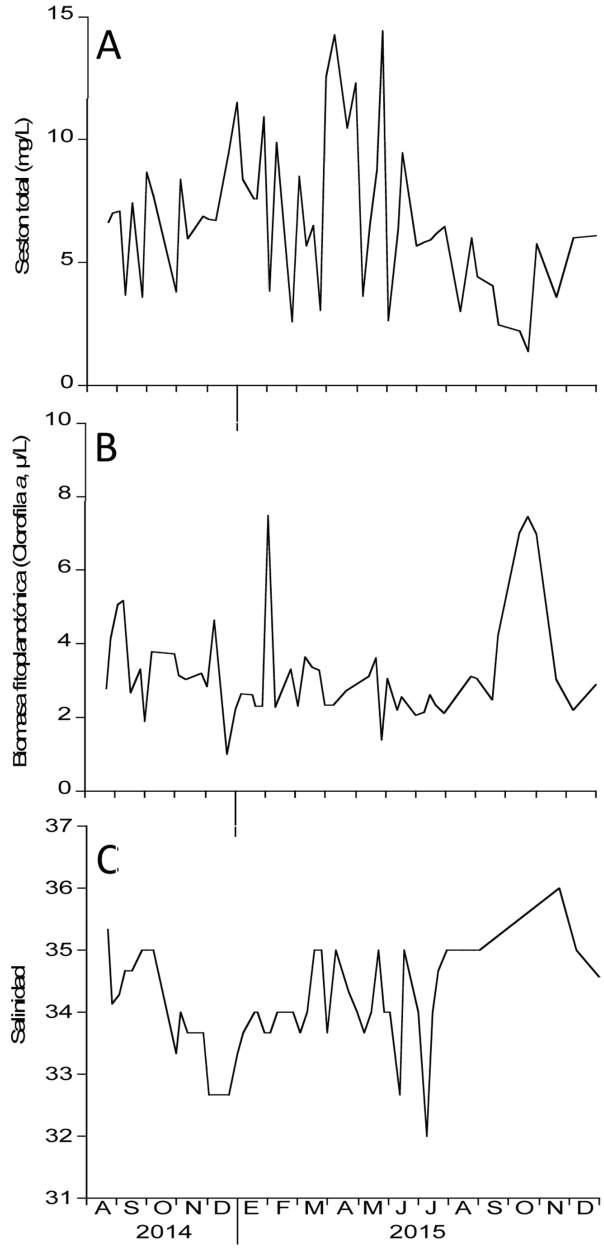


Figura 4.- Seston total (A), biomasa fitoplanctónica estimada por Clorofila *a* (B) y Salinidad (C) en el sitio de cultivo de la Ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

Discusión

El crecimiento en concha, tanto en longitud como en masa, de *Crassostrea gigas* en condiciones de cultivo suspendido en Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador, generalmente, en ambas cohortes, siguió una tendencia linear en las primeros meses de crecimiento con una disminución de su pendiente en los últimos, característico del crecimiento de otros bivalvos (Urban, 2002), lo cual sugiere que, la concha no estuvo notablemente influenciada por factores ambientales, aunque algunas excepciones de no deposición de concha ocurrieron en periodos de elevadas temperaturas y variabilidad diaria. Contrariamente a la concha, los tejidos blandos mostraron gran variabilidad en la masa y no siguiendo una tendencia de crecimiento exponencial típica de moluscos bivalvos, lo cual sugiere influencia en el proceso de producción de tejidos y estrés dado por factores ambientales (Lodeiros & Himmelman, 2000).

Las costas de Ecuador y particularmente de la región de peninsular está localizada en la confluencia de dos de los mayores ecosistemas marinos, el Sistema Costero del Pacífico Central Americano y el sistema de Humboldt, constituyendo una de zona transición del Pacífico americano, caracterizada por una remarcable variabilidad espacial y temporal de las condiciones oceanográficas (Allauca, 1990).

De los factores analizados la variabilidad de la salinidad solo fue de unos 2,5 a través del periodo experimental, estos cambios no generan efectos notables en procesos fisiológicos en moluscos bivalvos (Bernard, 1983; Griffiths & Griffiths, 1987; Lodeiros & Himmelman, 2000). El seston no mostró una tendencia correlativa con los cambios en el crecimiento, y no parece generar influencias negativas; por otra parte, su componente de biomasa fitoplanctónica estimada por clorofila *a*, la cual se mantuvo generalmente >2 µg/L no parece limitar la disponibilidad de alimento para moluscos bivalvos (Saxby 2002; Ren & Schiel, 2008). El único factor correlativo con las tasas de crecimiento fue la temperatura. Aunque la temperatura muestra una tendencia general en concordancia con el ciclo estival del hemisferio sur en la zona, se generó cambios importantes la variabilidad intradiaria (hasta >6ºC). Chávez-Villalba (2014) en un análisis del cultivo de *C. gigas* en el Pacífico mexicano indica, de igual modo, que el factor ambiental más importante en el cultivo de la especie es la temperatura.

Las demandas energéticas que acontecen en los procesos reproductivos (no estudiado en el experimento), pudo coadyuvar a sustraer energía que podría estar dirigida a la producción somática y crecimiento en general; dado que estas afecciones son particularmente establecidas cuando no existe una disponibilidad de alimento adecuada (Lodeiros & Himmelman, 2000), es probable que esto no haya contribuido notablemente a las afecciones del crecimiento en

el presente estudio. Investigaciones de reproducción concordantes con el crecimiento de *C. gigas* y la variabilidad ambiental en las costas ecuatoriales son necesarios para dilucidar las hipótesis antes señaladas.

Si bien los procesos reproductivos de gametogénesis hasta el desove con gametos viables ocurren en los ambientes del Pacífico subtropical y tropical, y que la especie es elevadamente prolífera (>100 millones de huevos) con desarrollos larvarios y postlarvarios para la producción de semilla en condiciones de *hatchery* exitosos, no se conocen reclutamientos notablemente abundantes que pudieran formar bancos naturales, sugiriéndose que las larvas competentes para la metamorfosis no encuentran señales apropiadas para fijarse. Chávez-Villalba (2014) analiza esta situación en las costas del Pacífico de México, concluyendo que este comportamiento tiene implicaciones importantes en la introducción de la especie, ya que se justifica que no ha tenido, hasta ahora, impacto sobre las poblaciones nativas y que la sostenibilidad del cultivo de *C. gigas* es dependiente de la semilla producida en *hatchery*. Esta situación no escapa de la que acontece en las costas ecuatorianas, donde tampoco se han observado reclutamientos importantes de *C. gigas*. Lo cual puede sugerir la factibilidad de expansión del cultivo de *C. gigas* en el pacífico tropical y subtropical americano y otras regiones como el trópico y subtrópico del atlántico, con una visión de poco impacto ambiental, particularmente en las comunidades bénticas establecidas.

El *fouling* es un factor importante en el crecimiento de bivalvos en cultivo de moluscos bivalvos (Lacoste & Gaertner-Mazouni, 2014) y particularmente de *C. gigas* (Chávez-Villalba, 2014); nuestras observaciones de abundante *fouling* tanto en la malla de las cestas de cultivo (no registrada) como sobre la concha, dada la elevada proliferación de organismos y acumulación de material acontecido, parece importante en el cultivo de *C. gigas* en las costas ecuatorianas. Aunque no encontramos una asociación de afección del *fouling* en el crecimiento, éste pudo llegar hasta un 27% del peso de la concha, lo cual puede traer inconvenientes en la filtración y otros procesos fisiológicos en bivalvos de disposición horizontal (Lodeiros, 2002), como es el caso de *C. gigas* bajo condiciones de cultivo.

En ambas cohortes el *fouling* sobre la concha aumentó inicialmente y luego disminuyó, lo cual indica la acción de biocontrol por otros organismos de la comunidad dentro de las cestas. Estas son concurrentes con los resultados del uso de erizos (organismos esporádicamente encontrados dentro de las cestas de cultivo) como biocontrol del *fouling* en el cultivo de *C. gigas* en costas ecuatorianas (Sonnenholzner *et al.,* 2016).

Aunque en el presente estudio no se analizó la supervivencia, se estima que la supervivencia acumulada en ambas cohortes fue del 45-60%, las cuales se consideran aceptables para el desarrollo del cultivo de *C. gigas* (Chávez-Villalba, 2014).

Las tasas de crecimiento de 0,28 y 0,25 mm/día en longitud de las cohortes agosto 2014 y marzo 2015, respectivamente, son concurrentes con las tasas de crecimiento en las costas subtropicales del pacífico mexicano, las cuales son las más elevadas de la especie (Chávez-Villalba, 2014), con ellas se pueden obtener organismos de 90-110 mm de longitud antero-posterior en el primer año de cultivo.

Conclusiones y recomendaciones

La temperatura es un factor importante en la zona y podría afectar el crecimiento de *C. gigas* bajo condiciones de cultivo. Independientemente de ello, las tasas de crecimiento de *C. gigas* fueron elevadas, concluyendo que pueden alcanzar tallas comerciales en menos de 1 año de crecimiento, generando una gran factibilidad de cultivo. Se recomiendan estudios en función de minimizar el estrés ambiental y optimizar las técnicas de cultivo en función de coadyuvar al desarrollo del mismo.

Agradecimientos

El trabajo se ha realizado como parte complementaria del proyecto de investigación *Desarrollo de protocolo de domesticación para el uso sostenible de nuevas especies marinas para consumo de alimento y repoblación de bancos naturales*, financiado por la SENESCYT. César Lodeiros participó en el estudio durante su vinculación al CENAIM-ESPOL a través del proyecto Prometeo de la SENESCYT, Ecuador.

Bibliografía

Allauca S. 1990. Presencia de la corriente costanera ecuatoriana. *Acta Oceanogr. Pac*. 6:10–17.

Bernard F.R. 1983. Physiology and the mariculture of some northeastern Pacific bivalve molluscs. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci*. 63, 24 pp.

Chavez-Villalba J. 2014. Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*, 24 (3): 175-190.

Griffiths C.L. & Griffiths J.S. 1987. Bivalvia. In: Pandian J.H. & Vernberg F.J. Eds. *Animals Energetics*, Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 1–88.

Lacoste E. & Gaertner-Mazouni N. 2014. Biofouling impact on production and ecosystem functioning: a review for bivalve aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 6: 1–10.

Lodeiros C. 2002. Cuestión de peso y posición. *Revista de Biología Tropical,* 50 (3/4): 875-878.

Lodeiros C. & Himmelman J.H. 2000. Identification of environmental factors affecting growth and survival of the tropical scallop *Euvola* (*Pecten*) *ziczac* in suspended culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela. *Aquaculture*, 182: 91-114.

Lombeida P. 1997. *Manual para el Cultivo de Ostras en Granjas Camaroneras*. Proyecto JICA-CENAIM. 25 pp.

Miossec L., Le Deuff R.M. & Goulletquer P. 2009. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Cooperative Research Report No*. 299. Copenhagen. 42 pp.

Ren J.S. & Schiel D.R. 2008. A dynamic energy budget model: parameterisation and application to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 361: 42–48.

Saxby S.A. 2002. A review of food availability, sea water characteristics and bivalve growth performance at coastal culture sites in temperate and warm temperate regions of the world. *Fisheries Research Report No*. 132, Department of Fisheries, Western Australia, 42 pp.

Sonnenholzner J., Marquez A. & Lodeiros C. 2016. Evaluación de los erizos de mar *Arbacia incisa* y *Eucidaris thouarssii* como biocontroles del *fouling* en cestas del cultivo de la ostra *Crassostrea gigas* en Ecuador. *3er Congreso Latinoamericano de Equinodermos*, 18-22 julio 2016, Costa Rica.

Strickland J.D.H. & Parsons T.R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Board. Can.* Vol. 167, 2nd edn., 310 pp.

Urban H.J. 2002. Modeling growth of different developmental stages in bivalves. *Marine Ecology Progress Series*, 238: 109–114.

Cultivo suspendido de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* en la Bahía de Ayangue, Ecuador: influencia de los factores ambientales

Lodeiros César[1,2,3], Daniel Rodríguez-Pesantes[1], Márquez Adrian[1], Revilla Jormil[1], Sonnenholzner Stanislaus[1]
[1]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, CENAIM-ESPOL. Ecuador
[2]Investigador Prometeo, Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, Ecuador
[3]Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Apartado Postal 245, Cumaná 6101, Venezuela

Introducción

La ostra del pacífico, ostión japonesa o ostra rizada (*Crassostrea gigas* (Fig. 1) es una de las moluscos más importantes en la mayoría de acuicultura global, con más de 600.000 t/año anuales en el 2014 (FAO 2016). La disponibilidad de ostras en pesca a factores influyentes en la biología de las mencionadas nuestras temperatura, salinidad, etc.) de la permitido encontrar diferentes latitudes.

En Ecuador, mediante la iniciativa de la Subsecretaría de Acuicultura del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, con apoyo del CENAIM-ESPOL, recientemente se ha iniciado un programa con las comunidades costeras para el desarrollo de *C. gigas* en su fase final, obteniendo resultados alentadores, por lo que ha sido considerada como una de las principales especies para la diversificación de la acuicultura en Ecuador. Sin embargo, pocos han sido los estudios publicados, sobre el comportamiento de esta especie bajo las condiciones locales (OSPE-Santa Rosa 1997) muestra información del crecimiento de *C. gigas* para el mismo, y algunas utilidades para el cultivo de camarones.

Materiales y métodos

El estudio fue realizado en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena (1° 56'1.59" S; 80° 45'30.15" W), en una finca de cultivo denominada Avalos (aproximadamente 1 y de donde se recogió durante 2 lotes de semillas procedentes de criaderos artesanales ubicados en el mismo sitio establecidos por el CENAIM-ESPOL, denominados como cohorte I, cuyas semillas que comenzaron el cultivo en el mes de agosto 2014 y cohorte II con inicio en 2015, con longitudes dentro variándose de 4.8 ±0.11 y 7.2±0.11 mm, respectivamente. Las semillas de las cohortes fueron sembradas en varias cestas japonesas (*pearl nets*) de aproximadamente 3 m de largo de malla, las cuales tuvieron a medida que el cultivo envolucionó hasta una densidad equivalente a la de horizontal de 125-250 %de la base de la cesta, para recibir un buen desarrollo, con las primeras mayores de forma (mensualmente) y luego trimestralmente, con el cambio de densidades, donde expuesto el cultivo a densidades por cesta variables según el tamaño. Las cestas en base de 4 a 6 fueron previamente cubiertas con malla de poros de sombra, en función de evitar la incidencia de depredadores, principalmente de peces de la familia Balistidae (*Balistes polylepis* et al. 2016).

Un cada dividió la se tomaron 5 individuos de cada una de 3 de placas en perpendiculares, a las cuales se les fue marcando la región distal del ancho donde se inicia, así llamado un vernier digital de 0.01 mm de precisión, así como la biométrica cada de los siguientes límites con una balanza analítica de 0.001 g de precisión. El largo de las procesos de dicha almeja fue por una muestra total cada una cada cada 0.05°C, hasta llegar a peso constante. De igual manera se determinó el peso de la concha y del manto del y organismos disponibles en la misma (*fouling*).

Para estimar el crecimiento de la ostra con los lotes a cultivarse los, semanal mente se cosechaban y se midieron los anchos de la concha entre 10, 5 m, siguiendo una fórmula para determinar la velocidad, el 1 vez/mes, a lo cual se le sigue de los mismos meses en 5 días hasta y Parsons (1972). La temperatura se registró continuamente cada 30 minutos a 20 cm bajo la superficie del mismo (Hobo, Onset, USA).



Figura 1. Juveniles de *Crassostrea gigas* producidas por el CENAIM-ESPOL y cultivadas en suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

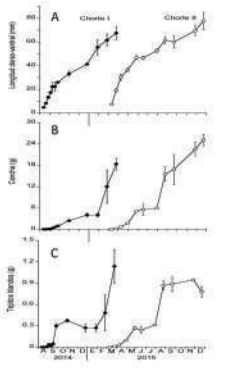


Figura 2. Crecimiento en longitud antero-posterior (A) y ganancia en peso de la concha y tejidos blandos de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

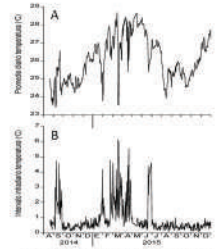


Figura 4. Promedio diario (A) y variabilidad intradiaria (B) de la temperatura en el sitio del cultivo de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

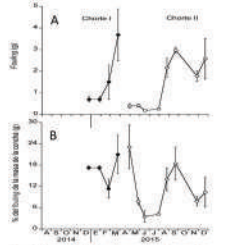


Figura 3. Masa total del *fouling* (A) y su porcentaje relativo a la masa de la concha (B) de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

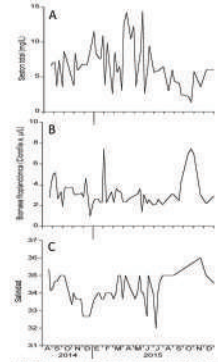


Figura 5. Sección total (A), biomasa fitoplanctónica estimada por Clorofila a (B) y Salinidad (C) total a lo largo de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

Resultados y discusión

El crecimiento en concha, tanto en longitud como en masa (Fig. 2A,B) de *Crassostrea gigas* en condiciones de cultivo suspendido en Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador, generalmente, en ambos cohortes, siguió una tendencia lineal en los primeros meses de crecimiento con una disminución de su pendiente en los últimos, cuando inicia del cese invierno de una lineal con (Urban 2002), lo cual sugiere que la concha no estuvo estadísticamente limitada por factores ambientales, aunque algunos excepciones de no disposición de concha encontrar en periodos de elevada temperatura y variabilidad diaria. Contrariamente a la concha, los tejidos blandos (Fig. 2C) muestran una variabilidad en la masa y no siguiendo una tendencia de crecimiento en potencia (Lagos & Quetin-Allaz-mani 2014), particularmente de C. gigas (Chávez-Villalba 2016), cuando observaciones de abundancia del *fouling* tanto en la malla de las cestas de cultivo que registra del como sobre la concha, dada la elevada probabilidad de organismos y acumulación de material acompañada, parece importante, en el cultivo de C. gigas en las cestas consistentes.

Un análisis a efectos el *fouling* sobre la concha aumentó mensualmente y luego disminuyó (Fig. 3A,B) lo cual indica la acción de los entre por otros organismos de la comunidad dentro de las cestas. Esta observación es consistente con los resultados del uso de otros organismos especies encontrados en dentro de las cestas de cultivo (en los bivalvos del *fouling* en el cultivo de *C. gigas* en zonas costeras con (Sonnenholzner et al. 2016). A aunque no incrementan una asociación de ocupación del *fouling* en el crecimiento, este puede llegar hasta en 27 % del peso de la concha (Fig 3B) lo cual puede traer inconvenientes en la filtración y otros procesos fisiológicos en bivalvos de disposición horizontal (Lodeiros 2002), como es el caso de *C. gigas* bajo condiciones de cultivo.

Las costas de Ecuador y particularmente de la región de presentan esta localización en la costa fluctuación de dos de los mayores consistentes marinos, el Sistema Corriente del Pacífico Central Americano y el sistema de Humboldt, caracterizando una zona de mezcla del Pacífico americano, caracterizada por una amplia variabilidad espacial y temporal de las condiciones oceanográficas (Alfaro 1998). Aunque la temperatura muestra una tendencia general en estacionalidad con el año en el del (Humboldt) varían la zona (Fig. 4A), se genera condiciones importantes de variabilidad intradiaria diaria >4°C, Fig 4B), las cuales tienen un notable efecto en la alimentación del crecimiento de la concha y el desarrollamiento en las masas de los tejidos. Esta observación viene con barra de por los análisis multivariados, donde cada lote separa una intervalo para el crecimiento en los modelos, explicando la variabilidad del crecimiento en >1.7% Chávez-Villarreal (2014) en un análisis de *Cultivo de C. gigas en el Pacífico mexicano*, indica de igual modo, que el factor ambiental más importante en el cultivo de la especie es la temperatura.

El sestón (Fig. 5A) no mostró una tendencia correlativa con los cambios en el crecimiento, y no parece generar influencias negativas, por otra parte, la composición de biomasa fitoplanctónica estimada por clorofila a, la cual se mantuvo generalmente >2 µg/L (Fig. 5B) no parece limitar la disponibilidad de alimento para moluscos bivalvos (Incze 2002, Rice y Schle 1.3 1988). La calidad de sólo fue de un en 2.5 (Fig. 5C) la mayoría del periodo experimental, estos cambios no generan efectos notables en procesos fisiológicos en moluscos bivalvos (Bayne et 1983, Griffiths y Griffiths 1987, Lodeiros y Himmelman 2000).

Las demandas energéticas que acontecen en los procesos reproductivos (no estudiado en el experimento) pueden ser drenaje constantemente agua que podría estar disponible la producción somática y crecimiento en organismo. Aunque estas afirmaciones son preliminares establecidas con más no existe una disponibilidad de alimento adecuada (Lodeiros et al. 2000), es probable que este no haya contribuido notablemente a los altos tasas de crecimiento en total presentados estudio. Investigaciones de reproducción como ordenes con el crecimiento de *C. gigas* y la variabilidad ambiental en las costas ecuatorianas son necesarios para dilucidar las hipótesis antes señaladas.

Sobre todo procesos reproductivos de gametogénesis hasta el desove con gametos viables encontrados los ambientes del Pacífico este tropical y tropical, y que la especie es elevadamente prolífera (>100 millones de huevos) con desarrollo larvario y posteriormente para la producción de semilla en condiciones de hatchery existentes, no se conocen exhaustivamente los estadíos marinos abundantes que pudieran formar bancos naturales, siguiendo esto que las larvas consideradas para la mayoría no fijos no exclusivamente sobre agregados para el ápice. Chávez-Villalba (2014) llama la atención sin embargo en las costas del Pacífico de México en relación de que este corresponde a otra zona biogeográfica, con implicaciones importantes en la introducción de la especie, lo que se justifica que no ha ocurrido, hasta ahora, un patrón sobre las poblaciones nativas y que la variabilidad del cultivo de *C. gigas* en dicho ambiente de la semilla producida en Ayangue. Esta circunstancia no excepción de la que se conoce en las costas ecuatorianas, donde tampoco se han observado mecanismos importantes de *C. gigas*. La cual puede sugerir la factibilidad de expansión del cultivo de *C. gigas* en el Pacífico tropical y subtropical a menor escala, como se genera como ejemplo en los subtropicales de Bahía, con una visión de poco impacto ambiental y particularmente en las comunidades bentónicas establecidas.

Aunque en el presente estudio no se analizó la capacidad invasiva, se estima que la especie tiene acumulado una cohortes fin del 45-6.0%, las cuales no coincide con otros países para el desarrollo del cultivo de *C. gigas* (Chávez-Villalba 2014).

Las tasas de crecimiento de 0.28 y 0.25 mm/día en longitud de los cohortes agosto 2014 y enero 2015, respectivamente, son consistentes con los tres décimos mencionados en las costas subtropicales del Pacífico mexicano, los cuales son las más elevadas de la especie (Chávez-Villa Ba 2016), con ellas se pueden obtener organismos de 90-110 mm de longitud antero-posterior en el primer año de cultivo.

Conclusiones y recomendaciones

La variabilidad intradiaria en la temperatura del crecimiento de *C. gigas* bajo condiciones de cultivo indujeron durante marzo de 2015, las tasas de crecimiento de *C. gigas* fueron elevadas, esta hayendo que puedan desarrollarse cultivos comerciales en menos de 1 año de crecimiento, generando de esta gran beneficio de cultivo. Se recomienda estudios en función de minimizar el estrés ambiental y optimizar las técnicas de cultivo en función de cualquier aldeamiento del mismo.

Agradecimientos

El trabajo se ha realizado como parte complementaria del proyecto de investigación *Desarrollo de protocolo de domesticación para el uso sostenible de nuevas especies marinas para consumo de alimento y repoblación de bancos naturales*, financiado por la SENESCYT. Los autores agradecen la participación en el estudio durante su vinculación al CENAIM-ESPOL, a través del proyecto de Formación de la SENESCYT, Ecuador.

Referencias

Alfaro S. 1998. Presencia de la corriente costanera ecuatoriana. Acta Oceanogr. Pac. 9:10-17.

Bernard F.R. 1983. Physiology and the mariculture of some northeastern Pacific bivalve molluscs. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. 65, 28 pp.

Chávez-Villava J. 2014. Cultivo de ostión Crassostrea gigas. Análisis de 40 años de actividades en México. Hidrobiológica 2014, 24 (2): 175-190.

Chamberlain M., Himmelman, J.H., 1996. Recruitment, growth and production o f giant scallops. *Placopecten magellanicus*. in Baie des Chaleurs, eastern Canada. Mar. Biol. 124, 661–674.

Griffiths, C.L., Griffiths, J.A. 1987. Bivalvia. In: Parsdon, J.H., Vernberg, F.J. , Eds., Animals Intertidales, Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 1–88.

Hair J.F., Black, W.C., Babin B.J., Anderson, R.E. 2014. Multivariate data analysis. Seventh Edition. Pearson International Edition, London, 734 pp.

Lacuesta E, Gutiérrez-Mansoni N. 2014. Biofouling: impact on growth and ecosystem functioning: a review for bivalve aquaculture. Reviews in Aquaculture 6: 1-44

Lodeiros C. 2002. Cinética de pesca y posición. Revista de Biología Tropical 50 (3/4): 875-876.

Lodeiros C., Himmelman J. H. 2000. Identification of environmental factors affecting growth and survival of the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus*. In suspended culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela. Aquaculture 182: 91-114.

Lombardi P. 1997. Manual para el Cultivo de Ostras en Granjas Comunitarias. Proyecto ECAGUA/MAR. 25 pp.

Mora-Sa L., Le Bouff, R.M., Goodbrand, P., 2008. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Cooperative Research Report No. 290. Copenhagen. 42 p.

Ren J.S., Schiel DR. 2008. A dynamic energy budget model: parameterization and application to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand waters. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 361: 42–48.

Sandy S.A. 2002. A review of food availability, sun water chemistry ties and biodyn growth performance of coastal carbon sites in temperate and warm temperate regions of the world. Fisheries Research Report No. 132. Department of Fisheries, Western Australia, 42 pp.

Sonnenholzner J., Márquez A., Lodeiros C. 2016. Evaluación de los artes de mar- *Arbacia incisa* y *Bacalao* in desarrollo como biocontrol del fouling en cestas del cultivo de la ostra *Crassostrea gigas* en Ecuador. 3er Congreso Latinoamericano de Equinodermos, 18-22 julio 2016, Costa Rica.

Strickland J. D.H., Parsons, T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bull. Fish. Res. Board. Can., Vol. 167, 2nd edn., 310 pp.

Urban H.J., 2002. Modeling growth of different developmental stages in bivalves. Marine Ecology Progress Series, 238: 109–114.

Desarrollo y aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico temprano de enfermedades bacterianas en tejido de rodaballo

Chapela[1] M.J., Garrido-Maestu[2] A., Ferreira[1] M., Ruiz-Cruz[3] A., Martín-Varela[3] I. & Fernández[3] J.

[1]ANFACO-CECOPESCA. Carretera Col. Univ. 16, 36310 Vigo (Pontevedra). España.
martina@anfaco.es

[2]International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL). Av. Mestre José Veiga s/n, 4715-330 Braga. Portugal

[3]INSUIÑA S.L.

Resumen

El cultivo de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) puede verse afectado por numerosas patologías bacterianas que causan pérdidas económicas importantes en las empresas del sector. El desarrollo de métodos rápidos para el diagnóstico precoz de estas enfermedades acelerará el tiempo de respuesta y reducirá el impacto económico de manera significativa. En este trabajo se ha desarrollado y optimizado un método de PCR multiplex en tiempo real para la detección simultánea de *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Tenacibaculum maritimum* en tejido de rodaballo.

Palabras clave

Diagnóstico, PCR en tiempo real, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Tenacibaculum maritimum*, rodaballo.

Introducción

En la actualidad la producción de pescado y productos del mar mediante acuicultura supera en gran medida a la pesca extractiva. Este hecho ha supuesto la expansión de diferentes enfermedades infecciosas, que son las responsables de importantes pérdidas económicas, cuyo impacto se ve incrementado por las técnicas de cultivo intensivo empleadas en la mayoría de las instalaciones (Lafferty *et al*., 2015).

La detección de microorganismos patógenos en acuicultura se ha desarrollado de manera tradicional mediante técnicas de microbiología clásica que en su mayor parte implican una demora de al menos 24-48 h para la obtención de resultados fiables. Sin embargo, los métodos moleculares han permitido solventar algunas de las limitaciones de los métodos clásicos de diagnóstico. En las pasadas décadas ha habido un creciente interés en el desarrollo de protocolos de biología molecular específicos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de diferentes tipos de bacterias patógenas que pueden afectar a los peces. En concreto, la PCR en tiempo real muestra un gran potencial para reemplazar a otros métodos gracias a sus múltiples ventajas como su rapidez y fiabilidad a la hora de determinar la carga bacteriana en tejidos de peces (Del Cerro *et al*., 2002). En la actualidad los retos en este campo incluyen el desarrollo de protocolos que permitan la detección e identificación múltiple de varios patógenos en un único ensayo y la aplicación de técnicas de diagnóstico basadas en el análisis de ADN en las instalaciones acuícolas.

En la industria acuícola el 34% de las enfermedades están causadas por bacterias, siendo de las más importantes para el cultivo del rodaballo *A. salmonicida*, *V. anguillarum* y *T. maritimum* (Lafferty *et al.*, 2015). *A. salmonicida* es el agente causal de la furunculosis, que causa lesiones musculares que pueden generar úlceras en la superficie de la piel y originar una septicemia (Vincent *et al*., 2015). *V. anguillarum* es el agente causal de la vibriosis, una septicemia hemorrágica mortal que afecta peces, bivalvos y crustáceos (Frans *et al.*, 2011). *T. maritimum* es el agente causal de la tenacibaculosis atacando la piel, boca, aletas y cola del pez, causando necrosis y úlceras en la superficie del cuerpo, mortalidad y pérdidas económicas muy severas en el NW de España (Avendaño-Herrera *et al*., 2006).

En este contexto el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método de PCR multiplex en tiempo real para el diagnóstico de estos patógenos en tejidos de rodaballo. Se pretendió proveer a la industria acuícola de una herramienta que permitiera reducir el tiempo de diagnóstico en relación a las técnicas convencionales lo que permitiría tomar medidas de contención más rápidas para el tratamiento de los peces enfermos reduciendo las pérdidas económicas.

Materiales y métodos

1. Cepas bacterianas.

Se emplearon cepas de *A. salmonicida* y *V. anguillarum* aisladas por la empresa INSUIÑA SL a partir de peces enfermos. *T. maritimum* se adquirió a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 4276).

Las bacterias se cultivaron empleando las condiciones descritas para estas especies por la CECT.

2. Tejidos de peces infectados.

Los peces infectados, diagnosticados en la planta de cultivo, se enviaron al laboratorio para la extracción de los tejidos (aleta, músculo, vísceras y corazón) seleccionados para comprobar la eficacia del método en la detección de los patógenos de interés.

3. Extracción de ADN y cuantificación.

Se aplicaron dos métodos de extracción de ADN diferentes dependiendo del tipo de muestra:

- ❖ Extracción de ADN de cultivos puros.

La extracción de ADN a partir de cultivo puros se realizó siguiendo el protocolo descrito por Blanco-Abad *et al.*, 2009 (Blanco-Abad *et al*., 2009; Garrido *et al*., 2012) last year the World Health Organization (WHO). En resumen 1 mL de cultivo líquido se centrifugó a 9.000 g durante 7 min. El pellet se resuspendió en 300 µL de TE 1 X buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y las suspensiones de células se lisaron incubándolas en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Finalmente las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante que contiene el ADN se transfirió a tubos nuevos y se almacenó a -20°C para su empleo posterior.

- ❖ Extracción de ADN de tejidos.

La extracción de los tejidos se realizó empleando el NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- ◊ Genes diana seleccionados y cebadores y sondas diseñados para la detección mediante qPCR de cada patógeno.

La selección de los genes diana se realizó en base a trabajos de identificación genética relativos a estas bacterias y se procedió al diseño de cebadores y sondas en el caso de *A.*

salmonicida y *T. maritimum* y sólo de sonda en el caso de *V. anguillarum*. En la tabla I se recogen los genes seleccionados y los cebadores y sondas diseñados para la detección de las tres bacterias. Además se incluyó un control interno basado en ADN quimérico para monitorizar la reacción de qPCR (Calvo *et al.*, 2008).

Todos los cebadores y sondas fueron adquiridos a Integrated DNA Technologies (IDT, Inc., Leuven Belgium).

Tabla I.- Cebadores y sondas diseñados durante el desarrollo de este trabajo. Los cebadores empleados para la detección de *V. anguillarum* son los publicados en los trabajos citados.

Bacteria	Gen	Referencia	Cebadores y sonda diseñados	Fragmento amplificado
A. salmonicida	*fstA*	Beaz-Hidalgo *et al*., 2008	F 5'-gtgaccgccacctatgaatc-3' R 5'-catcttgtgctgctggtcat-3' FAM/5'-ttcggggaagaaaaa-cagtg-3'/3IABkFQ	147 pb
V. anguillarum	*virA*/*virB*	Prol *et al.*,2009, 2010	Cy5/5'-atttcgacgagcgtcttgtt-3/3BHQ_1	99 pb
T. maritimum	*gyrB*	Suzuki, 2001	F 5'-aaggtttttgaaaacgaggaaa-3' R 5'-aacgtaattttgataaatttaatgctc-3' HEX/5'-tgcattaggagtttc-tattggaa-3'/3IABkFQ	103 pb

Método de detección de qPCR multiplex

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL incluyendo 10 µL de Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., USA) y 2 µL de ADN molde. El termociclador Stratagene Mx3005p (Agilent Technologies, Inc., USA) se programó con el siguiente perfil térmico: 15 min a 95°C para la activación de la polimerasa (Hot Start) seguidos de 40 ciclos cada uno de los cuales consiste en un paso de desnaturalización de 10 s a 95ºC y un paso de hibridación-extensión de 30 s a 60°C.

Resultados y discusión

Para llevar a cabo la detección de las bacterias de interés mediante qPCR multiplex en primer lugar se optimizó la concentración de cebadores, sonda y la temperatura de hibridación de modo individual para cada una de las bacterias de interés.

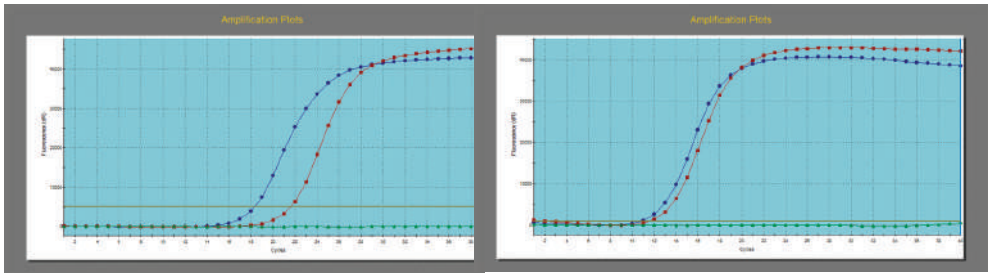


Figura 1.- Curvas de amplificación obtenidas en la detección de *A. salmonicida* y *T. maritimum*.

Una vez optimizadas las condiciones de la qPCR para cada una de las bacterias individualmente (Fig. 1) se optimizó una qPCR multiplex para los 3 microorganismos (Fig. 2). Las concentraciones de cebadores y sonda finalmente seleccionados se indican en la tabla II.

Tabla II.- Concentración de cebadores y sondas empleados en la qPCR multiplex desarrollada.

Bacteria	Cebadores	Sonda
A. salmonicida	200/300 nM	200 nM
T. maritimum	300 nM	150 nM
V. anguillarum	100 nM	100 nM
IAC (Internal Amplification Control)	150 nM	50 nM

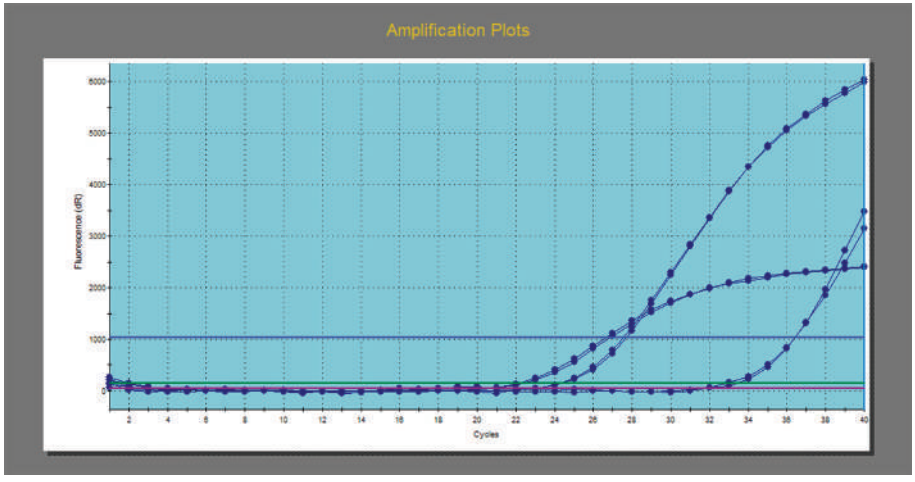


Figura 2.- Curvas de amplificación obtenidas en la detección de *V. anguillarum*, *A. salmonicida* y *T. maritimum* mediante qPCR multiplex.

Los resultados demuestran que se ha puesto a punto en condiciones óptimas una qPCR multiplex para la detección de *A. salmonicida*, *V. anguillarum* y *T. maritimum*. El método desarrollado permite una identificación específica, rápida y eficiente de estas tres especies mejorando el tiempo de respuesta de las empresas acuícolas frente a enfermedades con alta repercusión económica.

En los peces enfermos recibidos de diferentes plantas de INSUIÑA SL se ha podido detectar la presencia de *V. anguillarum* en todos los tejidos analizados (aleta, músculo, vísceras y corazón) (Fig 3). En cuanto a *A. salmonicida,* ha sido identificada solamente en el músculo y vísceras, confirmando estudios previos que demostraban que *A. salmonicida* se aísla fundamentalmente a partir del músculo del pez (Wiklound y Dalsgaard, 1998). Sin embargo, durante el desarrollo del proyecto no se ha detectado la presencia de *T. maritimum* en las muestras de tejido analizadas.

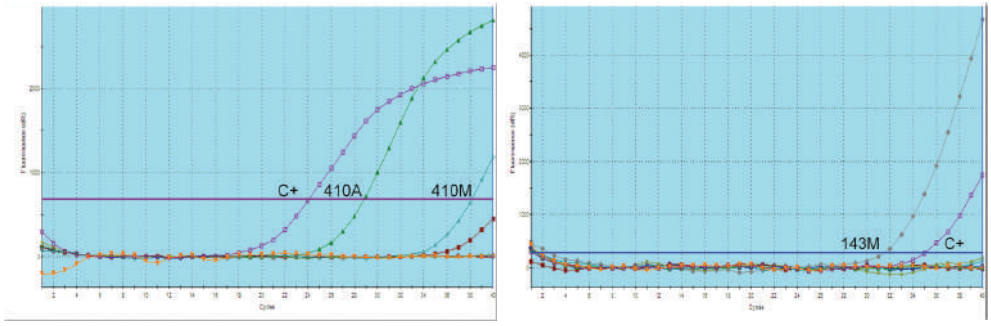


Figura 3.- Resultados del análisis de los tejidos de rodaballo mediante qPCR multiplex de *V. anguillarum* en aletas e músculo (410A y 410M) y *A. salmonicida* en músculo (143M), C+ es el control positivo.

Conclusiones

La detección múltiple de patógenos en una única prueba, y su implementación de manera rutinaria en la monitorización de enfermedades en las plantas de acuicultura, constituye un paso más en el desarrollo de técnicas rápidas, específicas y efectivas de diagnóstico. A esto hay que añadir que la qPCR ofrece mayor velocidad, especificidad y sensibilidad sobre los métodos de PCR tradicionales y su aplicación en formato multiplex incrementa el número de patógenos que puedan ser analizados en la misma reacción y reducir costes (Chapela *et al.*, 2010; Garrido-Maestu *et al.*, 2014, 2015, 2016).

Bibliografía

Avendaño-Herrera R., Toranzo A.E. & Magariños B. 2006. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Dis. Aquatic. Org.* 71(3): 255-266.

Beaz-Hidalgo R., Magi G.E., Balboa S., Barja J.L., Romalde J.L. 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Vet. Microbiol.* 128:386-394.

Blanco-Abad V., Ansede-Bermejo J., Rodriguez-Castro A. & Martinez-Urtaza J. 2009. Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 129(3): 229-236.

Calvó L., Martinez-Planells A., Pardos-Bosch J. & Garcia-Gil L.J. 2008. A new real-time PCR assay for the specific detection of Salmonella spp. Targeting the *bip*A gene. *Food Anal. Method*. 1(4): 236-242.

Chapela M.J., Fajardo P., Garrido A., Cabado A.G., Ferreira M., Lago J..& Vieites JM. 2010 Comparison between a TaqMan Polymerase Chain Reaction Assay and a Culture Method for ctx-positive *Vibrio cholerae* detection. *J. Agri.Food Chem.* 58: 4051-4055.

Del Cerro A., Márquez I. & Guijarro J.A. 2002. Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. Appl. *Environ. Microbiol*. 68: 105177-5180.

Frans I., Michiels C.W., Bossier P., Willems K.A., Lievens B. & Rediers H. 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *J. Fish Dis.* 34(9): 643-661.

Garrido A., Chapela M.J., Román B., Ferreira M., Lago J., Vieites J.M. & Cabado A.G. 2012. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes* in processed food samples. *Eur. Food Res. Technol.* 234(4): 571-580.

Garrido-Maestu A., Chapela M.J., Román B., Vieites J.M. & Cabado A.G. 2014. Application of a novel pathogenicity marker in a multiplex real-time PCR method to assess total and pathogenic *Vibrio vulnificus* in food and environmental samples. *Food Control* 35 (1): 274-283.

Garrido-Maestu A., Chapela M.J., Vieites J.M. & Cabado A.G. 2015. lolB gene, a valid alternative for qPCR detection of *Vibrio cholerae* in food and environmental samples. *Food Microbiol,* 46: 535-540.

Garrido-Maestu A., Lozano-León A., Rodríguez-Souto R.R., Vieites-Maneiro R., Chapela M.J. & Cabado A.G. 2016. Presence of pathogenic *Vibrio* species in fresh mussels harvested in the southern Rias of Galicia (NW Spain). *Food Control,* 59: 759-765.

Lafferty K.D., Harvell C.D., Conrad J.M., Friedman C.S., Kent M.L., Kuris A.M., Powell E.N., Rondeau D. & Saksida S.M. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann Rev Mar Sci*. 7: 471-496.

Prol M.J., Bruhn J.B., Pintado J. & Gram L. 2009. Real-time PCR detection and quantification of fish probiotic Phaeobacter strain 27-4 and fish pathogenic *Vibrio* in microalgae, rotifer, *Artemia* and first feeding turbot (*Psetta maxima*) larvae. *J. Appl. Microbiol.*106: 1292-1303.

Prol M.J., Planas M. & Pintado J. 2010. Different colonization and residence time of *Listonella anguillarum* and *Vibrio splendidus* in the rotifer *Brachionus plicatilis* determined by real-time PCR and DGGE. *Aquaculture,* 302: 26-35.

Suzuki M., Nakagawa Y., Harayama S. & Yamamoto S. 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine cytophaga-like bacteria:propasol for *Tenacibaculum* gen nov, with *Tenacibaculum maritimum* comb anov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov. and description of Tenacibaculum mesophylum sp,nov. *Int. J. Syst..Evol. Micr.* 51: 1639-1652.

Vincent A.T., Tanaka K.H., Trudel M.V., Frenette M., Derome N. & Charette S.J. 2015. Draft Genome Sequences of Two *Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida Isolates 2 Harboring Plasmids Conferring Antibiotic Resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* p.fnv002.

Wiklound T. & Dalsgaard I. 1998. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Dis. Aquat. Org.* 32: 49-69.

Desarrollo y aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico temprano de enfermedades bacterianas en tejido de rodaballo

María José Chapela[1], Alejandro Garrido-Maestu[2], Martiña Ferreira[1], Asela Ruiz Cruz[3], Iris Martin Varela[3], Jacobo Fernández[3]
1- ANFACO-CECOPESCA, 2-INL-International Iberian Nanotechnology Laboratory, 3-INSUIÑA SL

Resumen

El cultivo de rodaballo (*Scophtalmus maximus*) puede verse afectado por numerosas patologías bacterianas que causan pérdidas económicas importantes en las empresas del sector. El desarrollo de métodos rápidos de detección de estas enfermedades acelerará el tiempo de respuesta y reducirá el impacto económico de manera significativa. En este trabajo se ha puesto a punto una técnica de PCR Multiplex en tiempo real para la detección simultanea de *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Tenacibaculum maritimum* en tejido de rodaballo.

Introducción

El rodaballo *(Scophtalmus maximus)* es una de las especies más importantes de la acuicultura gallega con una producción próxima a las 8.000 Tm (APROMAR, 2015). Sin embargo, su cultivo puede verse afectado por varias enfermedades bacterianas y parasitarias que pueden causar daños económicos irreversibles al sector (Palenzuela et al., 2002, Leiro et al., 2002). El uso de métodos moleculares para el diagnóstico permitirá tomar decisiones rápidas para disminuir el impacto económico de estas patología. El objetivo de este trabajo es desarrollar un método de PCR Multiplex en tiempo real (qPCR) para la detección de las tres bacterias más comunes en el cultivo de rodaballo: *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Tenacibaculum maritimum* (Fig 1).



