



Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (CIMA)

Cultivo de almejas en criadero. Experiencias con la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850) y la almeja fina (*Ruditapes decussatus* Linnaeus, 1758)

Manuel Caeiro Aguado

Trabajo de Fin de Máster

Febrero, 2017



Máster Oficial en Acuicultura
UDC/USC/UVIGO

Las Dras. Dorotea Martínez Patiño y Susana Nóvoa Vázquez, directora e investigadora, respectivamente, del Centro de Investigacións Mariñas (CIMA), dependiente de la Consellería do Mar de la Xunta de Galicia, y tutoras del alumno **Manuel Caeiro Aguado**.

Informan:

Que el trabajo Fin de Máster titulado: "**Cultivo de almejas en criadero. Experiencias con la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850) y la almeja fina (*Ruditapes decussatus* Linnaeus, 1758)**", ha sido realizado bajo la dirección de la Dras. Dorotea Martínez Patiño y Susana Nóvoa Vázquez, en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (CIMA).

Y para que así conste a los efectos oportunos, hallándose concluido el trabajo, autorizamos su presentación ante el tribunal correspondiente.

En Ribadeo, 26 de Enero de 2017.

Fdo: Dorotea Martínez Patiño

Fdo: Susana Nóvoa Vázquez

RESUMEN

La producción de almeja constituye un sector económico de elevadas posibilidades en el litoral español, especialmente en Galicia, comunidad donde está concentrada la mayor parte del cultivo de este molusco bivalvo. El presente trabajo tiene por objetivo estudiar cómo evolucionan la talla, el peso (fresco y seco) y la mortalidad de dos de los veneridos más comercializados en la comunidad gallega, la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850) y la almeja fina (*Ruditapes decussatus*, Linnaeus, 1758). Ambas especies fueron cultivadas mediante dos sistemas diferentes: sistema abierto, con un aporte continuo de fitoplancton y agua, y sistema cerrado, donde se proporciona una única ración diaria de alimento. Además, se realiza el seguimiento de un cultivo larvario de *R. philippinarum* a fin de estimar el tiempo de aparición de cada una de las etapas que componen dicho estadio de desarrollo. Los resultados obtenidos mostraron los mayores crecimientos en la almeja fina al ser cultivada esta en sistema abierto, mientras que para la almeja japonesa dichos valores se alcanzan con el sistema cerrado. El cultivo larvario de almeja japonesa determinó el inicio de su fase de larva D al segundo día posterior a la puesta, la etapa umbonada a los 6-7 días, la larva pediveliger a partir de 17-18 días y la postlarva entre los días 24-25.

ABSTRACT

Clam production is an economic sector of high potential in the Spanish coast, especially in Galicia, where most of the culture of this bivalve mollusk is concentrated. The objective of this work is to study the evolution of the size, the weight (fresh and dry) and the mortality of two of the most traded venerids in the Galician community, the Manila clam (*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850) and the grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus* Linnaeus, 1758). Both species were cultivated by two different systems: an open system, with a continuous supply of phytoplankton and water, and a closed system, where a single daily ration of food is provided. Moreover, a larval culture of *R. philippinarum* is monitored in order to estimate the time of appearance of each of the phases that make up this stage of development. The results obtained showed the highest growth in the grooved carpet shell when it is cultivated in the open system, while for the Manila clam, these values are reached with the closed system. Manila clam's larval culture determined its beginning on the second day after laying with the D-stage, developing later the umbonate stage at 6-7 days, the pediveliger larvae from 17-18 days and postlarvas between 24-25 days.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Objetivos.....	7
3. Material y métodos	8
3.1. Seguimiento de un cultivo larvario de almeja japonesa	8
3.1.1. Origen de los progenitores	8
3.1.2. Estabulación de las larvas	8
3.1.3. Visionado al microscopio óptico	9
3.2. Pruebas con sistemas de cultivo de semilla	10
3.2.1. Origen de los progenitores	10
3.2.2. Estabulación y control inicial de la semilla	10
3.2.3. Sistemas de cultivo empleados	12
3.2.4. Controles y medida de parámetros	13
3.2.5. Análisis estadístico	16
3.3. Cultivo de fitoplancton	17
4. Resultados	19
4.1. Seguimiento de un cultivo larvario de almeja japonesa	19
4.2. Pruebas con sistemas de cultivo de semilla	22
4.2.1. Prueba 1: Cultivo de almeja fina y almeja japonesa	22
4.2.2. Prueba 2: Cultivo de almeja japonesa	25
5. Discusión	29
5.1. Seguimiento de un cultivo larvario de almeja japonesa	29
5.2. Pruebas con sistemas de cultivo de semilla	31
6. Conclusiones	33
7. Referencias bibliográficas	34

1. INTRODUCCIÓN

La almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), y la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), son dos moluscos bivalvos micrófagos pertenecientes a la familia Veneridae cuya dieta se compone principalmente de fitoplancton y partículas orgánicas presentes en el agua. Se trata de organismos filtradores bentónicos infaunales que viven enterrados en sustratos de arena y comparten hábitat. Ocupan preferentemente la zona intermareal, aunque existen también bancos submareales (JACUMAR, 2012).

Estas especies son euritermas (10-30°C, óptimo a 20-22°C) y eurihalinas (10-50‰, óptimo a 25-35‰), variando los umbrales según la situación geográfica. Presentan, además, una gran resistencia a la emersión, propiedad que les permite permanecer hasta varios días fuera del agua y soportar descensos ocasionales de salinidad de hasta el 0‰ (Drummond *et al.*, 2006; FAO, 2005; Tezuka *et al.*, 2013). La especie que mejor soporta estas bajadas de salinidad y los periodos de desecación es la almeja fina, motivo por el cual presenta un mayor valor de mercado al durar más tiempo su ciclo de comercialización (JACUMAR, 2010; Ojea, 2013). Otros parámetros que determinan el desarrollo de ambas especies son el fotoperiodo, la cantidad de oxígeno disuelto en el agua y la alimentación; esta última, junto con la temperatura, representan los dos factores de mayor influencia sobre los procesos biológicos de las especies objeto de estudio (Aranda-Burgos *et al.*, 2014; Helm *et al.*, 2006; Jara-Jara *et al.*, 1997; Munari *et al.*, 2011).

En cuanto a su distribución, *R. decussatus* se extiende desde Noruega hasta Senegal y desde las Azores, a través del Atlántico y del Mediterráneo, hasta el Canal de Suez y el Mar Rojo. Esta especie se cultiva principalmente en Francia, España, Portugal y la cuenca del Mediterráneo, especialmente en Túnez (Figura 1). Por su parte, *R. philippinarum* es originaria de Japón, con una amplia distribución en los Océanos Índico y Pacífico, desde Pakistán hasta las Islas Kuril. Además, ha sido introducida a lo largo de la costa del Pacífico de Norteamérica, las islas de Hawái y la costa europea, desde el Reino Unido hasta la cuenca mediterránea. Al igual que la almeja fina, presenta un gran potencial de producción en Europa, en países como Italia, Francia o Irlanda; sin embargo, su cultivo se concentra fundamentalmente en China, siendo Estados Unidos y Japón otros países importantes en su obtención (Figura 1) (FAO, 2005; JACUMAR, 2010; 2012).

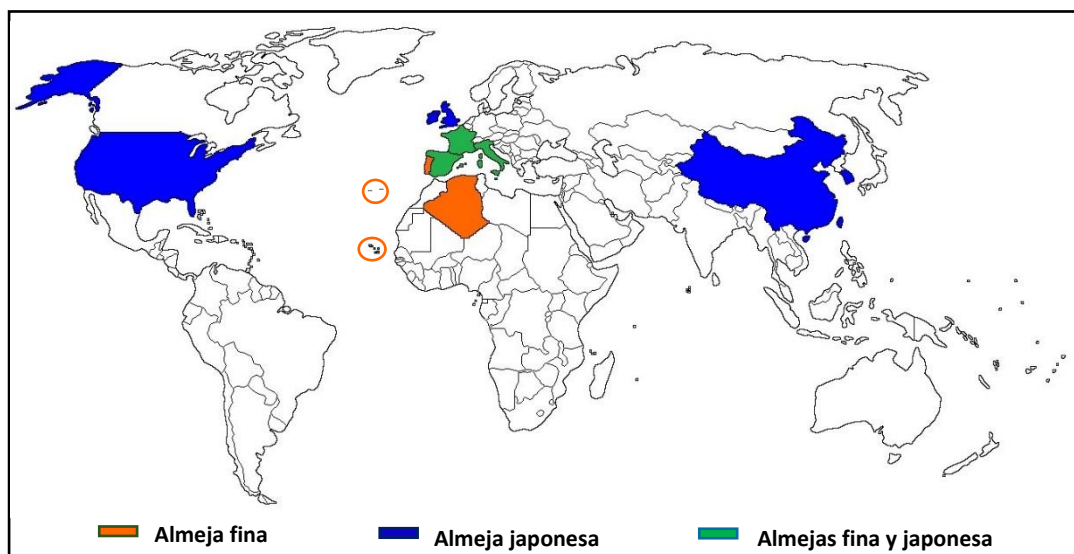


Figura 1: Principales países productores de almeja fina (naranja), almeja japonesa (azul) o ambas especies (verde). Datos obtenidos de las Estadísticas de Pesca de la FAO.

En lo referente a su anatomía, las almejas presentan una concha de naturaleza calcárea formada por dos valvas convexas y más o menos ovaladas, una superficie externa de color variable y un relieve marcado por estrías transversales y concéntricas. Las valvas son simétricas, están unidas entre sí dorsalmente por el ligamento, de cuya elasticidad depende la apertura de la concha, y se articulan gracias a la charnela o umbo.

La superficie interna de la concha está cubierta por un tegumento denominado manto, cuyos bordes están libres en la región anterior para dejar paso al pie, un órgano musculoso que les sirve tanto para desplazarse sobre el fondo como para enterrarse en él, pero soldados en la región posterior formando los sifones, dos prolongaciones tubulares retráctiles recubiertas de numerosos tentáculos en su extremo (Cerviño-Otero, 2011; Ojea, 2013; Pérez-Camacho, 1991; Ruiz-Azcona, 2013). A través del sifón inhalante ingieren agua y alimento, siendo el sifón exhalante el encargado de expulsar, además de los productos sexuales, los restos de desecho en forma de pseudoheces (Pérez-Camacho, 1991). Las principales diferencias anatómicas entre las dos especies objeto de estudio aparecen recogidas en la Tabla I y la Figura 2.

Tabla 1: Principales diferencias anatómicas entre la almeja fina y la almeja japonesa. Elaborado a partir de FAO (2005), Helm *et al.* (2006), JACUMAR (2012), Pérez-Camacho (1991), Polanco *et al.* (2000) y Ruiz-Azcona (2013).

		<i>Ruditapes decussatus</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>
Concha	Estrías de la superficie externa	Poco profundas	Muy pronunciadas
	Área de inserción del ligamento	Asimétrica e inexistente en la valva derecha	Asimétrica y visible en ambas valvas
Sifones	Características	Largos y separados desde la base	Soldados en sus tres cuartas partes
	Extremo del sifón inhalante	Doble fila de tentáculos	Tres filas de tentáculos

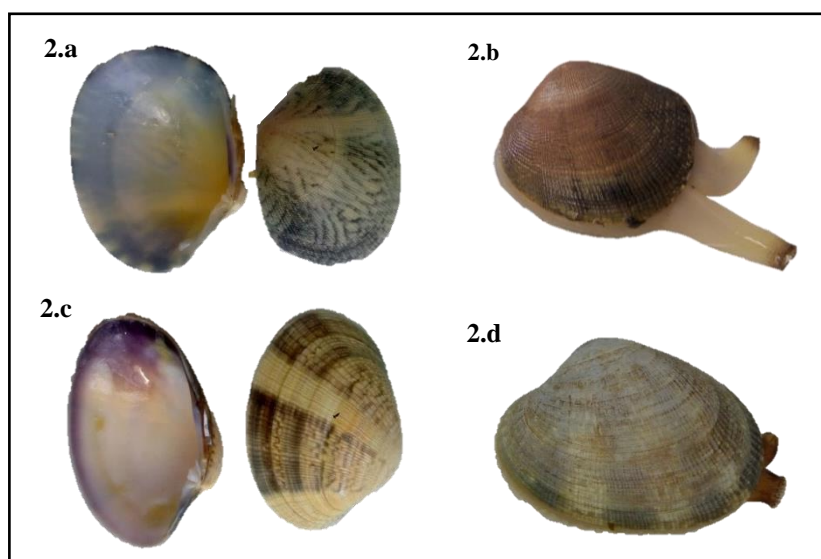


Figura 2: Principales diferencias anatómicas entre las almejas fina (2.a-b) y japonesa (2.c-d); superficie interna y externa de la concha (2.a y 2.c) y tipo de sifones (2.b y 2.d).

Ambas especies son unisexuales con un ciclo reproductor anual, fecundación externa y ausencia de dimorfismo sexual. El período de desove es estacional y en Galicia se concentra principalmente en los meses de mayo y agosto para la almeja fina (Ojea *et al.*, 2002; 2004; Rodríguez-Moscoso & Arnaiz, 1998), pudiendo prolongarse en el caso de la almeja japonesa hasta octubre (Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1992; Ruiz-Azcona, 2013). El desarrollo larvario es indirecto y da comienzo con la aparición de la fase de larva D, estadio formado posteriormente a la larva trocófora (Figura 3). Esta etapa larvaria está formada por fases en las que se alternan periodos de natación, para los que se valen del velo, con otras en las que se arrastran por el fondo sirviéndose del pie y buscan un sustrato adecuado para fijarse y sufrir la metamorfosis, fase crítica del proceso

(Helm *et al.*, 2006; Ojea, 2013; Ruiz-Azcona, 2013). La duración de este periodo está condicionada por factores ambientales y nutricionales (da Costa *et al.*, 2012; Polanco *et al.*, 2000; Ruiz-Azcona, 2013; Yan *et al.*, 2009).