(a) (b)

Fig.1 Rodaballos enfermos donde se aprecian síntomas patológicos causados por (a) *Aeromonas salmonicida*, (b) *Vibrio anguillarum*

Materiales y métodos

1- Selección de genes

Bacteria	Gen	Referencia	Fragmento amplificado
Aeromonas salmonicida	*fstA*	Beaz-Hidalgo et al., 2008[a]	**147 pb**[b]
Vibrio anguillarum	*virA/virB*	Prol et al., 2009, 2010[a]	**99 pb**
Tenacibaculum maritimum	*gyrB*	Suzuki, 2001[a]	**103 pb**

[a] Diseño propio en base a las referencias citadas [b] Pb: Pares de Bases

2- Puesta a punto del método de qPCR Multiplex



3- Aplicación a rodaballos enfermos



En los peces enfermos recibidos de diferentes plantas de INSUIÑA SL se ha podido detectar la presencia de *V. anguillarum* en todos los tejidos analizados (aleta, músculo, vísceras y corazón) (Fig 2). En cuanto a *A. salmonicida* ha sido identificada solamente en el músculo y vísceras, confirmando estudios previos que demostraban que *A. salmonicida* se aísla fundamentalmente a partir del músculo del pez (Wiklound and Dalsgaard 1998). Sin embargo, durante el desarrollo del proyecto no se ha detectado la presencia de *T. maritimum* en las muestras de tejido analizadas.

Resultados

Se ha puesto a punto en condiciones óptimas una qPCR multiplex para la detección de *A. salmonicida*, *V. anguillarum* y *T. maritimum*. El método desarrollado permite una identificación especifica, rápida y eficiente de estas tres especies mejorando el tiempo de respuesta de las empresas acuícolas frente a enfermedades con alta repercusión económica.

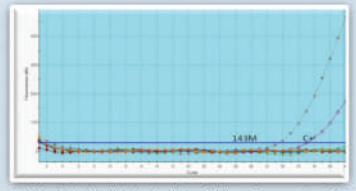


Fig 2. Resultados de análisis de músculo de rodaballos enfermos mediante PCR multiplex en tiempo real. Se detecta presencia de *Aeromonas salmonicida*.

Bibliografía

Apromar, 2015. La acuicultura en España 2015.
Beaz-Hidalgo R., Magariños B., Balboa S. et al. (2008) Development of a PCR protocol for the detection of Aeromonas salmonicida in fish by amplification of the fstA (ferric siderophore receptor) gene. Veterinary Microbiology 128:386–394.
Leiro J., Sisa RMG., Parama A., Ubeira FM., Sanmartín ML. (2002) RFLP analysis of PCR-amplified small subunit ribosomal DNA of three fish microsporidian species. Parasitology 125:113–118.
Palenzuela O., Redondo M.J., Alvarez-Pellitero P. (2002) Description of Enteromyxum scophthalmi gen. nov., sp nov (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (Scophthalmus maximus L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. Parasitology 124:569–579.
Prol M.J., Bruno I.B., Pereyra A., Gravic L. 2009. Real-time PCR detection and quantification of fish probiotic Phaeobacter strain 27-4 and fish pathogenic Vibrio in microalgae, rotifer, Artemia and first feeding turbot (Psetta maxima) larvae. Journal of Applied Microbiology 106: 1292–1303.
Prol M.J., Pérez M., Pintado J. 2010. Different colonization and residence time of Listonella anguillarum and Vibrio splendidus in the rotifer Brachionus plicatilis determined by real-time PCR and DGGE. Aquaculture 302: 26–35.
Suzuki M., Nakagawa Y., Harayama S., Yamamoto S. (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine cytophaga-like bacteria proposed for Tenacibaculum gen nov, with Tenacibaculum maritimum comb.nov. and Tenacibaculum ovolyticum comb. Nov and description of Tenacibaculum mesophylum sp.nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:(5) , pp. 1639-1652.
Wiklound T., and Dalsgaard I., 1998. Occurrence and significance of atypical Aeromonas salmonicida in non-salmonid and salmonid fish species: a review. Dis Aquat Org, Vol. 32: 49-69,1998.

XIX FORO DOS RECURSOS MARIÑOS E DA ACUICULTURA DAS RÍAS GALEGAS

Este trabajo se realizó con la financiación de la Consellería de Innovación e Industria de la Xunta de Galicia *Ref. 10MMA006E*

Deseño dun método de PCR multiplex en tempo real para o diagnóstico rápido de tres enfermidades bacterianas na troita arco da vella

Ferreira[1] M., Chapela[1] M.J., Varela[2] C., Garrido Maestú[3] A. & Arregui[2] L.
[1]ANFACO-CECOPESCA. Carretera Col. Univ. 16, 36310 Vigo (Pontevedra). España.
martina@anfaco.es
[2]Grupo Tres Mares S.L. Lires s/n, 12570 Cee, A Coruña.
[3]International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL). Av. Mestre José Veiga s/n, 4715-330 Braga. Portugal.

Palabras chave

PCR en tempo real, diagnóstico, *Flavobacterium psychrophilum*, *Lactococccus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, troita arco da vella

Resume

Lactococcus garvieae, *Yersinia ruckeri* e *Flavobacterium psychrophilum* son tres patóxenos con grave impacto no cultivo de troita arco da vella (*Oncorrhynchus mykiss*) a nivel mundial. A súa diagnose rápida é fundamental para reducir os tempos de resposta e seleccionar o tratamento máis axeitado. Os métodos de microbioloxía tradicional poden precisar ata varios días para dar resultados; en contraste, os métodos moleculares son rápidos e moi específicos. Neste traballo deseñouse e validouse un método de PCR multiplex en tempo real para a detección dos tres patóxenos en tecidos de troita arco da vella e comparouse o seu rendemento co das técnicas microbiolóxicas clásicas.

O método de PCR en tempo real deseñouse a partir de xens diagnóstico, cebadores e sondas validados en estudos previos, agás as sondas e os cebadores para a detección de *Y. ruckeri*, que foron deseñados especificamente para o presente estudo. Unha vez validado o método de PCR con cada bacteria individualmente, optimizouse a PCR multiplex para a detección simultánea das tres especies. *L. garvieae*, *Y. ruckeri* e *F. psychrophilum* detectáronse correctamente nas súas respectivas mostras. A especificidade do método confirmouse en ensaios con 49 cepas bacterianas non diana, sen que se observara reactividade cruzada en ningún caso.

Para a detección dos tres patóxenos en tecidos de troita utilizáronse 54 mostras de bazo e cerebro de troitas con síntomas de enfermidade. Realizouse unha comparación do método de PCR multiplex cos métodos microbiolóxicos clásicos. A PCR multiplex demostrou maior sensibilidade, xa que detectou 7 casos positivos de *F. psychrophilum*, 4 de *L. garvieae* e 6 de *Y. ruckeri* non detectados mediante técnicas microbiolóxicas clásicas.

Por tanto, o método de PCR multiplex en tempo real deseñado pode ser usado como unha ferramenta de diagnóstico específica e fiable, superando as técnicas tradicionais en sensibilidade e rapidez. Trátase dun método facilmente implantable en instalacións de cultivo de troita arco da vella, que pode acurtar os tempos de diagnóstico e contribuír a evitar perigosos andazos de infeccións bacterianas.

Diseño de un método de PCR multiplex en tiempo real para el diagnóstico de tres enfermedades bacterianas en trucha arco iris

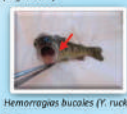
Martiña Ferreira [1], María José Chapela [1], Celia Varela [2], Alejandro Garrido-Maestu [3], Luz Arregui [3]
1- ANFACO-CECOPESCA, 2- Grupo Tres Mares, S.L, 3- International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL)

Resumen

Lactococcus garvieae, *Yersinia ruckeri* y *Flavobacterium psychrophilum* son tres patógenos de grave impacto en el cultivo de la trucha arco iris (*Oncorrhynchus mykiss*) a nivel mundial. En este trabajo se ha desarrollado una PCR multiplex a tiempo real (qPCR) para la detección simultánea de estos tres patógenos. Un estudio comparativo entre el método de análisis microbiológico tradicional y de la qPCR ha sido realizado empleando 54 muestras de bazo y cerebro de trucha arco iris. El método desarrollado mostró una sensibilidad relativa del 100%, especificidad mayor al 85% y una eficiencia diagnóstica superior al 87%; con una eficiencia de amplificación en multiplex que osciló entre un 97 y un 108%. Estos datos muestran que esta qPCR multiplex es una herramienta de diagnóstico fiable y rápida para la detección de *L. garvieae*, *Y. ruckeri* y *F. psychrophilum en trucha* arcoíris.


Exoftalmia (L. garvieae)


Úceras en la piel (F. psychrophilum)


Hemorragias bucales (Y. ruckeri)

Introducción

El desarrollo de los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido una detección rápida y segura de los patógenos en acuicultura. Este avance se consolidó con el uso de las PCR multiplex para el diagnóstico conjunto de varios patógenos (Balcázar *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2008). Este trabajo se ha centrado en tres patógenos de la trucha arco iris que causan daños económicos importantes al sector acuícola gallego, nacional y europeo: *L. garvieae*, *Y. ruckeri*, y *F. psychrophilum* (Aguado-Urda et al., 2011; Fouz et al., 2006; Barnes and Brown 2011). El objetivo es desarrollar una PCR multiplex en tiempo real (qPCR) que permita la detección fiable y rápida de estos tres patógenos y demostrar su eficacia respecto a los métodos clásicos de detección .

Materiales y métodos

Bacteria	Fragmento de DNA	Referencias	Cebadores
F. psychrophilum	Proteína	Maranich & Wiens, 2013	Fp Sig F 5' GGTAGCGGAACCGGAAATG 3' Fp Sig R 5' TTTCTGCCACCTAGCGAATACC 3'
Y. ruckeri	glnA	Keeling et al., 2012	YR glnA F: 5'-TCCAGCACCAAATACGAAGG-3' YR glnA R: 5' –ACATGGCAGAACGCAGATC-3'
L. garvieae	ITS	Diseño propio	pendiente de publicación



54 muestras de bazo y corazón


Medio de cultivo




Extracción de ADN de los Tejidos + qPCR Multiplex

Método de comparación				
	PA	ND	PD	NA
Cultivo	+	+	-	-
qPCR	+	-	+	-

Sensibilidad relativa (SE) = PA / (PA + ND) x 100
Especificidad relativa (SP) = NA / (PD + NA) x 100
Precisión relativa (AC) = [(PA + NA) / N] x 100
*N es el número de muestras analizadas



Resultados

En este estudio se ha puesto a punto una qPCR para la detección conjunta de *L. garvieae*, *Y. ruckeri*, y *F. psychrophilum*. Esta qPCR ha mostrado un porcentaje de especificidad del 100%, usando 49 cepas de bacterias diferentes. Además, se ha podido lograr una eficiencia que oscila entre 97 y 108% a la hora de la amplificación de las tres bacterias específicas (Fig. 1). Este rango es un indicador de una eficiencia correcta (Raymaekers *et al.*, 2009).

	PA	NA	PD	ND	SE	SP	AC
F. psychrophilum	8	39	7	0	100	85	87
L. garvieae	3	47	4	0	100	92	93
Y. ruckeri	5	43	6	0	100	88	89

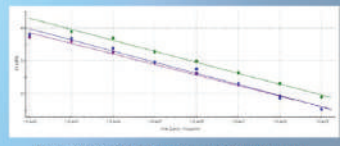


Figura 1. diagrama de la eficiencia de la amplificación de las tres bacterias. Cada dato es la media de un triplicado.

El análisis de la 54 muestras de bazo y corazón recogidas de 36 truchas arco iris infectadas de las plantas del Grupo Tres Mares ha mostrado una mayor sensibilidad del método de qPCR, detectando 7 casos de *F. psychrophilum*, *4 de L. garvieae* y 6 *Y. ruckeri*, no detectados por el método tradicional.

Por lo tanto, el método de análisis con qPCR diseñado para identificar *F. psychrophilum*, *L. garvieae y Y. ruckeri* en trucha arco iris puede ser usado como una herramienta de diagnóstico especifica y fiable, superando el método tradicional en fiabilidad y rapidez.

Bibliografía

Aguado-Urda M, Lopez-campos G H, Gibello A., Cutuli M.T., Lopez-Alonso V., Garayzabal J.F., Mar Blanco M., 2011. Genome sequence of lactococcus garvieae 8831, isolated from rainbow trout lactococcosis outbreaks in Spain. J. Bacteriol. 193:4269–4269.
Fouz B., Zarza C., Amaro C., 2006. First description of non-motile Yersinia ruckeri serovar I strains causing disease in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), cultured in Spain. J. Fish Dis. 29, 339–344. 10.1111/j.1365-2761.2006.00723.x.
Barnes M E and Brown M L., 2011. A Review of Flavobacterium psychrophilum Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment. The Open Fish Science Journal, 2011, 4, 1-9
Maranich D.P., Wiens G.D., 2013. A real-time polymerase chain reaction assay for identification and quantification of Flavobacterium psychrophilum and application to disease resistance studies in selectively bred rainbow trout Oncorhynchus mykiss. FEMS Microbiology Letters 335, 122–129.
Keeling S.E., Johnston C., Wallis R., Brosnahan C.L., Stuthers N., McDowall W.L., 2012. Development and validation of real-time PCR for the detection of Yersinia ruckeri. Journal of Fish Diseases 3, 123-125.
Raymaekers M., Smets R., Maes B., Cartuyvels R. (2009) Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. Journal of Clinical Laboratory Analysis 23, 145-151.

XIX FORO DOS RECURSOS MARIÑOS E DA ACUICULTURA DAS RÍAS GALEGAS
Este trabajo se realizó con la financiación del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI, proyecto nº. IDI-20120744).

Ensayos de crecimiento de coquina (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758) en sistemas de cultivo en el medio natural

Seoane[1] P., Catoira[2] J.L., Martínez[3] D. & Ojea[3] J.

[1]Cofradía de pescadores de A Coruña. Dársena de Oza, Local AR098, 15006 A Coruña, España. pseoane@hotmail.com

[2]Delegación Territorial de A Coruña. Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Casa do Mar, 15006 A Coruña

[3]Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA). Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Muelle de Porcillán s/n, 27700 Ribadeo (Lugo)

Resumen

A partir de muestreos efectuados en la playa de Bastiagueiro (A Coruña), que dieron como resultado la comprobación de ausencia de tallas comerciales en una población de coquina, *Donax trunculus* (Catoira *et al.*, 261-274 de este libro), se emprendieron ensayos de cultivo de esa especie en zonas próximas a dicha playa, con objeto de determinar su crecimiento y tasa de mortalidad, en diferentes condiciones de cultivo.

Palabras clave

Donax trunculus, Coquina, Biometrías, Crecimiento, Mortalidad.

Introducción

Dentro del proyecto *Determinación das causas da diminución dos bancos de cadelucha. Condicionantes naturais e antropoxénicos*, se realizaron experiencias de cultivo de la especie *Donax trunculus*, con semilla procedente de criadero, para determinar su crecimiento y supervivencia en zonas próximas a la playa de Bastiagueiro, en la que se había caracterizado una población de esa especie, que no alcanzaba la talla comercial.

El objetivo de estos ensayos se basó en la experimentación de sistemas viables cara a una consecución de semilla de talla suficiente para ser sembrada en banco natural y para la comprobación del crecimiento de la especie hasta alcanzar la talla comercial.

Materiales y métodos

La semilla se estabuló en diferentes sistemas (panniers en suspendido y cajas plásticas sobre sustrato de arena incluyendo en su interior arena fina procedente de la playa de Bastiagueiro), localizando la situación con un GPS Garmin. Los sistemas fueron instalados en dos espacios diversos: el cultivo en suspendido bajo una boya con una batimetría de 12 m en la bocana de la ría del Burgo y las cajas sobre sustrato arenoso en el interior de la ría del Burgo, ambas zonas próximas a la playa de Bastiagueiro (Fig. 1).



Figura 1.- Situación de los sistemas de cultivo.

Los muestreos sobre la población fueron mensuales, siendo las muestras procesadas en laboratorio, obteniendo peso fresco y biometrías con un calibre Mitutoyo y una balanza analítica Cobos, de 0,01 mm y 0,01 g de precisión respectivamente, atendiendo a las normas de medición del "Etude globale sur la Telline en Camargue" (BIOTOPE, 2007). Para el procesado de datos se utilizó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010.

Semanalmente se registraron datos de salinidad, temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto, anotando la fecha, hora y coeficiente de marea.

Para el cultivo en suspendido se utilizaron estructuras apilables o "panniers" con inclusión de cuarterones, a diferentes profundidades y se experimentó con diferentes densidades al igual que en las cajas plásticas individuales en sustrato (Fig. 2)

La procedencia de los individuos fue del CIMA de Ribadeo (N=1.468 identificados como DXL1) el 14/04/2016, y del minicriadero de Vicedo (N=2.315 identificados como DXL2) el 07/06/2016, con tallas de 10 y 9 mm, respectivamente, de un año de edad, ya que el cultivo larvario de estas partidas había finalizado en mayo de 2015. La DXL1 estuvo constituida por las "cabezas" de la población mantenida en nursery en Ribadeo.



Figura 2.- Sistemas utilizados para cultivo en sustrato y en suspendido.

Atendiendo a la metodología utilizada por Ocaña *et al.* (2013) para la dinámica poblacional de *Donax denticulatus* (Linnaeus 1758), la información básica para la estimación del crecimiento fue obtenida de la serie de histogramas de frecuencia de distribución de tallas, no pudiendo ser estimados los parámetros de la ecuación de crecimiento de Von Bertalanffy (ECVB) por falta de datos, por lo que se realizó una aproximación mediante la parametrización de Francis (1988), que se basa en un análisis de la curva de crecimiento entre un rango de edades conocidas t1 y t3. Esta función permitió evaluar la influencia del sistema de cultivo en tres parámetros L1, L2 y L3, los cuales pueden variar o no según el sistema de cultivo empleado. Se ajustaron modelos no lineales con el programa estadístico R (2016), permitiendo la variación de L1, L2, L3 y todas las posibles combinaciones. Se seleccionó el mejor modelo utilizando el criterio de Akaike (AIC). Parametrización de Francis:

$$LT = L1 + (L3 - L1) * (1 - ((L3 - L2)/(L2 - L1))^{(2 * (Edad - t1)/(t3 - t1)))/(1 - ((L3 - L2)/(L2 - L1))^2)$$

Los cálculos de mortalidad y supervivencia siguieron el modelo utilizado por Guerrero *et al* (2014) para el cultivo de semilla de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803).

Resultados

La tasa de crecimiento lineal fue de 38,44 micras por día (µm día^{-1}) y 42,67 µm día^{-1} para el sistema de cultivo en suspendido (DXL1 y DXL2, respectivamente) y de 60,96 y 60,70 µm día^{-1} para el sistema en sustrato, por lo que se concluye una diferencia significativa en el crecimiento para la variable sistema. De la misma forma, la tasa de crecimiento ponderal fue de 3,71 miligramos por día (mg día^{-1}) y 2,99 mg día^{-1} para el sistema de cultivo en suspendido (DXL1 y DXL2, respectivamente) y de 4,60 y 4,90 mg día^{-1} para el sistema en sustrato. Este resultado coincide con el observado por Louzán *et al.* (2013) en la ría de Arousa, encontrando un mayor crecimiento en individuos cultivados en sustrato de arena, y mucho más elevados que los calculados por De la Huz *et al.* (2002) para semilla de entre 26 y 28 mm de talla, siendo mayores los valores en el presente estudio, pero menores que el manifestado por Martínez (2014), para semilla de 7,5 mm sembrada en sustrato en banco natural. Los altos valores de crecimiento en el período de estudio se corresponden con lo observado por otros autores en primavera-verano (Bayed, 1998; Gaspar *et al.*, 1999; Manca *et al.,* 2002).

Los resultados obtenidos en el minicriadero de Vicedo (Martín Salas, *com. pers.*) para la población de partida de procedencia de la DXL2, han sido muy inferiores en el mismo período, con tasas de crecimiento de 24,96 µm día^{-1} y 1,57 mg día^{-1}.

Tabla I.- Incrementos en talla y peso, donde N es el nº de días en cultivo, Xi la talla inicial, Xf la talla final, Wi el peso inicial, Wf el peso final, ΔX el incremento de talla (mm) y ΔW el incremento en peso (g).

Sistema	N	Xi ± sd	Xf ± sd	ΔX	Wi ± sd	Wf ± sd	ΔW
DXL 1 suspendido	154	10,30 ± 0,33	16,22 ± 1,81	5,92	0,16 ± 0,10	0,73 ± 0,25	0,57
DXL 2 suspendido	101	9,13 ± 0,67	13,44 ± 1,37	4,31	0,12 ± 0,05	0,42 ± 0,14	0,30
DXL 1 sustrato	158	10,30 ± 0,33	19,87 ± 1,28	9,57	0,15 ± 0,09	1,11 ± 0,19	0,72
DXL 2 sustrato	104	9,13 ± 0,67	16,44 ± 2,13	6,31	0,12 ± 0,05	0,64 ± 0,22	0,51

En la tabla I se muestran los datos de incrementos en talla y peso, obtenidos a lo largo de la experiencia y en las figuras 3 y 4 los desplazamientos de tallas para DXL1.

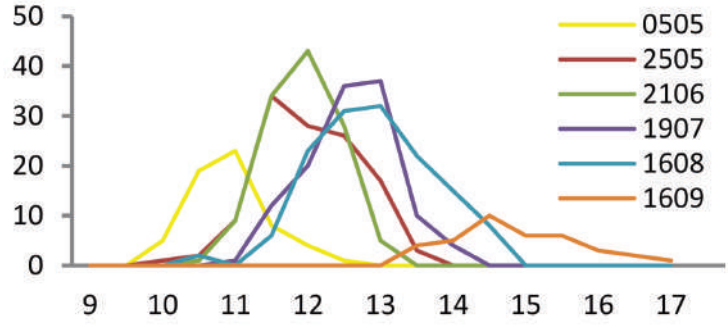


Figura 3.- DXL 1 cultivo en suspendido.

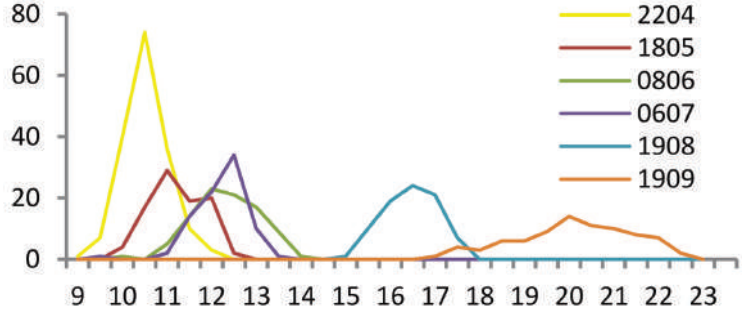


Figura 4.- DXL 1 cultivo en sustrato.

Por otra parte se calculó la tasa instantánea de crecimiento (G= LnL1-LnL2) y la G30, con los siguientes resultados:

DXL1 sustrato: G=0,6571; K=0,0042; G30=0,0008

DXL1 suspendido: G=0,4541; K=0,0029; G30=0,0006

DXL2 sustrato: G=0,5882; K=0,0057; G30=0,0016

DXL2 suspendido: G=0,3867; K=0,0038; G30=0,0011

Según la modelización de Francis (Fig. 5), la función que mejor ajustó el crecimiento de la coquina en los dos sistemas fue la que presentó una L1 estimada común (9,90 IC 95%: 9,76-10,04). Los valores estimados de L2 y L3 para el sistema de cultivo en sustrato, 14,74 (IC 95%: 14,60-14,88) y 20,80 (IC 95%: 20,56-21,03) respectivamente, fueron mayores a los estimados para la misma edad en el sistema en panniers, 14,10 (IC 95%: 14,00-14,21) y 16,47 (IC 95%: 16,21-16,74).

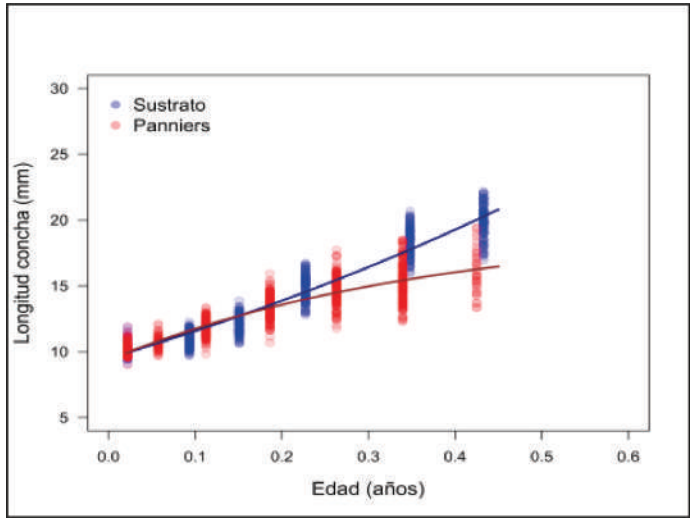


Figura 5.- Crecimiento de la coquina en suspendido y sobre sustrato. Se representan las curvas de crecimiento según la parametrización de Francis (1988), con una L1 común y una L2 y L3 diferentes para cada sistema de cultivo.

No se pudieron concluir diferencias en ninguna de las variables estudiadas en función de la densidad, así como de la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto (Fig. 6).

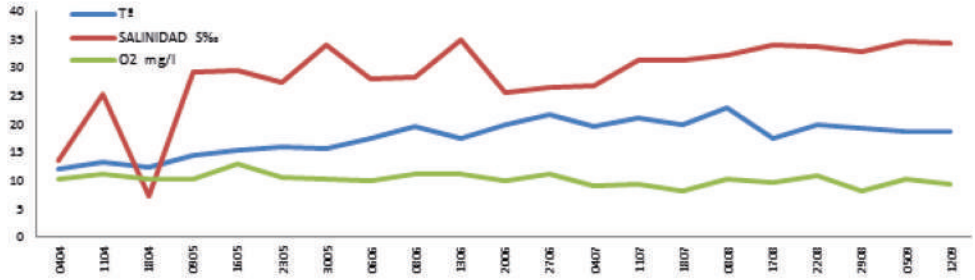


Figura 6.- Datos oceanográficos (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) en la Ría del Burgo.

Se calculó la regresión talla-peso (Fig. 7) y se establecieron las relaciones paramétricas entre talla, altura y espesor (Tabla II), siguiendo el modelo utilizado por Bayed (1998) y Gaspar *et al.* (2002), determinándolas mediante análisis de regresión lineal a través de la ecuación (en donde a y b son los parámetros de intersección y pendiente): $Y = a*X^b$

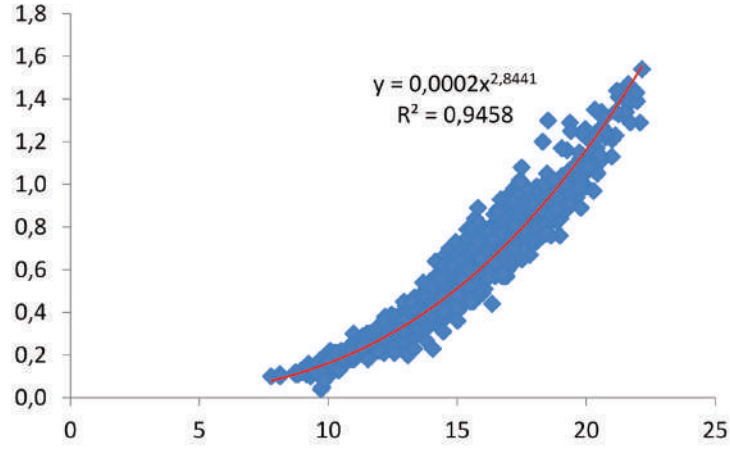


Figura 7.- Relación talla-peso.

Se observa una alometría negativa para la relación talla-peso, al igual que lo observado por Çolakoglu (2014) en Turquía. La relación de la talla o longitud antero-posterior con el peso (N:1.483) indicó para una talla de 20 mm, un peso de 1,00 g, mientras que la equivalencia en peso para la talla mínima de 35 mm fue de 4,93 g, cifras semejantes a las obtenidas en poblaciones nativas en el medio natural. De la misma forma, las relaciones lineales de la talla con la altura y con el espesor presentan unas modelizaciones biométricas que hacen

corresponder una media de 15,81 mm de altura y 8,20 mm de espesor para una talla de 25 mm, mientras que para la talla de 35 mm las correspondencias son de 21,34 mm y 11,18 mm, respectivamente.

Tabla II.- Ecuaciones y características de la regresión de las relaciones entre longitud, altura y espesor

X	Y	Ecuación	R^2	N
longitud	altura	$y = 1{,}0995x^{0{,}8257}$	0,9015	870
longitud	espesor	$y = 0{,}4929x^{0{,}8713}$	0,7982	870
altura	espesor	$y = 0{,}5581x^{0{,}9596}$	0,7323	870

La fijación en el interior de los sistemas de fauna y flora acompañante fue constante a lo largo de la experiencia pero con distintas intensidades temporales, siendo las principales especies fijadas: crustáceos (cangrejos, camarón y cirrípedos), bivalvos (mejillón, almejas babosa y japonesa, berberecho, lucero), hidrozoos, algas rodofíceas y gasterópodos. Estas fijaciones fueron abundantes en el cultivo en suspendido y mínimas en el sustrato.

Durante los meses de junio y julio se produce una gran fijación de mejilla en los sistemas de cultivo en suspendido y sobre la concha de las coquinas, lo que pudo provocar un incremento en la mortalidad, sobre todo en los pannier superiores, que soportaron la mayor abundancia de mejilla (con rango de tallas entre 2 y 10 mm). Esta fijación motivó una complicación en el control mensual, implicando asimismo un mayor tiempo de procesado debido a la limpieza del sistema y de los propios individuos en cuarterones y pannier (Fig. 8).



Figura 8.- Fijación de mejilla en coquinas

Las tasas instantáneas de mortalidad se calcularon por la siguiente ecuación: M = LN (N_f / N_i), siendo N_f el número final de coquinas, N_i el número inicial y LN el logaritmo. Para expresar la mortalidad en forma de porcentajes M (%), se transformaron las tasas instantáneas con la ecuación: M (%) = 100*(1-EXP(-M)). La supervivencia (S) resulta del valor complementario de la mortalidad (100-M).

Se observa una influencia de la calidad y talla inicial de la semilla en cultivo sobre la supervivencia, correspondiendo los mayores porcentajes de S a la semilla que partió con tallas más elevadas, coincidiendo con lo expuesto para esta especie en cultivo en la ría de Arousa (Louzán *et al.*, 2013). La tasa de mortalidad diaria se obtuvo al dividir el valor de las tasas totales entre los días que se mantuvo la experiencia (Tabla III).

Tabla III.- Tasas instantáneas de mortalidad (M) y supervivencia (S) de la semilla según sistema (en cultivo en suspendido o en cultivo en sustrato) y procedencia (DXL1 y DXL2).

N	M	M diaria	M %	S (%)	Fecha
DXL1 cultivo en suspendido					
1296	0	0	0	100,0	1404
1263	-0,025793	-0,0012	2,5	97,5	0505
1257	-0,004762	-0,0002	0,5	99,5	2505
1194	-0,051419	-0,0019	5,0	95,0	2106
820	-0,375760	-0,0134	31,3	68,7	1907
420	-0,669050	-0,0231	48,8	51,2	1608
37	-2,429337	-0,0784	91,2	8,8	1609
TOTAL			**97,1**	**2,9**	
DXL1 cultivo en sustrato					
95	0	0	0,0	100,0	1404
94	-0,01058	-0,00132	1,1	98,9	2204
91	-0,03244	-0,00125	3,2	96,8	1805
91	0,00000	0,00000	0,0	100,0	0806
84	-0,08004	-0,00286	7,7	92,3	0607
82	-0,02410	-0,00078	2,4	97,6	1908
81	-0,01227	-0,00040	1,2	98,8	1909
TOTAL			**14,7**	**85,3**	
DXL2 cultivo en suspendido					
1400	0	0	0	100,0	0706
794	-0,56714405	-0,02363	43,3	56,7	0107
125	-1,84876972	-0,04865	84,3	15,7	0808
25	-1,60943791	-0,04127	80,0	20,0	1609
TOTAL			**98,2**	**1,8**	
DXL2 cultivo en sustrato					
415	0	0	0	100,0	0706
269	-0,43356714	-0,01445224	35,1807229	64,8	0707
106	-0,93127229	-0,0216575	60,5947955	39,4	1908
70	-0,414944	-0,013385	34,0	66,0	1909
TOTAL			**83,1**	**16,9**	

Las tasas de mortalidad fueron más altas en la partida DXL2, tanto en suspendido como en sustrato, como posible consecuencia de su origen, al constituir las "colas" del cultivo inicial. La población identificada como DXL1 mostró gran variabilidad según el sistema de cultivo, siendo el porcentaje de M significativamente más elevado en el sistema en suspendido frente al cultivo en sustrato, y el de mayor supervivencia final (85,3%). La mortalidad más elevada se produjo en los meses de julio, agosto y septiembre, excepto para DXL1 en sustrato, donde el mayor porcentaje de M se produjo en el mes de junio.

Conclusiones

Por medio de operaciones de cultivo se determinó el comportamiento de dos poblaciones procedentes de criadero, experimentando su viabilidad en diferentes sistemas de cultivo, analizando el crecimiento y comprobando la tasa de mortalidad. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una supervivencia mayor en los individuos que inician el preengorde con mayor talla, estabulados en cultivo en sustrato, frente a los que inicialmente partían de tallas más bajas (posiblemente debidas a la procedencia de semilla perteneciente a "colas" en la producción en criadero).

El crecimiento en talla y peso muestra diferencias significativas ($P<0,001$) para la variable sistema, siendo el cultivo en sustrato el que presenta un mayor crecimiento y supervivencia.

Agradecimientos

Este trabajo se encuadra en el proyecto de investigación CIMA 16/06 "*Determinación das causas da diminución dos bancos de cadelucha. Condicionantes naturais e antropoxénicos*", financiado por la Consellería do Mar de la Xunta de Galicia. A Ignacio Alborés por el tratamiento estadístico.

Bibliografía

Bayed A. 1998. Variabilité de la croissance de *Donax trunculus* sur le littoral marocain. In: Lleonart J. (ed.). Dynamique des populations marines. Zaragoza: CIHEAM.1998. *Cahiers Options Mediterranéennes*, 35: 11-23.

BIOTOPE, 2PA Développement, 2007. Étude global sur la telline en Camargue-Parc Naturel Régional de Camargue *Donax trunculus* (Linne, 1767). Rapport Intermédiaire de la

Campagne d´automne. *Contract BIOTOPE/P2A Développement-Parc Naturel de Camargue*, juin 2007.

Catoira J.L., Seoane P., Martínez D., Ojea J., Méndez J. & No E. 2017. Caracterización de una población de coquina (*Donax trunculus*, L. 1758) en la playa de Bastiagueiro, A Coruña. En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Guerra A., Lastres M.A., Padín X.A., Lodeiros C. (eds.) 19: 261-274.

Çolakoglu, S. 2014. Population Structure, Growth and Production of the Wedge Clam *Donax trunculus* (Bivalvia:Donacidae) in the West Marmara Sea, Turkey. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 14: 221-230.

De la Huz R., Lastra M. & López J. 2002. The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of *Donax trunculus* L. (Bivalvia:Donacidae). *J. Sea Res.* 47(2): 85-95.

Francis R. 1988. Are growth parameters estimated from tagging and age-length data comparable? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 936-942.

Gaspar M.B., Chícharo L.M., Vasconcelos P., García A., Santos A.R. & Monteiro C.C. 2002. Depth segregation phenomenom in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) populations of the Algarve coast (southern Porugal). *SCI. MAR.* 66 (2): 111-121.

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

Guerrero S., Mariño J.C., Fernández M., Otero X. & Santos I. 2014. Crecimiento y supervivencia de semilla de almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) colocada en bolsas en dos zonas submareales de la Ría de Arousa (Pontevedra, España). En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Lodeiros C.,Guerra A. (eds.) 16: 135-146.

Louzán A., Novoa S., Ojea J., Nantón A., Méndez J. & Martínez-Patiño D. 2013. Ensayo de diferentes estructuras de preengorde de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758) en el medio natural. En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal*. Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Lodeiros C.,Guerra A. (eds.) 15: 221-227.

Manca M., Agnesi S. Mariani A., Maccaroni A. & Ardizzone G. 2002. Biology and population dinamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Doncidae) in the South Adriatic Coast (Italy). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 54: 951-982.

Martínez Patiño D. 2014. Incorporación de nuevas especies al cultivo industrial en criadero. En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Lodeiros C.,Guerra A. (eds.) 16: 314-321.

Ocaña F.A., Apin Y.C. & Cala Y.R. 2013. Dinámica poblacional de *Donax denticulatus* (Bivalvia:Donacidae) en playa Carenero, costa sur oriental de Cuba. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* Vol 61 (4): 1637-1646.

Ensayos de crecimiento y supervivencia de coquina (*Donax trunculus*, L. 1758) en sistemas de cultivo en el medio natural

Seoane[1] P., Catoira[2] J.L., Martínez[3] D y Ojea[3] J.

1 Cofradía de pescadores de A Coruña. Dársena de Oza, Local AR898. 15006 A Coruña, España. E-mail: pseoane@hotmail.com
2 Delegación Territorial de A Coruña. Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Casa do Mar, 15006 A Coruña.
3 Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA). Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Porcillán s/n, 27700 Ribadeo (Lugo)

Introducción

Dentro del proyecto *Determinación das causas da diminución dos bancos de cadelucha. Condicionantes naturais e antropoxénicos*, se realizaron experiencias de cultivo de la especie *Donax trunculus*, con semilla procedente de criadero, para determinar su crecimiento y supervivencia en zonas cercanas a la playa de Bastiagueiro, en la que se había caracterizado una población de esa especie, que no alcanzaba la talla comercial.

El objetivo de estos ensayos se basó en la experimentación de sistemas viables cara a una consecución de semilla de talla suficiente para ser sembrada en banco natural y para la comprobación del crecimiento de la especie hasta alcanzar la talla comercial. La semilla se estableció en diferentes sistemas (panniers en suspendido y cajas plásticas sobre sustrato de arena incluyendo en su interior arena fina procedente de la playa de Bastiagueiro), localizando la situación con un GPS Garmin (Fig. 1).

Los sistemas fueron instalados en dos espacios diversos: el cultivo en suspendido bajo una boya con una batimetría de 12 m en la bocana de la ría del Burgo y las cajas sobre sustrato arenoso en el interior de la ría del Burgo, ambas zonas próximas a la playa de Bastiagueiro.

Metodología

Para el cultivo en suspendido se utilizaron estructuras apilables o "panniers" con inclusión de cuarterones, a diferentes profundidades y se experimentó con diferentes densidades al igual que en las cajas plásticas individuales en sustrato. Los muestreos sobre la población fueron mensuales, siendo las muestras procesadas en laboratorio, obteniendo peso fresco y biométrias con un calibre Mitutoyo y una balanza analítica Cobos, de 0,01 mm y 0,01 g de precisión respectivamente, atendiendo a las normas de medición del "Etude globale sur la Telline en Camargue" (BIOTOPE, 2007). Para el procesado de datos se utilizó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010.

La procedencia de los individuos fue del CIMA de Ribadeo (N=1.468 identificados como DXL1) el 14042016, y del minicriadero de Vicedo (N=2.315 identificados como DXL2) el 07062016, con tallas de 10 y 9 mm, respectivamente, de un año de edad, ya que el cultivo larvario de estas partidas había finalizado en mayo de 2015.

La información básica para la estimación del crecimiento fue obtenida de la serie de histogramas de frecuencia de distribución de tallas (Fig. 3) y los cálculos de mortalidad y supervivencia siguieron el modelo utilizado por Guerrero *et al* (2014) para el cultivo de semilla de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803).



Figura 1.- situación de los sistemas de cultivo

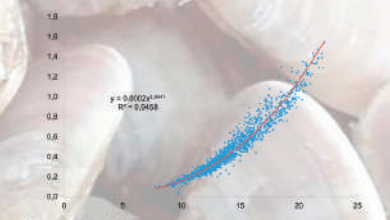


Figura 2.- Relación talla-peso

Tabla I.- incrementos en talla y peso y supervivencia, donde N es el nº de días en cultivo, Xi la talla inicial, Xf la talla final, Wi el peso inicial, Wf el peso final y S la supervivencia en porcentaje

Sistema	N	Xi ± sd	Xf ± sd	Wi ± sd	Wf ± sd	S
DXL 1 suspendido	154	10,30 ± 0,33	16,22 ± 1,81	0,16 ± 0,10	0,73 ± 0,25	2,9
DXL 2 suspendido	101	9,13 ± 0,67	13,44 ± 1,37	0,12 ± 0,05	0,42 ± 0,14	1,8
DXL 1 sustrato	158	10,30 ± 0,33	19,87 ± 1,28	0,15 ± 0,09	1,11 ± 0,19	85,3
DXL 2 sustrato	104	9,13 ± 0,67	16,44 ± 2,13	0,12 ± 0,05	0,64 ± 0,22	16,9

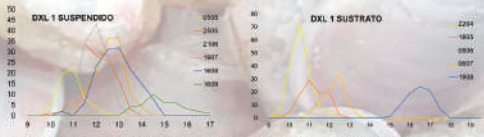


Figura 3 . - Desplazamientos de tallas obtenidos a lo largo de la experiencia para DXL 1

Tabla II.- Ecuaciones y características de la regresión de las relaciones entre longitud, altura y espesor

X	Y	Ecuación	R^2	N
longitud	altura	$y = 1,0995x^{0,9257}$	0,9015	870
longitud	espesor	$y = 0,4929x^{0,8713}$	0,7982	870
altura	espesor	$y = 0,5581x^{0,9598}$	0,7323	870

Resultados y discusión

La tasa de crecimiento lineal fue de 40,08 micras por día (µm día^{-1}) y 51,82 µm día^{-1} para el sistema de cultivo en suspendido (DXL1 y DXL2, respectivamente) y de 71,24 y 86,44 µm día^{-1} para el sistema en sustrato, por lo que se concluye una diferencia significativa en el crecimiento para la variable sistema (P> 0,01). De la misma forma, la tasa de crecimiento ponderal fue de 3,994 miligramos por día (mg día^{-1}) y 3,187 mg día^{-1} para el sistema de cultivo en suspendido (DXL1 y DXL2, respectivamente) y de 6,392 y 5,462 mg día^{-1} para el sistema en sustrato. (Tabla I)

Se calculó la regresión talla-peso (Fig. 2) y se establecieron las relaciones paramétricas entre talla, altura y espesor (Tabla II), siguiendo el modelo utilizado por Bayed (1998) y Gaspar *et al* (2002), determinándolas mediante análisis de regresión lineal a través de la ecuación (en donde a y b son parámetros de la curva: intersección y pendiente); $Y = 0,0002X^{2,9441}$ (R^2 = 0,9458).

Las tasas de mortalidad fueron más altas en la partida DXL2, tanto en suspendido como en sustrato, como posible consecuencia de su origen, al constituir las "colas" del cultivo inicial. La población identificada como DXL1 mostró gran variabilidad según el sistema de cultivo, siendo el porcentaje de M significativamente más elevado en el sistema en suspendido frente al cultivo en sustrato, el de mayor supervivencia final (85,3%). La mortalidad más elevada se produjo en los meses de julio, agosto y septiembre, excepto para DXL1 en sustrato, donde el mayor porcentaje de M se produjo en el mes de junio.

Por medio de operaciones de cultivo se determinó el comportamiento de dos poblaciones obtenidas de criadero, experimentando su viabilidad en diferentes sistemas de cultivo analizando el crecimiento y la tasa de mortalidad. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una supervivencia mayor en los individuos que inician el preengorde con mayor talla, establecidos en cultivo en sustrato, frente a los que inicialmente partían de tallas más bajas.

El crecimiento en talla y peso muestra diferencias significativas para la variable sistema, siendo el cultivo en sustrato el que presenta un mayor crecimiento y supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

Bayed, A. 1998. Variabilité de la croissance de *Donax trunculus* sur le littoral marocain. In: Lleonart J. (ed.). Dynamique des populations marines. Zaragoza: CIHEAM 1998. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 35: 11-23
Biotope, 2PA Développement (2007). Etude globale sur la teline en Camargue-Parc Naturel Régional de Camargue.
De la Huz, R., M. Lastra y J. López. 2002.The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of Donax trunculus L. Bivalvia:Donacidae). J.Sea Res. 47(2), 85-95
Gaspar, M.B., Chícharo, L.M., Vasconcelos, P., Garcia, A., Santos, A.R. and Monteiro, C.C. 2002. Depth segregation phenomenon in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) populations of the Algarve coast (southern Portugal). SCI. MAR., 66 (2): 111-121.
Guerrero, S., Mariño, J.C., Fernández, M., Otero, X. y Santos, I. 2014. Crecimiento y supervivencia de semilla de almeja babosa Venerupis pullastra (Montagu, 1803) colocada en bolsas en dos zonas submareales de la Ría de Arousa (Pontevedra, España). *Foro Rec. Mar. Ac. Ríos Gal.* (2016) 16: 135-146.

Agradecimientos

Este trabajo se encuadra en el proyecto de investigación CIMA 16/06 "*Determinación das causas da diminución dos bancos de cadelucha. Condicionantes naturais e antropoxénicos*", financiado por la Consellería do Mar de la Xunta de Galicia.
A Ignacio Alborés por el tratamiento estadístico

Estrategias productivas para la mejora del crecimiento y supervivencia durante el preengorde y engorde de ostra rizada (*Crassostrea gigas*) en el Delta del Ebro

Vallejo[1] O. & Fernández[2] C.

[1]Escola d'Aqüicultura INS Els Alfacs, Crta. Poble Nou, s/n. 43540. Sant Carles de la Ràpita (Tarragona). ovallsol@hotmail.com

[2]Muscleres Prats, S.L. Crta. Poble Nou, km 8. 43540. Sant Carles de la Ràpita (Tarragona).

Resumen

Como parte formativa del alumnado de la Escuela de Acuicultura del INS "Els Alfacs", con esta experiencia se han realizado todas las tareas técnicas relacionadas con el preengorde y se ha llevado a cabo un seguimiento de la fase de engorde.

Con los resultados obtenidos se podrán establecer protocolos productivos para minimizar la mortalidad debida al herpesvirus OsHV-1, la cual ha provocado pérdidas económicas importantes para el sector local productivo de ostra rizada (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793) del Delta del Ebro, durante estos últimos años.

Palabras clave

Preengorde, engorde, ostra rizada, OsHV-1, Delta del Ebro.

Introducción

A partir de datos epidemiológicos de OsHV-1 en ostra rizada (*C. gigas*) detectados desde hace años en el Delta del Ebro, se necesita aún avanzar más en la gestión del plan de producción, para poder así minimizar las pérdidas causadas por patologías que supone para el sector productor local una disminución importante de su rentabilidad.

También a partir de este estudio el alumnado realizó todas las tareas técnicas asociadas a las fases de preengorde y engorde de ostra rizada, como parte de su currículo formativo, a la vez que se introdujo en la metodología científica básica y aplicada.

Dichos resultados serán transferidos al sector productivo local con intención de mejorar su competitividad.

Materiales y métodos

El preengorde en suspensión se realizó en un emparrillado de la Bahía de los Alfaques (Delta del Ebro) de la empresa Muscleres Prats, S.L., durante sólo 3 meses desde el 03/12/2014 hasta el 04/03/2015, con semillas procedentes del IRTA, libres de herpesvirus, con una longitud media inicial de 7,65 $\pm$ 1,63 mm y peso medio inicial de 0,045 gramos.

Los recipientes de cultivo utilizados inicialmente fueron cestos ostrícolas rígidos de 40 cm de diámetro y 10 cm de altura y linternas de malla del mismo diámetro y luz de malla de 2x3 mm, de la empresa lantern-net.com.

Se distribuyeron las semillas a densidades iniciales de 500 semillas por unidad de superficie. Durante el período de estudio, se llevaron a cabo muestreos en donde se determinó el crecimiento en longitud y peso y el porcentaje de supervivencia. No se efectuó ninguna clasificación por tallas, ni desdoble de biomasa, ni limpieza de los recipientes de cultivo, por lo que supuso un ahorro económico en cuanto a personal.

Las semillas, una vez que obtuvieron una talla superior a los 30 mm, se cimentaron en cuerdas de 3 m de longitud, en grupos de 3 ostras cada 10 a 15 cm, para seguir la fase de engorde en suspensión.

En cada muestreo los datos fueron anotados y registrados en una hoja de cálculo (Excel) para su posterior cálculo e interpretación.

Resultados

Tabla I.- Parámetros de cultivo del preengorde.

Fecha	Recipiente de cultivo	Temperatura (ºC)	Peso (g)	Longitud (mm)	Desviación Estándar (mm)	% supervivencia
03/12/14		13	0,045	7,65	1,63	100
23/01/15	Cesto rígido	11	1,47	22,27	3,59	100
23/01/15	Linterna de malla	11	1,59	25,56	4,47	100
04/03/15	Cesto rígido	13	2	30,72	5,28	100
04/03/15	Linterna de malla	13,5	2,04	34,05	6,33	100

Discusión

Durante el preengorde (diciembre – marzo), debido a las temperaturas inferiores a 16ºC en donde no hay presencia del herpesvirus y a unas densidades de cultivo no elevadas, ha habido un crecimiento rápido y ausencia de mortalidad. El recipiente de cultivo más eficiente ha sido la linterna de malla con mayores rendimientos en cuanto al crecimiento, respecto a los tradicionales cestos rígidos.

Durante el engorde (marzo a diciembre), una longitud inicial de la semilla de ostra por encima de los 30 mm y una densidad de cultivo baja, asociada a la técnica de "cimentado en cuerda", han sido los parámetros significativos en cuanto a que ha habido una supervivencia media del 90%, llegando todas las ostras a la talla comercial (80 gramos por unidad) en diciembre, evitando así las mortalidades del 100% de semilla de ostra asociadas a temperaturas entre 16 a 24ºC, según Vallejo *et al*. (2014), ocurridas en la Bahía del Fangar del Delta del Ebro, y mortalidades del 33% debidas al recipiente de cultivo (cesto ostrícola) y sus densidades asociadas (250 ostras/cesto), según Vallejo y Garrigós (2014), ocurridas en la Bahía de los Alfaques del Delta del Ebro.

Los resultados de crecimiento en longitud y peso han sido similares a otras experiencias también realizadas en el Delta del Ebro, según Vallejo *et al*. (2011 y 2014).

Conclusiones

Por tanto se puede establecer como estrategia productiva las siguientes indicaciones técnicas:

1.- Las semillas han de proceder de un criadero con garantías sanitarias que estén libres del herpesvirus OsHV-1.

2.- Empezar en el mes de diciembre el preengorde en suspensión (a temperaturas inferiores de 16ºC), preferiblemente en la Bahía de los Alfaques.

3.- Utilizar como recipientes de cultivo, las linternas de malla de obertura 2x3 mm.

4.- Las semillas de ostra han de tener una longitud media inicial de 6 a 8mm o incluso ligeramente inferior (5 a 6 mm) para abaratar aún más el coste de compra.

5.- Las semillas inicialmente han de estar a una densidad aproximada de 500 semillas por unidad de superficie.

6.- En el mes de marzo (después de 3 meses aproximadamente de preengorde en suspensión), con unas temperaturas inferiores a 16ºC y cuando la semilla de ostra ya tiene una longitud media mayor a 30 mm, llevar a cabo el cimentado en cuerda.

7.- Hacer el seguimiento de la fase de engorde en cuanto a crecimiento y mortalidad (principalmente en el período crítico por encima de los 16ºC de temperatura).

Agradecimientos

Al IRTA por las semillas de ostra donadas. A los alumnos del Ciclo Formativo de Grado Medio en Cultivos Acuícolas por su gran voluntad, buen hacer y capacitación técnica en la consecución del trabajo. Sin todos ellos este estudio no hubiera sido posible.

Bibliografía

Vallejo O., Garrigós J. & Quintano J. 2011. Evaluación cualitativa de semilla de ostra rizada (*C. gigas*) producida mediante cestillos en el Delta del Ebro. En: *Actas de Resúmenes XIII Congreso Nacional de Acuicultura*.

Vallejo O. & Garrigós J. 2014. Preengorde en suspensión de ostra rizada (*C. gigas*) en el Delta del Ebro. En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Lodeiros C.,Guerra A. (eds.) 16: 251-256.

Vallejo O., Salord I. & Bori, C. 2014. Cría y engorde de ostra rizada (*C. gigas*) en el Delta del Ebro. En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Lodeiros C.,Guerra A. (eds.) 17: 185-190.

Estrategias productivas para la mejora del crecimiento y supervivencia durante el preengorde y engorde de ostra rizada *(Crassostrea gigas)* en el Delta del Ebro

O. Vallejo[1] y C. Fernández[2]

[1]Escola d'Aqüicultura INS Els Alfacs - Ctra. del Poble Nou, km 5.5 - 43540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona). e-mail: ovallsol@hotmail.com
[2]Muscleres Prats, S.L. - Ctra. Poble Nou, km 8. - 43540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)

Introducción

Como parte formativa del alumnado de la Escuela de Acuicultura del INS "Els Alfacs", con esta experiencia se han realizado todas las tareas técnicas relacionadas con el preengorde y se ha llevado a cabo un seguimiento de la fase de engorde. Con los resultados obtenidos se podrán establecer protocolos productivos para minimizar la mortalidad debida al herpes virus OsHV-1, la cual ha provocado pérdidas económicas importantes para el sector local productivo de ostra rizada (C.gigas) del Delta del Ebro, durante estos últimos años.

Materiales y Métodos

El preengorde en suspensión se realizó en un emparrillado de la Bahía de los Alfaques (Delta del Ebro) de la empresa Muscleres Prats, S.L., desde el 03/12/2014 hasta el 04/03/2015, con semillas procedentes del IRTA libres de herpesvirus, con una longitud media inicial de 7.65 ± 1.63mm. Los recipientes de cultivo utilizados inicialmente fueron cestos ostrícolas rígidos y linternas de malla de obertura de 2x3 mm. Se distribuyeron las semillas a densidades iniciales de 500 semillas por unidad de superficie. Durante el periodo de estudio, se llevaron a cabo muestreos en donde se determinó el crecimiento en longitud y peso y el porcentaje de supervivencia. No se efectuó ninguna clasificación por tallas, ni desdoble de biomasa, ni limpieza de los recipientes de cultivo. Las semillas una vez que obtuvieron una talla superior a los 30 mm, se cimentaron en cuerda para seguir la fase de engorde en suspensión. En cada muestreo los datos fueron anotados y registrados en una hoja de cálculo (Excel) para su posterior cálculo e interpretación.



Resultados y Discusión

Tabla 1. Parámetros de cultivo del preengorde

Fecha	Recipiente de cultivo	Temperatura (ºC)	Peso (g)	Longitud (mm)	Desviación Estándar (mm)	% supervivencia
03/12/2014		13	0,045	7,65	1,63	100
23/01/2015	Cesto rígido	11	1,47	22,27	3,59	100
23/01/2015	Linterna de malla	11	1,59	25,56	4,47	100
04/03/2015	Cesto rígido	13	2	30,72	5,28	100
04/13/2015	Linterna de malla	13,5	2,04	34,05	6,33	100

Los resultados se muestran en la **Tabla 1**. Por tanto podemos concluir:

- Durante el preengorde (diciembre – marzo), debido a las temperaturas inferiores a 16ºC en donde no hay presencia del herpesvirus y a unas densidades de cultivo no elevadas, ha habido un crecimiento rápido y ausencia de mortalidad. El recipiente de cultivo más eficiente ha sido la linterna de malla con mayores rendimientos en cuanto al crecimiento, respecto a los tradicionales cestos rígidos.
- Durante el engorde (marzo a diciembre) mediante la técnica de cimentado en cuerda ha habido una supervivencia media del 90% llegando todas las ostras a la talla comercial. Por tanto, durante el periodo crítico en cuanto a la presencia de herpesvirus (16 a 24ºC), la talla inicial (por encima de los 30mm) y la densidad de cultivo asociada al "cimentado en cuerda", han sido parámetros significativos en cuanto a los buenos resultados de supervivencia y crecimiento, si se compara con datos según Vallejo, O., et al., 2011 y 2014.



Bibliografía

Vallejo, O. y Garrigós, J., 2014. Preengorde en suspensión de ostra rizada (C. gigas) en el Delta del Ebro. XVI Foro de los Recursos Marinos y Acuicultura de las Rías Gallegas.

Vallejo, O., Salord, I. y Bori, C., 2014. Cría y engorde de ostra rizada (C. gigas) en el Delta del Ebro. XVI Foro de los Recursos Marinos y Acuicultura de las Rías Gallegas.

Vallejo, O., Garrigós, J. y Quintano, J., 2011. Evaluación cualitativa de semilla de ostra rizada (C. gigas) producida mediante cestillos en el Delta del Ebro. En: Actas de Resúmenes XIII Congreso Nacional de Acuicultura.

Agradecimientos

Al IRTA por las semillas de ostra donadas. A los alumnos del Ciclo Formativo de Grado Medio en Cultivos Acuícolas por su gran voluntad, buen hacer y capacitación técnica en la consecución del trabajo. Sin todos ellos este estudio no hubiera sido posible.

Estudio de la evolución espacial y temporal de la productividad y el precio del longueirón (*Ensis siliqua* Linnaeus, 1758*)* en los bancos naturales del seno de Corcubión (Galicia)

Suárez Santos[1] J.M., Catoira Gómez[2] J.L., Alborés Blanes[3] I. & Fernández Rodríguez[3] L.

[1]Cofradía de pescadores de Fisterra. Paseo da Ribeira sn, 15155 Fisterra, A Coruña, España. e-mail: finisterraess@gmail.com.
[2]Delegación Territorial de A Coruña. Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Ramón y Cajal, 2 Casa del Mar 5º. 15006 A Coruña.
[3]Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología. Facultad de Ciencias. Universidad de A Coruña.

Resumen

En el presente estudio se analiza la variabilidad espacial y temporal en el volumen de capturas (kg/mes), la CPUE (kg/buceador/día), y el precio del longueirón (€/kg) en 6 bancos marisqueros del Seno de Corcubión durante el periodo 2006-2015. Se tomaron todos los datos de las capturas procedentes de los bancos Langosteira (LAN), Talón (TAL), Sardiñeiro (SAR), Estorde (EST), Ézaro (EZA) y Caldebarcos (CAL) en las lonjas de Fisterra, Corcubión y Lira.

Los resultados obtenidos indican que el banco es la variable con mayor efecto en la variabilidad temporal de las capturas ($F=36,3$, $P<0,001$), seguida del mes ($F=18,5$, $P<0,001$) y, en menor medida, el año ($F=8,9$, $P<0,001$). El análisis de la CPUE mostró un efecto significativo ($P<0,001$) de las tres variables analizadas. Respecto al precio de venta del longueirón, las variables año y mes permitieron explicar el 76% de la variabilidad observada.

Palabras clave

Productividad, CPUE, Precio, *E. siliqua*, Zona V.

Introducción

La explotación de solénidos en la zona V o zona administrativa comprendida entre el Cabo Touriñán hasta Punta Insua (Juncal *et al.*, 2005), comenzó en Fisterra a finales de los años 60. Los primeros datos de capturas de *Ensis siliqua* datan de 1966 en la playa de Langosteira, (Catoira & Traba, 1997). Desde 1966 hasta 1978, la extracción se realizó a flote por arrastre de un endeño remolcado denominado "Can da navalla". Desde el año 1978 hasta el año 1983, la actividad se suspendió. La autorización en 1983 por parte de la Consellería do Mar del buceo en apnea para la captura de solénidos, revolucionó la metodología de extracción de estos moluscos, siendo la cofradía de Fisterra la pionera en Galicia en el uso de esta metodología (Guerra & Gabín, 2008).

La extracción de longueirón en Fisterra se desarrolla de manera furtiva entre 1983 y 1985, año en el que se expidieron los primeros carnets de mariscador. A partir de este año se estabiliza la situación hasta 1989, año de desaparición de dichos carnets y la situación se agrava continuándose la actividad de forma furtiva hasta 1993 (Catoira & Traba, 1997).

En 1993 se aprueba el primer plan de explotación del longueirón presentado por la cofradía de pescadores de Fisterra. En 2002 se presenta por primera vez el primer plan conjunto de explotación de recursos específicos de solénidos para la zona V, en el cual participan las cofradías de pescadores de Lira, Corcubión y Fisterra, representadas por esta última.

Desde el año 2003 hasta el 2015 el plan conjunto apenas sufrió modificaciones. Los únicos cambios importantes a destacar han sido el incremento del esfuerzo marisquero llevado a cabo en el año 2006 con la incorporación de 10 embarcaciones y 24 nuevos buceadores, la autorización por parte de la Dirección Xeral de Recursos Mariños de la Consellería do Mar de la Xunta de Galicia, del uso del aire subministrado desde superficie como técnica de inmersión para la captura de solénidos a partir del año 2008 (Orden de 17 de abril de 2008) y el cambio en la preferencia de extracción de la navaja en detrimento del

longueirón a partir de la recalificación de los bancos asentados en la zona GAL 07/04 el 15 de julio de 2013 (Resolución del 9 de Julio de 2013 de la Dirección del Intecmar).

Material y métodos

Se realizó un seguimiento de los desembarcos de longueirón en las lonjas de Fisterra, Corcubión y Lira, donde se tomaron datos diarios de capturas totales por embarcación (kg), cpue (kg/buceador/día) y precio (€/kg), así como el banco o los bancos de procedencia de las capturas, en el periodo 2006-2015 (Fig. 1).

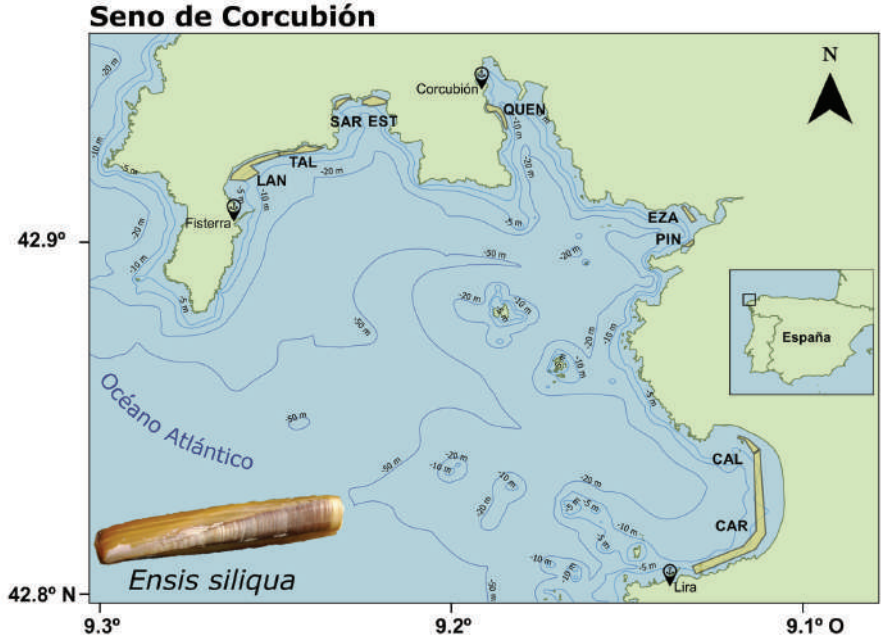


Figura 1.- Bancos naturales de longueirón en el Seno de Corcubión: LAN, Langosteira; CAS, Castelo; BRE, Brens; TAL, Talón; SAR, Sardiñeiro; EST, Estorde; QUEN, Quenxe; EZA, Ézaro; PIN, Pindo; CAL, Caldebarcos; CAR, Carnota. Datum: WGS84 (ww3.intecmar.org/Sigremar/).

Las variables respuesta (capturas, cpue y precio) mostraron una trayectoria no lineal durante el periodo de estudio por lo que se optó por ajustar un modelo aditivo generalizado

(GAM) para cada una de ellas. Este tipo de modelos permite evaluar la trayectoria no lineal de las variables analizadas en relación a una variable explicativa, en este caso, variables temporales como el mes y el año, y a nivel espacial, el banco de extracción. Los modelos finales obtenidos fueron:

$$\boldsymbol{Capturas}_i = \alpha_i + \boldsymbol{f(Mes}_i\boldsymbol{)} + \boldsymbol{f(Año}_i\boldsymbol{)} + \boldsymbol{Banco}_i + \boldsymbol{\varepsilon}_i$$
$$\boldsymbol{CPUE}_i = \alpha_i + \boldsymbol{f(Mes}_i\boldsymbol{)} + \boldsymbol{f(Año}_i\boldsymbol{)} + \boldsymbol{Banco}_i + \boldsymbol{\varepsilon}_i$$
$$\boldsymbol{Precio}_i = \alpha_i + \boldsymbol{f(Mes}_i\boldsymbol{)} + \boldsymbol{f(Año}_i\boldsymbol{)} + \boldsymbol{Banco}_i + \boldsymbol{\varepsilon}_i$$

Donde α_i es la intersección, f es una función suave de los datos, que representa el efecto de cada una de las variables numéricas Mes (1-12) y Año (2006-2015), Banco es una variable categórica y ε_i es el error residual, para los datos observados (i).

Para el ajuste del modelo aditivo, el número óptimo de grados de libertad de cada función de suavizado se obtuvo mediante validación cruzada (Wood, 2006). En el proceso de validación del modelo se utilizó la prueba de Razón de Verosimilitud para comparar modelos anidados (Wood, 2006). Las asunciones de normalidad y homogeneidad fueron comprobadas mediante el examen visual de gráficos diagnósticos de los residuales de los modelos (Zuur *et al.,* 2007). Los GAMs fueron ajustados utilizando el paquete *mgcv* (Wood, 2011) con el software estadístico R (R Core Team, 2015).

Resultados

Los parámetros que explicaron la variabilidad en las capturas fueron el banco ($F=36,3$, $P<0,001$), seguida del mes ($F=18,5$, $P<0,001$) y el año ($F=8,9$, $P<0,001$) (Fig. 2).

A nivel espacial los bancos estudiados pueden agruparse en tres grupos, dentro de cada uno de los cuales no se encontraron diferencias significativas entre bancos (GAM, $P>0.12$) (Fig. 2C). LAN fue el banco que presentó la mayor captura media de longueirón (1,053 kg/mes, IC 95%: 947-1,156 kg/mes). En EST y TAL las capturas se redujeron a 584 kg/mes (IC 95%: 482-686 kg/mes). Las menores capturas se obtuvieron en CAL, EZA y SAR, con una captura media de 252 kg/mes (IC 95%: 200-304 kg/mes) en todo el periodo analizado ($P<0,001$). El 81,03% del volumen de capturas de longueirón se extrae de os bancos de: LAN (39,89%), EST (23,41%) y TAL (17,73%). Sólo el 18,97% del volumen total de capturas de longueirón se extrae en los bancos de: SAR (6,73%), EZA (6,27%) y CAL (5,97%).

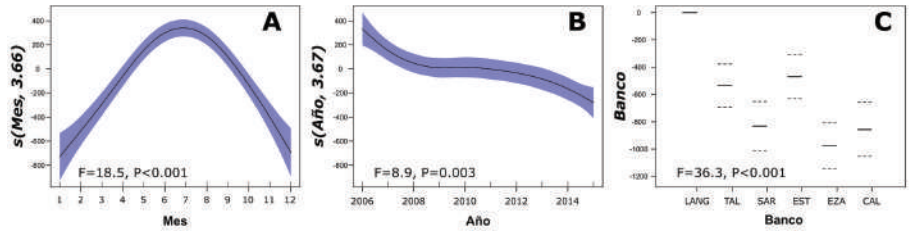


Figura 2.-Modelo aditivo generalizado (GAM) ajustado a las capturas del longueirón. De izquierda a derecha, se representa el efecto del mes (A), del año (B) y del banco (C), el valor de P valor y la significación de la prueba F.

A nivel temporal se observó un importante aumento de las capturas durante los meses de primavera y verano. La figura 3 ilustra también esta variabilidad temporal en las capturas. La mayor captura media se produjo durante el mes de agosto: 829 kg (IC 95%: 582-1.076 kg) y con un máximo de 3.477 kg. Durante el periodo anual estudiado se observaron dos periodos de descenso en las capturas, el primero desde 2006 hasta 2008 y un segundo periodo menos acusado de 2012 a 2015. El descenso medio total durante el periodo analizado fue de 689 kg (IC 95%: 225-1.153 kg).

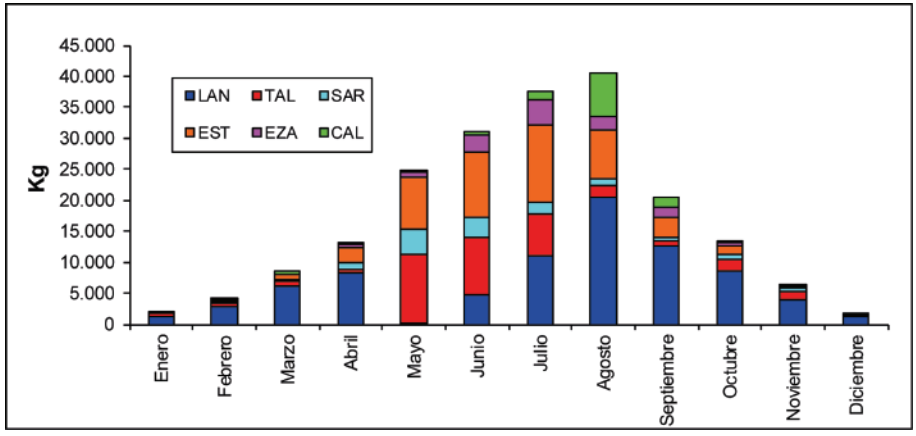


Figura 3.- Evolución mensual de las capturas de *E. siliqua* desde 2006 hasta 2015.

El GAM ajustado a la cpue mostró un efecto significativo del mes y del banco (P>0,001). Además, la interacción entre el mes y el banco indican la presencia de variaciones interanuales significativas entre bancos (P>0,001). Con respecto al banco, el mayor valor medio de cpue se obtuvo en CAL 10,6 ± 3,4 kg/buceador/día, aunque este banco posee un tope de capturas superior al resto (20 kg/buceador/día). Dentro de los bancos con un tope de capturas

de 15 kg/buceador/día, el banco de LAN tuvo un valor medio (7,8 ± 1,9 kg/buceador/día) significativamente menor al obtenido en los bancos de EZA, TAL y EST (P<0,005), con valores comprendidos entre 9,0 y 9,3 kg/buceador/día. Respecto a SAR, con una cpue media de 8,6 ± 1,6 kg/buceador/día, no mostró diferencias con los otros bancos (P>0,24).

A la vista de los resultados de la variabilidad de la cpue entre bancos, el análisis temporal se realizó de forma individual para cada banco. El GAM aplicado mostró resultados significativos en los bancos de LAN y EST, que presentaron resultados opuestos en la evolución anual de la cpue (Fig. 4). En LAN se apreció una tendencia descendente durante todo el periodo de estudio, con una variación total de 2,4 kg/buceador/día (25%). Por otra parte, en EST la cpue presentó una tendencia ascendente desde 2006 hasta 2015, con un incremento total de 2,4 kg/buceador/día (27%). Respecto a la variación mensual de la cpue, en general se observó una tendencia similar a la de capturas, con valores elevados durante los meses de verano.

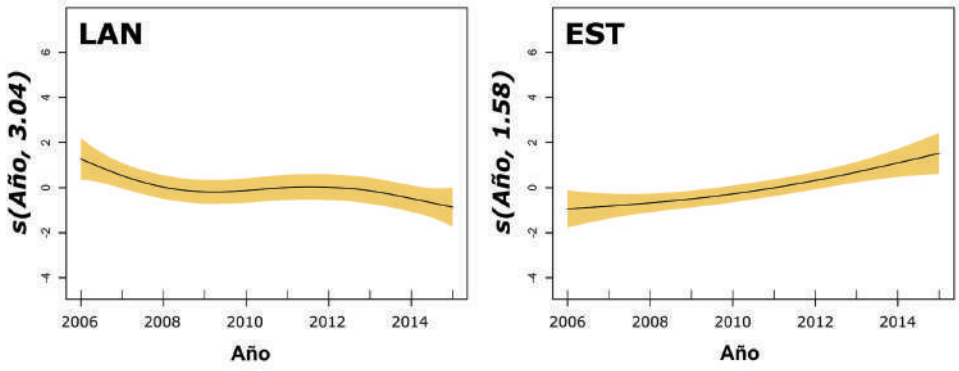


Figura 4.- Efecto del año en la cpue en los bancos de Langosteira y Estorde. En el eje de ordenadas se indica la función suavizadora estimada para cada variable, que representa la variación en la cpue media (kg/buceador/día).

Finalmente, el modelo aditivo aplicado a los datos del precio de venta del longueirón permitió determinar que el banco no tuvo un efecto significativo sobre el precio (GAM, F=0,23, P=0,23). Las capturas tampoco tuvieron influencia en el precio (F= 0,42, P=0,52). Así, se obtuvo un modelo final con las variables año (F=81,3, P<0,001) y, en menor medida, el mes (F=47,4, P<0,001) que permitió explicar hasta un 76% de la variabilidad total en el precio (Fig. 5).

Los resultados obtenidos indican que a nivel interanual (Fig. 5B) se observa un descenso del precio medio de 5,0 ± 2,8 €/kg, desde 2006 (11,1 ± 1,6 €/kg) hasta 2013 (45% menor), año en el que se registró el precio medio más bajo de toda la serie temporal (6,1 ± 1,2 €/kg), seguido por

un repunte hasta el año 2015, alcanzando el valor de 8,2 ± 1,9 €/kg. La tendencia general a lo largo de cada año muestra un descenso después de los meses de invierno, alcanzando el precio medio mínimo entre los meses de mayo-junio (7,5 ± 1,8 €/kg). Este mínimo es seguido de un repunte en el mes de agosto (9,2 ± 2,0 €/kg), para finalmente alcanzar los valores máximos en diciembre, mes en el que se llega a alcanzar un precio de 12,9 ± 2,9 €/kg (Fig. 5A).

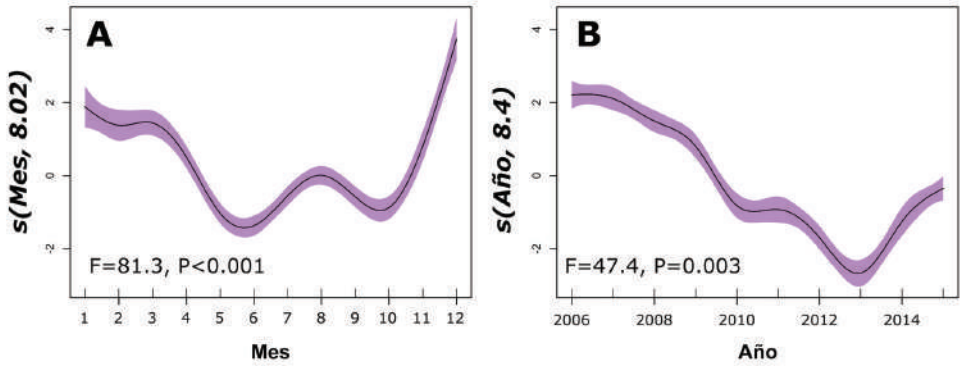


Figura 5.- Efecto del mes y del año en el precio del longueirón. En el eje de ordenadas se indica la función suavizadora estimada para cada variable, que representa la variación respecto al precio medio (€/kg).

Discusión

Observaciones *in situ* y consultas realizadas al propio sector sobre el motivo que determina la elección de las zonas de extracción, indican que la productividad, proximidad del banco al puerto base y la protección de aquel de las condiciones oceanográficas y atmosféricas, son los factores clave en la selección por parte de los mariscadores de las zonas a explotar, lo que influirá en mayor o menor medida sobre el esfuerzo pesquero y su productividad.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la variabilidad espacial en la explotación del longueirón en el Seno de Corcubión, son coherentes con lo anteriormente expuesto. LAN es el banco más protegido y más productivo, seguido de EST y TAL, todos ellos próximos al puerto de Fisterra. Las menores capturas se obtuvieron en CAL, EZA y SAR, los dos primeros muy alejados del puerto de Fisterra y muy expuestos a los vientos de sur y suroeste, mientras que en SAR, aún estando próximo al puerto de Fisterra, el esfuerzo realizado sobre él es menor debido a que la talla media de las capturas presenta un valor significativamente inferior a todos los anteriores (Alborés *et al*., páginas 373 a 382 del presente libro). Por otra

parte, el banco de LAN, aunque con una talla media de longueirón mayor que el de SAR, ésta es claramente inferior al resto de los bancos (Alborés *et al*., páginas 373 a 382 del presente libro). Esta circunstancia, unida al hecho de que se trata del banco más explotado, con mayores capturas, indica que el número de individuos extraídos en este banco es muy superior al del resto de los bancos y, por tanto, es donde disminuye en mayor medida el potencial reproductivo como consecuencia de la actividad pesquera.

El análisis de la variabilidad mensual en las capturas (Fig. 2A), permitió observar un importante aumento durante los meses de primavera y verano periodos en los cuales las condiciones meteorológicas y oceanográficas favorecen las capturas de solénidos, como ya fuera observado por Alonso *et al*. (1994) en Fisterra en 1993.

El análisis de la variabilidad interanual en las capturas en el periodo estudiado, muestra una tendencia general negativa, con dos periodos de descenso de las capturas, el primero desde 2006 hasta 2008 y un segundo periodo menos acusado de 2012 a 2015. El primer periodo de descenso se explica por una disminución progresiva en el número de buceadores que realizaron trabajos de extracción durante ese periodo, mientras que en el segundo se observa además del descenso en el número de buceadores, un descenso en el número de jornadas de trabajo realizadas.

El análisis de los resultados de la cpue (kg/buceador/día) mostró un efecto significativo ($P > 0{,}001$) para las variables mes y banco. La variable banco muestra una gradación norte-sur inversa a la productividad por el mayor esfuerzo (número de jornadas extractivas y buceadores) realizado sobre los bancos más resguardados y próximos al puerto de Fisterra que afectan negativamente a la cpue. Para la variable mes, en general se observó una tendencia similar a la de capturas, con valores elevados durante los meses de verano.

Para finalizar, los resultados obtenidos por el modelo aditivo aplicado a los datos del precio de venta del longueirón, a nivel interanual (Fig. 5B) el descenso en el precio medio podría explicarse por la crisis económica sufrida tanto en España como a nivel mundial. Dichos resultados también fueron observados por Hernandez (2016) en otras lonjas con importantes ventas de estas especies, como Cangas. Para la evolución mensual (Fig. 5A), los precios medios observados en los meses de julio y agosto coinciden con la temporada de turismo estival, mientras que en los meses de invierno el incremento de los precios se debe a la escasa oferta existente motivada por la meteorología y la diversificación del esfuerzo marisquero (el 54% de los buceadores participantes en el plan de solénidos, se dedican además a la extracción de erizo). Por el contrario, la finalización de la campaña de extracción de erizo, desplaza el esfuerzo hacia la extracción de solénidos que, conjuntamente con la ausencia de demanda por parte del turismo, favorece la caída de precios durante los meses de mayo y junio.

Bibliografía

Alborés Blanes I., Suárez Santos J.M., Catoira Gómez J.L. & Fernández Rodríguez L. 2017. Estudio de la variabilidad espacial y temporal en la talla comercial del longueirón (*Ensis siliqua* Linnaeus, 1758) en los bancos naturales del seno de Corcubión (Galicia). En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Guerra A., Lastres M.A., Padín X.A., Lodeiros C. (eds.) 19: 373-382 .

Alonso González A., Mariño Folla-Cisneros X.A. & Traba Fernández J.M. 1994. O longueirón, un recurso emerxente. Ed: Aula del Mar, Fundación Caixa Galicia.

Catoira Gómez J.L. & Traba Fernández J.M. 1997. La explotación del longueirón de fondo, *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758), en Fisterra: métodos de captura y análisis económico. Xornadas técnicas sobre o desenvolvemento productivo do marisqueo a pé. Santiago de Compostela, 13-14 de marzo de 1997.

Da Costa González F. 2009. Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777: composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios. Tesis doctoral, Santiago de Compostela, 2009.

Guerra Díaz A. & Gabín Sánchez C. 2008. Navajas y longueirones comerciales en España. En: Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos. 390 pp. Guerra Díaz A. & Lodeiros Seijo C. (Eds).

Hernández Otero A. 2016. Biology of the razor clam (*Ensis magnus* Schumacher, 1817), in the Ría de Pontevedra (NW Spain): application to fishery management. Tesis doctoral, Vigo, 2016.

Juncal Caldas L.M., Rodríguez Moscoso E. & Arnaiz Ibarrondo R. 2005. Georreferenciación y Cartografiado de los Bancos Marisqueros de Galicia. Evaluación del Potencial Marisquero. *Los Recursos Marinos en Galicia*, serie técnica-4. Ed: Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos.

R Core Team. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Wood S. 2006. *Generalized Additive Models: An Introduction with R.* Chapman and Hall/CRC.

Wood S.N. 2011. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society*, Series B, 73(1):3–36.

Zuur A., Ieno E.N. & Smith G.M. 2007. *Analysing Ecological Data*. Springer, New York.

Estudio de la evolución espacial y temporal de la productividad y del precio del longueirón *Ensis siliqua (Linnaeus, 1758)* en los bancos naturales del Seno de Corcubión (Galicia)

Suárez Santos[1] J.M., Catoira Gómez[2] J.L., Alborés Blanes[3] I. & Fernández Rodríguez[3] L.

1 Confraría de Pescadores de Fisterra. Paseo da Ribeira , 15166 Fisterra, A Coruña, España. E-mail: finisterraese@gmail.com
2 Delegación Territorial de A Coruña. Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Ramón y Cajal, 2. 15006 A Coruña.
3 Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía. Facultade de Ciencias. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n. 15071 A Coruña, España.

Introducción

La explotación del longueirón, *Ensis siliqua*, en el Seno de Corcubión constituye una pesquería histórica, con registros de producción desde el año 1966 (Catoira y Traba, 1997), siendo la Cofradía de Pescadores de Fisterra la pionera en Galicia en el uso del método de extracción por buceo en apnea (Guerra y Gabín, 2008). Posteriormente, en 2008, se autoriza el uso de equipos semiautónomos para su pesca. En este trabajo se analiza la variabilidad espacial y temporal de las capturas de longueirón y de la CPUE, así como la evolución de su precio, en los últimos 10 años (2006-2015) procedentes de 9 bancos de extracción (Fig.1)

Metodología

Se realizó un seguimiento de los desembarcos de longueirón en las Lonjas de Fisterra, Corcubión y Lira, donde se tomaron datos diarios de capturas totales por embarcación (kg), CPUE (kg/buceador/día) y precio (€/Kg), así como el banco o los bancos de procedencia de las capturas en el periodo 2006-2015.

Las variables respuesta (capturas, CPUE y precio) mostraron una trayectoria no lineal durante el periodo de estudio por lo que se ajustó un modelo aditivo generalizado (GAM) para cada una de ellas. Las variables explicativas temporales utilizadas fueron el mes y el año, y a nivel espacial, el banco de extracción. En los análisis no se tuvieron en cuenta los bancos de QUEN, PIN y CAR por su número de datos, muy inferior al resto, y el desbalance temporal de los mismos.



Fig. 1. Bancos naturales de longueirón en el Seno de Corcubión: LAN, Langosteira; TAL, Talón; SAR, Sardiñeiro; EST, Estorde; QUEN, Quenxe; EZA, Ézaro; PIN, Pindo; CAL, Caldebarcos; CAR, Carnota. Datum: WGS84 (*ww3.intecmar.org/Sigremar/*)

Resultados y discusión

La variabilidad en las capturas fue explicada en primer lugar por el banco (F=36.3, P<0.001), seguido del mes (F=18.5, P<0.001) y el año (F=8.9, P<0.001).

A nivel espacial, los bancos estudiados pueden agruparse en tres grupos, dentro de cada uno de los cuales no se encontraron diferencias significativas (GAM, P>0.12) (Fig. 2C). LAN fue el banco en el que presentó la mayor captura media de longueirón (1.053 kg/mes, IC 95%: 947-1.156 kg/mes), y también individuos, ya que la talla media de esta especie presenta un descenso N-S entre los bancos del Seno de Corcubión (datos no publicados). En TAL y EST las capturas se redujeron a 584 kg/mes (IC 95%: 482-686 kg/mes). Las menores capturas se obtuvieron en CAL, EZA y SAR, con una captura media de 252 kg/mes (IC 95%: 200-304 kg/mes) en todo el periodo analizado (P<0.001).

Respecto a la variabilidad temporal, se observó un importante aumento de las capturas durante los meses de primavera y verano (Fig. 2A), épocas con las condiciones del mar más adecuadas para la actividad subacuática. La mayor captura media se produjo durante el mes de Agosto (829 kg; IC 95%: 582-1.076 kg), mes que presentó la mayor captura registrada (3.477 kg). Por otra parte, durante el periodo anual estudiado se observó una tendencia general negativa, con dos periodos de descenso en las capturas, el primero desde 2006 hasta 2008 y un segundo periodo menos acusado de 2012 a 2015 (Fig. 2B). El descenso medio total durante el periodo analizado fue de 689 kg (IC 95%: 225-1.153 kg).

Capturas

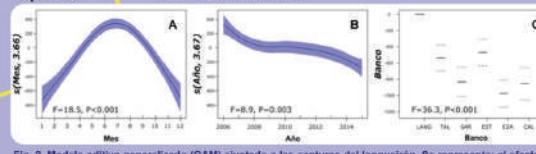


Fig. 2. Modelo aditivo generalizado (GAM) ajustado a las capturas del longueirón. Se representa: el efecto del mes (A), del año (B) y del banco (C). Se indica el valor y la significación de la prueba F.

El GAM ajustado a la CPUE mostró un efecto significativo del mes y del banco (P>0.001). Además, también indicó la presencia de variaciones interanuales significativas entre bancos (P>0.001).

Respecto al banco, la mayor CPUE media se obtuvo en CAL (10.6 ± 3.4 kg/buceador/día), aunque en este banco existe un tope de capturas superior al resto (20 kg/buceador/día). Dentro de los bancos con un tope de capturas de 15 kg/buceador·día, el banco de LAN mostró una CPUE media de 7.8 ± 1.9 kg/buceador·día, un valor significativamente menor al obtenido en los bancos EZA, TAL y EST (P<0.005), con valores comprendidos entre 9.0 y 9.3 kg/buceador/día.

Respecto a la variabilidad temporal, cabe destacar los patrones opuestos mostrados en la evolución anual de la CPUE en LAN y EST. LAN presentó una tendencia descendente durante todo el periodo de estudio (ΔCPUE=-2.4 kg/buceador/día), que representa una disminución del 25% (Fig. 3). En cambio, en EST tuvo lugar aumento de la CPUE desde 2006 hasta 2015, con un ΔCPUE=2.4 kg/buceador/día (27%). Respecto a la variación mensual de la CPUE, en general se observó una tendencia similar a la de capturas, con valores elevados durante los meses de verano.

CPUE

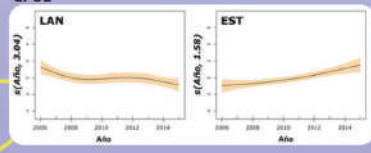


Fig. 3. Efecto del año en la CPUE en los bancos de LAN y EST. En el eje de ordenadas se indica la función suavizadora estimada para cada variable, que representa la variación en la CPUE media (kg/buceador/día) .

Precio

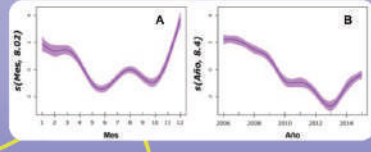


Fig. 4. Efecto del mes (A) y del año (B) en el precio del longueirón. En el eje de ordenadas se indica la función suavizadora estimada para cada variable, que representa la variación respecto al precio medio (€/kg)

Finalmente, el ajuste del GAM al precio de venta permitió determinar que el banco de origen no tiene un efecto significativo (F=0.23, P=0.23), y tampoco el volumen de capturas (F= 0.42, P=0.52). Así, se obtuvo un modelo final con la variable "año" y el "mes, que permite explicar hasta un 76% de la variabilidad total en el precio de venta.

Los resultados obtenidos indican que a nivel interanual se produjo un descenso del precio medio de 5.0 ± 2.8 €/kg (± DT), desde 2006 (11.1 ± 1.6 €/kg) hasta 2013 (45% menor), año en el que se registró el precio medio más bajo de toda la serie temporal (6.1 ± 1.2 €/kg), seguido por un repunte hasta el año 2015, alcanzando el valor de 8.2 ± 1.9 €/kg (Fig. 4B).

En general, a lo largo del año el precio medio muestra un descenso después de los meses de invierno, alcanzando el precio medio mínimo entre los meses de mayo-junio (7.5 ± 1.8 €/kg) (Fig. 4A). Este mínimo es seguido de un repunte en el mes de Agosto (9.2 ± 2.0 €/kg), para finalmente alcanzar los valores máximos en Diciembre, mes en el que se llega a alcanzar un precio de 12.9 ± 2.9 €/kg.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
XUNTA DE GALICIA



Bibliografía:

Catoira, J.L. & Traba, J.M. 1997. La explotación del longueirón de fondo, Ensis siliqua (Linnaeus, 1758) Fisterra: métodos de captura y análisis económico. Xornadas técnicas sobre o desenvolvemento produtivo marisqueiro e pd. Santiago de Compostela.

Guerra Díaz A. y Gabín Sánchez C. 2008. Navajas y longueirones comerciales en España. En: Guerra Díaz, Lodeiros Seijo C. (eds). Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo. Xunta de Galicia, Consellería Pesca e Asuntos Marítimos.

Estudio de la variabilidad espacial y temporal en la talla comercial del longueirón (*Ensis siliqua* Linnaeus, 1758) en los bancos naturales del seno de Corcubión (Galicia)

Alborés Blanes[1] I., Suárez Santos[2] J.M., Catoira Gómez[3] J.L. & Fernández Rodríguez[1] L.

[1]Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología. Facultad de Ciencias. Universidad de A Coruña. Campus da Zapateira. 15071. A Coruña. España.nachoalbores@gmail.com
[2]Cofradía de pescadores de Fisterra. Paseo da Ribeira sn, 15155 Fisterra, A Coruña, España.
[3]Delegación Territorial de A Coruña. Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Ramón y Cajal, 2. Casa do Mar 5ª P. 15006 A Coruña.

Resumen

En el presente estudio se analizó la variabilidad espacial y temporal de la talla del longueirón en 6 bancos marisqueros del Seno de Corcubión (Langosteira, Talón, Sardiñeiro, Estorde, Ézaro y Caldebarcos), a partir de las capturas comerciales obtenidas mediante buceo en la región submareal durante el periodo 2006-2015.

Para el banco de Langosteira se analizaron además los individuos de las subzonas A Serra y San Roque durante el periodo 2006-2010. En el caso de los bancos de Sardiñeiro y Langosteira se analizaron también los individuos capturados a pié en la región intermareal y los capturados mediante buceo en la región submareal.

Los resultados obtenidos muestran la existencia de diferencias espaciales y temporales en la talla del longueirón, con un efecto significativo del banco y del año, y en menor medida, del mes de captura. El banco marisquero fue la variable con mayor efecto sobre la variabilidad de

la talla. En el banco de Langosteira se encontraron diferencias significativas entre los individuos capturados entre las dos subzonas. La modalidad de captura también mostró un efecto significativo, siendo menor la talla de los individuos capturados en la zona intermareal con respecto a los capturados en la región submareal. En Langosteira sin embargo, los resultados no permitieron determinar un efecto claro.

Palabras clave

Ensis siliqua, longueirón, seno de corcubión, biometrías, monitorización pesquería.

Introducción

La explotación de los solénidos en el seno de Corcubión, que engloba las cofradías de Lira, Corcubión y Fisterra, es una zona pionera en la explotación de solénidos en Galicia, con registros en Fisterra desde finales de los años 60. Los primeros datos de capturas de *Ensis siliqua* datan de 1966 en la playa de Langosteira, (Catoira & Traba, 1997). Desde el año 1983, la actividad de extracción de longueirón se realiza a pié y mediante el buceo en apnea. El primer plan de explotación marisquera para la extracción de solénidos en Fisterra se presentó en 1993 para las modalidades de buceo en apnea y a pié. El esfuerzo marisquero para cada una de las zonas productivas siempre fue inferior en la zona intermareal, con un censo de mariscadores de entre una y seis personas, mientras que para la subzona submareal se encontraba entre los noventa buceadores iniciales y los cincuenta actuales.