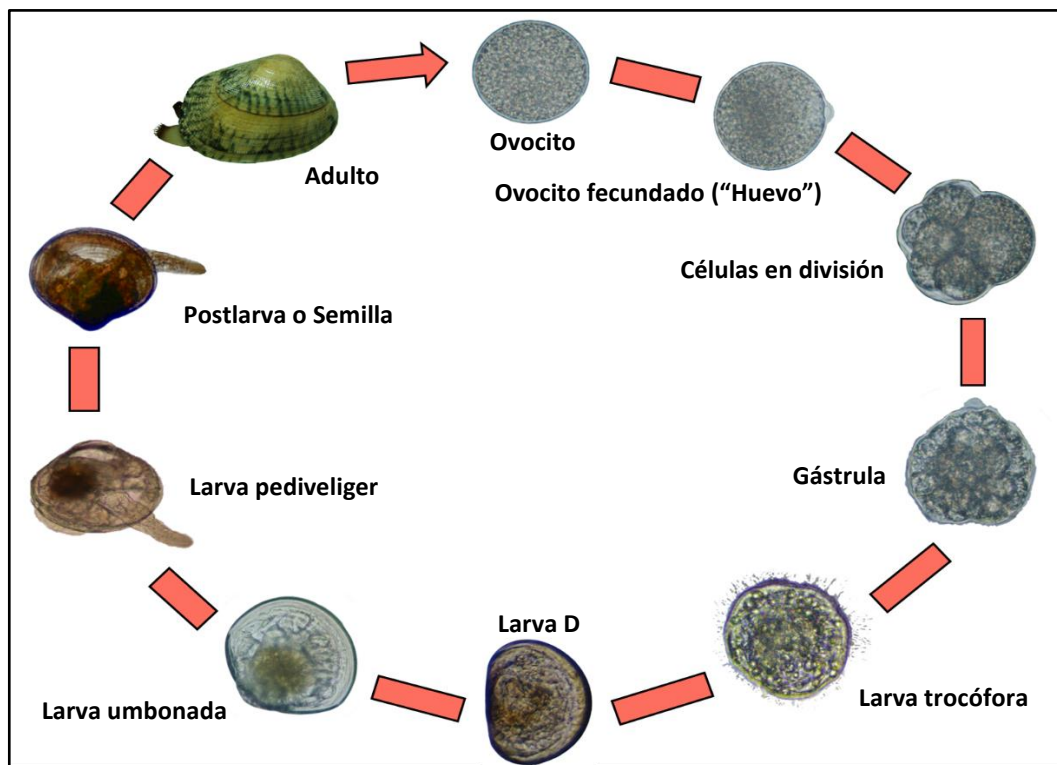


Figura 3: Esquema general del ciclo de vida de una almeja. Elaborado a partir de fotografías cedidas por el Centro de Cultivos Marinos (CIMA) de Ribadeo.

La comunidad gallega concentra la mayor parte del cultivo de estos venéridos debido a sus condiciones climáticas y oceanográficas, variando su producción anual de unas especies a otras (APROMAR, 2016; Aranguren *et al.*, 2014; García-Fernández *et al.*, 2003; Pérez-Camacho, 2007). La Figura 4 muestra las fluctuaciones que ha experimentado la producción y el precio de las tres especies de venéridos más cultivadas en Galicia durante los años 2004-2015 (almejas fina, japonesa y babosa). Con respecto a la almeja japonesa, su producción se dispara a partir del 2007, siendo el incremento en las almejas fina y babosa menos significativo. En los últimos 3 años registrados, existe una marcada tendencia descendente en la producción de almeja fina, hecho que no ocurre en las dos especies restantes, las cuales no muestran un patrón tan claro y cuyas variaciones de producción parecen ir de la mano. El declive producido en la cría de almeja fina se ha visto compensado mayoritariamente por un incremento en la producción de almeja japonesa, siendo su valor medio de mercado (22 €/kg) mayor que en las otras dos especies estudiadas (12,5 €/kg en la almeja babosa y 7 €/kg en la almeja japonesa).

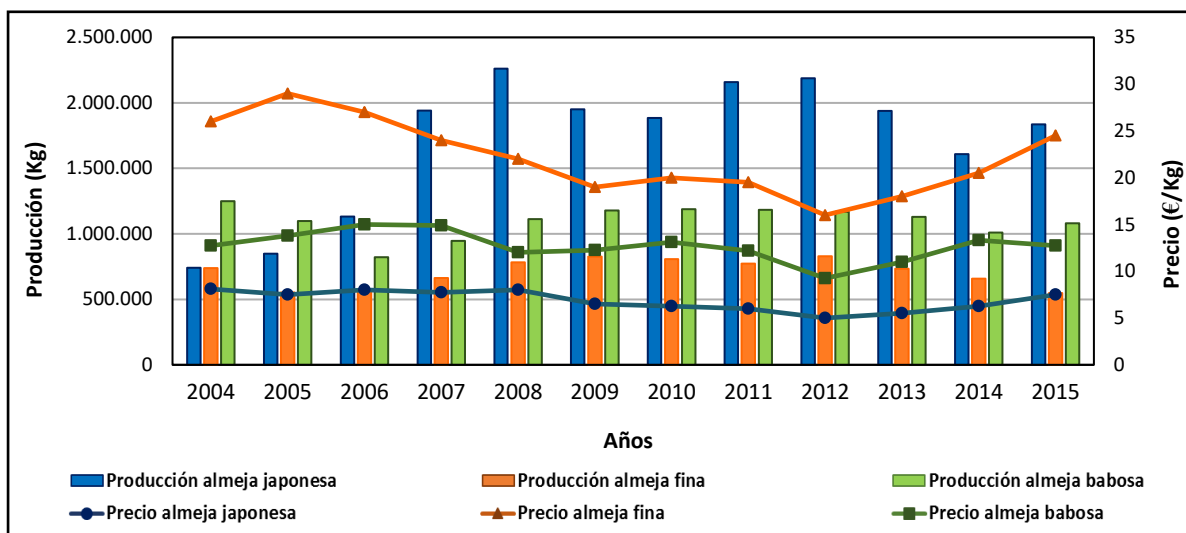


Figura 4: Evolución de la producción (Kg, barras) y el precio en lonja (€/kg, líneas) de las almejas japonesa, fina y babosa entre los años 2004 y 2015. Datos obtenidos de la Plataforma Tecnológica de Pesca; en www.pescadegalicia.gal.

La producción de semilla en criaderos representa una alternativa para tratar de solventar la posible falta de reclutamientos naturales. Otras ventajas de estos recintos son su fiabilidad y la posibilidad de obtener una semilla con unas características concretas. El cultivo de las almejas en un criadero comienza con la recogida y traslado de los progenitores procedentes del medio natural y su posterior acondicionamiento, en el caso de ejemplares que se encuentran fuera de su época de desove, y la inducción a la puesta, con los individuos maduros. El proceso de acondicionamiento consiste en la estabulación de los reproductores bajo unas condiciones de temperatura, alimentación y fotoperiodo específicas a fin de conseguir su maduración sexual fuera de la época natural. Los individuos maduros serán utilizados para inducir la puesta (puede producirse también de manera espontánea) y obtener desoves con los que realizar la fecundación e iniciar el cultivo larvario. Esta etapa finaliza con la fijación y la metamorfosis de las larvas, momento tras el cual los individuos presentan el mismo aspecto externo que un ejemplar adulto, comenzando así el cultivo postlarvario. Inicialmente las postlarvas quedan retenidas en tamices de 300 μm y su cultivo se prolonga hasta que alcanzan una talla de 1,7 mm (tamiz de 1.000 μm). En este momento se inicia el cultivo de la semilla, el cual se prolongará hasta que esta presente un tamaño adecuado para su preengorde en el medio natural (12-15 mm); hasta alcanzar una talla de 3-4 mm las semillas permanecen en el criadero, en el caso del CIMA de Ribadeo en la batea. El cultivo finaliza con el engorde de la semilla en el medio natural hasta alcanzar la talla comercial (40 mm) (Martínez-Patiño, 2013). Los cultivos pueden llevarse a cabo tanto en sistemas abiertos como cerrados. En el primero de los casos, se añade agua y alimento al tanque de manera continua,

mientras que en el sistema cerrado el volumen de agua se renueva dos o tres veces por semana y se proporciona una única ración diaria de alimento.

El Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA), dependiente de la Consellería do Mar, representa uno de los primeros criaderos dedicados al cultivo de moluscos bivalvos. En él se realiza una investigación orientada y aplicada, cuya finalidad es lograr la gestión racional y eficaz de los recursos marinos renovables en el ámbito geográfico dependiente de la Comunidad Autónoma de Galicia. Además de las almejas fina y japonesa, son muchas otras las especies que han sido cultivadas en este Centro: almeja babosa (*Venerupis corrugata* Gmelin, 1791), almeja rubia (*V. romboides* Pennant, 1777), coquina (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758), longueirón (*Ensis magnus* Schumacher, 1817), navaja (*E. siliqua* Linnaeus, 1758), longueirón vello (*Solen marginatus* Pulteney, 1799), erizo de mar (*Paracentrotus lividus* Lamarck, 1816) y erizo aguado (*Echinus esculentus* Linnaeus, 1758). El cultivo de almejas se desarrolla desde las primeras fases (acondicionamiento), hasta alcanzar las tallas adecuadas para su traslado al medio natural.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de las prácticas consistió en conocer el funcionamiento de un criadero de moluscos bivalvos, no sólo en lo referente a las diferentes etapas que componen el desarrollo larvario y juvenil de los venéridos, sino también en la importancia que presenta el llevar a cabo un correcto cultivo de fitoplancton y un control diario de los parámetros que influyen en el cultivo.

El presente trabajo estudia la posible influencia que presentan los diferentes sistemas de cultivo (abierto o cerrado) sobre el crecimiento, el peso y la mortalidad de las semillas de almeja fina y japonesa disponibles al inicio de las prácticas, controlando diariamente la temperatura, la alimentación, la salinidad, el oxígeno disuelto y los flujos de agua y fitoplancton de los tanques de cultivo. Esto nos permitió averiguar cuál de los sistemas anteriores sería el más adecuado para llevar a cabo el cultivo de la semilla de las especies mencionadas.

Por otro lado, se realizó también el seguimiento de un cultivo larvario de almeja japonesa a fin de conocer la duración y la talla media de cada uno de los diferentes estadios que componen dicha etapa. Además, se estudiaron también las principales transformaciones y estructuras de cada una de las fases anteriores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Seguimiento de un cultivo larvario de almeja japonesa

3.1.1. Origen de los progenitores

El seguimiento del desarrollo larvario de la almeja japonesa, *R. philippinarum*, se realizó a partir de un desove espontáneo de reproductores procedentes de una cetárea situada en Rinlo (Ribadeo, Lugo). Los ejemplares llegaron al CIMA el día 19 de octubre, teniendo lugar su desove al día siguiente.

3.1.2. Estabulación de las larvas

El cultivo larvario fue realizado mediante sistema cerrado y dio comienzo con el desove de los progenitores, a partir del cual se obtuvieron huevos fecundados. Estos huevos fueron recogidos e incubados en tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 500 L de capacidad (Figura 5), siendo la densidad inicial del cultivo de 2.700.000 larvas (5,4 larvas/mL). El mantenimiento de dichos tanques se realizó cada dos días y el agua de mar utilizada para su llenado es previamente calentada por una caldera (temperatura de salida próxima a 21°C), filtrada por filtros de arena y de cartucho de 5 µm y esterilizada por ultravioleta. El cultivo se mantuvo en unas condiciones de temperatura y salinidad de 20±1°C y 32,5-33,2‰, respectivamente. Al no tratarse de una sala acondicionada, para evitar los descensos bruscos de temperatura propios de los meses de otoño, fue necesario colocar termostatos (*EHEIM JÄGER-3619 300W*) en los tanques. Tanto los huevos como posteriormente las larvas fueron sometidos en todo momento a una aireación ligera y constante.

Las larvas se alimentaron diariamente con una dieta multiespecífica y de idéntica concentración a la utilizada para el cultivo de semilla (explicado en el apartado 3.3.), variando su ración diaria en función de las necesidades del cultivo.

El protocolo utilizado para el estudio de las diferentes fases del cultivo varió en función del grado de desarrollo de las larvas:

- Larvas nadadoras (larvas D y umbonada): se sitúan bajo el desagüe del tanque una serie de tamices de mayor a menor luz de malla, colocando debajo de todos ellos una bandeja que mantenía a las larvas en agua (Figuras 5.a). Una vez vaciado el tanque, se chorrean

las larvas retenidas en los distintos tamices. A medida que avanzaron los días de cultivo se fue incrementando la luz de malla.

- Larvas en fijación (pediveliger y postlarva): el cultivo tiene lugar en los mismos tanques que la etapa anterior, pero en este caso se emplean tambores con fondo de malla y un flujo forzado “air-lift” descendente donde las larvas realizan la fijación y la metamorfosis (Figura 5.b). Se consideró el inicio de la fijación cuando más del 50% de las larvas presentaban pie. El fondo de malla inicial fue de 150 μm y este se aumentó con el paso de los días. Al igual que en la etapa anterior, las larvas se chorrearón también tres veces por semana.

La prueba experimental finalizó cuando las postlarvas quedaron retenidas en los tamices de 400 y 500 μm de luz de malla (30 de noviembre), momento en el cual fueron trasladadas a otros tanques en abierto donde da comienzo el cultivo de la semilla.

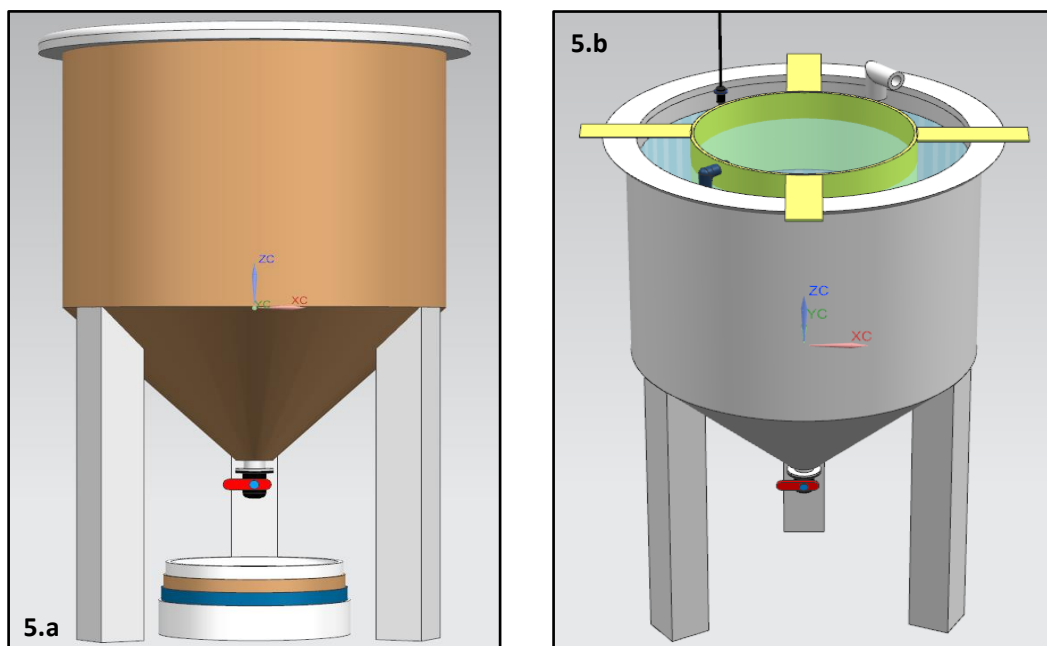


Figura 5: Esquema del material empleado para llevar a cabo el cultivo de larvas en fase nadadora (5.a) y larvas en fase de fijación (5.b).