A pesar de que el plan de explotación de longueirón fue presentado siempre por la cofradía de Fisterra para sus zonas productivas y sus asociados, desde 1993 los bancos a explotar incluían zonas productivas de los ámbitos territoriales de las cofradías de Corcubión, Pindo y Lira, cuya explotación se autorizaba a través de acuerdos anuales entre las cofradías. Siguiendo las directrices del segundo encuentro de mariscadores de recursos específicos (ENMARES, 2001), en el año 2002 se presenta el primer plan conjunto de explotación de solénidos de la zona V, actualmente vigente, en el cual participan los recolectores-buceadores de las cofradías de pescadores de Lira, Corcubión y Fisterra.

El objetivo de este trabajo es analizar la variabilidad espacial y temporal en la talla comercial del longueirón procedente de los bancos naturales de longueirón en el Seno de Corcubión (Fig. 1). A nivel de banco, se analiza además la variabilidad de la talla del longueirón según la modalidad de marisqueo autorizada (a pie-intermareal y buceo-submareal).

Materiales y métodos

Se realizó un control mensual de los datos biométricos (longitud máxima del eje antero-posterior y peso fresco) de los individuos de longueirón capturados en cada uno de los bancos incluidos en los planes de explotación de solénidos a pie y plan conjunto de la zona V. Los datos se obtuvieron en la lonja de Fisterra para un n≥30 a partir de las capturas obtenidas por los participantes de los diferentes planes (a pie y plan conjunto) durante el periodo 2006-2015. Los datos de longitud fueron obtenidos con una precisión de ±0,01 mm, mientras que en el peso fue de ±0,01 g.

Inicialmente se hizo un análisis exploratorio previo para cada variable respuesta (talla, peso) incluyendo todas las variables independientes (banco, año, mes, modalidad de captura), para identificar valores atípicos, la colinealidad, la independencia de las variables, la homogeneidad de la varianza y la identificación de problemas con los términos de interacción (Zuur, 2010). Dado el elevado coeficiente de determinación obtenido (R^2=0,8615) del ajuste por mínimos cuadrados de la linealización con logaritmos de la relación potencial $Y = aX^b$ (Peso=$1.407 \cdot 10^{-5} \cdot$Longitud$^{2.985}$, N=37,632), este estudio se ha centrado en la talla, que presenta un menor nivel de variabilidad en comparación al peso fresco. Además, se decidió no utilizar los datos de los bancos de QUE, PIN y CAR por su inferior número y el desbalance temporal de los mismos. En este análisis se observó que los cambios en la talla de las capturas durante el periodo de estudio no fueron lineales, por lo que se optó por ajustar un modelo aditivo generalizado (GAM). Este tipo de modelos permite evaluar la trayectoria no lineal de las variables analizadas en relación a una variable explicativa, en este caso, variables temporales como el mes y el año, y a nivel espacial, el banco de extracción. El modelo final ajustado fue:

$$\boldsymbol{Longitud_i = \alpha_i + f(Mes_i) + f(Año_i) + Banco_i + \varepsilon_i}$$

Donde α_i es la intersección, f es una función suave de los datos, que representa el efecto de cada una de las variables numéricas Mes (1-12) y Año (2006-2015), Banco es una variable categórica y ε_i es el error residual, para los datos observados (í).

Además, en el banco de LAN, el más explotado, se estudió la variabilidad en el tamaño del longueirón entre dos zonas submareales: "San Roque" y "A Serra" durante el periodo 2006-2010. Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA con la variable Zona, Año y Mes anidado en año. También se estudió del efecto de la modalidad de marisqueo en el tamaño de las capturas de longueirón (representativo también del efecto de la batimetría) en el banco de SAR durante 2006-2008 y en el de LAN durante los meses de enero-abril del año 2013. Para ello, se realizó un ANOVA anidado se con los datos de biometrías de las capturas recogidas a pie y mediante buceo con la variable Modalidad, Año y mes anidada en año para el análisis de los datos del banco de SAR y un ANOVA con la variable Modalidad y Mes para el banco de LAN.

Para el ajuste del modelo aditivo, el número óptimo de grados de libertad de cada función de suavizado se obtuvo mediante validación cruzada (Wood, 2006). En el proceso de validación del modelo se utilizó la prueba de Razón de Verosimilitud para comparar modelos anidados (Wood, 2006). Las asunciones de normalidad y homogeneidad fueron comprobadas mediante el examen visual de gráficos diagnósticos de los residuales de los modelos (Zuur *et al.*, 2007). Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico R (R Core Team, 2015). Para el ajuste del GAM se utilizó el paquete *mgcv* (Wood, 2011) en R.

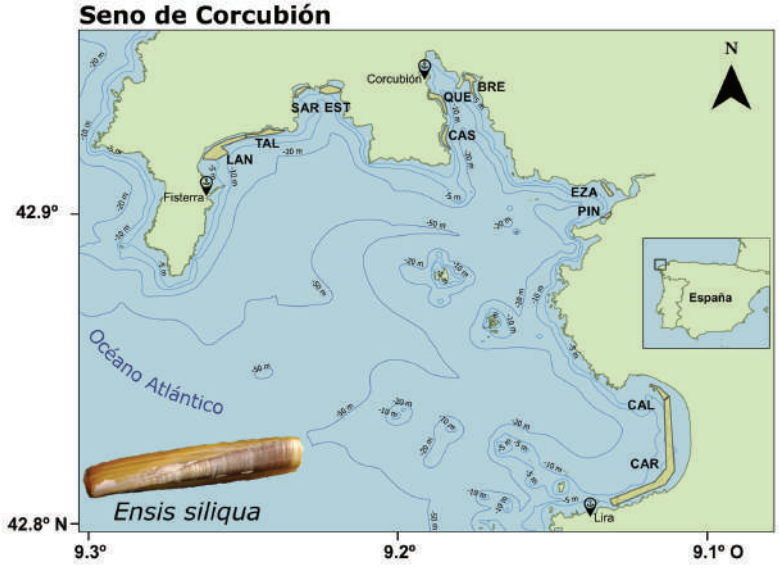


Figura 1.- Bancos naturales de longueirón en el Seno de Corcubión: LAN, Langosteira; TAL, Talón; SAR, Sardiñeiro; EST, Estorde; QUEN, Quenxe; EZA, Ézaro; PIN, Pindo; CAL, Caldebarcos; CAR, Carnota. Datum: WGS84 (*ww3.intecmar.org/Sigremar/).*

Resultados

Variabilidad espacial

Los resultados del ajuste del GAM indican que el banco tiene un efecto significativo sobre la talla media del longueirón capturado, seguido del año y, en menor medida, del mes (Fig. 2).

En general, se observa una gradación norte-sur en la talla de los individuos, siendo más pequeños los ejemplares en la zona norte (Fig. 2C). CAL y EZA presentaron la mayor talla media, con 120,96 ± 9,68 mm (± DT) y 120,79 ± 15,53 mm respectivamente, y no se observaron diferencias significativas entre ellos (GAM, P=0,15). La talla media en las capturas disminuyó desde EST (118,18 ± 11,99 mm), TAL (114,82 ± 11,76 mm) y LAN (112,40 ± 11,20 mm) a SAR (110,00 ± 9,93 mm).

El estudio realizado dentro del banco de LAN mostró la existencia de diferencias significativas en la talla media del longueirón entre las zonas de "San Roque" y de "A Serra" (ANOVA, F=629,7, P<0,001). La talla media de las capturas en San Roque fue menor a la de A Serra a lo largo de todo el periodo estudiado (2006-2010), con valores medios de 106,3 ± 11,3 mm y 113,8 ± 11,9 mm, respectivamente (Fig. 3A).

Finalmente, el estudio realizado en los bancos de SAR y LAN señala a la modalidad de captura (a pie-intermareal/buceo-submareal) como un factor importante en la talla del longueirón capturado (Fig. 3B). En el caso de SAR (2006-2008), la modalidad tuvo el mayor efecto sobre la talla de las capturas (ANOVA, F= 2806.5, P<0.001). La talla media de las capturas a pie (104,7 ± 7,6 mm) fue menor que la talla media de las capturas obtenidas mediante buceo (116,1 ± 12,5 mm). En cambió en LAN (2013), la interacción entre la modalidad de captura y el mes (ANOVA, F=6.3, P<0.001) no permitió determinar un efecto claro de la modalidad utilizada sobre la talla media de captura.

Variabilidad temporal

Los resultados mostraron que el año tuvo un efecto significativo (GAM, F=218.4, P>0,001) en todos los bancos estudiados, observándose una oscilación anual máxima de hasta 8,6 mm en la talla de captura entre 2010 y 2012, aunque sin mostrar un patrón común claro (Fig. 2B).

A nivel mensual (Fig. 2A), las tallas más grandes se obtuvieron en los periodos de marzo-abril y septiembre-octubre (rango: 114,3-115,8 mm), mientras que la talla mínima se obtuvo en el mes de Julio (113,8 ± 12,3 mm)

Por otra parte, se obtuvieron resultados similares para la talla del longueirón capturado a pie o buceo en el banco de SAR y entre zonas en el banco de LAN. Aquí también se encontraron diferencias interanuales significativas en ambos bancos (ANOVA, P>0.001; Fig. 3A-B). La talla media descendió ligeramente en 2008 respecto a los dos años anteriores, según el patrón general observado previamente (Fig. 2B).

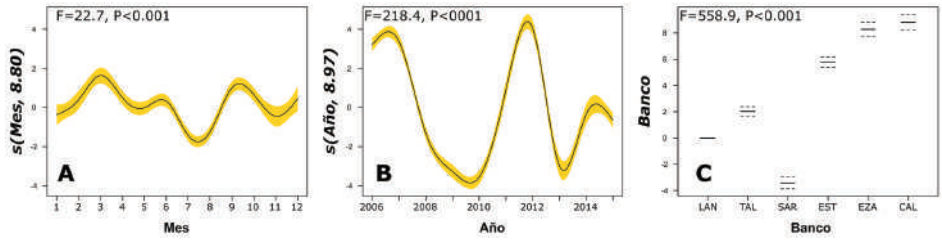


Figura 2.- Efecto del mes (A), del año (B) y del banco sobre la talla del longueirón en las capturas determinado mediante el GAM ajustado. En el eje Y se indica la función suavizadora y los grados de libertad para el mes y el año, y el efecto del banco, que representa la variación en la talla media. Se indica el valor y la significación de la prueba F.

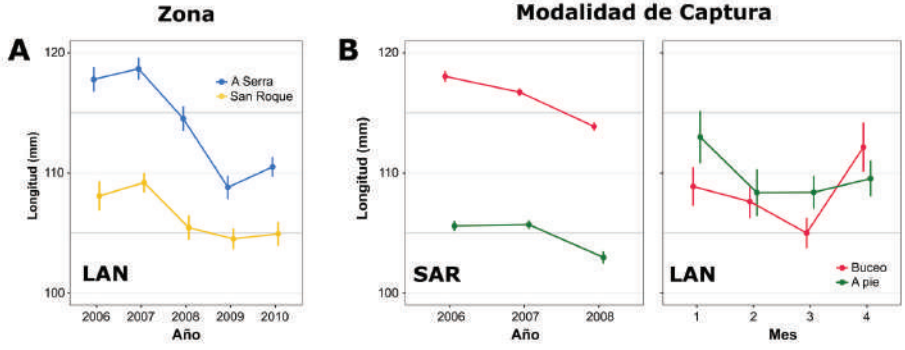


Figura 3.- Efecto de (A) la zona en el banco de LAN y (B) la modalidad de captura en los bancos de SAR y LAN en la talla de las capturas. Los puntos indican la media y las barras de error el IC 95%.

Discusión

Desde los comienzos de la actividad extractiva de solénidos en Fisterra, en 1966 (Catoira y Traba, 1997), las zonas productivas más explotadas fueron las más próximas a Fisterra. Observaciones *in situ* y consultas realizadas al propio sector sobre el motivo que determina la elección de las zonas de extracción, manifiestan que la productividad, proximidad del banco al puerto base y la protección de éste de las condiciones climatológicas, son los parámetros que determinan la elección del banco para la realización de los trabajos de extracción. La gradación norte-sur observada en el análisis de la variabilidad espacial de la talla para la variable banco puede relacionarse con el mayor esfuerzo marisquero soportado por los bancos del norte: LAN, TAL, SAR y EST, con respecto a los del sur: EZA y CAL.

El mayor esfuerzo de pesca realizado en los bancos del norte, además de afectar a la distribución de frecuencia de tallas del longueirón, con su reducción, probablemente repercuta asimismo en su potencial reproductivo y, por tanto, en su capacidad potencial de recuperación del efecto de la pesca. En relación con ello, sería oportuno realizar un estudio sobre la conectividad larvaria entre los diferentes bancos marisqueros del Seno de Corcubión, o incluso a mayor escala.

La variabilidad espacial observada en el banco de SAR entre la región intermareal y submareal (pie/buceo), podría explicarse en base a la existencia de una distribución espacial de las diferentes clases de talla de los individuos dentro del banco. Henderson y Richardson (1994) apuntan a una migración de los juveniles hacia cotas más profundas conforme incrementan su edad y se hacen más resistentes a las corrientes. En Galicia, en otros muestreos realizados en bancos de solénidos como en A Lanzada e Islas Cíes, también indican la presencia de ejemplares de mayor talla en las zonas más profundas (Darriba & Fernández, 2008). Los resultados obtenidos en el banco de SAR coinciden con estas apreciaciones, ya que los ejemplares de menor talla se dispusieron en la región intermareal, mientras que los adultos se distribuyeron en la región más profunda. Sin embargo, en LAN no se observó este patrón entre intermareal-submareal y si entre zonas (A Serra y San Roque), lo que indica que otros factores pueden estar interviniendo. Así, las diferencias en los tamaños de los longueirones capturados entre zonas, probablemente, son una respuesta a una serie de factores abióticos, como la granulometría del sedimento, la exposición al oleaje (McLachlan y Hesp, 1984; McLachlan *et al.*, 1995), en combinación con procesos bióticos como la depredación, la cantidad y calidad de alimento disponible y las interacciones ecológicas con otras especies.

A nivel temporal se ha observado una importante variación interanual en la talla media de los ejemplares capturados (hasta 8,6 mm). Esta oscilación probablemente esté relacionada con el crecimiento. No obstante, es necesaria una mejor comprensión de la plasticidad en el crecimiento y la longevidad de *E. siliqu*a a nivel espacial y temporal, dado que en *Ensis* spp. el crecimiento puede llegar a presentar variaciones entre zonas muy próximas <10 km (Hernández-Otero *et al.*, 2014), así como de su interacción con los procesos bióticos y abióticos en cada banco, ya que podría ayudar a determinar los posibles impactos de la pesca sobre sus poblaciones, así como su capacidad de adaptación y el tipo de respuesta que puede mostrar ante diferentes niveles de la explotación.

Bibliografía

Catoira Gómez J.L. & Traba Fernández J.M. 1997. La explotación del longueirón de fondo, *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758), en Fisterra: métodos de captura y análisis económico. *Xornadas técnicas sobre o desenvolvemento productivo do marisqueo a pé*. Santiago de Compostela, 13-14 de marzo de 1997.

Darriba Couñago S. & Fernández Tajes J. 2008. Sistemática y distribución. En: *Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo*. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos. Guerra Díaz A. & Lodeiros Seijo C. (eds).

ENMARES 2001, *Conclusións do 2º Encontro de Mariscadores de Recursos Específicos*, Sada, 2 de febrero de 2001. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura.

Henderson S.M. & Richardson C.A. 1994. A comparison of the age, growth rate and burrowing behavior of the rezor clams, *Ensis siliqua* and *Ensis ensis. J. Mar. Biol. Ass*. U.K. 74: 939-954.

Hernández-Otero A., Gaspar M. B., Macho G. & Vázquez E. 2014. Age and growth of the sword razor clam *Ensis arcuatus* in the Ría de Pontevedra (NW Spain): Influence of environmental parameters. *Journal of Sea Research*, 85: 59–72.

McLachlan A. & Hesp P. 1984. Faunal response to morphology and water circulation of a sandy beach with cusps. *Marine Ecology Progress Series,* 19: 133–144.

McLachlan A., Jaramillo E., Defeo O., Dugan J., de Ruyck A. & Coetzee P. 1995. Adaptations of bivalves to different beach types. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187: 147–160.

R Core Team. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Wood S. 2006. Generalized Additive Models: An Introduction with R. Chapman and Hall/CRC.

Wood S.N. 2011. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 73(1):3–36.

Zuur A., Ieno E.N. & Smith G.M. 2007. *Analysing Ecological Data*. Springer, New York.

Zuur A.F., Ieno E.N. & Elphick C.S. 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1):3–14.

Estudio de la variabilidad espacial y temporal en la talla comercial del longueirón *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758) en los bancos naturales del Seno de Corcubión (Galicia)

Alborés Blanes[3] I. , Suárez Santos[1] J.M., Catoira Gómez[2] J.L. & Fernández Rodríguez[3] L.

1 Confraría de Pescadores de Fisterra. Paseo da Ribeira , 15155 Fisterra, A Coruña, España. E-mail: fnisterraess@gmail.com
2 Delegación Territorial de A Coruña. Consellería do Mar. Xunta de Galicia. Ramón y Cajal, 2. 15006 A Coruña.
3 Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía. Facultade de Ciencias. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n. 15071 A Coruña, España.

Introducción

La explotación de solénidos en el Seno de Corcubión está gestionada por las cofradías de Fisterra, Corcubión y Lira. Actualmente el plan conjunto de explotación de longueirón gestiona 12 zonas productivas, siendo las más próximas a Fisterra las más productivas. Los primero registros de capturas de Ensis siliqua en Fisterra datan de 1966 en la playa de Langosteira (Catoira y Traba, 1997). En este trabajo se analiza la variabilidad espacial y temporal en la talla comercial del longueirón en 6 de los 9 bancos (Fig.1), explotados durante el periodo 2006-2015: Langosteira (LAN), Talón (TAL), Sardiñeiro (SAR), Estorde (EST), Ézaro (EZA) y Caldebarcos (CAL)). Para los bancos de LAN y SAR, se analiza además la variabilidad de la talla del longueirón según la modalidad de marisqueo autorizada (a pie-intermareal y buceo-submareal).



Fig. 1. Bancos naturales de longueirón en el Seno de Corcubión: LAN, Langosteira; CAS, Castelo; BRE, Brens; TAL, Talón; SAR, Sardiñeiro; EST, Estorde; QUE, Quenxe; EZA, Ézaro; PIN, Pindo; CAL, Caldebarcos; CAR, Carnota. Datum: WGS84 (ww3.intecmar.org/Sigremar/)

Metodología

El seguimiento de las capturas de longueirón fue realizado a partir de los desembarcos en la Lonja de Fisterra, donde se tomaron datos diarios de la longitud total (precisión: ±0.01 mm) y del peso (±0.01 g) de cada ejemplar, así como del banco de procedencia.

Se ajustó una regresión a los datos de talla y peso ($Peso=1.407 \cdot 10^{-5} \cdot Longitud^{2.995}$, N=37,632). Dado el elevado coeficiente de determinación obtenido (R^2=0,8615) este estudio se ha centrado en la talla, que presenta un menor nivel de variabilidad en comparación al peso fresco. Para el análisis de la variabilidad espacial y temporal, se eliminaron los bancos de QUE, PIN y CAR por su inferior número de datos y el desbalance temporal de los mismos. Para determinar cómo varía espacial y temporalmente la talla de *E. siliqua* se ajustó un modelo aditivo generalizado con las variables mes, año y banco.

Además, en el banco de LAN, el más explotado, se estudió la variabilidad en el tamaño del longueirón entre dos subzonas: "San Roque" y "A Serra". El estudio del efecto de la modalidad de marisqueo en el tamaño de las capturas de longueirón (representativo también del efecto de la batimetría) se realizó en los bancos de SAR (2006-2008) y LAN (2013). Para ello se realizaron ANOVAS anidados con la variable mes anidada en año o con mes como única variable categórica.

Resultados y discusión

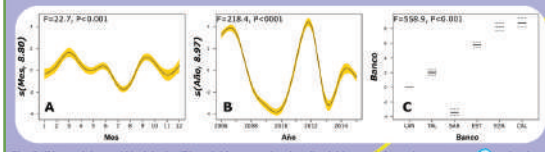


Fig. 2. Efecto del mes (A), del año (B) y del banco sobre la talla del longueirón en las capturas determinado mediante el GAM ajustado. En el eje Y se indica la función suavizadora y los grados de libertad para el mes y el año, y el efecto del banco, que representa la variación en la talla media. Se indica el valor y la significación de la prueba F.

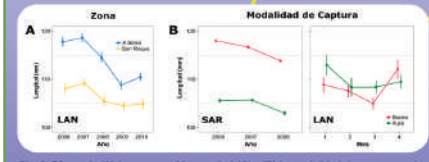


Fig. 3. Efecto de (A) la zona en el banco de LAN y (B) la modalidad de captura en los bancos de SAR y LAN en la talla de las capturas. Los puntos indican la media y las barras de error el IC 95%

Variabilidad espacial

Los resultados del ajuste del GAM indican que el banco tiene un efecto significativo sobre la talla media del longueirón capturado, seguido del año y, en menor medida, del mes (Fig. 2).

En general, se observa una gradación norte-sur en la talla de los individuos, siendo más pequeños los ejemplares en la zona norte (Fig. 2C). CAL y EZA presentaron la mayor talla media, con 120.9 ± 9.7 mm (± DT) y 120.8 ± 15.5 mm respectivamente, y no se observaron diferencias significativas entre ellos (GAM, P=0.15). La talla media en las capturas disminuyó desde EST (118.1 ± 12.0 mm), TAL (114.8 ± 11.8 mm) y LAN (112.4 ± 11.2 mm) a SAR (110 ± 9.9 mm). La gradación observada estaría relacionada con el grado de explotación de los bancos, que es mucho menor en la zona sur.

El estudio realizado dentro del banco de LAN mostró la existencia de diferencias significativas en la talla media del longueirón entre las zonas de "San Roque" y de "A Serra" (ANOVA, F=629.7, P<0.001). La talla media de las capturas en San Roque fue menor a la de A Serra a lo largo de todo el periodo estudiado (2006-2010), con valores medios de 106.3 ± 11.3 mm y 113.8 ± 11.9 mm, respectivamente (Fig. 3A).

Finalmente, el estudio realizado en los bancos de SAR y LAN señala a la modalidad de captura (a pie-intermareal/buceo-submareal) como un factor importante en la talla del longueirón capturado (Fig. 3B). En el caso de SAR (2006-2008), la modalidad tuvo el mayor efecto sobre la talla de las capturas (ANOVA, F= 2905.5, P<0.001). La talla media de las capturas a pie (104.7 ± 7.6 mm) fue menor que la talla media de las capturas obtenidas mediante buceo (116.1 ± 12.5 mm). En cambio en LAN (2013), la interacción entre la modalidad de captura y el mes (ANOVA, F=6.3, P<0.001) no permitió determinar un efecto claro de la modalidad utilizada sobre la talla media de captura.

La variabilidad en la talla observada entre zonas en LAN y según la modalidad de captura podría explicarse en base a la existencia de una distribución especial de las diferentes clases de talla de los individuos dentro del banco.

Variabilidad temporal

Los resultados mostraron que el año tuvo un efecto significativo (GAM, F=218.4, P>0.001) en todos los bancos estudiados, observándose una oscilación anual máxima de hasta 8.6 mm en la talla de captura entre 2010 y 2012, aunque sin mostrar un patrón común claro (Fig. 2B).

A nivel mensual las tallas más grandes se obtuvieron en el mes de marzo-abril y septiembre-octubre (114.3-115.8), mientras que la talla mínima se obtuvo en el mes de Julio (113.8 ± 12.3 mm)



Bibliografía:
Catoira, J.L. & Traba, J.M. 1997. La explotación del longueirón de fondo, Ensis siliqua (Linnaeus, 1758), en Fisterra: métodos de captura y análisis económico. Xornadas técnicas sobre o desenvolvimento productivo do marisqueo a pé. Santiago de Compostela.

XIX Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rias Galegas. 2016, Octubre 6-7, O Grove.

Evaluación de la eficacia de compuestos químicos y naturales frente a infecciones bacterianas y fúngicas de la trucha arcoíris

Lama-López[1] R., Saltos Rosero[1] N., García Diez C., Sánchez-Arévalo[2] A.R., Martínez[2] A. & Y. Santos[1]

[1]Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-Edificio CIBUS e Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. ysabel.santos@usc.es; lama.lopez.raquel@gmail.com

[2]Lípidos Toledo S.A, Madrid

Resumen

En el presente estudio se han comparado la eficacia de un compuesto químico, el biocida Bronopol (Santamix Ibérica S.L) y del compuesto natural Saprosafe (Lípidos Toledo S.A) para inhibir el crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum* y *Saprolegnia* spp. Con este objetivo se evaluó la sensibilidad de 42 cepas de *F. psychrophilum* y 4 cepas de *Saprolegnia* spp. aisladas de peces enfermos,mediante la técnica de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínima inhibitoria (CMI), mínima bactericida (CMB) y fungicida (CMF). Los resultados indican que las cepas de *F. psychrophilum* son más sensibles a Bronopol que a Saprosafe, mientras que las cepas de *Saprolegnia* muestran una sensibilidad similar a ambos compuestos.

Palabras clave

Flavobacterium psychrophilum, *Saprolegnia* spp, Saprosafe, Bronopol, ensayo de sensibilidad.

Introducción

La enfermedad del agua fría y el síndrome del alevín de la trucha, causada por *Flavobacterium psychrophilum* y la saprolegniosis, causada por miembros del género *Saprolegnia,* son dos importantes patologías que causan serias pérdidas económicas en el sector de la acuicultura de agua dulce a nivel mundial (Austin & Austin, 2016). En ambos casos, a las pérdidas ocasionadas por las mortalidades de los peces enfermos se suman las derivadas del deterioro de los individuos infectados, lo que imposibilita su comercialización.

F. psychrophilum ha sido aislado de una amplia variedad de especies de peces salmónidos y no salmónidos, salvajes y cultivados, a nivel mundial. La enfermedad aparece típicamente a temperaturas del agua por debajo de 16°C, y es más prevalente y grave a temperaturas por debajo de los 10°C. Aunque los peces de todas las edades se ven afectados, los peces pequeños son particularmente vulnerables a la infección. La bacteria produce lesiones abiertas características en la superficie corporal de los peces, mostrando predilección por el pedúnculo y la aleta caudal. La bacteria produce también infección sistémica.

Varias especies de *Saprolegnia* son responsables de infecciones en huevos y peces de agua dulce. La infección comienza con la entrada de las esporas en el cuerpo del hospedador a través de pequeñas heridas en la epidermis. *Saprolegnia* invade los tejidos epidérmicos, comenzando en la cabeza o las aletas y puede extenderse por toda la superficie del cuerpo. En los peces afectados se puede distinguir una masa algodonosa y zonas necróticas o ulceraciones, debidas a la acción de enzimas secretadas por el patógeno lo que a su vez provoca una respuesta inflamatoria en el pez.

Dado que no existen vacunas eficaces para la prevención, el uso de antimicrobianos es la única opción para el control de estas enfermedades. La rápida aparición de resistencias a los agentes antimicrobianos y las restricciones de uso de compuestos tóxicos en acuicultura ha estimulado la búsqueda de nuevos métodos de control de estas enfermedades, así como al desarrollo de métodos de prevención basados en la aplicación de medidas de higiene eficaces. En el presente estudio se ha evaluado la capacidad inhibidora de dos compuestos comerciales, Saprosafe (Lípidos Toledo S.A) y Bronopol (Pyceze, Santamix Ibérica S.L), sobre *F. psychrophilum* y *Saprolegnia* spp.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Se han utilizado 37 cepas de *F. sychrophilum* y 4 cepas de *Saprolegnia* aisladas a partir de peces enfermos. Con fines comparativos se incluyeron 4 cepas de referencia de *Flavobacterium psychrophilum* de la colección de Bacterias Marinas e Industriales (NCIMB 1947; NCIMB 2282; NCIMB 13383; NCIMB 13384). Las cepas se mantuvieron congeladas a -30ºC in Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada) hasta su uso. Las cepas se cultivaron en el medio de cultivo agar FLP (Cepeda *et al.*, 2004) y en Agar Infusion Cerebro-Corazón (BHIA) (Cultimed, Spain) a 18º C durante 48h-72h.

Determinación de la CMI

El estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó utilizando el método de microdilución en caldo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). El ensayo de sensibilidad de las cepas de *F. psychrophilum* se realizó en placas de 96 pocillos con fondo en U (Falcon®, USA). El ensayo de sensibilidad de las cepas de *Saprolegnia* se realizó en placas de 24 pocillos de fondo plano. Para ello, a partir de una solución madre de 5.000 ppm, se prepararon diluciones dobles seriadas de cada compuesto en los medios de cultivo caldo FLP (Cepeda *et al.*, 2004) y caldo infusión cerebro corazón (BHIC) para obtener concentraciones finales en el rango de 2.500 a 0,60 partes por millón (ppm). En las placas con el medio FLP se inocularon todos los pocillos, que contenían 100 µL de medio, con 10 µL de las suspensiones de *F. psychrophilum* (DO_{620}= 0,1 ± 0,005) para obtener una concentración final aproximada de $5x10^4$ UFC/pocillo. En las placas con medio caldo BHI se inocularon todos los pocillos, que contenían 1 mL de medio de cultivo, con fracciones de los cultivos frescos de las cepas de *Saprolegnia* obtenidas con ayuda de un sacabocados (2 mm). En cada placa se incluyeron un control positivo (medio inoculado sin antimicrobiano) y un control negativo (medio no inoculado) de crecimiento. Las placas de microdilución se incubaron a 18°C durante 48h (cepas de *Saprolegnia*) o 72h (cepas de *F. psychrophilum*) antes de proceder a la valoración del crecimiento.

El crecimiento de *F. psychrophilum* se valoró mediante espectrofotometría (Microplate Reader, model 680, Biorad®, USA) a una DO_{620}. El crecimiento de *Saprolegnia* se valoró mediante observación visual. Los ensayos se realizaron por triplicado y la CMI se definió como la menor concentración de compuesto capaz de inhibir completamente el crecimiento

del microorganismo en los pocillos inoculados, transcurridas 48 (cepas de *Saprolegnia*) o 72 (cepas de *F. psychrophilum*) horas de incubación.

Los resultados se expresaron como rango y media de la CMI. Los resultados de los ensayos de sensibilidad de *F. psychrophilum* se expresaron además como valores de CMI50 y CMI90, definidos como la concentración mínima del compuesto necesaria para producir inhibición del crecimiento (CMI) del 50% (CMI50) o 90% (CMI90) de los aislados probados.

Resultados y discusión

Actualmente el control de las infecciones por *F. psychrophilum* y *Saprolegnia* spp, se logra mediante tratamientos con piensos medicados y mediante baños con formol, respectivamente. La preocupación por la seguridad del consumidor y el impacto en el ambiente de tales compuestos ha promovido que la industria de la acuicultura limite el uso de antimicrobianos y promueva la aplicación de medidas de higiene eficaces. En este estudio se ha evaluado la sensibilidad de *F. psychrophilum* y *Saprolegnia* al compuesto Saprosafe (Lípidos Toledo S.A) en comparación con un conocido biocida, Bronopol (Pyceze, Santamix Ibérica S.L.), utilizando el método de microdilución en caldo.

Los resultados del ensayo de sensibilidad obtenidos con los aislados de *F. psychrophilum* se muestran en la tabla I. Todas las cepas de *F. psychrophilum* fueron sensibles al bronopol con CMI en el rango de 1,2 a 4,9 ppm (media = 2,5 ppm). La CMI 50 y CMI 90 de Bronopol para *F. psychrophilu*m fueron de 2,4 y 4,9 ppm, respectivamente (Tabla I). El 83% de las cepas de *F. psychrophilu*m probadas mostraron CMI menores o iguales a 2,44 ppm. Los valores de CMI del Bronopol frente a *F. psychrophilum* obtenidos en el presente estudio son similares a los descritos por Grasteau *et al.* (2015) (rango de CMI entre 1,6 a 6,3 ppm). Los valores de CMI de Saprosafe para *F. psychrophilum* están en el rango de 19,5 a 625 ppm (media 205 ppm). La CMI 50 y CMI 90 de Saprosafe para *F. psychrophilu*m fueron de 78,1 y 312,5, respectivamente (Tabla I). Estos valores de CMI son similares o ligeramente inferiores a los obtenidos por Grasteau *et al.* (2015) empleando como agentes desinfectantes glutaraldehido (CMI en el rango de 160 a 800 ppm) y cloramina T (CMI en el rango de 156 a 310 ppm). El 63% de las cepas probadas mostraron CMI menores o iguales a 78,1 ppm. Las ligeras diferencias en sensibilidad a los desinfectantes probados observadas entre las cepas de *F. psychrophilum* sugieren posibles diferencias en el estado fisiológico inicial de las células bacterianas utilizadas en el estudio.

Table I.- Actividad inhibitoria de Bronopol y Saprosafe frente *a Flavobacterium psychrophilum* determinada usando el método de microdilución en caldo.

Sensibilidad	Bronopol (ppm)	Saprosafe (ppm)
Media CMI	2,5	205
Rango CMI	1,2-4,9	19,5-625
CMI50	2,4	78,1
CMI90	4,9	312,5

CMI, Concentración mínima inhibitoria. CMI50 y CMI90, concentración mínima del desinfectante necesaria para inhibir el crecimiento del 50% (CMI50) o 90% (CMI90) de los aislados probados.

La Tabla II muestra los resultados del ensayo de sensibilidad obtenidos con los aislados de *Saprolegnia*. Las cepas de *Saprolegnia* mostraron una sensibilidad idéntica frente a Bronopol y Saprosafe con CMI en el rango de 78,1 a 312,5 ppm (media de 156,2 ppm).

Table II.- Actividad inhibitoria de Bronopol y Saprosafe frente a *Saprolegnia* determinada usando el método de microdilución en caldo.

Sensibilidad	Bronopol (ppm)	Saprosafe (ppm)
Media CMI	156,2	156,2
Rango CMI	78,12-312,5	78,12-312,5

CMI, Concentración mínima inhibitoria.

Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que el compuesto natural Saprosafe podría ser utilizados como una medida alternativa a los biocidas químicos para la prevención de las enfermedades causadas por *F. psychrophilum* y *Saprolegnia*. Se deben realizar estudios para determinar la eficacia de este compuesto *in vivo*.

Bibliografía

Austin B. & Austin D.A. 2016. *Bacterial Fish Pathogens*. Sixth Edit. Chichester, UK: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-32674-0.

Cepeda C., Garcia-Marquez S. & Santos Y. 2004. Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. *Aquaculture,* 238:75–82.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. *Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline*. CLSI document M49-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 19087-1898, USA1-56238-612-3.

Grasteau A., Guiraud T., Daniel P., Calvez S., Chesneau V. & Le Hénaff M. 2015. Evaluation of Glutaraldehyde, Chloramine-T, Bronopol, Incimaxx Aquatic® and Hydrogen Peroxide as Biocides against *Flavobacterium psychrophilum* for Sanitization of Rainbow Trout Eyed Eggs. *J. Aquac. Res. Development* 6: 382. doi:10.4172/2155-9546.1000382.

Evaluación de la eficacia de compuestos químicos y naturales frente a infecciones bacterianas y fúngicas de trucha arcoiris

R. Lama-López[1], N. Saltos-Rosero[1], C. García Diez[2], A. R. Sánchez-Arévalo[2], A. Martinez[2] e Y. Santos[1]

[1] Dpto. Microbiología y Parasitología, Edificio CIBUS-Facultad de Biología e Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela

[2]Lípidos Toledo S.A, Madrid

Resumen

La enfermedad del agua fría, causada por *Flavobacterium psychrophilum* y la Saprolegniasis, causada por miembros del género *Saproglenia* son dos importantes patologías que causan series pérdidas económicas en el sector de la acuicultura de agua dulce a nivel mundial. La rápida aparición de resistencias a los agentes antimicrobianos y las restricciones de uso de compuestos tóxicos en acuicultura ha estimulado la búsqueda de nuevos métodos de control de estas patologías. En el presente estudio se han comparado la eficacia de un compuesto químico y un compuesto natural para inhibir el crecimiento de *F. psychrophilum* y *Saproglenia* spp. Con este objetivo se evaluó la sensibilidad de 41 cepas de *F. psychrophilum* y 4 cepas de *Saproglenia* spp. aisladas de peces enfermos, frente al compuesto natural Saprosafe (Lípidos Toledo S.A) y el biocida Pyceze (Bronopol, Santamix Ibérica S.L). La actividad de estos compuestos se analizó mediante las técnicas de difusión en disco y dilución en caldo para la determinación de las concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) y fungicida (CMF). Los resultados indican que las cepas de *F. psychrophilum* son más sensibles a Bronopol que a Saprosafe, mientras que las cepas de *Saprolegnia* son muy sensibles a ambos compuestos.

Materiales y métodos

Cepas

- *F. psychrophilum*: 37 cepas aisladas de peces enfermos
  4 cepas de referencia NCIMB 13383, NCIMB 13384, NCIMB 1947 y NCIMB 2282
- Saprolegnia spp: 4 cepas aisldas de peces enfermos

Condiciones de cultivo

Medio FLP (Cepeda *et al.*, 2004) a 18ºC/72h

Medio Agar Infusión cerebro corazón (BHIA) a 18ºC/48h

Antimicrobianos

- Pyceze (SANTAMIX IBÉRICA, S.L.)
- Saprosafe (Lípidos Toledo S. A.)

Pruebas susceptibilidad antimicrobiana:

1. Método de dilución en caldo y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) según los protocolos recomendados por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M45-A2 (CLSI, 2010).
2. Las concentraciones utilizadas fueron 2500 a 0,60 ppm.
3. Los resultados de estos ensayos se expresaron como valores de CMI50, CMB50, CMI90 e CMB90 definidos como la concentración mínima necesaria para producir inhibición del crecimento (CMI) o muerte (CMM) del 50% (CMI50, CMM50) ou 90% (CMI90, CMM90) de los aislados probados

Resultados y Conclusiones

F. psychrophilum es sensible a Bronopol (CMI 1,2-4,9 ppm) y Saprosafe (CMI 19,5-625 ppm).

- *Saprolegnia* mostró sensibilidad similar a Saprosafe y Pyceze (78,12-312.5 ppm).

Table 1.- Actividad inhibitoria de Bronopol y Saprosafe frente a 41 cepas de *Flavobacterium psychrophilum* usando el método de microdilution en caldo

Sensibilidad	Bronopol (ppm)	Saprosafe (ppm)
Media CMI	2,5	205
Rango CMI	1,2-4,9	19,5-625
CMI50	2,4	78,1
CMI90	4,9	312,5

CMI, Concentración mínima inhibitoria. CMI50 y CMI90, concentración mínima del desinfectante necesaria para inhibir el crecimiento del 50% (CMI50) o 90% (CMI90) de los aislados probados.

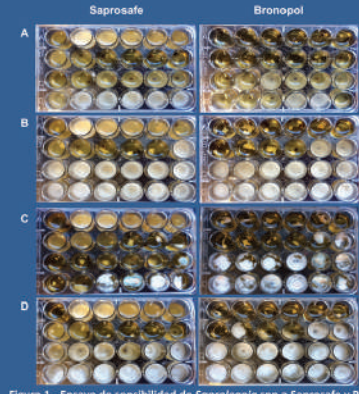


Figura 1.- Ensayo de sensibilidad de *Saprolegnia* spp a Saprosafe y Pyceze determinada por el método de dilución en caldo. A, cepa 69504; B, cepa 69526; C, cepa 70365, D, ESP-1.

Table 2.- Actividad inhibitoria de Bronopol y Saprosafe frente a 4 cepas de *Saprolegnia* usando el método de microdilución en caldo.

Sensibilidad	Bronopol (ppm)	Saprosafe (ppm)
Media CMI	156,1	156,1
Rango CMI	78,12-312,5	78,12-312,5

CMI, Concentración mínima inhibitoria.

Bibliografía

-Cepeda C., García-Márquez S., and Santos Y. 2004. Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. Aquaculture 238: 75-82.

-Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2010. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated of fastitious bacteria, document M45-A2.

Factibilidad biológica del cultivo suspendido de la Concha Nácar *Pteria sterna* en aguas ecuatorianas: crecimiento, supervivencia e influencia de factores ambientales

Lodeiros[1,2,3] C., Rodríguez-Pesantes[1] D., Márquez[1] A., Revilla[1] J., Freites[2,4] L., Lodeiros-Chacón[5] C. & Sonnenholzner[1] S.

[1]Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), Ecuador. cesarlodeiroseijo@yahoo.es
[2]Investigador Prometeo, Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, Ecuador
[3]Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Apartado Postal 245, Cumaná 6101, Venezuela.
[4]Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), Santa Elena, Ecuador.
[5]Master Interuniversitario en Acuicultura, Universidades de Santiago de Compostela, La Coruña y Vigo, La Coruña, España.

Resumen

Se analizó el crecimiento, la supervivencia y la influencia de los factores ambientales en dos cohortes de la Concha Nácar *Pteria sterna* (Gould, 1851) confinadas en cestas japonesas suspendidas de un *long line*, en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador. Las semillas o juveniles (8,4±0,54 y 5,0±0,17 mm, para la cohorte I-iniciada en noviembre 2015 y la II en febrero 2015, respectivamente) se mantuvieron en crecimiento durante 12 y 10 meses, cuando se realizaron muestreos mensuales y bimensuales de la longitud dorso-ventral y las biomasas secas de las conchas y los tejidos blandos; paralelamente se determinaron la temperatura, la salinidad, el seston total y la biomasa fitoplanctónica (clorofila *a*). Los

resultados muestran que *P. sterna* en el primer año de cultivo alcanza tallas de unos 100 mm (crecimiento mayor al reportado para otras zonas del Pacífico americano), con poca influencia negativa de los factores ambientales. Todo esto, junto con las elevadas masas de tejido alcanzado (6 g de masa seca a los 10 meses de cultivo), una supervivencia acumulada de un 60%, la elevada disponibilidad de semillas por captación natural, ser fuente de producción de alimento para el consumo humano, así como de mabes, perlas y posibles subproductos, conducen a considerar a la especie como emergente para el desarrollo de la acuicultura en Ecuador.

Palabras clave

Pteridae, acuicultura, Pacífico occidental, ostra perla.

Introducción

En el Pacifico tropical y subtropical americano, existen varias especies de moluscos que podrían producir perlas, pero solo dos, *Pintada mazatlanica* (Hanley, 1856) y *Pteria sterna* (Gould, 1851), son las que producen un nácar iridiscente adecuado para perlas de buena calidad. Aunque algunos ensayos de la producción perlífera se han realizado en el Pacífico americano, solo México ha sido el país que ha promovido una industria perlera a baja escala, y con ello gran información a cerca de las especies (Southgate *et al*., 2008; Lodeiros, 2015); sin embargo, muchas regiones se muestran idóneas para el desarrollo del cultivo de ostras perlíferas, particularmente para la Concha Nácar *P. sterna* (Serna-Gallo *et al*., 2014). En el caso de Ecuador, por ejemplo, hemos constatado que existe una enorme, aunque periódica, disponibilidad de semilla de *P. sterna* a través de la captación natural utilizando colectores artificiales (hasta 4-5 juveniles de 10 mm en 5 cm^2 de malla sardinera), la cual podría soportar una industria de cultivo, con interés de producción ya sea para la obtención de perlas y/o alimento, así como subproductos que pueden ser elaborados con su concha. La presente investigación es un aporte al conocimiento sobre el crecimiento, la supervivencia y la influencia de factores ambientales en *P. sterna* bajo cultivo suspendido en aguas ecuatoriales, donde existen cambios ambientales importantes debido a la mezcla de aguas provenientes de varios fenómenos oceanográficos, lo cual podría condicionar la fisiología del crecimiento de la especie bajo cultivo.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena (1°59'1.59" S; 80°45'35.15" W), en una línea de cultivo (*long line*) experimental, y de donde se suspendieron 2 lotes de semillas recolectadas a partir de mallas sardineras en diferentes épocas del año, denominándose cohorte I aquellos juveniles con los cuales se inició el cultivo experimental en noviembre 2014 y cohorte II en febrero 2015, con longitudes dorso-ventrales de 8,4±0,54 y 5,0±0,17 mm, respectivamente. Las semillas de las cohortes fueron confinadas en varias cestas japonesas (*pearl nets*: inicialmente de 3 mm luz de malla, incrementándose a medida que el cultivo evolucionaba) a una densidad equivalente a la cobertura del 25-30% de la base de la cesta; para ello se hicieron desdobles mensuales o bimensuales con recambios de las cestas, disminuyendo el número de individuos por cesta en función del criterio de densidad de cultivo establecido. Las cestas en lotes de 4 a 6 fueron protegidas con un saco confeccionado con malla de pesca de sardina, en función de evitar la incidencia de depredadores, principalmente de peces de la familia balastidae (Sonnelhozner *et al*., 2016).

En cada desdoble se contabilizaron los organismos vivos para estimar la supervivencia y se tomaron 5 individuos de cada una de 3 réplicas experimentales, a las cuales se les determinó la longitud en el eje dorso-ventral, utilizando un vernier digital de 0,01 mm de precisión, así como la biomasa seca de los tejidos blandos con una balanza analítica (0,001 g de precisión), luego de un proceso de deshidratación por tratamiento al calor en una estufa a 60ºC, hasta lograr peso constante.

Para contrastar el crecimiento de la ostra con los factores ambientales, semanalmente se recolectaron (por triplicado) muestras de agua entre 1-0,5 m, siendo analizadas para determinar la salinidad, el seston, clorofila *a* siguiendo las recomendaciones en Strickland & Parsons (1972). La temperatura se registró continuamente cada 30 min o 1h utilizando un termógrafo electrónico (Hobo, Onset, USA).

Resultados y discusión

La Concha Nácar *P. sterna* bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador durante 1 año mostró un crecimiento lineal en longitud (sin alcanzar asíntota de tallas máximas, Fig. 1A) y exponencial en masas de sus

conchas (Fig. 1B) y tejidos blandos (Fig. 1C), típico de los moluscos bivalvos; este comportamiento sugiere que los organismos se encontraron fisiológicamente poco estresados.

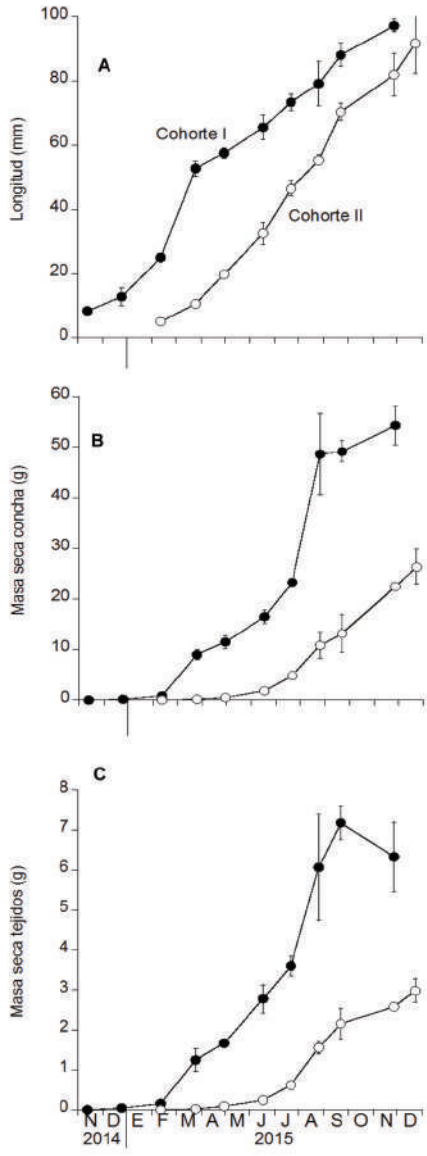


Figura 1.- Crecimiento en longitud antero-posterior (A) y masas secas de las conchas (B) y tejidos blandos (C) de la Concha Nácar *Pteria sterna* bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

Solo al final del estudio y en la cohorte I, se observó una disminución del crecimiento en las masas de las conchas (Fig. 1 B) y particularmente de los tejidos blandos (Fig. 1C), lo cual pudo deberse a un evento reproductivo, con la consecuente expulsión de gametos, y demandas energéticas previas que condicionaron el crecimiento somático. En ese periodo se manifestaron temperaturas elevadas que junto con el evento de la reproducción pudo conducir a estrés de los organismos del cultivo con la consecuente disminución del crecimiento y la más baja tasa de supervivencia observada en el estudio (85%, Fig. 2). Los estudios de González-Jiménez (2013) sobre la influencia de la temperatura en los procesos fisiológicos de *P. sterna* soportan la hipótesis antes señalada, ya que el límite crítico de la especie se encuentra hacia los 28ºC, temperatura cercana a la acontecida hacia finales del periodo experimental.

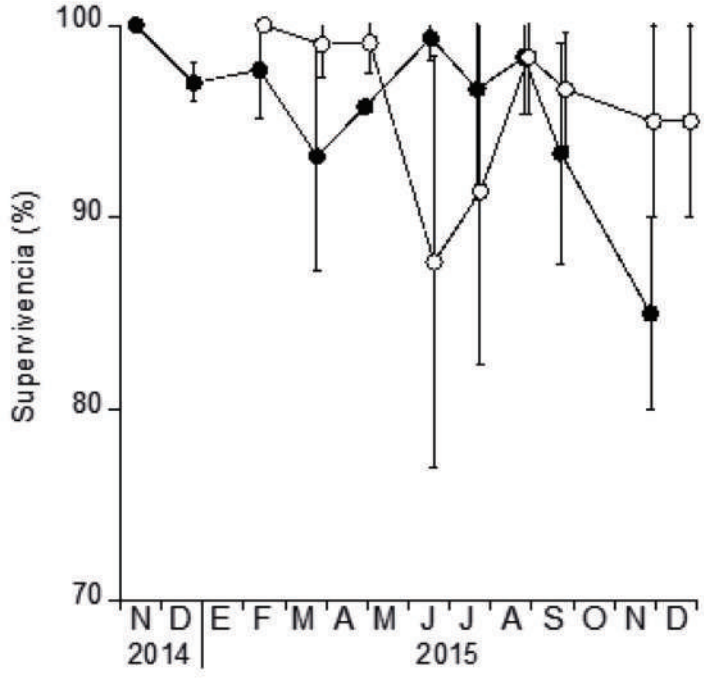


Figura 2.- Supervivencia mensual de la Concha Nácar *Pteria sterna* bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

Aunque la temperatura muestra una tendencia general en concordancia con el ciclo estival del hemisferio sur en la zona (Fig. 3A), la variabilidad intradiaria (Fig. 3B) que pudo llegar a intervalos de >6ºC, es un factor importante que puede afectar al crecimiento y procesos fisiológicos en organismos cultivados; sin embargo, no se observó alguna correlatividad de esta

variable con la curvas de crecimiento, en este sentido, a excepción de la posible influencia de elevadas temperaturas en periodos de reproducción, la poca o nula afección de la temperatura en *P. sterna* sugiere que la especie se encuentra evolutivamente adaptada a los múltiples cambios oceanográficos que acontecen en las costas peninsulares de Ecuador.

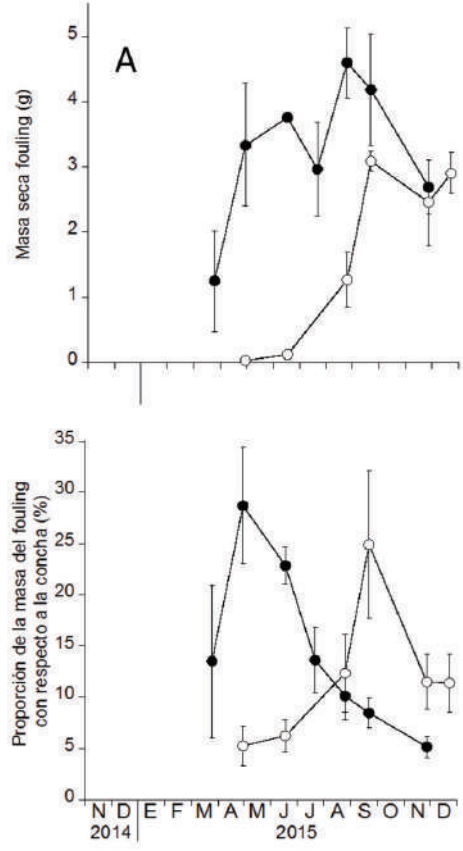


Figura 3.- Promedio diario (A) y variabilidad intradiaria (B) de la temperatura en el sitio del cultivo de la Concha Nácar *Pteria sterna* bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

Ninguno de los restantes factores ambientales: seston, clorofila *a* y salinidad (Fig. 4) mostraron alguna correlatividad con el crecimiento de *P. sterna*, y dada que la clorofila *a* se mantuvo generalmente >2 µm/L, la disponibilidad de alimento no parece ser un factor limitante.

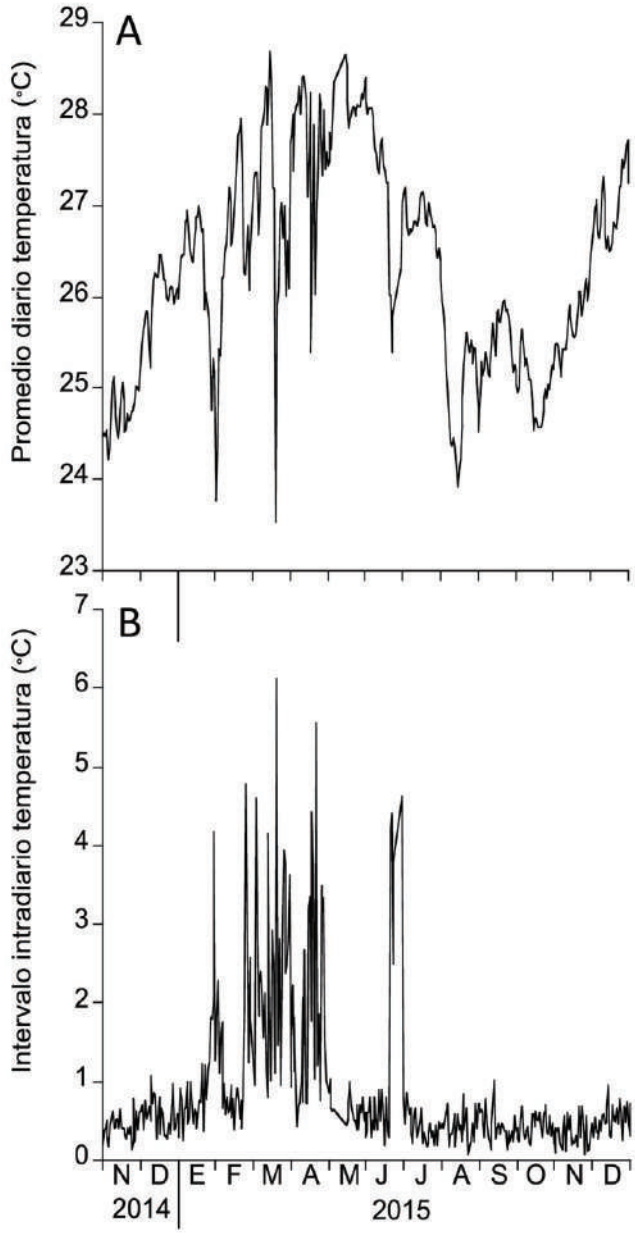


Figura 4.- Seston total (A), biomasa fitoplantónica estimada por Clorofila *a* (B) y Salinidad (C) en el sitio de cultivo de la Ostra Perla *Pteria sterna* bajo condiciones de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

Los resultados del presente estudio muestran que *P. sterna* en el primer año de cultivo alcanza tallas de unos 100 mm, lo cual es un crecimiento mucho mayor a la alcanzada en zonas subtropicales. Por ejemplo, en Bahía de La Paz, BCS, México, Gaytan *et al.* (1992) reportan en un año de cultivo tallas de *P. sterna* cercanas 80 mm (comenzando con juveniles de unos 30 mm) y Saucedo & Monteforte (1997) unos 63 mm. Adicionalmente las tallas alcanzadas en el presente estudio son mayores que las reportadas por Serna-Gallo *et al.* (2014) en aguas tropicales de México (Bahía de Acapulco, Guerrero). Todo esto sugiere que las tasas altas de crecimiento de *P. sterna* en el presente estudio es un indicativo de la potencialidad de la especie para obtener rápidamente las tallas mínimas requeridas para inducción de la producción perlera (medias perlas-mabes y perlas libres). En tan solo unos 7-8 meses la cohorte I alcanzó la talla mínima para la implantación de núcleos requeridos para la producción de medias perlas sería de entre 70-80 mm (Serna-Gallo *et al.,* 2014), lo cual contrasta con la proyección de 24 meses que Gaytan-Mondragon *et al.* (1992) estiman para alcanzar la talla adecuada en la implantación del núcleo. No obstante, estudios de implantación de núcleos para perlas y mabes en relación a la talla en *P. sterna* deben ser realizados en aguas ecuatorianas.

La Concha Nácar *P. sterna* también puede ser una especie emergente adecuada para la producción de alimentos, sea para su consumo directo o procesado (cocción), ya que se logran biomasas de tejido comestibles excepcionales, comparativamente con otros moluscos bivalvos y otros invertebrados (camarón), en un tiempo de cultivo relativamente corto, por ejemplo en la cohorte 1 se lograron unos 60 g de los tejidos blandos (equivalentes de su biomasa seca) en 10 meses de cultivo, lo cual supondría una rentabilidad alta, particularmente porque es una elevada biomasa producida por un consumidor primario, sin adición de alimento, a diferencia de la producción de camarones. Ello aunado a una supervivencia acumulada de un 60%, genera una gran factibilidad biológica del cultivo de la especie.

Un aspecto adicional que genera factibilidad biológica del cultivo de *P. sterna* en aguas ecuatorianas de la provincia de Santa Elena, Ecuador, es la existencia de una elevada disponibilidad de semillas a través de la captación natural con colectores artificiales, la cual pareciera extenderse por las costas de Manabí, inclusive a 11 millas de la costa (Observación personal en mallas de jaulas de cultivo de Cobia de Oceanfarm, frente de Jaramijó) y Esmeraldas (Rebolledo E., Pontífica Universidad Católica de Ecuador, comunicación personal), lo cual no ocurre al menos en costas de México, donde la captación de semilla es baja y se requiere de la producción en laboratorio (Serna-Gallo *et al.,* 2014).

Conclusiones y recomendaciones

El cultivo de la Concha Nácar *P. sterna* en aguas ecuatorianas muestra tener una elevada factibilidad biológica para el cultivo, dado su rápido crecimiento tanto en tallas (longitud) como en masas alcanzadas y la poca influencia de los factores ambientales generarían una elevada rentabilidad de su cultivo. Todo esto, junto a la elevada disponibilidad de semillas por captación natural y su característica de producción de alimento, mabes, perlas y posibles subproductos, conducen a considerar a la especie como emergente para el desarrollo de la acuicultura de Ecuador.

Se recomiendan estudios en función de optimizar las técnicas de captación natural y optimizar el cultivo en general, así como la determinación de aspectos nutricionales y de promoción alimenticia de la especie en función de considerarla como un nuevo rubro para la seguridad alimentaria de Ecuador, aparte de su uso para la producción de mabes, perlas y nácar iridiscente.

Agradecimientos

El trabajo se ha realizado como parte complementaria del proyecto de investigación *Desarrollo de protocolo de domesticación para el uso sostenible de nuevas especies marinas para consumo de alimento y repoblación de bancos naturales*, financiado por la SENESCYT. César Lodeiros y Luis Freites participaron en el estudio durante su vinculación al CENAIN-ESPOL, y UPSE, respectivamente, a través del proyecto Prometeo de la SENSCYT, Ecuador.

Bibliografía

Gaytan-Mondragon L., Cáceres-Martínez C. & Tobías-Sanchez M. 1992. Growth of the pearl oysters *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* in different culture structures at La Paz Bay, Baja California Sur, Mexico. *J. World Aquac. Soc.* 24: 541-546

González-Jiménez A. 2013. Efecto de la temperatura y concentración de alimento sobre la ecofisiología de la concha nácar *Pteria sterna* bajo condiciones controladas de laboratorio. MSc thesis, Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca, Mexico, 98 pp.

Hair J.F., Black W.C., Babin B.J. & Anderson R.E. 2014. *Multivariate data analysis*. *Seventh Edition Pearson International Edition*, London, 734 pp.

Lodeiros C. 2015. Perlas, la atracción del nuevo mundo: historia y cultivo en América. En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Lodeiros C.,Guerra A. (eds.) 17: 19-34.

Lodeiros C. 2002. Cuestión de peso y posición. *Revista de Biología Tropical,* 50(3/4): 875-878.

Lodeiros C. & Himmelman J.H. 2000. Identification of environmental factors affecting growth and survival of the tropical scallop *Euvola* (*Pecten*) *ziczac* in suspended culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela. *Aquaculture*, 182: 91-114

Serna-Gallo I., Ruíz-Velazco J., Acosta-Salmón H., Peña-Messina E., Torres-Zepeda G. & Saucedo P. 2014. Growth and reproduction patterns of the winged pearl oyster, *Pteria sterna*, cultivated in tropical environments of Mexico: Implications for pearl farming. *Ciencias Marinas*, 40(2): 75–88

Sonnenlhozner J., Márquez A., Lodeiros C. 2016. Evaluación de los erizos de mar *Arbacia incisa* y *Eucidaris thouarssii* como biocontroles del fouling en cestas del cultivo de la ostra *Crassostrea gigas* en Ecuador. *3er Congreso Latinoamericano de Equinodermos*, 18-22 julio 2016, Costa Rica.

Southgate P., Strack E., Hart A., Wada K., Monteforte M., Cariño M., Langy S., Lo C., Acosta-Salmón E. & Wang A. 2008. Exploitation and Culture of Major Commercial Species. En: *The Peral Oyster*. Southgate & Lucas (eds). Elsevier, The Netherlands. pp: 303-355.

Strickland J.D.H. & Parsons T.R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Board. Can.*, Vol. 167, 2nd edn., 310 pp.

Factibilidad biológica del cultivo suspendido de la Concha Nácar *Pteria sterna* en aguas ecuatorianas: crecimiento, supervivencia e influencia de factores ambientales

Lodeiros C.[1,2,3], Daniel Rodríguez-Pesantes[1], Márquez A.[1], Revilla J.[1], Freites L.[2,4], Lodeiros-Chacón C.[5], Sonnenholzner S.[1]

[1]Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), km 30,5 Vía Perimetral Guayaquil, Ecuador

[2]Investigador Prometeo, Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, Ecuador

[3]Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Apartado Postal 245, Cumaná 6101, Venezuela

[4]Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), Santa Elena, Ecuador.

[5]Master Interuniversitario en Acuicultura, Universidades de Santiago de Compostela, La Coruña y Vigo, La Coruña, España.

Introducción

En el Pacífico tropical subtropical americano, a lo largo varias especies de moluscos que podrían producir perla, pero solo la *Pinctada mazatlanica* y *Pteria sterna* son las que producen un nácar y filosentia de alta calidad. Aunque algunos ensayos de la producción perlífera se han realizado en el Pacífico americano, solo México ha sido el país que ha logrado dar un paso hacia la industrialización a baja escala, y con ello gran información acerca de las especies (Southgate et al. 2008, Lodeiros 2014); sin embargo, muchas regiones se mostrar idóneas para el desarrollo del cultivo de estas perlíferas, particularmente para la Concha Nácar *P. sterna* (Sato Gallo et al. 2014). En el caso de Ecuador, por ejemplo, hemos encontrado que es una especie, aunque poco abundante, disponibilidad del semilla de *P. sterna* a través de la captación natural utilizando sustratos artificiales (bastidores) durante 6 años (de 30 mm en 5 cm² de malla cada mes), la cual podría soportar una industria de cultivo, con miras de producción y sea para la obtención de perlas y alimento, así como subproductos que puedan ser elaborados con su concha. La presente investigación es una primera aproximación al conocimiento sobre el crecimiento, la supervivencia, la influencia de factores ambientales en *P. sterna* bajo cultivo suspendido en aguas ecuatorianas, donde existen cambios ambientales importantes debido a la marcada diferencia proveniente de varios fenómenos oceanográficos y cual podría condicionar la fisiología del crecimiento de la especie bajo cultivo.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena (1° 56'1,90" S; 80° 45'26,15"W), en una línea de cultivo (long line) experimental, y donde se suspendieron 2 lotes de semillas en bolsas (o sartas) de malla sarlanza anchura de 5 mm (tamaño de esfuerzo). Los dos lotes se iniciaron el cultivo experimental en noviembre 2014 y abierto 11 de febrero 2015, con longitud dorso-ventral de 84 ± 20.54 y 5.0 ± 0.03 mm, respectivamente. Las semillas de los colectores fueron sembradas en varias cestas japonesas (*pearl nets*) (o bandejas de 3 mm de luz de malla, inicialmente con una densidad de 50 individuos por cesta (o bandeja) y una densidad que fue aumentando a medida que iba creciendo hasta 25-30% de la base de la cesta, para cubrir solo la zona de los bordes mantenidos bien separadas con recambios de las cestas japonesas, dándose cada cierto tiempo de la limpieza de incrustantes y depredadores, principalmente de peces de la familia Balistidae (Sato Gallo et al. 2014). En cada medida se cuantificaron 6 organismos con pie para estimar la talla y crecimiento. Se tomaron 5 individuos de cada una de las 3 réplicas experimentales, a los cuales se les determinó la longitud dorso-ventral, utilizando un vernier digital de 0.01 mm de precisión, así como la biomasa seca de los tejidos blandos con una balanza analítica (0.001 g de precisión), luego de un proceso de deshidratación por transmisión al calor en una estufa a 60 °C, hasta lograr peso constante. De igual manera se determinó el peso de la concha y del material y organismos depositado en la misma (*fouling*).

Para monitorear el crecimiento de la ostra ante los factores ambientales, semanalmente se colectaron (por triplicado) muestras de agua a nivel 1-0.5 m, siendo analizadas para determinar la salinidad, el oxígeno, clorofila-a siguiendo las recomendaciones en Strickland y Parsons (1972). La temperatura se registró continuamente cada 30 min o 1h utilizando un termógrafo electrónico (Hobo, Onset, USA).

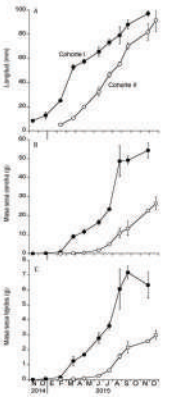


Figura 1. Crecimiento en longitud anteroposterior (A) y masa seca de la concha (B) y tejidos blandos (C).

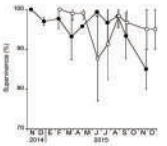


Figura 2. Supervivencia mensual.

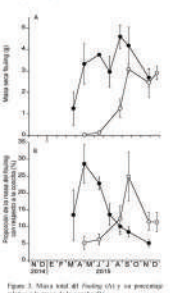


Figura 3. Masa total del *fouling* (A) y su porcentaje relativo a la masa de la concha (B).

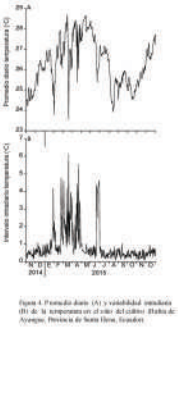


Figura 4. Promedio diario (A) y variabilidad semanal (B) de la temperatura en el sitio del cultivo (Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador).

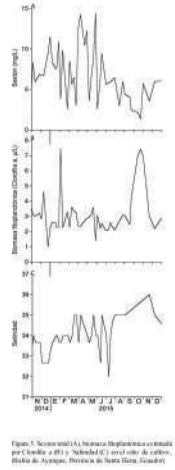


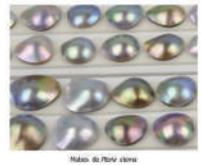
Figura 5. Seston total (A), biomasa fitoplanctónica estimada por clorofila *a* (B) y Salinidad (C) en el sitio de cultivo, Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador).



Pteria sterna en cestas japonesas



Formación de matas o medias perlas en *Pteria sterna*



Matas de *Pteria sterna*



Pteria sterna para el consumo

Resultados y discusión

La Concha Nácar *P. sterna* bajo sistema de cultivo suspendido en la Bahía de Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador durante 1 año mostró un crecimiento lineal en longitud (sin alcanzar asintota de tallas máximas, Fig. 1A) y exponencial en masa de su concha (Fig. 1B) y tejidos blandos (Fig. 1C), tipo de los moluscos bivalvos; este comportamiento sugiere que los organismos se encuentran en fisiológicamente poco estresados.

Solo al final del estudio y en la ostra tal, se encontraron disminución del crecimiento en la masa de los tejidos, particularmente de los tejidos blandos, lo cual podría observarse un evento reproductivo, que la consecuente aparición de gametos, y demandas energéticas propias que condicionaron el crecimiento somático. En cuanto a la reproducción como un factor endógeno y la elevada temperatura como exógeno, podrían ejercer una acción sobre la cual que pudo evidenciar estrés de los organismos de cultivo con la consecuente disminución del crecimiento y la mortalidad masa de septiembre/octubre a un 40 % (Fig. 2). los estudios de González-Jiménez (2013) sobre la influencia de la temperatura en los procesos fisiológicos de *P. sterna* soportan la hipótesis antes señalada, ya que el límite crítico de la especie se encuentra hacia los 28 °C temperatura cercana a la encontrada en la bahía de estudio del presente experimental.

Análisis de regresiones múltiples para explicar los variabilidad de crecimiento en longitud y masa de tejidos blandos sugieren una influencia ambiental del 6% de la masa del *fouling* acumulado en la concha con respecto a la de la concha, el cual llega a los 27 y 28 cm los ostras de 1y 2 años, respectivamente (Fig. 2B). *P. sterna* por su disposición vertical puede exponer las branquias que el resto de especies de la masa del *fouling* en la concha (Isdeires 2002), sin embargo los modelos identifican a este variable como influyente, el cual podría estar asociado por el poco crecimiento de las masa de la concha a la edad experimento que al ser integrado en el denominador generan un alto valor del índice. El *fouling* puede jugar un papel de camuflaje de otras variables ambientales en estos análisis explicativos de la variabilidad del crecimiento entre diseños ajustes (Isdeires y Himmelman 2000). Otro factor que participó en los modelos fue la temperatura invernal, este factor de igual manera, pero en menor magnitud de afectó en que la ostra del japonesa Crassostrea gigas bajo condiciones de cultivo similar. Resultados similares obtenidos al presente estudio (Isdeires et al. 2006-presente libro). Aunque la temperatura mostró una tendencia general un incremento en el ciclo este al del mismo fue en la zona (Fig. 3A), la variabilidad invernal (Fig. 3B) que pudo llegar a intervalos de <6°C, es un factor importante que podría afectar el crecimiento y procesos fisiológicos en organismos tropicales. La poca afección de la temperatura en *P. sterna* en contrast al influencia de la determinada en *C. gigas*, podría deberse a que, contrariamente a la otra ostra japonesa, que es una especie introducida en aguas ecuatorianas, la Concha Nácar de Ecuador constituye se encuentra en los límites norte adaptativo los múltiples cambios oceanográficos que acontecen en las costas pacíficas de Ecuador. Sato Gallo et al. (2014) también sugiere que la temperatura es un factor importante en la modulación del crecimiento y la reproducción de *P. sterna*.

Ningún de los restantes factores ambientales: seston, clorofila-a y salinidad (Fig. 4), no mostraron alguna correlación con el crecimiento de *P. sterna*, y datos que el clorofila-a se mantuvo generalmente >2 µm/L, la disponibilidad de alimento no parecían ser una limitante.

Los resultados del presente estudio muestran que *P. sterna* en el primer año de cultivo alcanzan tallas de unos 100 mm, lo cual es un crecimiento mucho mayor a lo alcanzado en otras subregiones. Por ejemplo, en Bahía de La Paz, BCS, México (Gaytan et al. (1992) reportan alcanzar en un año tallas de *P. sterna* bajo sistema de cultivo cercanas 80 mm (amortiguado con juveniles de unos 30 mm) y Saucedo y Monterrubio (1997) unos 63 mm. Adicionalmente las tallas alcanzadas en el presente estudio son mayores que las reportadas por Sato Gallo et al. (2014) en aguas tropicales de México (Bahía de Acapulco, Guerrero). Todo esto sugiere que las aguas ubicadas en el límite norte del presente estudio existe un mayor potencialidad de la especie para obtener rápidamente las tallas más buscadas para la elección de la producción perlera (medias perlas o botones) por los Brasil. En un solo año (>7-8 meses) la ostra ha logrado alcanzar la talla mínima para la implantación de núcleos requerido para la producción de medias perlas serán de entre 70-80 mm (Sato Gallo et al. 2014), lo cual contrasta con la proyección de 28 meses que Gaytan-Mendigan et al (1992) estima para alcanzar la talla adecuada a la implantación núcleo. No obstante, estudios de implantación de núcleos para perlas y mabes en relación a la talla en *P. sterna* deben ser realizados en aguas ecuatorianas.

La Concha Nácar *P. sterna* también puede ser una especie emergente alcanzada para la producción de alimento, sea para su consumo directo proceso de (secado), o aquí se logran biomasas de tejidos comestibles aceptables, comparable aunque aun otros moluscos bivalvos y otros invertebrados (camarón) en un tiempo de cultivo relativamente corto, por ejemplo en la cohorte 1 se lograron unos 60 g de los tejidos blandos (equivalentes de su biomasa seca) a 10 meses de cultivo, lo cual supondría una rentabilidad alta, particularmente porque es una elevada biomasa producida por un consumidor primario, sin añadir de alimento, a diferencia de la producción de camarones. Ello aunado a una supervivencia cercana a la del 60%, generan una gran factibilidad biológica del cultivo de la especie.

Un aspecto adicional que genera factibilidad biológica del cultivo de *P. sterna* en aguas ecuatorianas de la provincia de Santa Elena Ecuador, es la existencia de una elevada disponibilidad de semillas a través de captación natural con colectores artificiales, lo cual practicas se ha desarrollado por las costas de Manabí, incluso a 11 millas de la costa (Observación personal en mallas de jaulas de cultivo de Cobia de Oceanfarm, Proyecto Jaramijó y Bastualdia (Ribeiro E., Pontificia Universidad Católica de Ecuador, comunicación personal). lo anterior ocurre al menos en costas de Manabí, donde la captación de semillas de bajo y se requiere de la producción en laboratorio (Sonna Gallo et al. 2014).

Conclusiones y recomendaciones

El cultivo de la Concha Nácar *P. sterna* en aguas ecuatorianas muestra tener una elevada factibilidad biológica para el cultivo, las tallas en longitud y masa alcanzadas son de rápido crecimiento, sin poca influencia de los factores ambientales, lo que consecuentemente garantizan una elevada rentabilidad de su cultivo. Ello junto a la elevada disponibilidad de semillas por captación natural y su característica de producción de alimento, mabes, perlas y posibles subproductos, conducen a considerarla la especie como emergente para el desarrollo de la acuicultura de Ecuador.

Se recomiendan estudios en función de optimizar las técnicas de captación natural y optimizar el cultivo en general, así como la determinación de aspectos nutricionales y de composición alimenticia de la especie en función de considerarla como un nuevo nicho para la seguridad alimentaria de Ecuador, a parte de su uso para la producción de mabes, perlas y nácar idóneo de.

Agradecimientos

El trabajo se ha realizado amparado en el proyecto de investigación *Desarrollo de protocolos de domesticación para el cultivo suspendido de nuevas especies marinas para consumo de alimento y repoblación de bancos naturales*, financiado por la SENESCYT. César Lodeiros y Luis Freites participaron en el estudio durante su visita/estadía al CENAIM/ESPOL, y UPSE, respectivamente, a través del proyecto Prometeo de la SENESCYT, Ecuador.

Referencias

Gaytan-Mendigan, L., Cáceres-Martínez, C., Tobías-Sánchez, M. 1992. Growth of the pearl oysters, *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* A different culture structures at La Paz Bay., Baja California Sur, Mexico. J. World Aquac. Soc. 24: 543-546

González-Jiménez A. 2013. Efecto de la temperatura y concentración de alimento sobre la ecofisiología de la condensación *Pteria sterna* bajo condiciones semicontroladas de laboratorio. MSci Thesis, Universidad del Mar, Puerto Angel, Oaxaca, México, 98 pp.

Hair JF., Black, W.C., Babin B.J., Anderson, R.E. 2014. Multivariate data analysis. Seventh Edition Pearson International Edition, London, 734 pp.

Lodeiros C. 2014. Perlas, la atracción del océano mundo histórico y activo en América. Fron Ac. Rec. Mar. Rias Gal. XV 15:9-31.

Lodeiros C. 2002. Cuestiones de por y posición. Revista de Biología Tropical 50 (3-4): 875-878.

Lodeiros C., Himmelman JH. 2000. Identification of environmental factors affecting growth and survival of the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* (Linnaeus, 1758) in suspended culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela. Aquaculture 182: 91-114

Sonna Gallo L., Ruiz-Velasco J., Acosta-Salmón H., J. Patiño Mesina E., Torres-Zapata G., Saucedo P. 2014. Growth and reproduction patterns of the winged pearl oyster, *Pteria sterna*, cultivated in tropical environments of Mexico: Implications for pearl farming. Ciencias Marinas 40(2): 75-88

Sonnenholzner J., Márquez A., Lodeiros C. 2006. Evaluación de los efectos de mar *Mytella strigata* y *Eucalyptus binaerata* como biofouling en cestas de cultivo de la ostra *Crassostrea gigas* en Ecuador. Ser Congreso Latinoamericano de Equinodermos, 18-22 julio 2006, Costa Rica.

Strickland J.D.H., Parsons T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bull. Fish. Res. Board. Can., Vol. 167, 2 edición., 310 pp.

Southgate P., Strunk, E., Hart A., Walla K., Monteforte M., Cariño M., Lagy S., Ito C., Acosta-Salmón E., Wang A. 2008. Exploitation of Culture of Major Commercial Species. En: The Pearl Oyster. Southgate y Lucas (eds). Elsevier, The Netherlands. pp 310-355.

Marcadores moleculares para la identificación genética de especies comerciales en Ecuador

González-Henríquez[1] N., Quinteiro[2] J., Flores-Suárez[3] D., Tomalá-Reyes[3] S., Balón-Lainez[3] K., Rodríguez-Pozo[3] J., Oñate[3] D., Cornejo-Rodríguez[3] M.H., Chavarría-Viteri[3] J., Melena-Cevallos[3] J., Villón[3] J., Medina-Alcaraz[1] C. & Sarmiento-Herrero[1] R.

[1]Departamento de Biología, BIOMOL, Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, España. nieves.gonzalez@ulpgc.es
[2]Departamento de Bioquímica e Bioloxia Molecular. CIBUS, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela.
[3]Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Santa Elena. Ecuador

Palabras clave

Cebadores especificos, región control, *Anadara* spp, *Opisthonema* spp., *Ucides occidentalis*, *Cardisoma crassum,* PCR-RFLP.

Introducción

Las bibliotecas de referencia de códigos de barras de ADN son relativamente sencillas cuando se dispone de cebadores, diseñados específicamente para amplificar la región COX1 de un grupo taxonómico relativamente próximo, un género o especie. Los códigos de barras de ADN de la biodiversidad marina han sido más difíciles de lograr que los de la biodiversidad

terrestre debido a la amplia diversidad taxonómica y la falta de cebadores eficientes. Aunque algunos de los llamados cebadores "universales" han servido para este fin y han tenido éxito aleatorio incluso entre especies dentro de cada grupo, todavía no logran amplificar regiones específicas del COX1 en muchos grupos de animales marinos.

Los cebadores universales diseñados por Folmer *et al.* (1994) LCO1490/HCO2198, para la amplificación de un fragmento de 658 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COX1), han demostrado ser efectivos en la amplificación de este fragmento de gen en una amplia gama de especies marinas. Así, la región del ADN mitocondrial COX1, delimitada por los cebadores de Folmer se convirtió en la región de código de barras de ADN establecida para la identificación del reino animal. Se están realizado cada vez más estudios que tratan de examinar los códigos de barras de ADN de diferentes taxones animales, pero es evidente que el par de cebadores LCO1490/HCO2198 no es tan "universal" como se pensaba antes, ya que no amplifican algunos taxones. Además, la utilidad de los cebadores Folmer es limitada para algunos grupos como los crustáceos decápodos porque no están optimizados, debido a la presencia de pseudogenes, por ello la amplificación del COX1 es a menudo un reto.

En este trabajo se propone el uso de cebadores específicos para cada una de las especies estudiadas: *Anadara tuberculosa* (G. B. Sowerby I, 1833), *A. similis* (C. B. Adams, 1852), *A. grandis/Larkinia grandis* (Broderip & G. B. Sowerby I, 1829), *Opisthonema bulleri* (Regan, 1904), *O. libertate* (Günther, 1867), *O. medirastre* (Berry & Barrett, 1963), *Ucides occidentalis* (Ortmann, 1897), *Cardisoma crassum* (Smith, 1870), diseñados a partir de las secuencias obtenidas con los cebadores Folmer COX1, para mejorar la amplificación de esa región, en una serie de organismos marinos de interés económico, con el fin de aportar herramientas rápidas y eficaces para la gestión de los recursos pesqueros en Ecuador.

Materiales y métodos

A partir de los tejidos de los organismos (Tabla I) se ha procedido al aislamiento del ADN total mediante los Kit Omega Bio-Tech (The E.Z.N.A.® Mollusc DNA Kit; The E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit). La amplificación y secuenciación de fragmentos de los genes mitocondriales COX1 y 16S rRNA con cebadores universales LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al*., 1994) y 16S rRNA (Palumbi *et al*., 1996), se realizó mediante los protocolos descritos en Quinteiro *et al.* (2015). Las secuencias nucleotídicas del 16S rRNA y las del fragmento del gen COX1, fueron alineadas entre sí utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software

MEGA versión 5 (Tamura *et al*., 2011). Las secuencias recortadas y alineadas fueron verificadas con la base de datos de GenBank (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) utilizando el software en línea Nucleotide Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Para el diseño *in silico* de primers y enzimas de restricción se utilizó el software en línea OligoArchitect (Sigma-Aldrich) y Bioedit (Hall, 1999), respectivamente. Los nuevos cebadores para PCR y secuenciación, fueron sintetizados por METABION (Tabla II), a una escala de síntesis de 0,04 µM (ANA-COX1-1F, OPIS-COX1-1F, CCRA-COX1-2R) y 0,025 µM (ANA-COX1-2R, OPIS-COX1-2R, UCI-COX1-1F, UCI-COX1-2R, CCRA-COX1-1F). Para validar el funcionamiento de los nuevos *primers* se realizó un test 3x3, modificando parámetros básicos de la PCR, como la concentración de $MgCl_2$ (1,5 – 2,5 - 3,5 mM) y de ADN (0,1 µL, 1 y 2 µL). Las condiciones de PCR fueron las mismas para todos los primers, desnaturalización inicial a 95ºC, durante 3 minutos; seguidos de 40 ciclos: desnaturalización a 95ºC, durante 30 segundos, ligamiento a 60ºC, durante 30 segundos y extensión a 72ºC, durante 40 segundos; seguida de una extensión final de 72ºC, durante 10 minutos. Para la validación de la especificidad de los primers se amplificó en el test ADNmt de otras especies (*Sardina pilchardus,* Walbaum 1792; *Grapsus adscensionis,* Osbeck 1765*; Patella aspera,* Röding 1798).

Tabla I.- Listado de organismos estudiados.

ANADARA			OPISTHONEMA			UCIDES	CARDISOMA
ASIM M197	ATUB - GMO111	AGRA M169	OLIBM 695 M	OBULSELS 284 A	OMEDSELS 297	UOCC-GMO258	CCRA EEL 424
ASIM M198	ATUB - MACH181	AGRA M175	OLIBM 696 M	OBULSELS 287	OMEDSELS 298 A	UOCC -GMO274	CCRA EEL 433
ASIM M199	ATUB - MACH191		OLIBM 700 A	OBULMSA 649	OMEDSELS 358	UOCC-GBA488	CCRA EEL 439
ASIM GMO251	ATUB - ESME393				OMEDSELS 368	UOCC-GBA496	CCRA EEL 453
	ATUB - ESME412				OMEDSELS 383	UOCC-GBA497	CCRA EEL 460
						UOCC-GBA508	CCRA SEPA 639
							CCRA SEPA 642
							CCRA SEPA 646

Tabla II.- Nuevos cebadores/primers específicos diseñados.

ESPECIES	PRIMERS ESP.	SECUENCIAS 5"	TM Tª
Anadara spp.	ANA-COX1-1F	5' GTGCTGGRACTGGTTGGACT-3'	61
	ANA-COX1-2R	5'-CACCTCCACCTTGAGGACGA-3'	63
Opisthonema spp.	OPIS-COX1-1F	5'-CCWCCTGCAATYTCACAATACCA-3'	62
	OPIS-COX1-2R	5'-TTCTGGGTGGCCAAAGAATCAG-3'	62
Ucides occidentalis	UCI-COX1-1F	5'-AGTAGTTACAGCCCACGCCTT-3'	61
	UCI-COX1-2R	5'-ACTCCGGCTAAATGAAGGGAG-3'	61
Cardisoma crassum	CCRA-COX1-1F	5'-GGAAATTGGCTCGTACCCCT-3'	60
	CCRA-COX1-2R	5'-GCTGCTARGGGTGGGTAAAC-3'	61

Resultados

La ausencia generalizada de secuencias de la región control para estas especies ha implicado una previa caracterización de las zonas flanqueantes y del COX1. Para ello ha sido necesaria una primera aproximación con los cebadores 16Sa-5' y 16Sb-3' (Palumbi *et al.*, 1996) y los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994).

Anadara (*A. similis, A. tuberculosa, A. grandis*): concha negra, casco de burro

Basándonos en los haplotipos obtenidos de *A. similis* y de *A. tuberculosa*, y el haplotipo depositado en el Genbank (AF345641) para *A. grandis*, se procedió al diseño *in silico* de un sistema de PCR-RFLP que permitará la discriminación entre las 3 especies presentes en Ecuador. El sistema incluye los cebadores específicos ANA-COX1-1F (5'-GTGCTGGRACTGGTTGGACT-3') y ANA-COX1-2R (5'-CACCTCCACCTTGAGGACGA-3'), destinados a la amplificación de un fragmento de 318 pb en el gen COX1. La especificidad se ha testado por el tamaño, mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa (2%) (Fig. 1), donde hay presencia de bandas en todas las muestras procesadas de las tres especies del género Andara (*A. similis, A. tuberculosa, A. grandis*), no apareciendo en el control negativo con la especie *Patella aspera.*

La digestión *in silico* del amplicón generado en la PCR, con la enzima de restricción AluI (AG*CT), genera un patrón de fragmentos específicos para las 3 especies consideradas

(Tabla III), 3 fragmentos en *A. tuberculosa* (183, 72 y 63 pb), sólo un punto de corte en, *A. similis* originando 2 fragmentos (255 y 63 pb) y en *A. grandis* 2 fragmentos de 246 y 72 pb.

Figura 1.- PCR con los cebadores específicos ANA-COX1 en gel de agarosa 2%.

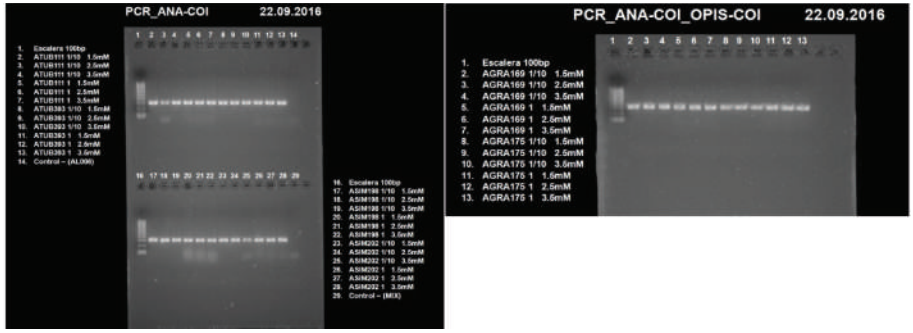
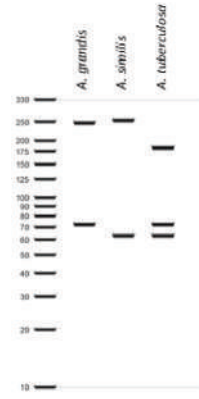


Tabla III.- Fragmentos y PCR-RFLP digestión *in silico* con AluI

Especies / Enzima AluI (AG*CT)		
A. grandis	*A. similis*	*A. tuberculosa*
246pb	**255pb**	**183pb**
72pb	**63pb**	**72pb**
		63pb



Este sencillo y económico protocolo evita el requerimiento de secuenciación para la discriminación entre las especies presentes en Ecuador. Su aplicación al control y gestión de las especies del género *Anadara* deberá ser evaluado en futuros estudios biológicos/ecológicos en aguas ecuatorianas.

Opisthonema (*O.bulleri, O. libertate, O. meridastre*): pinchagua, sardina crinuda

A partir de las secuencias analizadas del gen COX1 se diseñaron *in silico* los cebadores específicos OPIS-COX1-1F (5'-CCWCCTGCAATYTCACAATACCA-3') y OPIS-COX1-2R

(5'-TTCTGGGTGGCCAAAGAATCAG-3') que flanquean un corto fragmento de 210 pb. Este fragmento ha sido seleccionado debido a que contiene sitios de reconocimiento para enzimas de restricción específicos, y además posee un tamaño amplificable a partir de ADN degradado, tal y como el extraído a partir de muestras de productos procesados, como transformados y conservas (Quinteiro *et al*. 1998), posibilitando así el análisis e identificación de tales productos comerciales. La especificidad de los cebadores se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa (2%), donde hay presencia de bandas en todas las muestras procesadas de las tres especies del género *Opisthonema* (*O. bulleri, O. libertate, O. meridastre*) y en la especie de control negativo *Sardina pilchardus*, que no existe en el Pacífico (Fig. 2).

La digestión *in silico* del amplicón generado con los primers OPIS-COX1-1F y OPIS-COX1-2R con la enzima de restricción MboI (* GATC), origina patrones de restricción específicos de cada una de las 3 especies consideradas del Pacífico (Tabla IV). Para las 3 especies hay fragmentos comunes de 81 y 44 pb, sin embargo *O. bulleri* presenta un fragmento exclusivo de 93 pb, mientras que *O. medirastre*, muestra dos fragmentos específicos de 31 y 22 pb.

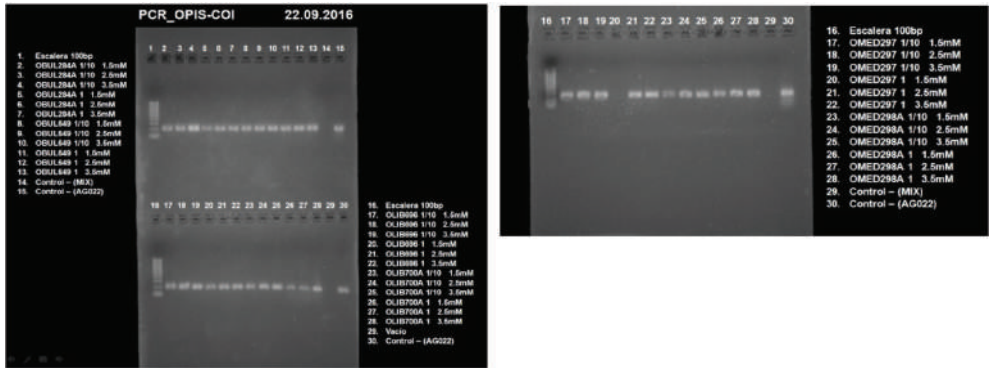
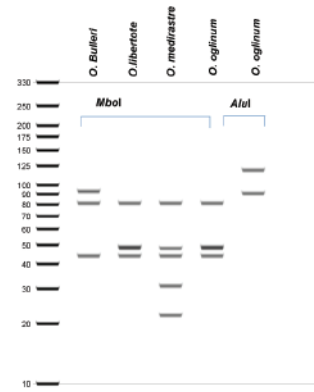


Figura 2.- PCR con los cebadores específicos OPIS-COX1 en gel de agarosa 2%.

Debe tenerse en cuenta la ausencia de datos para *O. berlangai (*Berry & Barrett, 1963), una especie endémica de Galapagos, que podría originar tanto patrones distintos como comunes con las especies incluidas en el presente análisis.

Tabla IV.- Fragmentos y PCR-RFLP digestión *in silico* con MboI.