3.1.3. Visionado al microscopio óptico

Con el fin de controlar el estado de las larvas y los tiempos de aparición de cada una de las etapas que componen el desarrollo larvario de *R. philippinarum*, así como para realizar una estimación aproximada de su tamaño y poder conocer las principales estructuras anatómicas

desarrolladas durante las mismas, a partir de la fase de larva D, se llevaron a cabo muestreos *in vivo* cada dos días. Para ello, se recogió una muestra de cada uno de los tamices donde quedaban retenidas las larvas, siendo fotografiados y medidos de manera aleatoria al menos 25 individuos, haciendo uso del software *Leica Application Suite (LAS) Version 4.7.2* acoplado a un microscopio óptico *Leica DM750*. La medición utilizada para estudiar el crecimiento de las larvas fue la longitud máxima del eje antero-posterior de su concha y se consideró la aparición de un nuevo estadio larvario cuando más de la mitad de los individuos lo habían alcanzado.

3.2. Pruebas con sistemas de cultivo de semilla

Durante el desarrollo de las prácticas se realizaron dos experiencias que tuvieron por objetivo determinar si existen diferencias significativas en el crecimiento, el peso y la mortalidad, cuando la semilla es cultivada mediante los sistemas de cultivo abierto y cerrado. La primera de las pruebas (Prueba 1) tuvo una duración de tres semanas (desde el 25 de octubre hasta el 10 de noviembre) y en ella se utilizaron tanto semillas de almeja fina como de almeja japonesa. Las elevadas mortalidades registradas en la almeja fina provocaron que se detuviera el cultivo de dicha especie, siendo sustituida esta en la segunda prueba por otro lote de almeja japonesa (Prueba 2). La segunda experiencia tuvo lugar entre el 10 de noviembre y el 18 de enero y sirvió para proporcionarnos un número de réplicas más representativo de cada sistema, con el cual poder realizar la discusión de los resultados.

3.2.1. Origen de los progenitores

Los estudios fueron realizados a partir de una semilla que estaba siendo cultivada en el CIMA en el momento del inicio de las prácticas, lugar donde se llevó a cabo su desarrollo embrionario y larvario. La semilla de almeja fina utilizada para la Prueba 1 procede de un desove inducido del 7 de junio de reproductores originarios de Figueira da Foz (Portugal) llegados al Centro el día 15 de marzo. Toda la semilla de almeja japonesa (Pruebas 1 y 2) proviene de un desove espontáneo del 9 de julio de progenitores procedentes de Cambados (Pontevedra) que llegaron al CIMA el 7 de julio.

3.2.2. Estabulación y control inicial de la semilla

El experimento tuvo lugar a partir de 12 lotes de semillas (3 réplicas por especie y para cada sistema de cultivo), homogéneos en talla y peso, que fueron colocados en cilindros de PVC

de 20 cm de diámetro y 25 cm de altura; el fondo de dichos recipientes se cubrió previamente con una malla de 150-200 μm de luz. El mantenimiento de estos cilindros se realizó una vez por semana mientras que las semillas fueron lavadas por chorreo diariamente. Cada uno de los cilindros contó además con un sistema de aireación que les proporcionaba un flujo de agua forzado por “air-lift” descendente.

Los lotes preparados para la Prueba 1 presentaron un peso inicial de 50 g y una talla superior a los 1.000 μm , no obstante, en la Prueba 2 fue necesario ajustar dicho peso debido al crecimiento producido en los lotes que fueron reutilizados de la experiencia anterior. El número de individuos, la densidad y los valores de peso fresco (PF) y seco (PS) totales resultantes del control inicial realizado a cada uno de los cilindros que componen ambas pruebas, aparecen recogidos en las Tablas II y III.

Tabla II: Valores iniciales obtenidos en los cilindros de la Prueba 1 para cada sistema de cultivo.

		Almeja fina				Almeja japonesa			
		Nº Ind.	PF Total (g)	PS Total (g)	Densidad (kg/m ²)	Nº Ind.	PF Total (g)	PS Total (g)	Densidad (kg/m ²)
Sistema abierto	C1	29.839	50,00	27,57	1,59	40.484	50,00	24,83	1,59
	C2	30.625	50,00	27,59	1,59	39.000	50,00	24,88	1,59
	C3	28.939	50,00	26,70	1,59	36.290	50,00	22,52	1,59
Sistema cerrado	C1	29.355	50,00	26,59	1,59	36.200	50,00	24,62	1,59
	C2	30.625	50,00	28,22	1,59	38.092	50,00	23,55	1,59
	C3	29.850	50,02	28,00	1,59	38.402	50,02	25,04	1,59

Tabla III: Valores iniciales obtenidos en los cilindros de la Prueba 2 para cada sistema de cultivo.

		Almeja japonesa Tanque 1				Almeja japonesa Tanque 2			
		Nº Ind.	PF Total (g)	PS Total (g)	Densidad (kg/m ²)	Nº Ind.	PF Total (g)	PS Total (g)	Densidad (kg/m ²)
Sistema abierto	C1	42.365	63,14	29,93	2,01	38.360	63,23	29,99	2,01
	C2	43.771	59,15	29,50	1,88	40.029	59,09	27,48	1,88
	C3	41.031	57,79	30,20	1,84	36.420	57,81	28,41	1,84
Sistema cerrado	C1	47.120	63,51	31,20	2,02	36.859	63,55	29,86	2,02
	C2	42.987	61,41	30,43	1,96	34.895	61,58	34,45	1,96
	C3	42.635	59,49	30,00	1,90	34.614	59,68	30,46	1,90

3.2.3. Sistemas de cultivo empleados

El cultivo de las dos especies objeto de estudio se llevó a cabo, en ambos casos, a través de un sistema abierto y de un sistema cerrado. Los tanques empleados para cada sistema difieren no solo en su forma y dimensiones, sino también en la capacidad y el material que los componen (Figura 6). En el interior de dichos tanques fueron colocados tres de los cilindros descritos anteriormente (un tanque para cada especie en la Prueba 1).

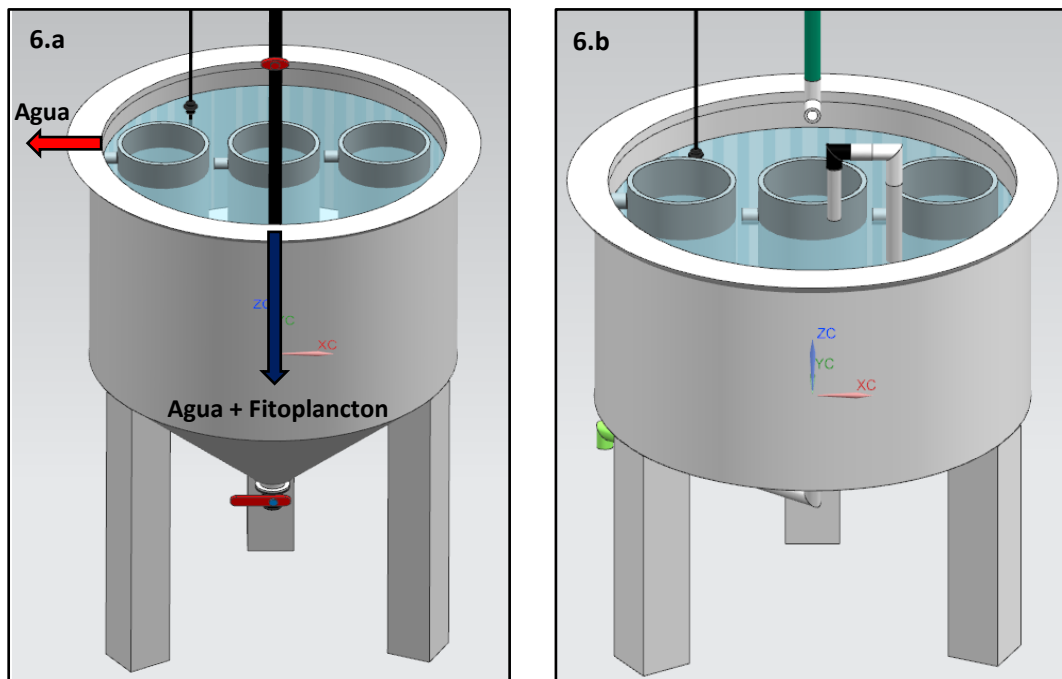


Figura 6: Esquema de los sistemas de cultivo de semilla. **6.a)** Sistema abierto, tanque troncocónico de 500 L; **6.b)** Sistema cerrado, tanque cilíndrico de 400 L.