Especies / Enzima Mbo I (* GATC)		
O. bulleri	***O. libertate***	***O. medirastre***
93 pb	**81 pb**	**81 pb**
81 pb	**49 pb**	**48 pb**
44 pb	**48 pb**	**44 pb**
	44 pb	31 pb
		22 pb



Ucides occidentalis: cangrejo rojo del manglar

Basándonos en toda la información disponible en las bases de datos genómicos y la generada en este trabajo, se ha seleccionado la secuencia parcial del COX1 para albergar un juego de cebadores UCI-COX1-1F (5'-AGTAGTTACAGCCCACGCCTT-3') y UCI-COX1-2R (5'-ACTCCGGCTAAATGAAGGGAG-3'), destinado a la amplificación de un producto de PCR de 297 pb. Esta amplificación permite la identificación y detección de ADN de *U. occidentalis,* su especificidad se ha testado y demostrado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa (2%), donde hay presencia de bandas en todas las muestras procesadas de *U. occidentalis.* Además, es también verificable mediante PCR-RFLP, la digestión *in silico* del amplicón con la enzima BseGI (GGATG) produce dos fragmentos de 212 y 85 pb (Fig. 3).

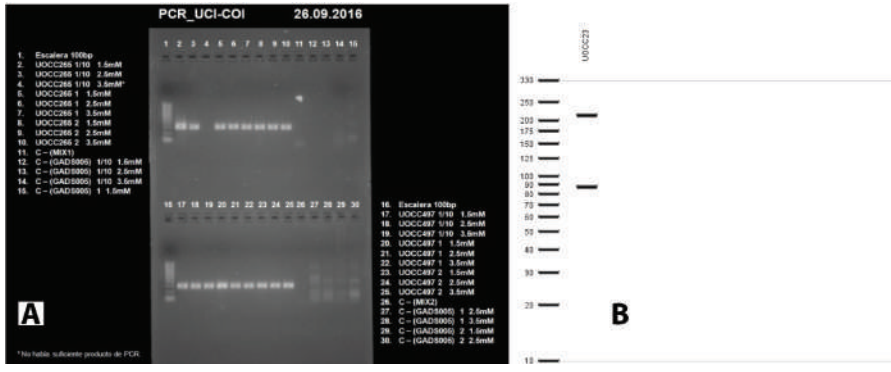


Figura 3.- A) PCR con los cebadores específicos UCI-COX1 en gel de agarosa 2%. B) PCR-RFLP digestión in silico con BseGI.

La disponibilidad de esta herramienta permite además la identificación de ADN de *U. occidentalis* en muestras de agua del medio natural (muestras planctónicas), lo que permitirá la detección de etapas larvarias de esta especie en muestras zooplánctónicas. Este supuesto deberá ser evaluado en el marco de estudios biológicos/ecológicos en las poblaciones de *U. occidentalis* presentes en la costa ecuatoriana.

Cardisoma crassum: cangrejo azul del manglar

Basándonos en los alineamientos de 16S rRNA y COX1, se han evaluado las posiciones polimórficas presentes en cada juego de datos y se ha seleccionado el gen COX1 como más apropiado para el diseño de un juego de cebadores dirigidos a la detección de ADN de *Cardisoma*. Dentro de la secuencia COX1 se han diseñado *in silico* los cebadores CCRA-COX1-1F (5'-GGAAATTGGCTCGTACCCCT-3') y CCRA-COX1-2R (5'-GCTGCTARGGGTGGGTAAAC-3'), que generan un fragmento de 167 pb. La especificidad mostrada *in silico*, indica la limitación de estos cebadores para funcionar correctamente solo en las especies más próximas de *Cardisoma*. La especificidad se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa (2%), donde hay presencia de bandas en todas las muestras procesadas de *C. crassum* y en la especie de control negativo *Grapsus adscensionis* (Fig.4).

El sistema diseñado no posee especificidad para la especie *C. crassum,* sin embargo debido a la distribución alopátrica de las especies de este género, ello no es un requerimiento ya que es la única especie del género con una distribución que abarca la costa este del Pacífico, el resto de especies congenéricas cercanas se distribuyen exclusivamente en el Atlántico.

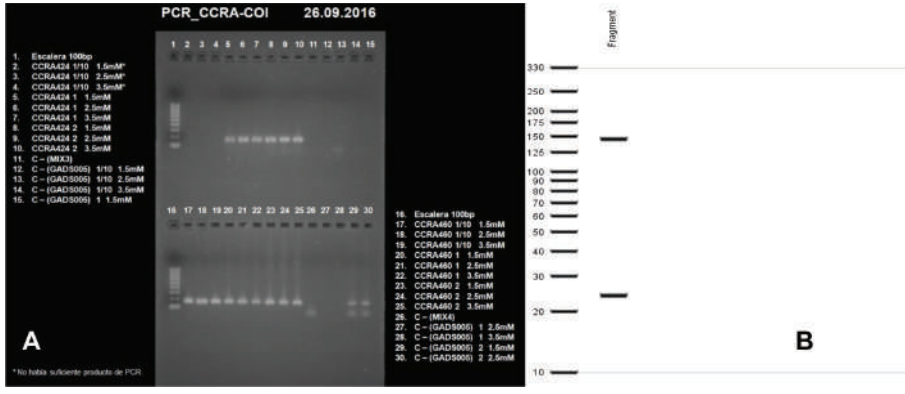


Figura 4.- A) PCR con los cebadores específicos CCRA-COX1 en gel de agarosa 2%. B) PCR-RFLP digestión *in silico* con BseGI

La especificidad de este fragmento para *C. crassum* se puede verificar *in silico*, además de por el tamaño, por PCR-RFLP mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción BseGI (GGATG) que producirá dos fragmentos de 22 pb y 145 pb, confirmando así la naturaleza del fragmento obtenido (Fig. 4).

La disponibilidad de esta herramienta permitirá la detección de etapas larvarias de *C. crassum* en muestras zooplánctónicas, que deberá ser evaluada en el marco de estudios biológicos/ecológicosa lo largo de todo el rango geográfico de distribución de la misma en la costa ecuatoriana.

Conclusiones

- Los *primers* específicos ANA-COX1 y la PCR-RFLP con Alu I, diseñados en este trabajo, permiten la identificación y detección de las especies comerciales de *Anadara* estudiadas, siendo recomendable su aplicación en el control y gestión de las poblaciones en las aguas ecuatorianas.
- La técnica de PCR-RFLP con la enzima de restricción Mob I origina un patrón de corte diferenciado para cada una de las tres especies comerciales de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. libertate* y *O. medirastre*), siendo esta una herramienta muy útil y rápida para la discriminación de las diferentes especies, aún en tejidos procesados como los de las conservas.
- Los *primers* específicos UCI-COX1 permitirán la detección de ADN de *U. occidentalis* en muestras de agua del medio natural (muestras planctónicas), siendo verificable su especificidad además por digestión con la enzima BseGI mediante PCR-RFLP.
- El sistema diseñado *in silico* con los cebadores específicos CCRA para la amplificación de un fragmento del gen COX1 y la PCR-RFLP, con la enzima de restricción BseGI, no posee especificidad para la especie *C. crassum.* Sin embargo, la disponibilidad de esta herramienta permitirá la detección de etapas larvarias de *C. crassum* en muestras zooplánctónicas que deberá ser evaluada en el marco de estudios biológicos/ecológicos en el futuro.

Agradecimientos

Al Programa PROMETEO (SENESCYT, Gobierno de Ecuador). A la Universidad Estatal Península de Santa Elena (CIBPA, CIAP, laboratorios de biología y microbiología), y al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la ESPOL (Escuela Politécnica del Litoral). A los Laboratorios, SISMOL de la Universidad de Santiago de Compostela y BIOMOL de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Bibliografía

Folmer O. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotecnology*, 3(5): 249-299.

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

Quinteiro J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Pérez-Martín R.I., Rey-Méndez M. & Mackie I.M. 1998. Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in species Identification of Canned Tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:1662-1669.

Quinteiro J., Manent P., Assunção P., Medina C. & Sarmiento R. 2015. *Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas*. Edit. González N. & Rey-Méndez M. BIOMOL Revisión Nº 1. Marzo 2015.

Palumbi S.R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics*, 2nd ed., Hillis D.M., Moritz C. & Mable B.K. (eds.) Pp. 205-247. Sinauer Associates Inc.

Marcadores moleculares para la identificación genética de especies comerciales en Ecuador

González-Henríquez, N.[1], Quinteiro, J.[1], Flores-Suárez, D.[1], Tomalá-Reyes, Sh.[1], Balón-Lainez, K.[1], Rodríguez-Poza, J.[1], Oñate, D.[1], Cornejo, M.H.[1], Chaverra-Viteri, J.[1], Melena-Cevallos, J.[1], Villón, J.[1], Medina-Alcaraz, C.[2], Sarmiento-Herrera, R.[2]

Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Santa Elena. Ecuador [1]
Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canarias, Islas Canarias, España [2]
Departamento de Bioquímica e Biología Molecular. Universidade de Santiago de Compostela España [3]

Introducción

Las bibliotecas de referencia de códigos de barras de ADN son relativamente sencillas cuando se dispone de cebadores diseñados específicamente para amplificar la región COX1 de un grupo taxonómico relativamente pequeño, ej género o especie. Los códigos de barras de ADN de la biodiversidad marina han sido más difíciles de lograr que los de la biodiversidad terrestre debido a la amplia diversidad taxonómica y la falta de cebadores eficientes. Aunque algunos de los llamados cebadores "universales" han servido para este fin y han tenido éxito absoluto incluso entre especies dentro de cada grupo, todavía no logran amplificar regiones específicas del COX1 en muchos grupos de animales marinos.

Los cebadores universales diseñados por Folmer et al (1994) (LCO1490/HCO2198, para la amplificación de un fragmento de 658 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COX1), han demostrado ser efectivos en la amplificación de este fragmento de gen en una amplia gama de especies marinas. Así, la región del ADN mitocondrial COX1, delimitada por los cebadores de Folmer ya consentía en la región de código de barras de ADN establecida para la identificación del reino animal. Se había realizado cada vez más estudios que tratan de examinar los códigos de barras de ADN de diferentes taxones animales, para es evidente que el par de cebadores (COI1490/HCO2198 es en tan "universal" como se pensaba antes, ya que no amplifican algunos taxones. Además, la utilidad de los cebadores Folmer es limitada para algunos grupos como los crustáceos decápodos porque no están optimizados, debido a la presencia de poroplegmes, por ello la amplificación del COX1 es a menudo un reto.

En este trabajo se proponen el uso de cebadores específicos para cada uno de los géneros y especies estudiadas, *Anadara* (*A.tuberculosa*, *A. similis*, *A. grandis*), *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. libertate*, *O. meridasta*), *Lirides occidentalis*, *Cardiosoma crassum*, diseñados a partir de las secuencias obtenidas con los cebadores Folmer COX1, para mejorar la amplificación de esa región, en una serie de organismos marinos de interes económico, con el fin de aportar herramientas rápidas y eficaces para la gestión de los recursos pesqueros en Ecuador.

Materiales y Métodos

A partir de los tejidos de los organismos se ha procedido al aislamiento del ADN total mediante el Kit Omega Bio-Tech (Tissue y Mollus). La amplificación y secuenciación de fragmentos de los genes mitocondriales COX1 y 16SrRNA con cebadores universales (LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) y 16SrRNA (Palumbi *et al.*, 1991), se realizó mediante los protocolos descritos en Quinteiro *et al.*, 2015. Las secuencias nucleotídicas del 16SrRNA y las del fragmento del gen COX1, fueron alineadas entre sí utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias recortadas y alineadas fueron verificadas contra la base de datos de GenBank (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) utilizando el software en línea Nucleotide Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Para el diseño in silico de primers y enzimas de restricción se utilizó el software en línea OligoArchitect (Sigma-Aldrich) y BioEdit (Hall, 1999), respectivamente. Los nuevos cebadores para PCR y secuenciación, fueron sintetizados por METABION. La mezcla de entrada de 0.04 µM (ANA-COX1-1F, OPIS-COX1-1F, COPA-COX1-2R) y 0.025 µM (ANA-COX1-2R, OPIS-COX1-2R, UCI-COX1-1F, UCI-COX1-2R, COPA-COX1-1F). Para validar el funcionamiento de los nuevos primers se realizo un test 3x3, modificando parámetros básicos de la PCR, como la concentración de MgCl2 (1,5 – 2,5 – 3,5 mM) y de ADN (0,1 µL, 1 y 2 µL). Las condiciones de PCR fueron las mismas para todos los primers, desnaturalización inicial 95 ºC, durante 3 minutos; seguidos de 40 ciclos: desnaturalización 95ºC, durante 30 segundos, ligamiento 60ºC, durante 30 segundos y extensión 72ºC, durante 40 segundos; seguidos de una extensión final de 72ºC, durante 10 minutos. Para la validación de la especificidad de los primers se amplificó en el test ADNmt de otras especies (*Jaroba pilchardus*, *Engraulis ringens*, *Patella ypsilonensis aspera*).

Tabla 1.- Listado de organismos estudiados

NOMBRE	ESPECIE	COX	GENBANK
ANADARA	*Anadara tuberculosa*	KM360139	KM360139
	Anadara similis	KM360140	KM360140
	Anadara grandis	KM360141	KM360141
OPISTHONEMA	*Opisthonema libertate*	KM360142	KM360142
	Opisthonema bulleri	KM360143	KM360143
	Opisthonema meridasta	KM360144	KM360144
LIRIDES	*Lirides occidentalis*	KM360145	KM360145
CARDIOSOMA	*Cardiosoma crassum*	KM360146	KM360146

Tabla 2: Nuevos cebadores/primers específicos diseñados

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	TAM
ANADARA	ANA-COX1_1F	21
	ANA-COX1_2R	21
OPISTHONEMA	OPIS-COX1-1F	20
	OPIS-COX1-2R	20
	UCI-COX1-1F	20
	UCI-COX1-2R	21
	COPA-COX1-1F	20
	COPA-COX1-2R	20

RESULTADOS

La ausencia generalizada de secuencias de la región control para estas especies ha implicado una previa caracterización de las zonas flanqueantes y del COX1. Para ello ha sido necesaria una primera aproximación con los cebadores 165a-5' y 16Sb-3' (Palumbi *et al.*, 1991) y los cebadores LC01490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994).

Anadara (*A. similis, A. tuberculosa, A. grandis*)
Concha negra, Casco de burro

Basándonos en los haplotipos de *A. similis* y de *A. tuberculosa*, y el haplotipo depositado en el Genbank (AF345641) para *A. grandis*, se procedió al diseño *in silico* de un sistema de PCR-RFLP que permitirá la discriminación entre las 3 especies presentes en Ecuador. El sistema incluye los cebadores específicos ANA-COX1-3F (5' GTGCTGGRACTGGTTGGACT-3') y ANA-COX1-2R (5'-CACCTCCACCTTGAGGAGGA-3') destinados a la amplificación de un fragmento de 318pb en el gen COX1. La especificidad se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa al 2% (Figura 1).

La digestión *in silico* del amplicón generado en la PCR, con la enzima de restricción AluI (AG^CT) genera un patrón de fragmentos específicos para las 3 especies consideradas (Tabla 3). 3 fragmentos en *A. tuberculosa* (183, 72 y 63pb), sólo un punto de corte en, *A. similis* originando 2 fragmentos (255 y 63pb) y en A. grandis 2 fragmentos de 248 y 72pb. (Figura 1).

Este sencillo y económico protocolo evita el requerimiento de secuenciación para la discriminación entre las especies presentes en aguas ecuatorianas. Su aplicación al control y gestión de las especies del género *Anadara* deberá ser evaluado en futuros estudios biológicos-ecológicos en aguas ecuatorianas.



Figura 1. A y B Geles al 3% PCR con cebadores ANA-COX1. C y D Tablas y fragmentos vía PCR-RFLP in silico con AluI

Lucides occidentalis (Cangrejo rojo del manglar)

Basándonos en toda la información disponible en las bases de datos genómicas y la generada en este trabajo, se ha seleccionado la secuencia parcial del COX1 para albergar un juego de cebadores UCI-COX1-1F (5'-AGTAGTTACAGCCCACGCCTT-3') y UCI-COX1-2R (5'-ACTCCGGCTAAATGAAGGGAG-3') destinado a la amplificación de un producto de PCR de 257pb. Este amplificación permite la identificación y detección del ADN de *U. occidentalis*, su especificidad se ha testado y demostrado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa al 2% (Figura 5). Además, es también verificable mediante PCR-RFLP, la digestión *in silico* del amplicón con la enzima BseGI (GGATG) produce dos fragmentos de 212 y 85 pb (Figura 3).

La disponibilidad de esta herramienta permite además la identificación de ADN de *U. occidentalis* en muestras de agua del medio natural (muestras planctónicas), lo que permitirá la detección de etapas larvarias de *U. occidentalis* en muestras zooplanctónicas, este supuesto deberá ser evaluado en el marco de estudios biológicos/ecológicos en las poblaciones de esta especie presentes en la costa ecuatoriana.

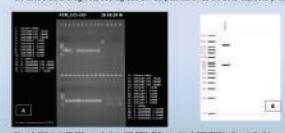


Figura 3. A) Gele al 2% PCR con cebadores UCI-COX1. B) Fragmentos de PCR-RFLP in silico con BseGI

Referencias bibliográficas

Folmer, O. (1994). "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates." Molecular Marine Biology and Biotechnology, 294-299.

Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Quinteiro J., Seibel C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Pérez-Martín R.I., Rey-Méndez M., & Mackie I.M. (1998). Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in species identification of Canned Tuna. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46:1462-1469.

Quinteiro J., Moreiri P., Asunción P., Medina F., Sarmiento R. Guía de procedimientos y protocolo genético de especies marinas. Edit. González R. & Rey-Méndez M. ECIMAS Revista Nº 1. Marzo 2015.

Palumbi, S. R. (1996). the polymerase chain reaction. Molecular systematics. D. M. Hills, C. Moritz and B. K. Mable. Sunderland, Mass., Sinauer Associates: Sinauer Associates: 205-247.

Opisthonema (*O.bulleri, O. libertate, O. meridastre*)
Pinchagua, Sardina crinuda.

A partir de las secuencias analizadas del gen COX1 se diseñaron *in silico* los cebadores específicos OPIS-COX1-1F (5'-CCWCCTGCAATYTCACAATACCA-3') y OPIS-COX1-2R (5'-TTCTGGGTGGCCAAAGAATCAG-3') que flanquean un corto fragmento de 210pb. Este fragmento ha sido seleccionado debido a que contiene sitios de reconocimiento para enzimas de restricción específicos, y además posee un tamaño amplificable a partir de ADN degradado, tal y como es el estraído a partir de muestras de productos procesados, como transformados y conservas (Quinteiro *et al.* 1998), posibilitando así el análisis e identificación de tales productos comerciales. La especificidad de los cebadores se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa 2% (Figura 2).

La digestión *in silico* del amplicón generado con los primers OPIS-COX1-1F y OPIS-COX1-2R con la enzima de restricción Mbo I (^ GATC) origina patrones de restricción específicos de cada una de las 3 especies consideradas del Pacífico (Tabla 2). Para las 3 especies del presente trabajo hay fragmentos comunes 81 y 44 pb. Sin embargo, *O. bulleri* presenta un fragmento exclusivo de 93pb, mientras que *O. medirastre*, nuestro dos fragmentos específicos de 33 y 22 pb. Figura 2.

Debe tenerse en cuenta la ausencia de datos para *O. bertangol*, una especie endémica de Galapagos, que podría originar tanto patrones distintos como comunes con las especies incluidas en el presente análisis.

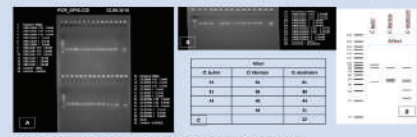


Figura 2. A y B Geles al 3% PCR con cebadores OPIS-COX1. C y D Tablas y fragmentos de PCR-RFLP in silico con MboI

Cardisoma crassum (Cangrejo azul del manglar)

Basándonos en los alineamientos de 16SrRNA y COX1, se han evaluado las posiciones polimórficas presentes en cada juego de datos y se ha seleccionado el gen COX 1 como más apropiado para el diseño de un juego de cebadores dirigidos a la detección do ADN de *Cardisoma*. Dentro de la secuencia COX1 se han diseñado *in silico* los cebadores COPA-COX1-1F (5'-GGAAATTGGCTCGTACCCCT-3') y COPA-COX1-2R (5'-GCTGCTAGCGGTGGGTAAAC-3') que generan un fragmento de 167pb. La especificidad mostrada in silico, indica la limitación de estos cebadores para funcionar correctamente solo en las especies más próximas de *Cardisoma*. La especificidad se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa 2% (Figura 4).El sistema diseñado no posee especificidad para la especie *C. crassum*, sin embargo debido a la distribución alopátrica de las especies de este género, ello no es un requerimiento ya que es la única especie del género con una distribución que abarca la costa este del Pacífico, el resto de especies congenéricas cercanas se distribuyen exclusivamente en el Atlántico.

La especificidad de este fragmento para *C. crassum* se puede verificar *in silico*, además de por el tamaño, mediante PCR-RFLP mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción BseGI (GGATG) que produciría dos fragmentos de 22pb y 145pb, confirmando así la naturaleza del fragmento obtenido (Figura 6).

La disponibilidad de esta herramienta permitirá la detección de etapas larvarias de *C. crassum* en muestras zooplanctónicas que deberá ser evaluada en el marco de estudios biológicos/ecológicos sobre las poblaciones de esta especie presenten en la costa ecuatoriana y más exhaustivamente a lo largo de todo el rango geográfico de distribución de la misma.



Figura 4. A) Gele al 2% PCR con cebadores COPA-COX1. B) Fragmentos de PCR-RFLP in silico con BseGI

Agradecimientos

A Programa PROMETEO SENESCYT, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UEPA, CIAS laboratorios de biología y microbiología), y al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la ESPOL (Escuela Politécnica del Litoral). A los Laboratorios, SEMPO, de la Universidad de Santiago de Compostela y BIONAP, de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria por el asesoramiento y análisis genéticos de las muestras.

Protocolo de cultivo de la navaja (*Ensis magnus* Schumacher, 1817) en criadero

Nóvoa S., Ojea J. & Martínez D.
Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, Muelle de Porcillán s/n, 27700, Ribadeo, Lugo. dorotea.martinez.patino@xunta.gal

Resumen

En el Centro de Investigacións Mariñas (CIMA) de Ribadeo se vienen realizando cultivos de navaja, *Ensis magnus* (Schumacher, 1817) para obtener semilla con el fin de estudiar la viabilidad de las siembras en los bancos naturales. En este trabajo se marca un protocolo para el cultivo en criadero de esta especie.

Partiendo de reproductores recogidos del medio natural (febrero-abril) en estado de madurez, se pueden obtener desoves realizando el cultivo larvario con alto porcentaje de supervivencia y el postlarvario hasta 5 mm sin arena, utilizando sistemas de flujo descendente. A partir de esta talla se emplean sistemas con arena como sustrato aplicándoles un flujo forzado de agua ascendente *air-lift*, alcanzando en 80-92 días tallas de 16-15 mm. Posteriormente, se emplean unos tamices que contienen arena colocados en el fondo de un tanque hasta alcanzar las tallas de 28-36 mm, tamaño adecuado para su siembra en el medio natural. Estos sistemas fueron válidos pero se pueden mejorar estudiando tallas y densidades más adecuadas para cada uno.

Palabras clave

Ensis magnus, cultivo, sistema de preengorde, semilla de navaja.

Introducción

A lo largo de varios años de investigación, en el criadero de Ribadeo (CIMA), se ha conseguido poner a punto técnicas para la correcta estabulación y acondicionamiento de reproductores, inducción a la puesta, cultivo de larvas, postlarvas y semilla en criadero de navaja (*Ensis magnus*). Las investigaciones se hicieron con el fin de producir semilla para estudiar la posibilidad de incrementar su producción y, en algunos casos, de asegurar la sostenibilidad del recurso.

Sin embargo, en la fase de cultivo de semilla, existen bajas supervivencias lo que obliga a plantear la necesidad de diseñar algún sistema que sea eficaz para disminuir las mortalidades si se pretende mantener a los individuos en el criadero, hasta una talla adecuada para poder ser engordados posteriormente en el medio natural.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo es establecer un protocolo de cultivo para *E. magnus* incidiendo y mejorando las condiciones del cultivo de semilla para disminuir las mortalidades y poderla mantener en el criadero hasta ser sembrada en el medio natural.

Materiales y métodos

En anteriores investigaciones realizadas por el CIMA de Ribadeo (Martínez-Patiño, 2002; da Costa, 2009), se obtuvieron los primeros resultados para poder establecer un protocolo inicial de cultivo de navaja, que se fue mejorando para aumentar las supervivencias y en consecuencia la producción de semilla.

Este protocolo, es la base del material y métodos empleado en este trabajo hasta la etapa de preengorde, momento en el que se realizan los ensayos para evaluar tres nuevos sistemas.

Los progenitores de navajas utilizadas, procedentes de las Islas Cíes llegaron al Centro entre los meses de febrero y abril, en estado gametogénico de madurez.

El cultivo comenzó con la estabulación de progenitores de *E. magnus* utilizando un sustrato, arena, para imitar el medio natural y en el que permanecieron enterrados hasta su inducción a la puesta (Fig. 2.A). La ración de alimento suministrado fue de 6% en peso seco de fitoplancton.

Para obtener los desoves, los adultos se desenterraban y se ataban a varillas de vidrio con gomas para que las valvas no se abrieran pero permitiendo su movilidad y de esta forma, evitar causarles estrés (Fig. 2.B).

Obtenido un desove espontáneo, el desarrollo embrionario y cultivo larvario tuvo lugar en tanques de 500 L (Fig. 2.C) y a los dos días, se contabilizaron las larvas D para asegurar una densidad inicial de 5 larvas mL^{-1}. El cambio de agua se realizó tres veces a la semana con agua de mar filtrada por filtro de arena y esterilizada con ultravioleta a una temperatura de 15±1ºC. La fijación, se realizó en los tanques troncocónicos de 500 litros pero, en cilindros con malla de 150 µm a los que se les aplica un flujo forzado por *air-lift* descendente (Fig. 2.D).

Para la etapa postlarvaria se utilizaron cilindros con malla de menor diámetro y mas altura que los anteriores (19 y 26 cm, respectivamente) en tanques de 150 L y también, con flujo descendente y sin arena (Fig. 2.E).

En este sistema permanecen hasta los 5-6 mm, momento en el que se ensayan dos sistemas con arena y flujo forzado *air-lift* ascendente (Fig. 1. I y II) para iniciar su preengorde.

Uno consistió en botellas recicladas de plástico (de 9 cm de diámetro y 22 cm de alto) rellenas de arena con entrada del agua con el fitoplancton de abajo a arriba; se utilizaron ocho botellas en un tanque de 1.000 L con recirculación y al que se le hacía el cambio total del agua una vez a la semana.

El otro sistema estaba formado por cilindros con malla de 19 cm de diámetro y 26 cm de alto con flujo forzado *air-lift* ascendente, en tanques troncocónicos de 400 L y circuito cerrado, a los que se les hacía los cambios de agua cada dos días.

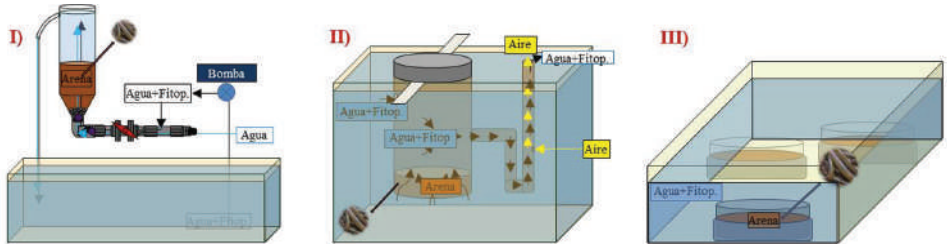


Figura 1.- Sistema de preengorde: **I)** Botellas recicladas; **II)** Cilindros con malla; **III)** Tamices con arena.

Al alcanzar tallas de 15-16 mm, la semilla de navaja continúa su preengorde, dentro del criadero, enterrada en tamices con arena de 35 cm de diámetro y 15 cm de alto que se colocan en el fondo de un tanque de 1.000 L con circuito abierto, burbujeo de aire y cambio total de agua una vez a la semana (Fig. 1. III).

Cuando la semilla tiene una talla de unos 30 mm, se inicia su engorde en el medio natural.

La alimentación fue diaria, en todas las etapas del cultivo y la ración de un 4% de peso seco de fitoplancton. Las especies de microalgas empleadas en la estabulación y en el cultivo fueron: *Tetraselmis suecica, Isochrysis sp., Diacronema lutheri y Chaetoceros sp.* y se cultivaron en sistema continuo.

Resultados y discusión

En los estudios iniciales realizados en el Centro de Ribadeo, con la estabulación de los progenitores en arena, se consiguieron supervivencias superiores al 90% (Martínez-Patiño & da Costa, 2008; da Costa *et al*., 2011). Colgando los reproductores en varillas para conseguir desoves controlados, se evitaron las pérdidas de ovocitos que quedaban depositados en la arena y se disminuyeron sus niveles de estrés y por lo tanto, se aumentó su supervivencia. La metodología del manejo de los cultivos larvarios, la fijación y cultivos postlarvarios fueron mejorando, logrando que las supervivencias promedio desde huevo a postlarva, fuesen de un 16% (da Costa *et al.*, 2010) hasta un 50%.

En este trabajo se ratifican y mejoran estos resultados, consiguiendo que la fijación fuera a los 20 días, cuando los individuos alcanzaron una talla de 350 µm y se consigue aumentar la supervivencia de huevo a postlarva, hasta un 50%.

Con semilla obtenida, a los 60-100 días desde el desove, de 5-6 mm se realizó el preengorde inicial con los sistemas diseñados y descritos anteriormente, botellas y cilindros, obteniendo a los 80-92 días del inicio de esta fase de cultivo, tallas de 15-16 mm.

En estos dos sistemas, fue importante el flujo forzado ascendente sin embargo, como ya da Costa *et al.* (2010) concluyó en estudios realizados con esta especie, las supervivencias son mucho mejor al utilizar sustrato en esta etapa de cultivo. Esta necesidad de sustrato también fue decisiva en el preengorde final, en el que el sistema utilizado basa sus buenos resultados en el aumento de la superficie y altura de sustrato (arena) y no en el flujo del agua. De esta forma, se consiguieron individuos de 30 mm (óptimos para la siembra) en 50 días desde que se enterraron

en los tamices y, casi no se observaron mortalidades en este período de tiempo.

La suma de los estudios anteriormente realizados en el CIMA de Ribadeo y los ensayos de preengorde con estos tres sistemas, permiten establecer el protocolo de cultivo expuesto en figura 2.

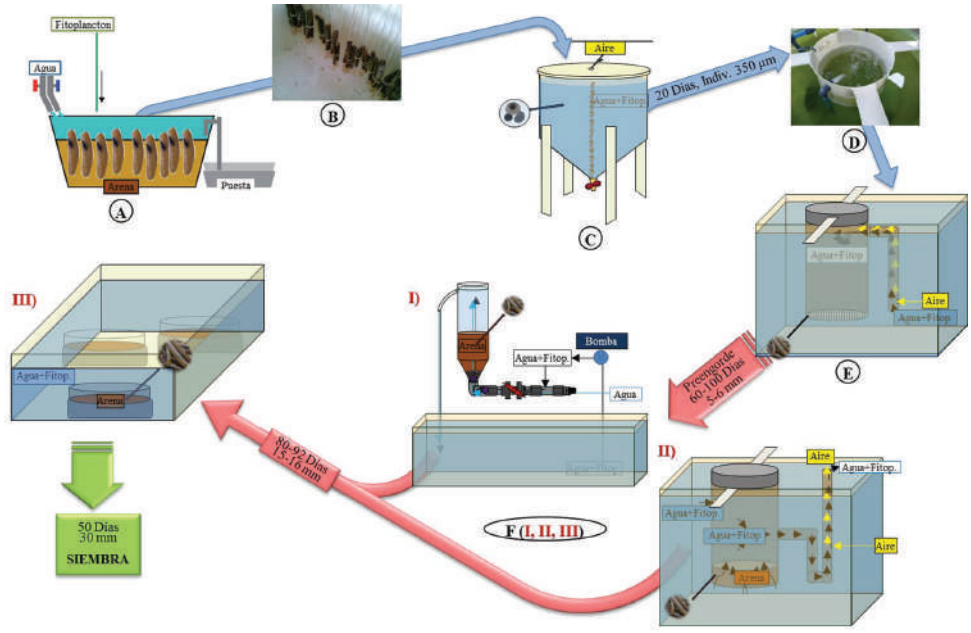


Figura 2.- A.-Esquema del tanque con arena para estabular a los progenitores; **B**.- Sistema de mantenimiento de reproductores colgados en varillas para desove; **C**.- Sistema de cultivo larvario; **D**.- Sistema de fijación; **E**.- Sistema postlarvario; **F**.- Sistemas de preengorde: I) Botellas recicladas; II) Cilindros con malla; III) Tamices con arena.

Conclusiones

Los tres sistemas de preengorde diseñados y evaluados son óptimos pero el tamaño de los individuos marca el protocolo a seguir, puesto que es aconsejable utilizar primero las botellas para tallas más pequeñas y después los cilindros porque en estos, los individuos pequeños presentan mayor mortalidad.

Para finalizar el preengorde, antes de su siembra en el medio natural, la navaja necesita más superficie de sustrato (arena), por lo que los tamices en el fondo del tanque dan buenos resultados y su mantenimiento en criadero, no representa excesivos problemas.

Agradecimientos

Al personal del Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo-CIMA.

A la Cofradía de Cangas y a la Agrupación de navalleiros.

Trabajo financiado por la Acción: C*ultivo intensivo de especies de interés marisqueiro abordando a produción de semente* de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia.

Bibliografía

da Costa F. 2009. Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios. Ph.D Thesis, University of Santiago de Compostela, 336 pp.

da Costa F., Darriba S., Martínez-Patiño D. & Guerra A. 2010. Culture possibilities of the razor clam *Ensis arcuatus* (Pharidae: Bivalvia). *Aquaculture Res*. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02747.

da Costa F., Nóvoa S., Ojea J., & Martínez-Patiño D. 2011. Razor clam culture in Galicia (NW Spain). En: Guerra A.; Lodeiros C.; Gaspar M.; da Costa F. (eds.). *Razor clams: Biology, Aquaculture and Fisheries*. 428 pp. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia, pp. 181-218. ISBN 978-84-453-4986-1 (P) 978-84-453-4546-7 (CD).

Martínez-Patiño D. 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennánt, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. Ph.D Thesis, University of Santiago de Compostela, 240 pp.

Martínez-Patiño D. & da Costa F. 2008. Cultivo de navaja, longueirón y longueirón vello. pp: 213-221. En: Guerra A. & Lodeiros C. (ed). *Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo*. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Santiago de Compostela. (ISBN: 978-84-453-4546-7).

Protocolo de cultivo de la navaja, *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) en criadero

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MAR

CIMA
CENTRO DE INVESTIGACIÓNS MARIÑAS

S. Nóvoa[1], J. Ojea[1] y D. Martínez[1]

[1]Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, Muelle de Porcillán s/n, 27700, Ribadeo, Lugo. doroteo.martinez.patino@xunta.es

Resumen

En el CIMA Ribadeo se vienen realizando cultivos de navaja, *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) para obtener semilla con el fin de estudiar la viabilidad de las siembras en los bancos naturales. En este trabajo se marca un protocolo para el cultivo en criadero de esta especie.

Partiendo de reproductores recogidos del medio natural (febrero-abril) en estado de madurez, se pueden obtener desoves, realizando el cultivo larvario con alto porcentaje de supervivencia y el postlarvario hasta 5 mm sin arena, utilizando sistemas de flujo descendente. A partir de esta talla se emplean sistemas con arena como sustrato aplicándoles un flujo forzado de agua ascendente ("air-lift"), alcanzando en 80-92 días tallas de 16-15 mm. Posteriormente se emplean unos cilindros que contienen arena colocados en el fondo de un tanque, hasta alcanzar las tallas de 28-36 mm, tamaño adecuadas para su siembra en el medio natural. Estos sistemas fueron válidos pero se pueden mejorar estudiando tallas y densidades más adecuadas para cada uno.

Introducción

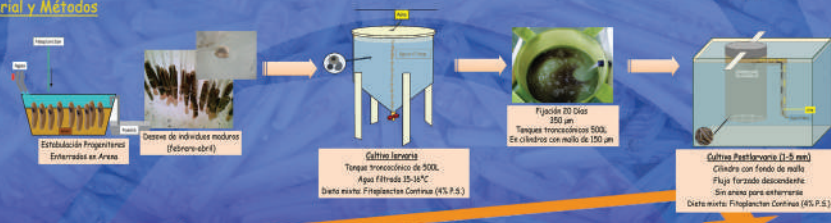
A lo largo de varios años de investigación, en el criadero de Ribadeo (CIMA), se ha conseguido poner a punto técnicas para la correcta estabulación y acondicionamiento de reproductores, inducción a la puesta, cultivo de larvas, postlarvas y semilla en criadero de *Ensis arcuatus*. Las investigaciones se hicieron con el fin de conocer su biología y producir semilla para estudiar la posibilidad de incrementar su producción y, en algunos casos, de asegurar la sostenibilidad del recurso.

Sin embargo, en la fase de cultivo de semilla, existen bajas supervivencias lo que obliga a plantear la necesidad de diseñar algún sistema que sea eficaz para disminuir las mortalidades si se pretende mantener a los individuos en el criadero, hasta una talla adecuada para poder ser engordados posteriormente en el medio natural.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo es establecer un protocolo de cultivo para *Ensis arcuatus* incidiendo y mejorando las condiciones del cultivo de semilla para disminuir las mortalidades y poderla mantener en el criadero hasta ser sembrada en el medio natural.



Material y Métodos





Resultados

*El principal resultado de este trabajo es, el haber conseguido establecer un PROTOCOLO DE CULTIVO DE SEMILLA de navaja (*E. arcuatus*) en el criadero hasta alcanzar las tallas adecuadas para su siembra.

*En anteriores investigaciones en el CIMA de Ribadeo, se resolvió mantener a los progenitores enterrados en arena; se estandarizaron métodos para la inducción de los desoves; metodología del manejo de los cultivos larvarios, la fijación y cultivos postlarvarios mejorando las supervivencias desde un 16% hasta un 50%.

*Con este trabajo, se ratifican los resultados anteriores y se diseñan tres sistemas que mejoran las supervivencias de la semilla mayor de 5 mm hasta que puede ser trasladada al medio natural.

*El sistema de botellas y el de cilindros con flujo forzado ascendente manteniendo a los individuos enterrados en arena, son óptimos y se consiguen tallas de 15 y 16 mm, pero es aconsejable utilizar primero las botellas para tallas más pequeñas y después los cilindros puesto que, en estos, los individuos pequeños presentan mayor mortalidad.

*El sistema de los tamices con arena es idóneo para finalizar con el preengorde de la semilla hasta conseguir que salga con 30 mm.

Agradecimientos

Al personal del Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo-CIMA
A la Cofradía de Cangas y a la Agrupación de navalleiras
Trabajo financiado por la Acción: CULTIVO INTENSIVO DE ESPECIES DE INTERÉS MARISQUEIRO ABORDANDO A PRODUCIÓN RENDIBLE DE SEMENTE. De la Consellería do Mar. Xunta de Galicia

GROVE
OCTUBRE 2016

Restauración de *Spondylus* en Ecuador: Producción de juveniles y avances de la repoblación de *Spondylus limbatus* G. B. Sowerby II, 1847 en la reserva El Pelado, Provincia de Santa Elena, Ecuador

Márquez[1] A., Revilla[1] J., Lodeiros[1,2,3] C., Loor[1] A., Rodríguez[1] D. & Sonnenholzner[1] S.
[1]Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), Ecuador.
[2]Investigador Prometeo, Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación SENESCYT, Ecuador.
[3]Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Apartado Postal 245, Cumaná 6101, Venezuela.
ajmm16@hotmail.com

Resumen

Ningún molusco ha sido tan importante en las costas del Pacífico americano como los *Spondylus*; sin embargo, su desmedida y no controlada explotación ha condicionado el recurso a estar en vías de extinción, por lo que se han tomado medidas reglamentarias de protección, particularmente en México y Ecuador. En vista de ello, en Ecuador se han emprendido una serie de estudios para poner a punto una técnica de producción de *Spondylus* con miras a restaurar sus bancos. En el presente avance se divulga conocimiento sobre tecnologías de acondicionamiento de reproductores, inducción al desove, desarrollo larvario, dietas para larvas, post-larvas y juveniles, así como conocimiento del comportamiento en el asentamiento de *Spondylus limbatus*, lo cual ha sido crucial para el avance de las técnicas de producción, dado que se devela un comportamiento atípico en la iniciación de la fase bentónica en el ciclo de vida de la especie, por lo que con ello ha sido posible

producir organismos para la siembra en el mar. Todos estas investigaciones, aportan información esencial para esclarecer las características fisiológicas particulares de la especie, así como su implicación para la acuicultura, mostrando al cultivo de *Spondylus* como una alternativa viable para la restauración de sus bancos naturales, mediante la creación de núcleos de repoblamiento (exportadores de gametos), promoviendo el asentamiento de las larvas en zonas aledañas, lo cual podría conducir a un balance positivo en el reclutamiento de la especie; estas tecnologías son extrapolables a otras zonas diezmadas en las costas del Pacifico americano, con expectativas alentadores sobre su impacto en la recuperación de *Spondylus* spp.

Palabras claves

Restauración, *Spondylus*, cultivo, bivalvos.

Introducción

Ningún molusco ha sido tan importante en las costas del Pacífico americano como los *Spondylus* (Pectinoida: Spondylidae), *Spondylus limbatus* (=*Spondylus calif*er), junto con otras especies de su género (*S. gloriosus* Dall, Bartsch & Rehder, 1938*, S. crassisquama* Lamarck, 1819 y *S. leucacanthus* Broderip, 1833) han jugado un papel importante desde tiempos prehistóricos, no sólo como recursos económicos, sino también en asuntos políticos, culturales y religiosos particularmente en culturas mesoamericanas y andinas (Lodeiros *et al.,* 2016). En Ecuador fue particularmente importante, siendo utilizado como ofrendas ceremoniales desde la época Valdivia e Inca desde 2800 a.C. (Marcos, 2005), con reciente resurgimiento de su importancia, llegando a ser un icono actual de la ecuatorianidad en las comunidades costeñas. Sin embargo, a partir de la década de los 90, el recurso Spondylus en américa, dado a un interés gastronómico y uso de su concha en joyería, sufre una presión de pesca elevada que conduce al agotamiento de sus bancos, por lo cual, tanto en México como en Ecuador, donde ha sido mayormente explotado, se genera restricciones de su pesca a principios del presente siglo (SEMARNAT 2001, MAGAP 2006), sugiriendo estudios para la administración y repoblación de los mismos. En vista de ello, el CENAIM-ESPOL conjuntamente con la Subsecretaría de Acuicultura y Pesca del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (SA-MAGAP) y la Secretaría de Educación

Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de Ecuador han emprendido una serie de estudios para poner a punto una técnica de producción de *Spondylus* y de repoblación de sus bancos en función de coadyuvar a su restauración ecológica.

Materiales y métodos

Se realizaron una serie de experimentos con reproductores, para ello se han utilizado varias dietas microalgales y diferentes temperaturas (24-27ºC). La dietas microalgales constaron de *Chaetoceros gracilis* y *Tisochrysis lutea* en una proporción 2:1 (5% del peso seco de los organismos día).

Para los experimentos con larvas se utilizaron densidades de 4-6 larvas.mL^{-1} primeras fases hasta 1-0,5 larva.mL^{-1} en las últimas fases (pediveliger) con una temperatura adecuada de 22-26°C y dieta microalgal de *T. lutea* y *C. gracilis* con alimentación desde 15.000 hasta 50.000 cel.mL^{-1} (incrementos de 3.000 cel.mL^{-1}) en proporción de 3:1 para los primeras etapas larvarias (hasta veliger-umbonada temprana) y luego 1:1 para las etapas intermedias (Umbonada temprana-tardía) y 1:3 el resto de las etapas.

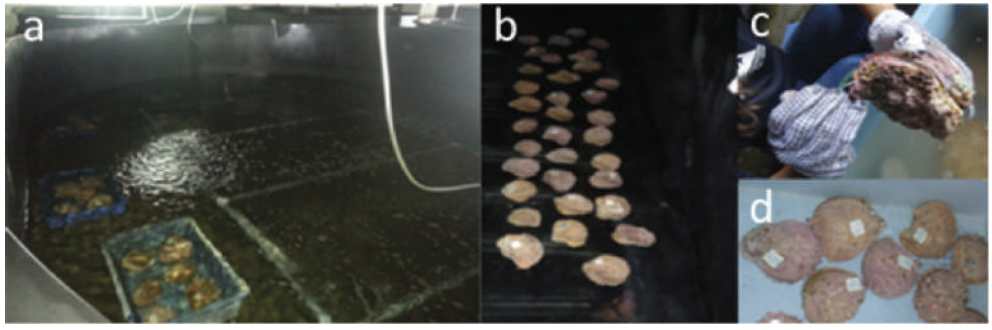


Figura 1.- a) Acondicionamiento de reproductores de *S. limbatus* en tanques de alto volumen, b) Inducción a desove, c) y d) Mantenimiento de reproductores en laboratorios del CENAIM-ESPOL.

Todos estos estudios permitieron la producción de juveniles de *S. limbatus* para pruebas de repoblación, en zonas de la reverva de El Pelado, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

Resultados y discusión

Acondicionamiento de reproductores

Con la utilización de las dietas microalgales (*Chaetoceros gracilis* y *Tisochrysis lutea*) y temperaturas entre 24 y 27ºC se ha logrado la obtención de organismos maduros y aptos para la reproducción inducida, a través de *shock* de desecación (1-2 h), seguidos de *shock* por diferencia de temperatura, con lo cual se consiguen desoves de hasta 30 millones de huevos, y esperma suficiente, con los cuales se realiza la fertilización en una proporción 1:10, consiguiéndose un porcentaje de huevos fertilizados >90% (Fig.1).