El cultivo en **sistema abierto** fue realizado en dos tanques similares a los utilizados para el cultivo larvario (Figura 6.a), pero en los que las semillas recibieron un aporte continuo de agua y fitoplancton, siendo este último dosificado y repartido mediante el uso de bombas peristálticas. El flujo de entrada de agua fue regulado diariamente y presentó unos valores de 110 ± 10 mL/min (158 ± 14 L/día) para la Prueba 1 y 120 ± 15 mL/min (173 ± 22 L/día) en la Prueba 2. El aporte de fitoplancton se mantuvo más constante, con un flujo medio de 35 mL/min (50 L/día) en ambas experiencias, y supuso una ración diaria del 5,1% (Prueba 1) y 2,7% (Prueba 2) de su peso seco con respecto al peso seco de cada semilla. El agua de los tanques de la Prueba 1 se mantuvo a temperatura ambiente, alcanzando valores iniciales de 20°C y finales de 16°C, su salinidad fue de $33,1 \pm 0,1$ ‰ y la concentración de oxígeno disuelto en agua de $7,25 \pm 0,2$ mg/L. Las variaciones de temperatura registradas durante el mes de noviembre (15-19°C) hicieron que fuese necesario

colocar termostatos en los tanques de la Prueba 2. Estos fueron conectados el día 1 de diciembre y a partir de esta fecha la temperatura se mantuvo a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$. La salinidad a lo largo de la segunda experiencia fue de $32,9\pm 0,4\%$ y la concentración de oxígeno en agua de $7\pm 0,65$ mg/L.

El cultivo en **sistema cerrado** fue llevado a cabo en dos tanques de plástico cilíndricos con una capacidad de 400 L donde no existía un aporte continuo de fitoplancton ni agua (Figura 6.b). Las semillas se alimentaron diariamente con un volumen de fitoplancton de 20 L/tanque/día para la Prueba 1, mientras que en la Prueba 2 este varió de 20 a 50 L/tanque/día en función del consumo observado. La alimentación supuso una ración diaria del 1,6% (Prueba 1) y 1,8% (Prueba 2) de su peso seco con respecto al peso seco de cada individuo. El agua de los tanques de la Prueba 1 se mantuvo a temperatura ambiente, alcanzando valores iniciales de 21°C y finales de 19°C , y a la misma salinidad que en el sistema abierto. El rango de las concentraciones de oxígeno disuelto en agua fue ligeramente superior a las observadas en el sistema anterior, presentando en este caso valores de $7,35\pm 0,35$ mg/L. En los tanques de la Prueba 2 se colocaron también termostatos para tratar de mantener una temperatura lo más constante posible, estos fueron conectados el día 25 de noviembre y a partir de ese momento la temperatura se mantuvo a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ (hasta la fecha había sido de $16,3\pm 1^{\circ}\text{C}$). La salinidad a lo largo de esta segunda experiencia fue de $32,9\pm 0,5\%$ y la concentración de oxígeno en el agua de $7,3\pm 0,5$ mg/L. A diferencia del sistema anterior, cada uno de los tanques del sistema cerrado contó con un flujo forzado “air-lift” descendente para tratar de repartir lo más homogéneamente posible el alimento que se le proporcionaba a las semillas.

El mantenimiento de los tanques del sistema abierto se realizó una vez por semana, momento que fue aprovechado para limpiar todos los cilindros de la prueba; en el sistema cerrado esta actividad tuvo lugar cada dos días. Por su parte, el tratamiento y mantenimiento del agua y las tuberías del fitoplancton fueron idénticos a los realizados en el cultivo larvario, siendo en este caso la temperatura de llenado de los tanques de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2.4. Controles y medida de parámetros

Los parámetros que han sido evaluados en cada una de las pruebas para estudiar la evolución de las semillas fueron los siguientes:

1. Temperatura, salinidad y concentración de oxígeno disuelto en el agua

Los tres factores fueron controlados diariamente tanto en los tanques del sistema abierto como en los del sistema cerrado, siendo utilizado para su evaluación los medidores

multiparamétricos portátiles *WTW ProfiLine Multi 1970i* (temperatura y salinidad) y *HACH HQ30d* (oxígeno disuelto).

2. Talla, pesos y mortalidad de la semilla

Los controles de los parámetros de crecimiento y mortalidad se realizaron cada 10 días, aproximadamente. La medida escogida para determinar la talla media de las semillas fue la longitud máxima del eje antero-posterior de su concha. Para ello fueron seleccionados de manera aleatoria 25 ejemplares de cada uno de los cilindros, los cuales se fotografiaron y midieron con el programa de análisis de imagen *NIS-Elements BR 3.0*, acoplado a una lupa *Nikon SMZ-10A*. Para obtener la tasa de mortalidad y los diferentes pesos, se pesaron en una balanza de precisión *CB Complet* (0,01 g de precisión) tres sublotes de 0,1 g por cilindro (Figura 7). El número de semillas presente en cada réplica anterior servirá para conocer su peso fresco individual, mientras que el porcentaje de mortalidad fue estimado por contaje visual de los individuos vivos y muertos de cada sublote. Una vez conocidos el peso fresco y la mortalidad, cada sublote se envolvió en papel de aluminio y fue introducido en una estufa *J.P. Selecta Conterm* a 100°C durante al menos 24 horas, proceso tras el cual pasaron una hora en un desecador de vacío *Simax GL36*. Finalmente, para conocer el peso seco de cada sublote, se pesaron estos en una balanza de precisión *Scaltec SBC-22* (0,01 mg de precisión). Al finalizar la Prueba 2, los cilindros de cada uno de los sistemas fueron tamizados conjuntamente a fin de estimar el número total de semillas retenidas en cada luz de malla (1000-3500 µm).

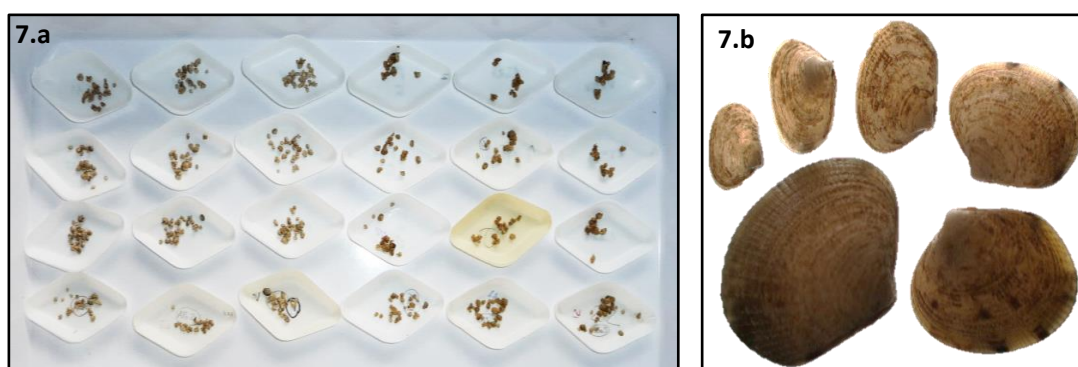


Figura 7: 7.a) Réplicas de los cilindros del sistema abierto para realizar los estudios de la talla, el peso y la mortalidad; 7.b) Evolución de la talla a lo largo del cultivo, semillas resultantes del tamizado final.

3. Flujos de agua y fitoplancton

Los flujos de agua y fitoplancton fueron medidos diariamente en los tanques del sistema abierto.

4. Densidad de fitoplancton

Además de la densidad diaria de fitoplancton empleada para la alimentación de las semillas de los dos sistemas, en el sistema cerrado se midió también su densidad inicial (una vez añadido el alimento) y final (pasadas 24 horas). De esta manera fue posible realizar una estimación del fitoplancton consumido cada día, a partir de la cual se decidió si era necesario aumentar o mantener su dosis diaria. Las medidas de las densidades citadas anteriormente fueron calculadas por conteo visual en el microscopio óptico *Nikon Alphaphot-2 YS2* haciendo uso de una cámara cuentaglóbulos tipo Bürker; para facilitar el recuento, las muestras se fijaron añadiendo una pequeña cantidad de formol al 4%. La densidad media de fitoplancton registrada a lo largo de las prácticas fue de 998 células/ μL .

5. Peso seco del fitoplancton

Las mediciones del peso seco del fitoplancton utilizado en la alimentación se realizaron dos veces por semana y para ello fue necesario emplear un colector de filtración múltiple *Millipore 1225*. En el interior de dicho instrumento se disponen filtros *Whatman 934-AH* de 25 mm de diámetro, previamente muflados en un horno *Herotec 10-PR/300 8B* para eliminar la posible materia orgánica que puedan contener. Los tubos y filtros son pesados en una balanza de precisión *Scaltec SBC-22* (0,01 mg de precisión). Una vez conocida la densidad del fitoplancton, se filtran 30-40 mL de este y se lavan los filtros con una pequeña cantidad de formiato amónico al 3% (10 mL), solución que ayuda a precipitar las microalgas y elimina las sales presentes en el agua de mar. Los tubos con los filtros fueron guardados en un congelador (-80°C) hasta el momento de su liofilización, proceso tras el cual permanecieron 1 hora en el desecador *Simax GL36* para ser nuevamente pesados y obtener así el peso seco. La liofilización tuvo lugar en un liofilizador *VirTis Advantage BenchTop* y en ella se elimina el agua contenida en las células por sublimación, manteniéndose estas congeladas y en vacío a lo largo de todo el proceso. El peso seco medio de cada célula microalgal fue de 0,062 ng, este valor fue utilizado para el cálculo de la determinar la ración diaria de alimento.

3.2.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en las Pruebas 1 y 2 fueron analizados y comparados estadísticamente mediante el test de permutaciones de Fisher (1935). En particular, hemos optado por utilizar un test de permutaciones con una cola y dos muestras no pareadas, haciendo uso de 100.000 randomizaciones distintas. El motivo por el cual se seleccionó dicho test es debido a que

permite realizar inferencia estadística no paramétrica sin necesidad de ningún supuesto previo sobre la distribución de la población, siendo posible evaluar medias cuando los tamaños muestrales son relativamente pequeños. No nos pareció relevante realizar un test de análisis de la varianza (ANOVA) pues en este trabajo lo que nos interesa estudiar es la significancia de las diferencias observadas en la media muestral de la talla, peso y mortalidad de las semillas, no su variabilidad en distintas situaciones. El nivel de significancia estadística utilizado para contrastar los resultados fue del 95% (p-valor = 0,05). Para el análisis estadístico realizado sobre los peso fresco y seco y la mortalidad fueron utilizados los valores medios obtenidos tras el pesaje de las réplicas de 0,1 g de cada cilindro; sin embargo, la talla fue medida de manera individualizada con el tamaño obtenido en cada semilla. Por lo tanto, el tamaño muestral empleado para el estudio del peso y la mortalidad fue de 6 muestras (3 valores para cada especie y sistemas), mientras que en la talla este fue de 150 muestras (75 individuos medidos en cada especie y sistema).

3.3. Cultivo de fitoplancton

El Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo dispone de tres sistemas de cultivo para garantizar una producción de microalgas capaz de suplir las necesidades establecidas en el criadero: el sistema discontinuo (*batch*) en cámara isotérmica y los sistemas continuo y discontinuo realizados en el invernadero del Centro. Para la elaboración del presente trabajo únicamente fueron necesarios los dos primeros.

Las distintas fases de cultivo (semillas y larvas) fueron alimentadas en todo momento con una dieta mixta procedente del sistema continuo constituida por *Tetraselmis suecica* ((Kylin) Butcher, 1959), *Isochrysis galbana* (Parke, 1949), *Diacronema lutheri* ((Droop) Bendif & Véron, 2011), *Chaetoceros calcitrans* ((Paulsen) Takano, 1968), *C. gracilis* (Schütt, 1895) y *C. muelleri* (Lemmermann, 1898). En la Figura 8 se muestran algunas de las especies mencionadas. Este sistema de producción mono-específico es conocido como “Sea Salter Continuous Algal Production Systems” y está basado en un aporte de medio nutritivo y una cosecha microalgal constantes (26-34 L/día/bolsa), realizándose el proceso en 46 bolsas de polietileno de 400 L. El agua de entrada es tratada en primer lugar con CO₂ y posteriormente esterilizada por pasteurización a 75°C durante 30 minutos. Los nutrientes empleados se corresponden al medio John Bayes, el cual se compone de una solución de nitrato amónico, fosfato amónico y EDTA, a la que se le añaden otra solución de tricloruro de hierro, oligoelementos (Zn, Mn, Mo, Co y Cu) y

vitaminas (B1, B12 y H); para el cultivo de la diatomea *Chaetoceros* fue necesario añadir manualmente y dos veces por semana una solución enriquecida en silicatos (sodio-silicato).

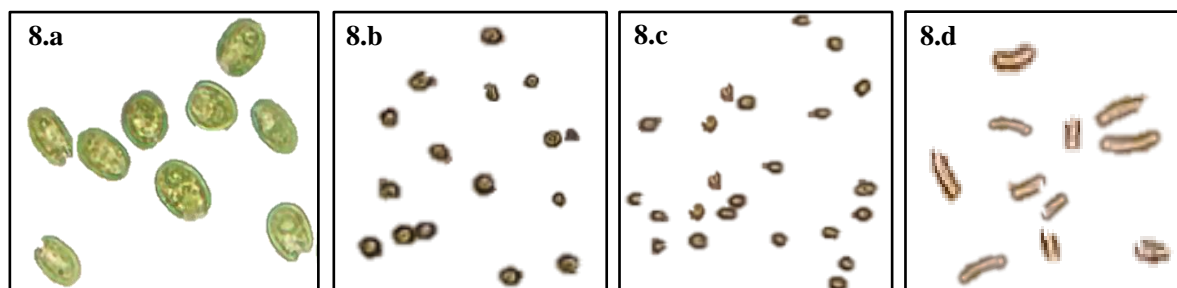


Figura 8: Especies microalgales utilizadas para la alimentación de las larvas y las semillas. **8.a)** *Tetraselmis suecica*; **8.b)** *Isochrysis galbana*; **8.c)** *Diacronema lutheri*; **8.d)** *Chaetoceros* sp.