Producción larvaria

Luego de diferentes pruebas de desarrollos larvales y establecimiento de dietas microalgales, se ha logrado la producción de larvas competentes pediveliger a los 15-16 días, con una tasa de crecimiento diaria de 5,1 $\mu m.día^{-1}$. También se han identificado 2 periodos críticos durante las larviculturas (picos de mortalidad) entre los días 3 y 6 relacionados con periodos de mayor cambio fisiológico *S. limbatus* asociada a una elevada sensibilidad a invasiones de bacterias, particularmente tipo *Vibrio*, por lo cual es necesario tratamientos, particularmente a partir del 2 post-fertilización, con antibióticos (Florfenicol 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ y oxitetraciclina 1 $\mu g.mL^{-1}$).

Producción de semillas

Tras ensayos experimentales y de prueba y error, los resultados obtenidos en el asentamiento de las larvas y metamorfosis al principio no fueron alentadores, hasta la determinación del comportamiento *in vivo* con microscopía óptica del comportamiento particular de la etapa postmetamórfica. Los resultados de estas observaciones permitieron por un lado establecer el ciclo biológico temprano de la especie, el cual es atípico a la mayoría de los moluscos bivalvos, y a la vez la apertura del desarrollo de tecnologías para la obtención de juveniles de *S. limbatus* y con ello el desarrollo en la producción de *Spondylus*. A diferencia de la mayoría de pectínidos, *S. limbatus* no produce ni biso, ni se cementa a ningún sustrato al principio de su etapa bentónica, luego de la metamorfosis las postlarvas y juveniles desarrollan el pie y se mantienen reptando por un periodo prolongado, cementándose cuando los juveniles alcanzan 1-2 mm a los 3 meses postmetamorfosis. Nuestros estudios muestran que la cementación se hace en los sustratos duros mayores de 3 cm

(sin que corrientes puedan perturbarlos), con preferencia en sustratos rugosos como la concha de la misma especie, lo que provoca una densidad elevada de reclutas, que dificulta la extracción de los organismos para el cultivo posterior. Ensayos de asentamiento con otros sustratos como lijas y las piedras de cemento, promueven la fijación y ofrecen mayor facilidad de extracción de las semillas. También se ha determinado que existe una preferencia por los sustratos en orientación vertical, con respecto a los horizontales (Fig. 2). Las estrategias de cultivo has sido separar del fondo (donde se acumula material con alta carga bacteriana) soportando los sustratos de fijación mediante mallas a más de 40 cm del fondo, cuando las larvas son competentes.

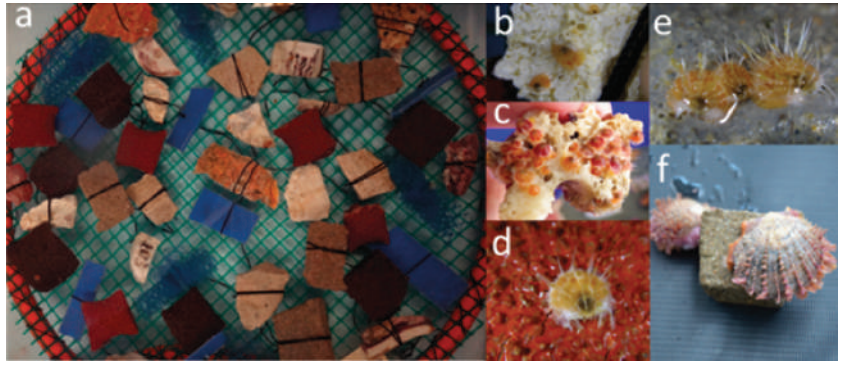


Figura 2.- a) Ensayos de seleccion de sustratos para postlarvas de *S. limbatus*, b) y c) Juveniles fijos sobre trozos de conchas de adultos, d) Juveniles fijos sobre lijas rojas. d) y f) Juveniles fijos sobre piedras de cemento.

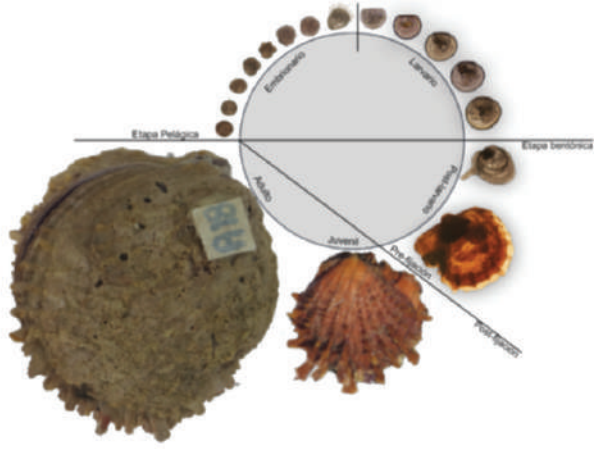


Figura 3.- Ciclo de vida de *Spondylus limbatus* (desarrollo embrionario, larvario, postlarvario, juveniles y adultos).

El ciclo de vida de *S. limbatus* se muestra en la figura 3, este hallazgo ha permitido la continuidad de los estudios en la producción de *Spondylus* y da apertura a el desarrollo de otras especies similares. Estos estudios han sido publicados en Loor *et al*. (2016), Lodeiros *et al*. (2016) y son protocolizados en el Manual de producción de semillas en laboratorio de *Spondylus limbatus* pronto a publicarse.

Juveniles

Dada la importancia individual de los juveniles de *S. limbatus*, estos se mantienen en condiciones de laboratorio hasta que posean una talla a las que resulten manejables para siembras o cultivo suspendido y se asegure en mejor medida su supervivencia (15-25 mm), por lo cual mediante pruebas sucesivas, se determinaron las mejores condiciones de mantenimiento de juveniles en ambientes controlados, uno de estos ensayos fue comparar dietas de 9 microalgas usadas en acuicultura y sus combinaciones binarias, el crecimiento y supervivencia en el mar (dieta natural), siendo las dietas de laboratorio que contenían a la especie de microalga *Pavlova lutheri* las que obtuvieron un índice de rendimiento (integración de crecimiento y supervivencia) igual o mejor que dietas bialgales, demostrando la factibilidad en el uso de esta microalga como alimento en los juveniles de *S. limbatus* individualmente o combinada (Fig. 4).

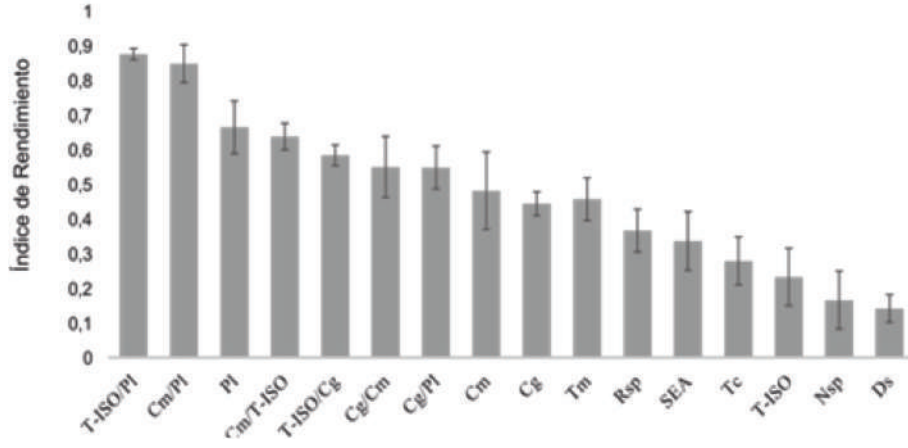


Figura 4.- Índice de rendimiento (integración del crecimiento y la supervivencia).

Pruebas de repoblamiento

Los resultados obtenidos en términos de crecimiento y supervivencia de *S. limbatus*, para organismos de sembrados de 15 mm establecidos en un área protegida de la Reserva marina El Pelado, Península de Santa Elena de Ecuador resultan alentadores (Fig. 5), principalmente porque esta es una zona actualmente considerada diezmada en sus poblaciones de *Spondylus* sp. (densidades menores a 3 individuos en 100 m^2 Sacha Steiner, CENAIM-ESPOL, 2016, comunicación personal), y que tradicionalmente era reconocida por los pescadores como abundante de estas especies. Esta zona presenta características que resultan favorables para el crecimiento de juveniles de *S. limbatus*, aunque la temperatura en la zona es muy variable (diferencias intradiarias en algunos meses de hasta 6°C (Lodeiros *et al*., 2017), la concentración de biomasa fitoplanctónica, estuvo generalmente >2 µg/L, concentración considerada excelente para el crecimiento de moluscos bivalvos (Saxby, 2002), con poca variabilidad de la salinidad y pH.

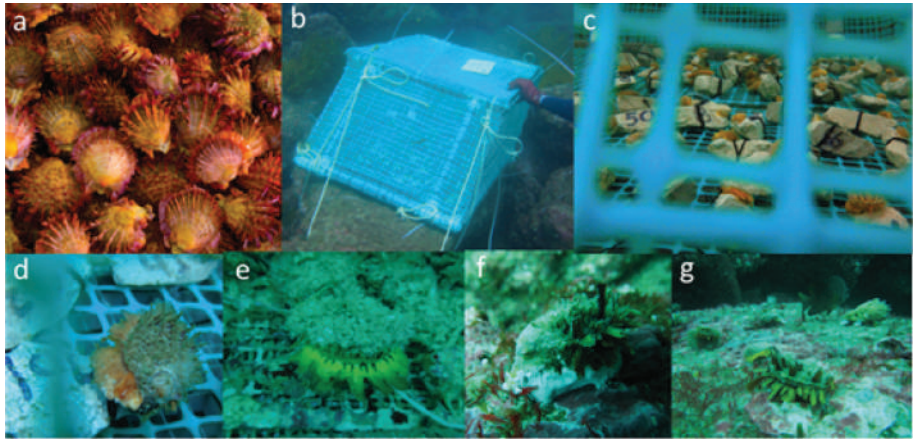


Figura 5.- a) Juveniles de *Spondylus limbatus* cultivados en laboratorios del CENAIM-ESPOL, b) Canastas de confinamiento de juveniles sembradas en el mar, c) Juveniles dentro de la canasta, d) Detalle de juveniles e) Juveniles al final del ensayo f) y g) Siembras sin confinamiento de juveniles sobre sustrato rocoso.

Los incrementos promedios obtenidos fueron de 2,7 $mm.mes^{-1}$ y supervivencia del 67%, con lo que se podría alcanzar la primera etapa de maduración sexual después de 1,5-2 años (~70-80 mm), estos resultados fortalecen la propuesta de la reserva como un área idónea para la restauración de su banco (Fig. 6). Siembras posteriores fueron realizadas sin confinamiento sobre sustratos rocosos con pegamento epóxico, teniendo en consideración que los organismos que tuvieron menor incidencia de los depredadores fueron los colocados en grietas y concavidades de las rocas, es de destacar que la zona rocosa de la reserva marina se caracteriza por

tener una estructura tridimensional compleja con nichos adecuados para las siembras. Estos resultados dejan claro la factibilidad de la creación de núcleos de repoblamiento, que potencien la disponibilidad natural de organismos, reestableciendo el balance positivo de reclutamiento y así promover la recuperación de los bancos naturales en la zona de la reserva marina El Pelado.

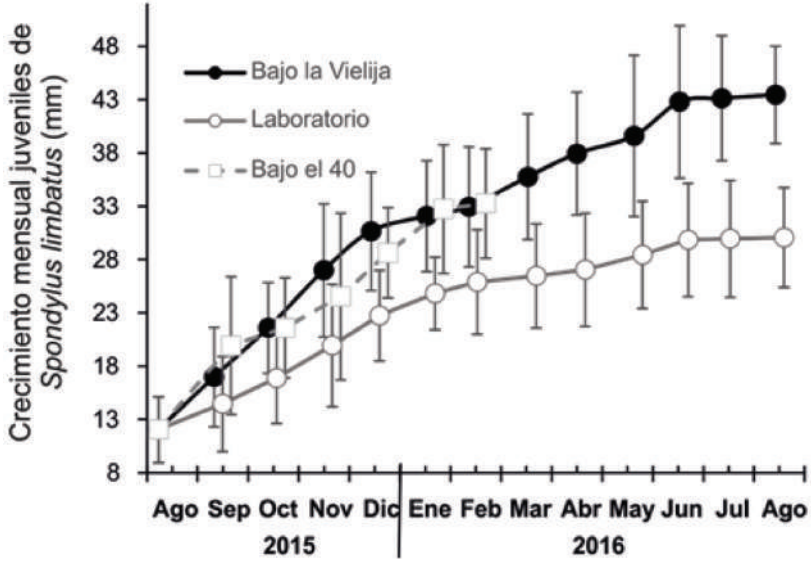


Figura 6.- Crecimiento de juveniles de *Spondylus limbatus*, en condiciones de laboratorio y canastas de confinamiento en la reserva marina El Pelado, Provincia de Santa Elena. Ecuador.

Conclusión

Se ha establecido mediante diversas investigaciones, protocolos de producción de semillas de *Spondylus limbatus* en laboratorio mediante el desarrollo de tecnología de acondicionamiento de reproductores, inducción al desove, desarrollo larvario, dietas para larvas, post-larvas y juveniles, así como técnicas de asentamiento y siembra en el mar. Los hallazgos del comportamiento atípico en la iniciación de la fase bentónica en el ciclo de vida de la especie han sido imprescindibles para el desarrollo de las técnicas de producción de *Spondylus*. Todos estas investigaciones aportan información esencial para esclarecer las características fisiológicas particulares de la especie, así como su implicación para la acuicultura, mostrando al cultivo de *Spondylus* como una alternativa viable para la restauración de sus bancos naturales, mediante

la creación de núcleos de repoblamiento (exportadores de gametos), que promuevan una mayor y más efectiva diseminación de la especie, facilitando el asentamiento de las larvas en zonas aledañas, lo cual podría conducir a un balance positivo en el reclutamiento de la especie; estas tecnologías son extrapolables a otras zonas diezmadas en las costas del Pacifico americano, con expectativas alentadores sobre su impacto en la recuperación de *Spondylus* spp.

Agradecimientos

El trabajo se ha realizado como parte proyecto de investigación "Producción en laboratorio de semilla de la concha *Spondylus* spp., para repoblación en la zona del Islote El Pelado provincia de Santa Elena", financiado Subsecretaría de Acuicultura y Pesca (MAGAP-SA) y el proyecto el "Desarrollo de protocolo de domesticación para el uso sostenible de nuevas especies marinas para consumo de alimento y repoblación de bancos naturales", financiado por la SENESCYT, Ecuador. César Lodeiros quien participó en el estudio durante su vinculación al CENAIM-ESPOL a través del Prometeo de la SENESCYT, Ecuador. Se agradece a los departamentos de Moluscos y Fitoplancton del CENAIM-ESPOL por la contribución en la realización de los experimentos.

Bibliografía

Lodeiros C., Soria G., Valentich-Scott P., Munguía-Vega A., Santana Cabrera J., Cudney-Bueno R., Loor A., Márquez A. & Sonnenholzner S. 2016. *Spondylus* of Eastern Pacific Ocean. *J. Shellfish Res.* 35(2): 1-15.

Lodeiros C., Rodríguez-Pesantes D., Márquez A., Revilla J. & Sonnenholzner S. 2017. Cultivo suspendido de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* en la Bahía de Ayangue, Ecuador: influencia de los factores ambientales. En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal.* Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Guerra A., Lastres M.A., Padín X.A., Lodeiros C. (eds.) 19: 317-329.

Loor A., Ortega D., Lodeiros C. & Sonnenholzner S. 2016. Early life cycle and effects of microalgal diets on larval development of the spiny rock-scallop, *Spondylus limbatus* (Sowerby II, 1847). *Aquaculture*, 450:328–334.

Marcos J.G. 2005. *Los pueblos Navegantes del Ecuador Prehispánico*. Quito, Ecuador: Ediciones Abya Yala. 205 pp.

Saxby S.A. 2002 A review of food availability, sea water characteristics and bivalve growth performance at coastal culture sites in temperate and warm temperate regions of the world, *Fisheries Research Report,* No. 132, Department of Fisheries, Western Australia, 42pp.

SEMARNAT. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en Riesgo. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Viceministerio de Acuacultura y Pesca. 2006. Acuerdo Ministerial 136 (Veda permanente del recurso concha *Spondylus*). [http://www.viceministerioap.gob.ec/subpesca287-acuerdo-ministerial-136-veda-permanente-del-recurso-concha-spondylus.html]

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca
Subsecretaría de Acuacultura

CENAIM

PROMETEO

Restauración de Spondylus en Ecuador: Producción de juveniles y avances de la repoblación de *S. limbatus* en la reserva El Pelado, Provincia de Santa Elena, Ecuador

Adrian Márquez[1], Jormil Revilla[1], César Lodeiros[1,2,3], Alfredo Loor[1], Daniel Rodríguez[1] y Stanislaus Sonnenholzner[1]

1 Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), km 30.5 Vía Perimetral Guayaquil, Ecuador
2 Investigador Prometeo, Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación SENESCYT Ecuador
3 Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Apartado Postal 245, Cumaná 6101, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Ningún molusco ha sido tan importante en las costas del Pacífico americano como los Spondylus (Pectinoida: Spondylidae), *Spondylus limbatus* (=*Spondylus calcifer*), junto con otras de su género (*S. gloriosus*, *S. crassisquama* y *S. leucacanthus*) han jugado un papel importante desde tiempos prehistóricos, no sólo como recursos económicos, sino también en asuntos políticos, culturales y religiosos para mesoamericanos y culturas andinas (Lodeiros et al 2014). En Ecuador fue particularmente importante, siendo utilizado como ofrendas ceremoniales desde la época Valdivia en los (Marcos 2005), con reciente resurgimiento de su importancia, llegando a ser un icono actual de la autoridad en las comunidades costeñas. Sin embargo, a partir de la década de los 90, el recurso Spondylus en américa, dado a un interés gastronómico y uso de su concha en joyería, sufre una presión de pesca sin adecuada que conduce al agotamiento de sus bancos, por lo que tanto en México como en Ecuador, donde ha sido mayormente explotado, se genera restricciones de su pesca en principios del presente siglo (SUBMARINA T 2003, MAGAP 2016), sugiriendo estudios para la administración y repoblación de los mismos. En vista de ello, el CENAIM-ESPOL conjuntamente con la Subsecretaría de Acuicultura y Pesca del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (SA-MAGAP) y la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, (SENESCYT) de Ecuador han emprendido una serie de estudios para poner a punto un tecnología de producción de *Spondylus* y de repoblación de sus bancos en función de cada vez ser su restauración ecológica. Estos estudios se resumen a continuación.

PRODUCCIÓN DE JUVENILES

Acondicionamiento de reproductores

Una serie de experimentos para el uso de distintas dietas microalgales y variaciones en la temperatura con la condución de utilización de una dieta de *Chaetoceros spp* cilé + *Tisochrysis lutea* en una proporción 2:1 (3% del peso seco de los organismo día) a temperaturas de 24-27 °C se ha logrado la obtención de organismos maduros y aptos para la reproducción inducida, a través de shock de desecación (1-2 h), seguidos de shock por diferencia de temperatura, con lo cual se consiguen desoves de hasta 30 millones de huevos, y esperma suficiente, con los cuales se realiza la fertilización en una proporción 1:10, consiguiendo en un porcentaje de huevos fertilizados >90% (Fig.1).

Producción larvaria

Luego de diferentes pruebas de desarrollo larvales y establecimiento de dietas microalgales, se ha logrado la producción de larvas competentes a pediveliger a los 15-16 días, con densidades de 4-6 larvas.ml⁻¹ primeras fases hasta 1-0,5 larvas.ml⁻¹ últimas fases (pediveliger) con una temperatura adecuada de 22-26 °C y dieta microalgal de (*T. lutea* y *C. gracilis*) con alimentación desde 15.000 hasta 50.000 cel.ml⁻¹ (incrementos de 3000 cel.ml⁻¹) en proporción de 3:1 para los primeras etapas larvarias (hasta veliger-umbonal temprana) y luego 1:1 para las etapas intermedias (Umbonada temprana-tardía) y 1:3 el resto de las etapas, con una tasa de crecimiento diario estuvo en 5.1 µm.día⁻¹. También se han identificado 2 periodos críticos durante las larvas larvas (picos de mortalidad) entre los días 3 y 4 relacionados con periodos de mayor cambio fisiológico *S. limbatus* con los que se observa una elevada sensibilidad a invasiones de bacterias, particularmente spp *Vibrio*, por lo cual es necesario tratamientos, particularmente a partir del 2 post-fertilización, con antibióticos (Florfenicol 0,5um.ml⁻¹ y oxitetraciclina 1 um.ml⁻¹).

Producción de juveniles

Tras ensayos experimentales y de prueba de error, los resultados obtenidos en el asentamiento de las larvas y metamorfosis al principio no fueron alentadores, hasta el punto donde se determinó bajo observación microscópica el comportamiento pueclular de la etapa postmetamórfica. Los resultados de estas observaciones permitieron por un lado establecer el ciclo biológico temprano de la especie, el cual es atípico a la mayoría de los moluscos bivalvos, y a la vez la apertura de la obtención de juveniles de *S. limbatus* y con ello el desarrollo en la producción de *Spondylus*. A diferencia de la mayoría de pectínidos, *S. limbatus* no produce nibbio, ni se cementa a ningún sustrato al principio de su etapa bentónica, luego de la metamorfosis las postlarvas y juveniles desarrollan el pie y se mantienen reptando, por 1-3 meses, registrándose como talla máxima en esta etapa 1,2 mm de altura a los 3 meses post metamorfosis. Nuestros estudios muestran que la cementación se hace en los sustratos duros mayores de 3 cm (sin que corrientes puedan perturbarlo), con preferencien sustratos rugosos como la concha de bivalvo espada, lo que provoca una densidad elevada de reclutas, que dificulta la extracción de los organismos para el cultivo posterior. Ensayos de asentamiento con otros sustratos como lija y las piedras de cemento, promueven la fijación y ofrecen mayor facilidad de extracción de las semillas. También se ha determinado que existe una preferencia por los sustratos en orientación vertical, con respecto a los horizontales (Fig. 2). Las estrategias de cultivo has sido separando el fondo lo donde se acumula material con ataca gra bacterianal soportando los sustratos de fijación mediante mallas a mas de 40 cm del fondo, cuando las larvas son competentes.

El ciclo de vida de *S. limbatus* se muestra en la figura 3, este hallago ha permitido la continuidad de los estudios en la producción de *Spondylus* y la apertura a el desarrollo de otras especies similares. Estos estudios han sido publicados en Loor *et al.* 2016, Lodeiros *et al.* 2016 y son protocolizados en el Manual de producción de semillas en laboratorio de *Spondylus limbatus*. 2016 (Figura 4, 5 y 6).



Figura 1 a Acondicionamiento de reproductores de *S. limbatus* en tanques de alto volumen, b inducción a desove en laboratorio del CENAIM-ESPOL.



Figura 2 a Ensayo de colección de sustratos positivos de *S. limbatus*, b juveniles fijos sobre trozos de conchas de adultos, c juveniles fijos sobre piedras de cemento y d juveniles fijos sobre lijas rojas.

Figura 3 Ciclo de vida de *Spondylus limbatus* (desarrollo embrionario, larvario, postlarvario, juveniles y adultos).



Figura 4 productos de investigación sobre el cultivo de *Spondylus limbatus*

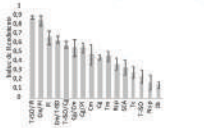


Figura 5 Índice de crecimiento total/supervivencia a dietas para

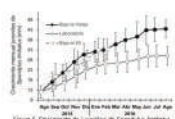


Figura 6. Crecimiento de juveniles de *Spondylus limbatus*, en condiciones de laboratorio y cercas de confinamiento en la reserva marina El Pelado, Península de Santa Elena, Ecuador y mantenidas en cilindro del CENAIM-ESPOL).



Figura 7 a Juveniles de *Spondylus limbatus*, b cercas de confinamiento de juveniles, c juvenile dentro de la cerca, d detalle de juveniles y juveniles al final del ensayo y e y f comisión o confinamiento de juveniles sobre sustrato rocoso.

REPOBLAMIENTO

Juveniles.

Dado la importancia individual de los juveniles de *S.limbatus*, estos se mantienen en condiciones de laboratorio hasta que posean una talla a las que resultan manejables para sembrar a cultivos suspendido 2-3 Smm y se asegure en mejor medida su supervivencia, por lo cual mediante pruebas sucesivas, se determinan las mejores condiciones de mantenimiento de juveniles en ambientes controlados, comparando las dietas de laboratorio con el crecimiento en el mar, siendo las dietas de laboratorio que contienen a la especie de microalga *Pavlova lutheri* las que obtuvieron un índice de rendimiento igual o mejor que las bulgalas, demostrando la factibilidad en el uso de esta microalga como alimento en los juveniles de *S. limbatus* individualmente o combinada (fig. 5).

Pruebas de repoblamiento

Resultan alentadores los resultados obtenidos de crecimiento y supervivencia de organismos juveniles de *S. limbatus* para organismo de sembrados de 15 meses de edad, los cuales eran desprotegidos de la Reserva marina El Pelado, Península de Santa Elena, Ecuador (Fig. 6), que es una zona actualmente se consideradesmedida en sus poblaciones de *Spondylus* sp (densidades menores a 3 individuos. en 1.00 m² Sacha Steiner, CENAIM-ESPOL, 2016, datos por publicar), y que tradicionalmente era conocida por los pescadores como abundante de estas especies. Esta zona presenta unas características que resultan favorable para el crecimiento de juveniles de *S.limbatus*, aunque la temperatura en la zona es muy variable (diferencias intradiarias en algunos meses de hasta 6 °C), la concentración de biomasa fitoplanctónica, siempre se determinó por encima de 0,5 mgm⁻³, concentración considerada como mínima para el crecimiento de moluscos bivalvos (Seeley 2002), con poca variabilidad de la salinidad y pH. Obteniendo incrementos promedios de 2,7 mm.mes⁻¹ y supervivencia del 67% con lo que se podría alcanzar la primera etapa de maduración sexual después de 1,5-2 años (~70-80 mm) (fig. 7). Sembrados posteriores fueron realizados sin confinamiento sobre sustratos rocosos con pegamento epóxico, teniendo en consideración que los organismos que tuvieron menor incidencia de los depredadores fueron los colocados en grietas y concavidades de las rocas, es de destacar que las zonas rocosas de la reserva marina se caracteriza por tener una estructura tridimensional compleja con nichos adecuados para las siembras. Estos resultados dejan claro la factibilidad de la creación de nuevos de repoblamiento, que potencien la disponibilidad natural de organismos restableciendo el balance positivo de reclutamiento y así promover la recuperación de los bancos naturales en la zona de la reserva marina El Pelado.

CONCLUSIONES

Se ha establecido mediante diversas investigaciones, protocolos de producción de semillas de *Spondylus limbatus* en laboratorio mediante el desarrollo de tecnología de acondicionamiento de reproductores, inducción al desove, desarrollo larvario, dietas para larvas, post larvas y juveniles, así como técnicas de asentamiento y siembra en el mar. Todas estas investigaciones, aportan información esencial para esclarecer las características fisiológicas particulares de la especie, así como su implicación para la acuicultura, mostrando al cultivo de *Spondylus* como una alternativa viable para la restauración de sus bancos naturales, mediante la creación de núcleos de repoblamiento (reproductores de gametos), que promuevan un mayor y más efectivo reclutamiento, estableciendo de organismos a una distancia menor, promoviendo el asentamiento de las larvas en zonas aledañas, y recobrar un balance positivo en el reclutamiento de la especie, esta tecnología es extrapolable a otras zonas de semillas en especial a los alrededores sobre su impacto en la recuperación de *Spondylus limbatus*.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo se ha realizado como parte del proyecto de investigación *Desarrollo de protocolo de domesticación para el uso sostenible de nuevas especies marinas para consumo de alimento y repoblación de bancos naturales*, financiado por la SENESCYT. César Lodeiros participó en el estudio durante su vinculación al CENAIM-ESPOL a través del proyecto Prometeo de la SENESCYT, Ecuador.



Sensitivity of *Pseudomonas anguilliseptica* to natural compounds and antimicrobial agents

Torres Corral Y. Fernández Álvarez C. & Santos Y.
Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-Edificio CIBUS e Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela. yolanda.torres.corral@gmail.com; ysabel.santos@usc.es

Abstract

Aquaculture industry is a great source of fish and other marine products which are important part of the human diet all over the world. In parallel with the growth of this sector have appeared or reappeared pathogenic microorganisms that must be considered because of the negative consequences on food safety and economic losses in the aquaculture industry. *Pseudomonas anguilliseptica* is a fish pathogenic bacterium infecting mainly farmed fish in marine environments. Since 1971, data of the first isolation of *P. anguilliseptica* from diseased Japanese eels *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, 1846 in Japan, several species of economic importance have been affected by this emerging pathogen. The purpose of this work is to test the sensitivity of *Pseudomonas anguilliseptica* to different antimicrobials authorized for use in aquaculture in comparison with natural compounds.

Keywords

Pseudomonas anguilliseptica, Antimicrobial agents, Sensitivity tests.

Introduction

Search of new fish species for aquaculture production have increased in recent years, in order to respond to the constant market demand. Intensive production and growth in aquaculture industry has been accompanied by appearance of new pathologies. One of the emergent bacterium occurring in marine and fresh aquaculture is *Pseudomonas anguilliseptica*. *P. anguilliseptica* has gained importance for being responsible for mortality outbreaks in various fish species (Doménech *et al.,* 1997). *P. anguilliseptica* was first isolated from diseased farmed Japanese eels (*Anguilla japonica*) in Japan in 1971 (Wakabayashi & Egusa, 1972). Subsequently, the infection has been confirmed in several species in diverse areas, including European eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758), black seabream *Acathopagrus schlegelii* (Bleeker, 1854), ayu *Plecoglossus altivelis* (Temminck & Schlegel, 1846), rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), Atlantic salmon *Salmo salar* Linnaeus, 1758, whitefish *Coregonus lavaretus* (Linnaeus, 1758), brown trout *Salmo trutta* Linnaeus, 1758, gilthead seabream *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758), cod *Gadus morhua* Linnaeus, 1758, striped beakperch *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel, 1846) (see Austin and Austin, 2016 for a review), and recently from lumpsucker *Cyclopterus lumpus* Linnaeus, 1758 (Alarcon *et al.*, 2016). At present, the bacterium is responsible for major losses in the aquaculture sector, especially in the species of recent introduction.

The purpose of this work is to comparatively evaluate the efficacy of the phytobiotics MethPlus and Liptofry (Lípidos Toledo, S.A.) and antimicrobials authorized for use in aquaculture for the control of disease caused by *Pseudomonas anguilliseptica*.

Materials and methods

Bacterial strains

A total of 6 bacterial strains belonging to *Pseudomonas anguilliseptica* were studied, including the reference strains CECT899 and CECT900 from the Spanish Type Culture Collection (CECT), as well as clinical strains isolated from fish. All strains were kept frozen at -30ºC in Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada) until use. For the dilution susceptibility testing method, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658

was used as a quality control strain as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute document M49-A (CLSI, 2006). The strains were cultured on Mueller-Hinton agar medium (MHA) (Cultimed, Spain) at 18ºC for 24-48 h.

Disc diffusion method

To assess the antibacterial activities of phytobiotics (Liptofry and Methplus), and antimicrobials authorized for use in aquaculture against *Pseudomonas anguilliseptica* the disk diffusion method was used, following the procedures of the Clinical Standards Institute (CLSI, 2006). Phytobiotic stock solutions (concentration of 30 mg/mL) were prepared by using DMSO as solvent. Sterile disks of 6 mm diameter (Liofilchem, Italy) embedded in the phytobiotics at final concentrations of 300 and 150 µg/disk were kept on agar surface. Sterile disks embedded with DMSO were used as a negative control. The commercial antimicrobials used for comparative purpose and its concentrations (µg/disk) were: oxytetracycline (30), flumequine (30), florfenicol (30), trimethoprim-sulphamethoxazole 25 (1.25 + 23.75), and amoxicillin (25). Bacterial inoculum was prepared in sterile saline solution (0.9% NaCl) from a 48 h MHA plate to an optical density at 625 nanometers (OD_{625}) of 0.80. The entire surface of the agar plate was inoculated by streaking with the swab containing the inoculum. The diameter of the zone of inhibition was determined after incubation at 18ºC up to 72 hours. Assays were carried out by duplicate and inhibition zones were expressed in millimetres (average ± SD).

Minimum inhibitory concentration (MIC) assay

The MIC for Liptofry and MethPlus was evaluated using the broth microdilution method and agar dilution method, following the procedures of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). For broth microdilution method, Liptofry and MethPlus were serially diluted from 300 to 2.34 µg/mL in Mueller-Hinton Broth (MHB), reaching a final volume of 100 µL in each well. Bacterial suspensions, adjusted to an OD_{625} of 0.8 in saline solution, were inoculated to each well in a 1:10 proportion. MHB with and without inoculum was used as positive and negative control of growth, respectively. MHB with Liptofry or MethPlus was used as blank. The plates were incubated at 18ºC for 72 h. The assays were carried out by triplicate. Minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of antimicrobial agents able to completely inhibit the growth of the microorganism. The MIC was established by comparing the amount of growth in the wells containing Liptofry or MethPlus with the amount of growth in the growth-control wells (no antimicrobial agent) as detected by the unaided eye or reading (OD_{625}) the microdilution tests with a spectrophotometer (Microplate Reader Model 680, BioRad).

For Agar Dilution method, Liptofry and MethPlus were diluted from 300 to 2.34 µg/mL in MHA. Plates, prepared in triplicate, were spot inoculated with 1 µL aliquots of bacterial suspensions adjusted to 0.8 (OD_{625}). Plates were incubated at 18°C for 72 h and the MIC was determined as the lowest concentration of phytobiotics to result in no growth of the inoculum on three replicates.

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assay

The MBC was estimated by spectrophotometric and culture methods. For culture method, the initial inoculum, the dilution representing the MIC and at least two of the more concentrated test product dilutions were plated and enumerated to determine viable CFU by using the plate dilution method. The cultures were incubated at 18ºC for 72 h and the antimicrobial concentration that cause a reduction of the 99.9% of the original inoculum was considered the MBC. The reduction of number of viable cells was also measured by a colorimetric assay based on the reduction of a tetrazolium salt (MTT method). Briefly, viable bacteria present in the wells were quantified by the addition of 10 µL of [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT, 5 mg/mL), which is reduced in proportion to the number of viable bacteria present. The optical density was read at 625 nm 15 min later on a spectrophotometer (Microplate Reader Model 680, BioRad). Experiments were carried out in triplicate.

Results and discussion

The global demand for safe food has prompted the search for natural alternative growth promoters with antimicrobial and or immunostimulant activities to be used in feeds for aquatic animals.

In the present study the susceptibility of the strains of *P. anguilliseptica* to the phytobiotics MethPlus and Liptofry was evaluated in comparison with the antimicrobial compounds approved for their use in aquaculture. The results of disk diffusion tests are summarized in Table I. All *P. anguilliseptica* strains showed susceptibility "*in vitro*" to oxytetracycline, flumequine, florfenicol, trimethoprim-sulphamethoxazole, and amoxicillin. The phytobiotic Liptofry possess notable antimicrobial activity against *P. anguilliseptica* strains with inhibition zones of 16.5-29.0 mm and 11.5-20.2 using concentrations of 300 µg/disk and 150 µg/disk, respectively. However, all strains were resistant to MethPlus (no inhibition zone) by the disk diffusion method.

Table I.- In vitro antibacterial activity[a] by disk diffusion method of antimicrobials approved for use in aquaculture and phytobiotics (Liptrofry and MethPlus) against *Pseudomonas anguilliseptica* strains, expressed as inhibition zones (mm)[b].

Strains	FLO	OT	UB	AMX	STX	Liptofry		MethPlus	
	30µg	30µg	30µg	25µg	25µg	300µg	150µg	300µg	150µg
Reference Strains (n=2)	48.0±1.4-50.5±1.1	55.3±1.1-54.0±3.1	55.5±1.1-56.8±0.4	32±3.2-39.8±0.4	29.3±1.1-32.0±0.0	24.0±4.9-29.0±0.7	15.8±1.1-20.2±2.0	<5	<5
Clinical isolates (n=4)	41.5±1.7-51.25±0.5	56.0±4.9-63.3±1.8	43.0±1.4-66.0±1.1	34.8±0.4-67.0±1.4	14.8±0.4-29.3±0.4	16.5±4.2-20.8±1.1	11.5±0.4-18.0±2.1	<5	<5

[a] These results are average results of two experiments (average ± SD); [b]The phytobiotics were used at the concentration of 300 and 150 µg/disk and the inhibition zones are stated in mm. No inhibitory activity, diameter of inhibition zone <5 mm FLO, florfenicol; OT, Oxytetracycline; AMX, Amoxycillin; STX, trimethoprim-sulfametoxazole; UB, Flumequine.

The capacity of phytobiotic to inhibit *P. anguilliseptica* growth was also evaluated by using broth and agar dilution methods. The Table II shows the MIC values of Liptofry and MethPlus for *P. anguilliseptica* strains determined by both agar and broth dilution method after 72 h of incubation. The MIC values of Liptofry for *P. anguilliseptica* obtained using the broth dilution method were 8 to 4 times (37.5 µg/mL) lower than those obtained by using the agar dilution method (150 to 300 µg/mL). The MIC values of Methplus for *P. anguilliseptica* determined by broth dilution method ranged between 18.75 to 37.5 µg/mL, but MIC values higher than 300 µg/mL were obtained using the agar dilution method. The existence of discordances between results obtained with both dilution techniques, depending on the assay conditions, drugs tested and species of microorganism involved have been described by several researchers (Waites *et al*., 1991).

MBC values of Liptofry and Methplus evaluated using spectrophotometric and culture assay were coincident (Table II). The mean ratio MBC/MIC of both phytobiotics for *P. anguilliseptica* strains was <2.0. Therefore, under the laboratory conditions, Liptofry and MethPlus showed bactericidal activity against *P. anguilliseptica* following the definitions proposed by Pankey and Sabath (2004). Moreover, Methplus showed a bactericidal activity slightly higher than Liptofry.

Conclusions

The overall results suggest that both phytobiotics could be applied as an alternative natural measure for the control of the diseases caused by *Pseudomonas anguilliseptica*. Further studies should be carried out in order to determine the efficacy of these natural compounds on "*in vivo*" situations.

Table II.- MICs and MBCs expressed in µg/ml of phytobiotics tested against *Pseudomonas anguilliseptica strains.*

Phytobiotic	Strains	MIC (Agar dilution test)	MIC (Broth Dilution test)	MBC Spectrophotometric/ culture assays
Liptofry	Reference strains (n=2)	150-300	37.5	75
	Clinical isolates (n=4)	150-300	37.5	75
MethPlus	Reference strains (n=2)	>300	18.75-75	37.5-75
	Clinical isolates (n=4)	>300	18.75-37.5	18.75-37.5

Bibliography

Austin B. & Austin D.A. 2016. *Bacterial Fish Pathogens*. Sixth Edit. Chichester, UK: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-32674-0.

Alarcón M., Gulla S., Røsæg M.V., Rønneseth A., Wergeland H., Poppe T.T., Nilsen H. & Colquhoun D.J. 2016. Pasteurellosis in lumpsucker *Cyclopterus lumpus*, farmed in Norway. *Journal of Fish Diseases.* 39: 489–495.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline. CLSI document M49-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 19087-1898, USA1-56238-612-3.

Doménech A., Fernández-Garayzabal J.F., Lawson P., García J.A., Cutuli M.T., Blanco M., Gibello A., Moreno M.A., Collins M.D. & Domínguez L. 1997. Winter disease outbreak in sea bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection. *Aquaculture.* 156: 317-326. DOI: 10.1016/S0044-8486(97)00069-0.

Pankey G.A. & Sabath L.D. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of actions in the treatment of Gram-Positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 864-870.

Waites K.B., Figarola T.A., Schimid T., Crabb D.M., Duffy L.B. & Simecha J.W. 1991. Comparison of Agar versus Broth Dilution Techniques for Determining Antibiotic Susceptibilities of *Ureaplasma urealyticum*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 14: 265-271.

Wakabayashi H. & Egusa S. 1972. Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 38(6): 577–587.

Sensitivity of *Pseudomonas anguilliseptica* to natural compounds and antimicrobial agents

Torres Corral Y. [1], Fernández Álvarez C.[1], Santos Y.[1]*

[1] Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-Edificio CIBUS and Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela. e-mail: yolanda.torres.corral@gmail.com; ysabel.santos@usc.es



Abstract

Aquaculture industry is a great source of fish and other marine products which are important part of the diet all over the world. The great growth of this sector involves the appearance of pathogenic microorganisms that should be considered for potential negative consequences on food safety and economical losses in aquaculture industry. Hence, one of the major objectives of fish-farmers has been the elimination of all diseases. *Pseudomonas anguilliseptica* is a fish pathogenic bacterium infecting mainly farmed fish in marine environments. Since 1971, first isolation of *Pseudomonas anguilliseptica* from diseased Japanese eels (*Anguilla japonica*) in Japan, several species have been affected by this emerging pathogen. Therefore, the purpose of this work is to test the sensitivity of *Pseudomonas anguilliseptica* to different antimicrobials used in aquaculture and natural compounds.

Material and Methods

Figure 1: Antimicrobial Activities

Strains: 6 strains *P. anguilliseptica* from *Pagellus bogaraveo*

Culture medium: Mueller-Hinton Agar (MHA) and Mueller-Hinton Broth (MHB)

Inoculum: Bacterial suspension in 0.9% NaCl (OD625 = 0.8)

Disc diffusion methods

Antimicrobial tested

Authorized for use in aquaculture

- Oxytetracycline (OT; 30 µg)
- Flumequine (UB; 30 µg)
- Chloramphenicol (CHL;)
- Florfenicol (FLO; 30µg)
- Ampicillin (AMP; 10 µg)
- Trimethoprim-sulphamethoxazole (SXT; 25 µg)
- Amoxicillin (AMX; 25 µg)
- Trimethoprim (TMP; 5µg)

Phytobiotics

- Liptofry (1.5 mg/ml and 3 mg/ml)
- Meth Plus (1.5 mg/ml and 3 mg/ml)

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Agar dilution method (ADM)

MHA + phytobiotics (3 to 0.25 mg/mL)

Broth dilution method (BDM)

in MHB + phytobiotics (3 to 0.0234 mg/mL)

Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

MBC was estimated by spectrophotometric and culture method as previously described by Vázquez-Rodríguez et al., 2015. Bioorg. Med. Chem. 23: 7045-7052

Results

Table 1: In vitro antibacterial activity by disk diffusion method of antimicrobials approved for use in aquaculture and phytobiotics (Liptrofry and MethPlus) against *P. anguilliseptica* strains, expressed as inhibition zones (mm).FLO, florfenicol; OT, Oxytetracycline; AMX, Amoxycillin; STX, trimethoprim-sulfametoxazole; UB, Flumequine.

Strains	FLO	OT	UB	AMX	STX	Liptofry		MethPlus	
	30µg	30µg	30µg	25µg	25µg	300µg	150µg	300µg	150µg
Reference Strains (n=2)	48.0±1.4-50.5±1.1	55.3±1.1-54.0±3.1	55.5±1.1-56.8±0.4	32±3.2-39.8±0.4	29.3±1.1-32.0±0.0	24.0±4.9-29.0±0.7	15.8±1.1-20.2±2.0	<5	<5
Clinical isolates (n=4)	41.5±1.7-51.25±0.5	56.0±4.9-63.3±1.8	43.0±1.4-66.0±1.1	34.8±0.4-67.0±1.4	14.8±0.4-29.3±0.4	16.5±4.2-20.8±1.1	11.5±0.4-18.0±2.1	<5	<5

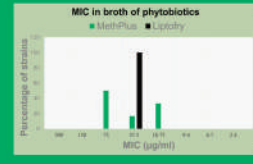


Figure 2: Distribution of strains of *P. anguilliseptica* according to the MIC of phytobiotics (Liptofry and Meth Plus) determined by the broth microdilution method. Range between 2.4 to 300 µg/ml

Table 2: MICs and MBCs expressed in µg/ml of phytobiotics tested against *P. anguilliseptica* strains

Phytobiotic	Strains	MIC (Agar dilution test)	MIC (Broth Dilution test)	MBC Spectrophotometric/ culture assays
Liptofry	Reference strains (n=2)	150-300	37.5	75
	Clinical isolates (n=4)	150-300	37.5	75
MethPlus	Reference strains (n=2)	>300	18.75-75	37.5-75
	Clinical isolates (n=4)	>300	18.75-37.5	18.75-37.5

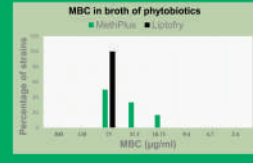


Figure 3: Results of viability of strains of *P. anguilliseptica* according to the MBC of phytobiotics (Liptofry and MethPlus) determined by broth microdilution method. Range between 2.4 to 300 µg/ml

Conclusions

- *P. anguilliseptica* strains are susceptible "in vitro" to all antimicrobials approved for use in aquaculture.
- *P. anguilliseptica* are more susceptible to Liptofry than to MethPlus using both ADM and BDM techniques.

Técnicas de preengorde en suspensión de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) en el Delta del Ebro. Hacia una talla de siembra mayor en parques de arena

Vallejo[1] O. & Fernández[2] C.

[1]Escola d'Aqüicultura INS Els Alfacs, Crta. Poble Nou, s/n. 43540. Sant Carles de la Ràpita (Tarragona).

ovallsol@hotmail.com

[2]Muscleres Prats, S.L. Crta. Poble Nou, km 8. 43540. Sant Carles de la Ràpita (Tarragona).

Resumen

Se pretende continuar mejorando la fase de preengorde en suspensión de de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* en cuanto a la obtención de semilla de mayor tamaño (>25 mm) en el menor tiempo y coste posible, para su siembra en arena y garantizar una menor depredación y por tanto mayor supervivencia inicial.

Palabras clave

Preengorde, almeja japonesa, talla de siembra, Delta del Ebro.

Introducción

Como parte formativa del alumnado de la Escuela de Acuicultura del INS “Els Alfacs”, con esta experiencia se han realizado todas las tareas técnicas relacionadas con el preengorde de almejas en suspensión.

Se aportaran todos los datos significativos que puedan ser transferidos al sector local productor de moluscos bivalvos del Delta del Ebro, con la intención de posibilitar la diversificación del cultivo de mejillón y ostra rizada en los emparrillados.

Materiales y métodos

Las semillas con una longitud media inicial de 15,42 mm y un peso medio de 0,6 gramos, se distribuyeron a diferentes densidades entre 3.000 y 1.500 almejas por metro cuadrado en diferentes recipientes de cultivo en suspensión desde un emparrillado de la Bahía de los Alfaques en el Delta del Ebro, durante cinco meses desde octubre de 2015 hasta marzo de 2016.

Se realizaron muestreos para determinar la longitud media, peso medio, porcentaje de supervivencia y deformaciones en valvas. En cada muestreo los datos fueron anotados y registrados en una hoja de cálculo (Excel) para su posterior cálculo e interpretación.

Resultados y discusión

No hay diferencias significativas en cuanto a crecimiento si lo comparamos con los resultados obtenidos en el Delta del Ebro, bajo parámetros de cultivo análogos, según Vallejo *et al*. (2011).

La fecha de siembra en sustrato arenoso se puede establecer entre febrero y marzo, ya que han alcanzado una longitud superior a 25 mm (Fig.1) y en el Delta del Ebro las condiciones climáticas son adecuadas (temperaturas entre 12 a 14ºC) ya que no hay presencia de depredadores (cangrejos y gasterópodos perforadores), por lo que puede repercutir muy positivamente en la supervivencia durante el periodo crítico de la siembra.

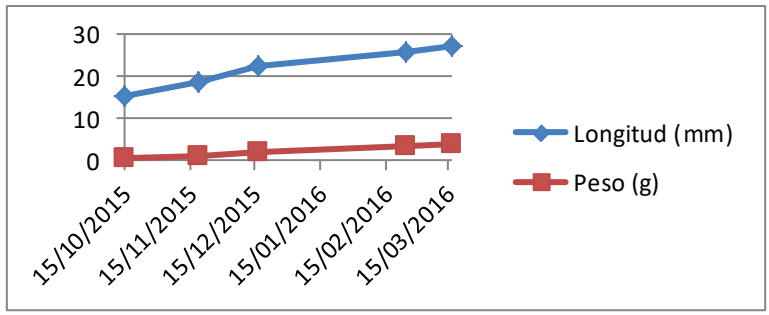


Figura 1.- Crecimiento en longitud y peso

El período de preengorde de octubre a marzo, permite que no haya un mantenimiento de los cestos por incrustaciones, que se dan principalmente en verano (ahorro económico de personal) y permite una climatización de las semillas a las condiciones ambientales y oceanográficas de las bahías del Delta del Ebro, para su óptima siembra en parques de arena.

La ausencia de mortalidad y deformaciones en valvas significativas, facilitan la viabilidad del preengorde desde un punto de vista productivo y económico y posibilita la diversificación del cultivo de mejillón y ostra rizada en el Delta del Ebro.

La talla (mayor de 25 mm) y época de siembra (febrero y/o marzo) también permitirán un periodo de engorde menor, y así se podría obtener almeja con talla comercial (cabezas de crecimiento) durante las épocas de verano (julio y agosto) y de navidades (medias y colas de crecimiento) donde la demanda es mayor y el precio de la almeja también puede serlo, con la consecuente mayor rentabilidad del proceso.

Conclusiones

Desde un punto de vista productivo, el crecimiento en longitud es elevado con una media de 2,42 mm por mes y el crecimiento en peso también es óptimo con un aumento medio mensual de 0,67 gramos. Desde un punto de vista económico, aunque el valor inicial de la semilla es más alto si se compara con longitudes menores por debajo de los 15 mm, no es necesaria mano de obra por tareas de mantenimiento en un periodo aproximado de cinco meses (octubre a marzo), pudiéndose obtener un rendimiento económico mayor,

compensado por las pérdidas que podrían haber cuando la siembra se hace a longitudes iguales o inferiores a 15 mm debidas a la depredación (comunicación personal oral de acuicultores).

Agradecimientos

A los alumnos del Ciclo Formativo de Grado Medio en Cultivos Acuícolas por su gran voluntad, buen hacer y capacitación técnica en la consecución del trabajo. Sin todos ellos este estudio no hubiera sido posible.

Bibliografía

Vallejo O. & Garrigós J. 2011. Preengorde en suspensión de almeja japonesa (*R. philippinarum*) a bajas densidades en el Delta del Ebro En: *Actas de Resúmenes XIII Congreso Nacional de Acuicultura*.

Técnicas de preengorde en suspensión de almeja japonesa *(R. philippinarum)* en el Delta del Ebro

Hacia una talla de siembra mayor en parques de arena

O. Vallejo[1] y C. Fernández[2]

[1]Escola d'Aquicultura INS Els Alfacs - Ctra. del Poble Nou, km 5.5 - 43540 Sant Carles de la Rápita (Tarragona). e-mail: ovallsol@hotmail.com
[2]Muscleres Prats, S.L. - Ctra. Poble Nou, km 8. - 43540 Sant Carles de la Rápita (Tarragona)

Introducción

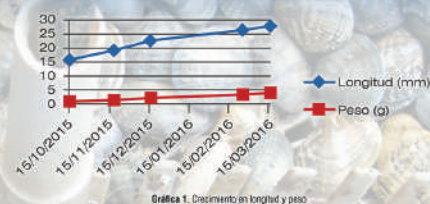
Como parte formativa del alumnado de la Escuela de Acuicultura del INS "Els Alfacs", con esta experiencia se han realizado todas las tareas técnicas relacionadas con el preengorde de almejas en suspensión. Así, se pretende continuar mejorando la fase de preengorde en cuanto a la obtención de semilla de mayor tamaño (> 25mm.) en el menor tiempo y coste posible, para su siembra en parques de arena y garantizar una menor depredación y por tanto mayor supervivencia inicial. Se aportaran todos los datos significativos que puedan ser transferidos al sector local productor de moluscos bivalvos del Delta del Ebro con la intención de posibilitar la diversificación del cultivo de mejillón y ostra rizada en los emparrillados.

Materiales y Métodos

Las semillas con una longitud media inicial de 15.42 mm y un peso medio de 0.6 gramos, se distribuyeron a diferentes densidades entre 3000 y 1500 almejas por metro cuadrado en diferentes recipientes de cultivo en suspensión desde un emparrillado de la Bahía de los Alfaques en el Delta del Ebro, durante 5 meses desde octubre de 2015 hasta marzo de 2016. Se realizaron muestreos para determinar la longitud media, peso medio, porcentaje de supervivencia y deformaciones en valvas. En cada muestreo los datos fueron anotados y registrados en una hoja de cálculo (Excel) para su posterior cálculo e interpretación.



Resultados y Discusión



Gráfica 1. Crecimiento en longitud y peso

Los resultados están representados en la **Gráfica 1**. Por lo tanto podemos concluir lo siguiente:

- No hay diferencias significativas en cuanto a crecimiento si lo comparamos con los resultados obtenidos en el Delta del Ebro, bajo parámetros de cultivo análogos, según Vallejo, O., et al., 2011.
- La fecha de siembra en sustrato arenoso se puede establecer en entre febrero y marzo, ya que han alcanzado una longitud superior a 25 mm y en el Delta del Ebro las condiciones climáticas son adecuadas (temperaturas entre 12 a 14°C) ya que no hay presencia de depredadores (cangrejos y gasterópodos perforadores), por lo que puede repercutir muy positivamente en la supervivencia durante el periodo crítico de la siembra.
- El periodo de preengorde de octubre a marzo, permite que no haya un mantenimiento de los cestos por incrustaciones, que se dan principalmente en verano (ahorro económico de personal) y permite una climatización de las semillas a las condiciones ambientales y oceanográficas de las bahías del Delta del Ebro, para su óptima siembra en parques de arena.
- La ausencia de mortalidad y deformaciones en valvas significativas, facilitan la viabilidad del preengorde desde un punto de vista productivo y económico y posibilita la diversificación del cultivo de mejillón y ostra rizada en el Delta del Ebro.
- La talla (mayor de 25 mm) y época de siembra (febrero y/o marzo) también permitirán un periodo de engorde menor, y así se podría obtener almeja con talla comercial (cabezas de crecimiento) durante las épocas de verano (julio y agosto) y de navidades (medias y colas de crecimiento) donde la demanda es mayor y el precio de la almeja también puede serlo, con la consecuente mayor rentabilidad del proceso.

Bibliografía

Vallejo, O. y Garrigos, J., 2011. Preengorde en suspensión de almeja japonesa (R. philippinarum) a bajas densidades en el Delta del Ebro En: Actas de Resúmenes XIII Congreso Nacional de Acuicultura.

Agradecimientos

A los alumnos del Ciclo Formativo de Grado Medio en Cultivos Acuícolas por su gran voluntad, buen hacer y capacitación técnica en la consecución del trabajo. Sin ellos este estudio no hubiera sido posible.





Valorización do berberecho *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) da costa galega, mediante un marcador de identidade da súa orixe xeográfica. VALOBER.GAL

Quinteiro[1] J. & Rey-Méndez[1,2] M.

[1]Laboratorio de Sistemática Molecular. Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular. CIBUS. Campus Vida. Universidade de Santiago de Compostela. 15782- Santiago de Compostela, A Coruña. javier.quinteiro@usc.es; manuel.rey.mendez@usc.es

[2]Instituto de Acuicultura da Universidade de Santiago de Compostela, Spain.

Resumo

Preséntase un proxecto, concedido polas axudas autonómicas 2016 (Xunta de Galicia) ao abeiro das estratexias de desesenvolvemento local participativas (GALP4-011), dirixido ao desenvolvemento e aplicación de técnicas moleculares que permitan a identificación e autenticación do berberecho galego, *Cerastoderma edule*, fronte á mesma e outras especies foráneas presentes nos mercados. O desenvolvemento de marcadores xenéticos que posibiliten diferenciar poboacións e especies taxonómicamente similares, permitirá resaltar o valor engadido do berberecho galego, baseado na trazabilidade deste recurso mariño local a través dunha figura de calidade asociada a súa orixe xeográfica. As actividades do proxecto inclúen a mostraxe do recurso e o illamento do ADN, caracterización xenética de poboacións e especies, análise de microbioma e, finalmente, implementación de métodos de trazabilidade e detección larvaria.

Palabras chave

Cerastoderma edule, berberecho, orixe xeográfica, marcadores xenéticos, microbioma.

Introdución

Este proxecto está dirixido ao desenvolvemento e aplicación de técnicas moleculares que permitan a identificación e autenticación do berberecho, *Cerastoderma edule*, fronte á mesma e outras especies foráneas presentes nos mercados. O desenvolvemento de marcadores xenéticos que posibiliten diferenciar poboacións e especies taxonómicamente similares, permitirá resaltar o valor engadido do berberecho *C. edule*, baseado na calidade deste recurso mariño local a través dunha figura de calidade asociada a súa orixe xeográfica. A posibilidade de verificar xenéticamente a natureza e orixe dunha mostra do produto confire unha nova perspectiva ao sistema de trazabilidade para a valoración do produto, sendo reflectido na etiquetaxe do producto final. Isto permitirá garantir a súa orixe e a correcta trazabilidade deste importante recurso mariño das nosas costas ao longo da cadea de distribución.

O impulso e desenvolvemento deste proxecto para o fomento da trazabilidade do berberecho conlevará a dispoñibilidade de ferramentas que permitan un control da calidade do produto dirixido a unha maior valorización do recurso. Esto suporá un incremento da competitividade, fronte a un mercado globalizado nun contexto de crise económica, de tódolos elementos relacionados coa súa explotación e comercialización. A consecuencia esperable do incremento da competitividade fronte a produtos homólogos pero alóctonos, é a promoción económica do sector extractivo, industrial e comercializador do berberecho, baseada na dispoñibilidade dun produto baixo a imaxe dunha figura de calidade diferenciada.

Os obxectivos do presente proxecto alcanzaranse a través da análise e monitorización nas costas galegas do berberecho, *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758), coas metodoloxías moleculares máis eficientes. Se ben esta monitorización é obrigada de forma recomendable para unha xestión total do recurso, varias circunstancias fana máis necesaria e crítica. Así, no Real Decreto 1334/1999, do 31 de xullo, dispóñense os principios xerais de etiquetaxe, destacando que as modalidades para realizalo deberán impedir que induza a erro no comprador e en particular, sobre a súa natureza, identidade, calidade, composición, cantidade, duración, orixe ou procedencia e modo de fabricación ou de obtención. A capacidade de autenticación do produto, conduce a unha clara valoración impedindo os erros ou fraude na etiquetaxe comercial.

Dentro da actividade extractiva do marisqueo a pé, a extracción do berberecho, *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758), constitúe a actividade con máis quilos de produción poxado, con un total de 2.649.193 quilos, o 27,44% da cantidade total dos bivalvos desta actividade, e a que representa o maior valor económico, con 13.410.475 €, o 49,74% do valor total dos bivalvos descargados nas lonxas galegas. (Fonte: www.pescadegalicia.gal. Servizo de Produción Pesqueira da Dirección Xeral de Recursos Mariños. Consellería do Mar, ano 2015). No mesmo ano, a Zona IV – Muros-Noia representou o 80,53% da produción total de berberecho, por un valor total de 10.958.090 € (81,71% do valor económico total). A Confraría de pescadores San Bartolomé de Noia constitúe a principal entidade galega na explotación do berberecho. Pero debido á globalización na comercialización dos produtos do mar e á importación dende o mercado europeo, principalmente holandés e francés, é común a utilización de berberecho foráneo para a súa elaboración en conserveiras, mesmo galegas. Esta situación, repercute negativamente no campo laboral e económico do sector extractivo. Calquera acción destinada a solucionar ou paliar esta problemática prevese que teña unha influencia positiva sobre a creación ou consolidación de emprego no sector e nesta área xeográfica.

A definición de figuras de protección da calidade, asociadas á identificación da especie e orixe, sistema de produción ou sostibilidade da explotación, constitúen unha vía fundamental para a promoción, fomento da calidade e busca de novas, ou alternativas, saídas comerciais aos produtos da pesca, marisqueo e acuicultura, de importante transcendencia social. A denominación de calidade redunda no beneficio tanto dos produtores, co aumento dos beneficios que compensan o particular esforzo na caracterización e distinción do seu produto, como de aqueles consumidores que solicitan produtos de alta calidade que garanten o método de produción, cultivo ou extracción e a súa orixe. Un fundamental requirimento práctico destas denominacións é que o produto implicado sexa identificable e diferenciable dos seus competidores nun mercado globalizado. Para elo é necesario dispoñer de técnicas analíticas adecuadas para a súa autentificación e verificación, en calquera das fases de extracción, produción e comercialización, que constitúan unha garantía para o sector produtivo, administración e consumidor, comportando o cumprimento das normas asociadas á etiquetaxe do produto. Sen embargo, a adopción de figuras de calidade do produto, asociadas á produción en áreas locais restrinxidas, tales como as rías galegas, e sistemas de produción particulares, require un maior e exhaustivo control da trazabilidade e un sistema de diferenciación deste recurso doutros produtos da mesma especie pero producidos noutras áreas xeográficas do Atlántico Noroeste. Nesta confraría téñense detectado etiquetados incorrectos que levan á comercialización como berberechos das Rías Galegas de produto importado, principalmente de Holanda e Francia. Isto comporta perda da calidade e confianza neste produto nos mercados, dificultades na estratexia de produción e dependencia dos vaivéns do mercado dificultando unha axeitada estratexia comercial.

Esta primeira problemática é a que se abordará dende o eido da trazabilidade xenética (Quinteiro *et al.*, 2008), para a definición dun marcador molecular específico do berberecho (*Cerastoderma edule*) de augas galegas, planteándose 3 alternativas metodolóxicas organizadas en sendas actividades. Con esto preténdese maximizar a viabilidade deste primerio obxectivo. A primeira metodoloxía considera a obtención de secuencias moi variables para avaliar a presenza de secuencias ou haplotipos asociados ás poboacións da costa galega. É una persepectiva semellante á usada por Krakau *et al.* (2012) mediante a cal foi posible diferenciar as poboacións do norte de europa frente a poboacións do sur, incluindo as da península ibérica. A avaliación de novos marcadores máis variables indicará a súa capacidade para resolver as relacións entre poboacións máis próximas. Estes marcadores terán utilidade inmediata para a diferenciación de *C. edule*, de outras especies relacionadas, explotadas comercialmente, e que son susceptibles de ser utilizadas como especies substitutorias.

Unha segunda aproximación considera a obtención de marcadores de posición nucleotídicas polimórficas (SNPs) que sexan informativas da orixe xeográfica do bivalvo. É unha aproximación máis poderosa e resolutiva para a obtención de tal información que a baseada no xenotipado por microsatlélites ou STRs (Martínez *et al.*, 2013), os cales presentaron unha congruente información mostrando a agrupación en stocks norte e sur. Non obstante estes marcadores STRs e as súas frecuencias alélicas teñen unha aplicación limitada para identificación dunha mostra problema.

Como terceira aproximación planease a caracterización do microbioma asociado ao berberecho. É abundante a presenza de parásitos no berberecho, algúns dos cales son responsables de graves patoloxías (Carballal *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2014), sen embargo outros non están asociados a patoloxías de consideración. A presenza xeneralizada, pero non patolóxica, de bacterias, fungos, protozoos, metazoos ou virus, provee dunha oportunidade para determinar a existencia dunha asociación entre os berberechos das costa galegas e un ou varios organismos asociados. Polo tanto, a presencia dese organismo podería ser utilizado como marcador da orixe xeográfica do berberecho.

Estas aproximacións biolóxicas son máis efectivas que aquelas relacionadas ca especiación de metais , por exemplo na cuncha de berberechos da área de Aveiro, que permiten a discriminación de zonas de cultivo próximas. Sen embargo tal aproximación é eficaz no caso da presencia de cunchas e restrinxido á análise de zonas caracterizadas.

Os datos obtidos e as metodoloxías postas a punto no laboratorio participante permitirán monitorizar de forma casi constante, espacial e temporalmente, a presencia de larvas e gametos no medio mariño. Así se teñen avaliado sistemas para a monitorización da presenza e cuantificación de larvas de ameixas (Quinteiro *et al.,* 2011) e ostras (Sánchez *et al.*, 2014),

que son datos moi valiosos para a correcta xestión do recurso, permitindo visualizar a dinámica do reclutamento, a dinámica larvaria, dun xeito non acadable previamente. Por eso planéase implementar un sistema similar para o seguemento larvario do berberecho (tanto *C. edule*, como *C. glaucum*), con aplicacións variadas, dende o cultivo á ecoloxía ou patoloxía. Así por exemplo, a presenza en determinadas áreas do litoral galego dunha importante mortalidade pola presenza de neoplasia difuminada causada por un axente todavía descoñecido (probable retrovirus), e a trasmisión da enfermidade de berberechos afectados a sans, require o exhaustivo control dos movimentos larvarios entre zonas. Esta metodoloxía permitiría evaluar a potencial importación natural de larvas de rías con alta incidencia da patoloxía, e polo tanto probablemente transmisoras, a circunstancias oceanográficas, épocas e nivel de movemento larvario.

Participantes

No ámbito do Grupo de Acción Local Pesqueira (GALP) Costa Sostible participan no proxecto dúas entidades, a Confraría de Pescadores de Noia e a Confraría de Pescadores de Muros, principais entidades na extracción do berberecho, representando (no ano 2015) o 80,53% da produción do berberecho total de Galicia, cun valor de 10.958.090€ (81,71% do valor económico total de Galicia), sendo a confraría de Noia (que é a solicitante do proxecto) a principal entidade galega na explotación deste recurso. Estes datos manifestan a relevancia que para a ría de Muros-Noia significaría unha valorización do berberecho, a través dos resultados perseguidos neste proxecto. Pero aínda máis, o interese é colectivo para todas as entidades que fan extracción de berberecho, tal como proba que catro confrarías máis, pertencentes a catro GALP diferentes (Agrupación de Mariscadores Estuario do "Río Anllóns", Confraría de Pescadores de Barallobre, Confraría de Pescadores de Espasante, Confraría de Pescadores de Cabo de Cruz), tamén participan no proxecto sendo, a continuación de Muros-Noia, as de maior produción de berberecho, estando incluída nos cinco GALP participantes case a totalidade da produción de berberecho de Galicia (Fig. 1). Como asistencia técnica do proxecto participa o Laboratorio de Sistemática Molecular da Universidade de Santiago (LSM-USC).

Beneficiarios

Este proxecto conleva a análise da diversidade xenética e a súa partición xeográfica. Os resultados acadados por estas análises son de aplicación inmediata para asesorar na xestión sostible do recurso mariño. A aplicación dos datos da análises no etiquetaxe permite garantir a trazabilidade dos produtos presentes nos mercados, ofrecendo unha ampla información sobre a orixe, denominación e outros parámetros, aportándolle un valor engadido fronte a

outras especies ou poboacións procedentes doutras áreas xeográficas cuxa trazabilidade é dubidosa ou insuficiente. Por outro lado, a utilización de metodoloxías de análise de ADN permite incorporar unha novedosa tecnoloxía neste sector, abrindo o camiño a súa aplicación noutros eidos do cultivo e explotación do berberecho.



Figura 1.- Mapa de Galicia mostrando a situación das zonas de mostraxe de *C. edule* e confrarías participantes (Cabo de Cruz, Noia, Muros, Río Anllóns, Barallobre, Espasante).

Así, os beneficiario máis directos serían os/as mariscadores/as de toda Galicia que fagan extracción de berberecho *C. edule*, xa que o proceso de identificación xeográfica significaría unha valorización da produción que vai ligada á calidade intrínseca dun produto pesqueiro: tradicional, recollido con métodos artesanais, nun entorno mariño coidado e de alto valor

ambiental, cunha participación moi importante das mulleres na súa pesquería, que non só é extracción senon tamén traballos de limpeza da zona, control de depredadores e algas, redistribución da semente, … que son propias dun sistema de semicultivo. Esta valorización dun selo con garantía de orixe vai permitir evitar fraudes na etiquetaxe doutros produtos foráneos que compiten co galego sen ter ningún ou moitos dos atributos do noso, polo que se supón que habería unha valorización do mesmo se o consumidor sabe que non o están enganando.

Os seguintes beneficiarios serían todas as empresas de transformación do produto (conserveiras, especialmente), que valorizarán os seus produtos coa garantía de orixe e a calidade asociada. Froito desto, as zonas dependentes deste recurso (caso de Noia) se beneficiarían en xeral dos resultados do proxecto, xa que a actividade económica xerada polas vendas no berberecho tería grande impacto no resto dos sectores económicos da zona, convertíndose nun beneficiario colectivo.

O acceso aos resultados do proxecto van ser públicos e sen restricións, con difusión na páxina web do propio proxecto, nas revistas científicas especializadas, e noutros sistemas de promoción e difusión dos resultados que están definidos no apartado de difusión do proxecto.

Obxectivos

Obxectivos estratéxicos:

O proxecto enmárcase no Plan de Acción do GALP Costa Sostible como obxectivo estratéxico 1 (Sector Pesqueiro), dentro do punto:

1.1.- Fomento dun sector pesqueiro sostible ambientalmente, eficiente no uso dos recursos, innovador, competitivo e baseado no coñecemento. Enmárcase especialmente na liña de actuación:

1.1.2.- Valorización dos produtos da pesca local mediante o apoio á comercialización e presenza nos mercados dos produtos pesqueiros así como o potenciamento do valor engadido dos mesmos.

O grao de contribución deste proxecto á Estratexia de Desenvolvemento Local Participativo (EDLP) do GALP Costa Sostible, é alto, especialmente no aspecto da Responsabilidade Social Corporativa (RSC). Hai que ter en conta que o propio proxecto é unha actividade de

RSC en sí mesmo, xa que aínda que é unha iniciativa da Confraría de Noia, todos os resultados e a implementación dos mesmos (etiquetaxe con garantía de orixe, por exemplo), vanse facer públicos e poden ser utilizados por calquera entidade que teña actividade pesqueira ou transformadora do berberecho galego (*C. edule),* este beneficio pódese ampliar á toda a poboación, xa que todos somos consumidores e a identificación da orixe permite unha trazabilidade que garanta a calidade e a seguridade alimentaria.

Obxectivo xeral:

Dotar ao berberecho da costa galega (*C. edule*) dunha identidade propia e diferenciada no mercado como recurso sostible

Obxectivos económicos:

- Garantir a trazabilidade dos produtos etiquetados, valorizando este produto fronte á mesma ou especies de aspecto similar pero procedentes doutras áreas xeográficas;
- Favorecer o rendemento económico do berberecho como produto de calidade garantindo a súa trazabilidade xenética, xerando un valor engadido no mercado como produto procedente do marisqueo das confrarías galegas.

Obxectivos tecnolóxicos

- Desenvolver técnicas moleculares de vangarda que permitan a diferenciación xenética do berberecho (*Cerastoderma edule*), fronte á mesma ou especies similares presentes nos mercados nacionais e internacionais;
- Implementar novas tecnoloxías que permitan dispoñer de información, de cara ao consumidor final, sobre a procedencia e características do produto grazas á trazabilidade na etiquetaxe.

Obxectivos medioambientais

Potenciar a correcta xestión dos recursos propios evitando a introdución doutras especies que poidan afectar ás poboacións autóctonas, garantindo unha explotación sostible, responsable e continuada do berberecho como base importante da economía rexional.

Actividades

I.- Mostraxe do recurso

Xunto coa obtención de mostras representativas da especie obxectivo, especies relacionadas e produtos comerciais, esta actividade inclúe a documentación e almacenamento das mostras. Nesta tarefa fundamental involucrarase o persoal das confrarías participantes, baixo a coordinación da Confraría de Pescadores "San Bartolomé" de Noia. A súa preservación será en etanol, RNAlater e refrixeración/conxelación.

- Mostraxe de individuos de *Cerastoderma edule* do litoral galego: a mostraxe será semestral (marzo-abril e agosto-setembro), cun total de 4 mostraxes por cada zona de estudio no tempo de duración do proxecto. O tamaño medio será de N=25 individuos para cada zona de explotación (Fig. 1).
- Mostraxe de individuos de *Cerastoderma glaucum* do litoral galego: de forma similar o tamaño medio da mostraxe situarase en N=25 individuos para cada área de estudo, cun total de 4 mostraxes semestrais durante a duración do proxecto.
- Mostraxe de berberecho, *Cerastoderma* sp. de zoas de cultivo non galegas: incluirase unha mostraxe para a obtención dun total de 25-50 individuos das seguintes áreas xeográficas: Marrocos, Mediterráneo, Portugal, Francia, Irlanda, Reino Unido, Dinamarca e Holanda.
- Mostraxe de especies relacionadas potencialmente substitutivas: preténdese obter mostras de especies relacionadas con potencial comercial (Cardiidae).
- Mostraxe de produtos elaborados comerciais: estímase un número máximo de 50 mostras, en calquera formato de presentación ou elaboración, e representativas do mercado. Permitirá levar a cabo un screening do mercado a nivel global, facilitado polo comercio electrónico.

II.- Illamento de ADN total

O ADN total será illado a partir do manto mediante o uso do kit Mollusk DNA kit (Omega Biotek). No caso de produtos comerciais elaborados será utilizado o kit SpeedTools Food (Bio Tools). O ADN será cuantificado, caracterizado, codificado e arquivado a -20ºC, en tampón TE. Esta tarefa será levada a cabo por persoal do Laboratorio de Sistemática Molecular da USC (LSM-USC).

III.- Identificación poboacional baseada nas secuencias da rexión control do ADNmt

Esta tarefa inclúe a novidosa caracterización da ata hoxe descoñecida rexión controladora do ADNmt de *C. edule*. Este esforzo e requirido para dispoñer de información acerca dunha secuencia xeralmente hipervariable e con potencial para a diferenciación poboacional e interespecífico.

- Amplificación de longos fragmentos mitocondriais mediante "long-PCR" con cebadores universais: fragmentos mitocondriais >10Kpb serán xerados con Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Termofisher Sci.) para abarcar o xenoma mitocondrial de *C. edule*.
- Cloning, secuenciación e ensamblado de secuencias de ADNmt: os fragmentos serán clonados e secuenciados nunha plataforma Illumina.
- Deseño de cebadores específicos para a amplificación da rexión control e secuenciación: os datos de secuenciación permitirán o deseño de cebadores dirixidos á obtención das mostras poboacionais mediante secuenciación Sanger (BidDye, Termofisher Sci.).
- Análise comparativo dos haplotipos detectados nas áreas en estudo: a distribución xeográfica dos haplotipos obtidos será avaliada para determinar a posibilidades da existencia de haplotipos privados de poboacións e a conseguinte definición dun marcador de orixe xeográfica.

IV.- Identificación e análise de SNPs en *C. edule* para a autentificación do recurso

Esta tarefa busca a detección de posibles polimorfismos específicos das poboacións consideradas. Implica a obtención de datos xenómicos. A metodoloxía de elección para a xeración de librerias representativas do berberecho do litoral galego e doutras costas basearase no uso de metodoloxías de RAD-Seq e secuenciación na plataforma Illumina.

- Preparación de librerías: inclúe a dixestión enzimática do ADN; reparación dos extremos e selección do tamaño da librería; adenilación dos extremos 3'; ligación dos adaptadores e normalización e combinación das librerías con TruSeq® DNA PCR-Free LT Sample Preparation Kit (Illumina).
- Validación das librerias: as librerías serán cuantificadas por PCR a tempo real con KAPA Library Quantification Kit; a calidade avaliada mediante electroforese, e preparadas para a secuenciación.

- A secuenciación das librerias: despois da xeración automática dos clusters, a secuenciación levarase a cabo nun servicio de secuenciación externo usando os reactivos MiSeq v3 de 600 ciclos incluíndo o uso de PhiX ao 5%, ca configuración 2x300pb paired-end.
- Análise bioinformática dos datos xerados.

V.- Análise do microbioma de *C. edule* con fins de autentificación do recurso

Esta novidosa aproximación basease na obtención do microbioma asociado especificamente as poboacións galegas de *C. edule*. Procurarase así a presenza de microorganismos a utilizar como marcadores para a autentificación do recurso.

- Illamento de ADN total e obtención de amplicóns: a partir da microbiota presente nos tecidos do berberecho, de poboacións galegas e foráneas, obteránse os amplicóns 16S. Organismos non bacterianos serán detectados con cebadores dirixidos ao operón ribosomal.
- Construción de librerías: incorporaránse os índices requeridos co uso dos kits Nextera XT index, e preparación das librerías mediante o uso de Nextera XT Sample Prep Kit.
- Secuenciación: farase a secuenciación nunha plataforma Illumina, nas condicións descritas para a tarefa IV.
- Análise bioinformática dos datos xerados: ademais do software Geneious, diversos paquetes estándar van ser utilizados para os procesos de edición, mentres que para os procesos de ensamblaxe utilizaránse Newbker, Velve, IDBAt, ABySS e SOAP e a colección de ferramentas de Galaxy.org.
- Avaliación da capacidade discriminatoria dos OTUs detectados: o proceso de organización das secuencias obtidas en grupos específicos de especies o especies relacionadas (binning) é abordable cos programas PhymmBL e MetaCLuster e a inferencia filoxénetica con RaxML. A continuación evaluarase a presenza específica e prevalencia dos OTUs relacionados nas áreas galegas e foráneas.
- Detección de taxa con capacidade discriminatoria: a posible detección de taxa diagnóstico da área no berberecho das costas galegas implicará o deseño, avaliación e implementación dun sistema específico de PCR a tempo real, para a súa rápida e directa detección, e baseado en Power SYBRGreen e Taqman Master Mix (Termofisher Sci.).

VI.- Definición dun método que verifique a trazabilidade do berberecho das Rías Galegas

As tarefas III, IV e V son independentes e constituen vías alternativas dirixidas a descubrir un marcador biolóxico específico do berberecho das costas galegas. Os resultados acadados polas devanditas tarefas determinarán a viabilidade e resolución dun método de autentificación do berberecho galego.

Para a súa implementación nun marco de trazabilidade do recurso, a metodoloxía baséase preferentemente nun sistema económico, eficiente e eficaz de análise por PCR a tempo real, Power SYBRGreen/Taqman Master Mix (Termofisher Sci.), dunha mostra problema. A avaliación do sistema incluirá o análise cego de mostras de orixen conocido (N<100) e un screening de produtos comerciais de múltiples orixes (N<100).

VII.- Monitorización da presenza de gametos e etapas larvarias no medio mariño

Esta tarefa está dirixida á detección é cuantificación de etapas larvarias e gametos de *C. edule* na columna de auga. Inclúe:

- Deseño e proba de sistemas específicos: para a detección de *C.edule* baseados en PCR a tempo real con química SYBR e TaqMan (Termofisher Sci.) e dirixidos a xenes mitocondriais (16S e RC), previamente analizado o seu polimorfismo nunha mostra das poboacións consideradas mediante secuenciación Sanger (BigDye de Termofisher Sci.).

- Avaliación dos sistemas con mostras experimentáis e do medio natural.

- Monitorización do medio mariño: a modo de prototipo, levarase a cabo un seguimento anual con 2 mostras/mes en 3 estacións de mostraxe ubicadas na ría de Muros-Noia. Inclúe a tarefa de mostraxe, illamento do ADN total planctónico, e o seu ensayo por qPCR con Power SYBRGreen e Taqman Master Mix (Termofisher Sci.).

VIII.- Difusión das actividades, resultados, conclusións e actuacións

A difusión tanto das actividades a desenvolver como dos resultados acadados é unha tarefa fundamental dado o obxectivo de diferenciación, valorización e publicidade do recurso. Polo tanto lévaránse a cabo iniciativas que comprenderán: a publicidade en medios de comunicación, material divulgativo (pósters, folletos, exposición itinerante), participación en Congresos/Foros, xornada de difusión de resultados, e sitio web adicado ao proxecto.

Resultados previstos

1. Obtención dun marcador identificativo da orixe xeográfica do berberecho galego (*Cerastoderma edule*), mediante estudos de xenética poboacional, xenómica e microbioma.

Esto vai permitir a autentificación da orixe xeográfica, nun marco de trazabilidade e valorización do recurso, que se materialice nunha etiquetaxe que garanta a orixe xeneticamente certificada. Permitindo tamén un control do fraude no berberecho transformado e que leve indicacións de orixe xeográfica.

2. Monitorización da presenza de estadios larvarios de *C. edule* na columna de auga.

Estes son datos moi valiosos para a xestión do recurso e a súa sostibilidade, permitindo a visualización da dinámica do reclutamento e das poboacións, adiantando as previsións no tempo e aportando capacidade de manobra para a planificación da seguinte campaña de marisqueo.

3. Implementación dos resultados na trazabilidade alimentaria e a xestión sostible do recurso.

Permitirán facer un deseño das aplicacións dos resultados de identificación na etiquetaxe do produto aportando a garantía de orixe, así como a utilización da cuantificación larvaria no plan de manexo e a xestión sostible do recurso.

Impacto sobre o territorio: económico, social e medioambiental

- Económico:
  - Valorización do produto fronte a outras especies de aspecto similar procedentes doutras áreas xeográficas, mediante a súa trazabilidade e etiquetado;
  - Xeración dun valor engadido no mercado, como produto de calidade, ao garantir a procedencia de zonas de marisqueo galegas;
  - Creación de novos negocios en relación coa transformación ou explotación dun produto de calidade cunha garantía de orixe que aumenta a confianza do consumidor.

- Social:
  - Aumentar a confianza do consumidor ao dispoñer de información de interese sobre a procedencia e características do produto mercado, grazas á trazabilidade na etiquetaxe a través das novas tecnoloxías TIC;

- ◊ Elevación da autoestima da poboación ao manter unha actividade tradicional, sostible e respetuosa co medio;
- ◊ A valorización do berberecho derivada da súa trazabilidade, e o incremento económico que supón, aumentará a calidade de vida das poboacións pesqueiras locais e rexionais, así como a do resto da poboación;
- ◊ Potenciación da vertebración social no territorio a través da cooperación entre cinco GALP e seis confrarías, no marco do proxecto.

❖ Medioambiental:

- ◊ Detección de especies ou haplotipos non autóctonos nas áreas de explotación do berberecho local, evitándose así a introdución doutras especies que poidan afectar ás poboacións autóctonas (importacións de enfermidades que poden acabar co recurso, tal como está sucedendo en moitas rías de Galicia);
- ◊ Análise da diversidade xenética e a súa partición xeográfica para o asesoramento na xestión sostible do recurso mariño, garantindo unha explotación sostible, responsable e continuada do berberecho como base importante da economía local e rexional galega;
- ◊ Defensa dunha actividade económica moi ligada á boa situación medioambiental do territorio, especialmente na zona litoral, e moi preocupada pola conservación do medio e dos espazos naturais protexidos nos que se desenvolve parte da súa actividade pesqueira.

Agradecementos

Proxecto financiado polas axudas autonómicas 2016 (Xunta de Galicia) ao abeiro das estratexias de desesenvolvemento local participativas (GALP4-011).

Bibliografía

Carballal M.J., Iglesias D., Santamarina J., Ferro-Soto B. & Villalba A. 2001. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2): 87–97.

Krakau M., Jacobsen S., Jensen K.T. & Reise K. 2012. The cockle *Cerastoderma edule* at Northeast Atlantic shores: Genetic signatures of glacial refugia. *Marine Biology*, 159(1): 221–230.

Martínez L., Méndez J., Insua A., Arias-Pérez A. & Freire R. 2013. Genetic diversity and population differentiation in the cockle *Cerastoderma edule* estimated by microsatellite markers. *Helgoland Marine Research*, 67(1): 179–189.

Quinteiro J., Pérez-Dieguez L., Sánchez A., Pérez-Martín R.I., Sotelo C.G. & Rey-Méndez M. 2011. Quantification of Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) larvae, based on SYBR Green real-time PCR. *Journal of Shellfish Research*, 30(3): 791-796.

Quinteiro J., Santaclara F.J. & Rehbein H. 2008. Authenticity of Canned Seafood. In: *Quality Parameters in Canned Seafoods*. Cabado A.G. & Vieites J.M. eds., pp. 135-158. Nova Science Publishers, Inc, New York.

Sánchez A., Quinteiro J., Rey-Méndez M., Perez-Martín R.I. & Sotelo C.G. 2014. Identification and quantification of two species of oyster larvae using real time PCR. *Aquatic Living Resources*, 27(3-4): 135-145.

Villalba A., Iglesias D., Ramilo A., Darriba S., Parada J.M., No E., Abollo E., Molares J. & Carballal M.J. 2014. Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochilli*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 109(1): 55–80.

VALORIZACIÓN DO BERBERECHO *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) DA COSTA GALEGA, MEDIANTE UN MARCADOR DE IDENTIDADE DA SÚA ORIXE XEOGRÁFICA.

VALOBER.GAL

Javier Quinteiro e Manuel Rey-Méndez

Laboratorio de Sistemática Molecular. Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular. CIBUS. Campus Vida. Universidade de Santiago de Compostela.

Proxecto presentado ás axudas autonómicas 2016 ao abeiro das estratexias de desenvolvemento local participativas

Este proxecto está dirixido ao desenvolvemento e aplicación de técnicas moleculares que permitan a identificación e autenticación do berberecho, *Cerastoderma edule*, fronte a outras especies foráneas presentes nos mercados. O desenvolvemento de marcadores xenéticos que posibiliten diferenciar poboacións e especies taxonómicamente similares, permitirá resaltar o valor engadido do *berberecho C. edule*, baseado na calidade deste recurso mariño local a través dunha figura de calidade asociada a súa orixe xeográfica.

Obxectivo Xeral do Proxecto

Dotar ao berberecho da costa galega dunha identidade propia e diferenciada no mercado como recurso sostible



Actividades

- Enmárcase no Plan de Acción do GALP Costa Sostible dentro do obxectivo estratéxico **1 (Sector Pesqueiro)**, especialmente co punto **1.1.- Fomento dun sector pesqueiro sostible ambientalmente, eficiente no uso dos recursos, innovador, competitivo e baseado no coñecemento**.
- Enmárcase especialmente na liña de actuación:
- **1.1.2.- Valorización dos produtos da pesca local mediante o apoio á comercialización e presenza nos mercados dos produtos pesqueiros así como o potenciamento do valor engadido dos mesmos.**

Obxectivos

Obxectivos económicos:

- Garantir a trazabilidade dos produtos etiquetados, valorizando este produto fronte a outras especies de aspecto similar procedentes doutras áreas xeográficas.
- Favorecer o rendemento económico do berberecho como produto de calidade garantindo a súa trazabilidade xenética, xerando un valor engadido no mercado como produto procedente do marisqueo das confrarías galegas.

Obxectivos tecnolóxicos

- Desenvolver técnicas moleculares de vangarda que permitan a diferenciación xenética do berberecho (*Cerastoderma edule*) fronte a outras especies presentes nos mercados nacionais e internacionais.
- Implementar novas tecnoloxías que permitan dispoñer de información de cara ao consumidor final sobre a procedencia e características do produto comprado grazas á trazabilidade na etiquetaxe.

Obxectivos medioambientais

- Potenciar a correcta xestión dos recursos propios evitando a introdución doutras especies que poidan afectar ás poboacións autóctonas, garantindo unha explotación sostible, responsable e continuada do berberecho como base importante da economía rexional.

Participantes

Solicitante: Confraría de Noia

Colaboran: Confraría de pescadores de Muros,

Agrupación de Mariscadores "Río Anllóns",

Confraría de Pescadores de Barallobre,

Confraría de Pescadores de Espasante,

Confraría de Pescadores de Cabo de Cruz.

Asistencia técnica: Laboratorio de Sistemática Molecular. Dpto. de Bioquímica e Bioloxía Molecular. USC

Contribución do proxecto á Estratexia de Desenvolvemento Local Participativo (EDLP)

O grao de contribución deste proxecto á EDLP do GALP Costa Sostible, é ALTO, especialmente no aspecto da **Responsabilidade Social Corporativa** (RSC). Hai que ter en conta que o propio proxecto é unha actividade de RSC en si mesmo, xa que aínda que unha iniciativa da Confraría de Noia, todos os resultados e a implementación dos mesmos (etiquetaxe con garantía de orixe, por exemplo), vanse facer públicos e poden ser utilizados por calquera entidade que teña actividade pesqueira ou transformadora do berberecho *C. edule*, este beneficio se pode ampliar á toda poboación, xa que todos somos consumidores e a garantía de orixe permite unha trazabilidade que garanta a calidade e a seguridade alimentaria



Mostraxe do recurso e illamento do ADN



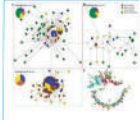
a) Mostraxe de individuos de *Cerastoderma edule* do litoral galego.

b) Mostraxe de individuos de *Cerastoderma glaucum* do litoral galego.

c) Mostraxe de berberecho, *Cerastoderma* sp. de zoas de cultivo non galegas.

d) Mostraxe de especies relacionadas potencialmente substitutivas.

Caracterizacion xenética de poboacións e especies



Caracterización de marcadores mitocondriais e nucleares con capacidade de diagnóstico da orixe xeográfica

Análise do microbioma



Evaluación da capacidade diferenciadora da microbiota asociada ao berberecho mediante metodoloxías de NGS

Implementación de métodos de trazabilidade e detección larvaria



Os datos xenéticos xerados estarán destinados a implementarse nun sistema de:

Trazabilidade da orixe xeográfica

Detección e cuantificación de etapas larvarias na columna de auga

galicia

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MAR

União Europea
Fondo Europeo Marítimo y de Pesca (FEMP)

ÍNDICE DE AUTORES

Alamrousi A. 227

Alborés Blanes I. 363, 373

Alfaya Massó J. 173

Alonso Pozas C. 127, 151

Álvarez Molina P.A. 151

Andrés C. 235

Arregui L. 341

Balón-Lainez K. 287, 403

Buján M. 179

Carragal R. 235

Casais E. 227, 235

Catoira Gómez J.L. 261, 345, 363, 373

Chapela M.J. 331, 341

Chavarría-Viteri J. 287, 403

Cid E. 235

Cobo F. 17

Cornejo M.H. 287, 403

Couce A. 227

Cremades J. 227

da Costa F. 235

de Santiago Meijide J.A. 33

Elkhalfi B. 307

Escalante González J.L. 43

Fernández Álvarez C. 297, 435

Fernández Barreiro J.A. 145

Fernández C. 357, 443

Fernández J. 331

Fernández Pérez J.D. 123

Fernández Rodríguez L. 363, 373

Ferreira M. 331, 341

Figueira I. 235

Flores-Suárez D. 287, 403

Freites L. 391

García del Campo M. 173

García Diez C. 383

Garrido Maestú A. 331, 341

González P. 235

González-Henríquez N. 287, 403

Hdia J. 307

Jormil R. 217

Laghriab M 307

Lama-López R. 383

Lamas A. 275

Lastres M. 235

Lodeiros C. 217, 317, 391, 423

Lodeiros-Chacón C. 391

Loor A. 217, 423

López A. 235

Macho G. 29

Mariño Balsa C. 177

Márquez A. 217, 317, 391, 423

Martínez A. 383

Martínez-Patiño D. 235, 261, 345, 415

Martín-Varela I. 331

Medialdea M. 81

Medina-Alcaraz C. 403

Melena-Cevallos J. 287, 403

Méndez J. 261

Nerlović V. 203

No E. 261

Novoa González A. 105

Nóvoa S. 235, 415

Ojea J. 261, 345, 415

Oñate D. 403

Ortega A. 91

Potel I. 235

Quinteiro J. 203, 275, 287, 307, 403, 449

Rengel S. 99

Revilla J. 317, 391, 423

Rey-Méndez M. 203, 275, 307, 449

Rodríguez D. 423

Rodríguez-Castro J. 307

Rodríguez-Pesantes D. 317, 391

Rodríguez-Pozo J. 287, 403

Ruiz-Cruz A. 331

Saltos Rosero N. 383

Sánchez Sánchez C. 185

Sánchez-Aréval A.R. 383

Santos Y. 297, 383, 435

Sarmiento-Herrero R. 403

Seoane P. 261, 345

Sonnenholzner S. 65, 217, 317, 391, 423

Soukri A. 307

Suárez Santos J.M. 363, 373

Temperán C. 109

Tomalá-Reyes S. 287, 403

Torres Corral Y. 297, 435

Vallejo O. 357, 443

Varela C. 341

Villón J.J. 287, 403

Viñuela Rodríguez J.A. 165