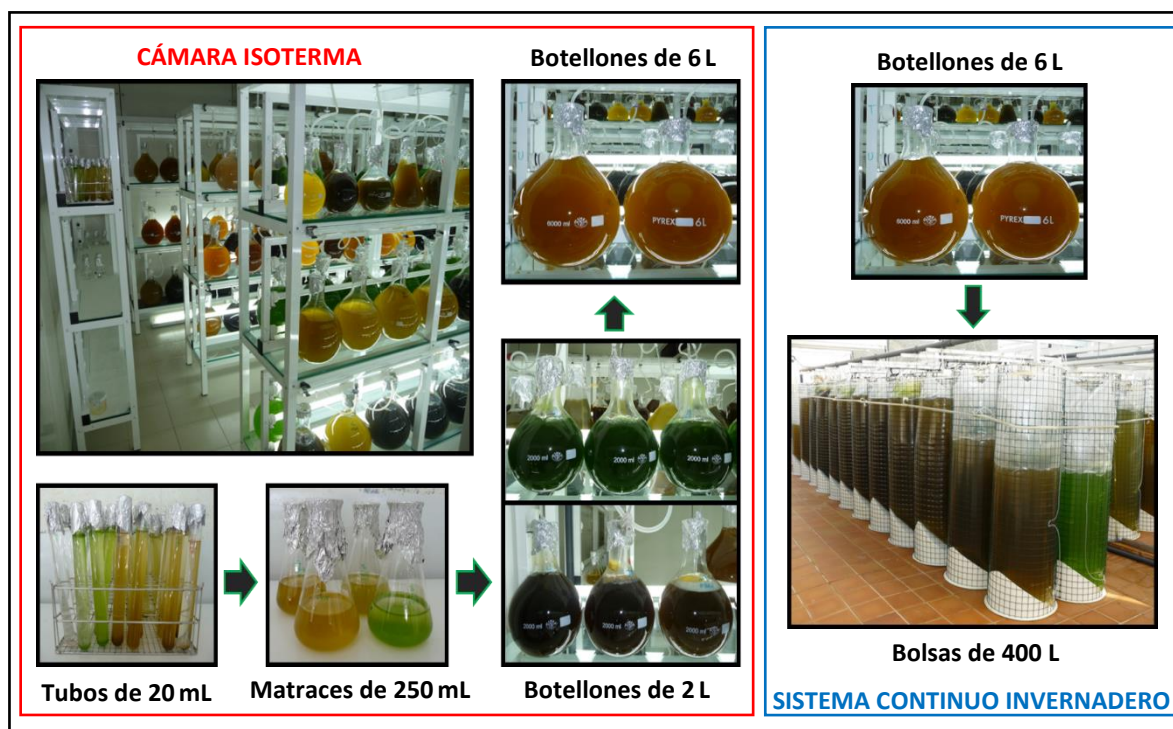


Figura 9: Cámara isoterma e invernadero del CIMA donde se realizan los cultivos discontinuo y continuo de fitoplancton, respectivamente. Cultivo escalonado en cámara.

El cultivo se mantiene bajo unas condiciones de temperatura y luz ambientales, no obstante, cada bolsa presenta también un aporte de luz artificial generado por parrillas de luz led. El encendido y apagado de dicha luz se regula mediante un temporizador que permite ajustar el fotoperiodo según las necesidades deseadas, actualmente es de 18:6 (luz:oscuridad). La aireación de las bolsas es constante. Con el objetivo de conseguir que el sistema permaneciera lo más axénico posible, a la canalización de la cosecha, los nutrientes y el agua se les aplica vapor a 100°C

dos veces por semana; además, al igual que en los dos cultivos anteriores, fue realizado también un estudio de microbiológico tanto del fitoplancton presente en la tubería y en el tanque de cosecha como del agua empleada para el llenado de las bolsas.

La inoculación de las bolsas del sistema continuo es llevada a cabo a partir de los botellones cultivados en la cámara isoterma con sistema *batch*. El cultivo es monoespecífico y escalonado, desde cepas en tubos de 20 mL hasta botellones de 6 L (Figura 9), todo ello bajo unas condiciones de temperatura ($19\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) y luz (lámparas fluorescentes) constantes. Los botellones disponen además de un flujo continuo de aire enriquecido con CO_2 . El agua de mar utilizada, 32-34‰ de salinidad, es filtrada mediante filtros de arena y filtros de cartucho de $5\ \mu\text{m}$ y esterilizada, junto con los recipientes empleados para el cultivo, en autoclave a 120°C y 2bar. Tras este proceso el agua es enriquecida con el medio nutritivo comercial ALGAL (*Aqualgae*), el cual se compone de macronutrientes (nitrato de sodio y dihidrogenofosfato de sodio), oligoelementos (Fe, Zn, Mn, Mo, Co, Cu y EDTA) y vitaminas (B1, B12 y H). Al igual que en las bolsas del sistema continuo, para el cultivo de diatomeas se añadió también sodio-silicato.

4. RESULTADOS

4.1. Seguimiento de un cultivo larvario de almeja japonesa

La Tabla IV recoge el tiempo de aparición y la talla media inicial de los cuatro estadios larvarios identificados en *R. philippinarum* durante el desarrollo del cultivo (larva D, larva umbonada, larva pediveliger y postlarva).

Tabla IV: Estadios larvarios de *R. philippinarum*. Tiempos de aparición desde la fecundación y rango de tallas iniciales de cada estadio.

Estadio larvario	Días tras el desove	Tamaño (μm)
Larva D	2	97 - 108
Larva umbonada	6 - 7	132 - 147
Larva pediveliger	17 - 18	230 - 247
Postlarva	24 - 25	252 - 278

Como se puede observar, al segundo día tras la puesta, la larva trocófora se transforma en una larva D veliger cuyo tamaño osciló entre 97 μm y 108 μm . En dicho estadio, las valvas (prodisoconcha I) envuelven ya todas las partes blandas del animal. Las características más representativas de esta etapa son la presencia de una charnela recta (Figura 10.a) y un velo ciliado, este último presente durante todos los estadios de larva nadadora. Los cilios del margen exterior del velo permiten a las larvas nadar durante breves periodos de tiempo y mantenerse en la columna de agua (Figura 10.c).

Transcurridos 6-7 días desde la puesta, la larva comienza a experimentar un cambio en la morfología de su concha, perdiendo su forma característica de “D” y pasando a umbonarse a nivel de la charnela (Figura 10.b). Los resultados de las mediciones realizadas (Tabla IV) muestran una longitud de 132-147 μm para esta etapa del desarrollo.

El siguiente estadio larvario aparece 17-18 días después de la puesta. Los individuos miden 230-247 μm y la fase debe su nombre (larva pediveliger) a la presencia simultánea del velo y el pie (Figura 10.d). Una vez desarrollado dicho pie, y con el objetivo de que tuviera lugar la metamorfosis y su fijación, el cultivo fue trasladado al interior de un tambor cuya luz de malla irá creciendo posteriormente a medida que lo hace el tamaño larvario. La densidad larvaria al inicio

de la etapa de fijación fue de 1.900.000 individuos (3,8 larvas/mL) y la supervivencia registrada del 70,4% (la densidad inicial fue de 5,4 larvas/mL). Durante el proceso de metamorfosis, fase crítica del cultivo, el velo se reabsorbe y pierde su función locomotora y alimenticia (Figura 10.d), momento en el cual da comienzo el desarrollo de los filamentos branquiales. Tiene lugar, por lo tanto, el paso de una forma de vida planctónica a un modo de vida sésil.

El último estadio larvario comenzó al finalizar la metamorfosis (24-25 días posteriores al desove) y en él las postlarvas mostraron una longitud de 252-278 μm y un aspecto similar al de una almeja adulta. En esta fase el velo ha desaparecido completamente y el pie se mantiene bien desarrollado. La identificación de dos sifones todavía en formación hace suponer que esta última etapa representa aquella donde las larvas desarrollan sus aparatos digestivo, vascular y excretor (Figura 10.e). Transcurridos 27-28 días desde la puesta, la totalidad del cultivo se encontraba en fase de postlarva, siendo las tallas registradas de 260-360 μm . Al finalizar la prueba, las larvas presentaron una longitud de 430-670 μm .

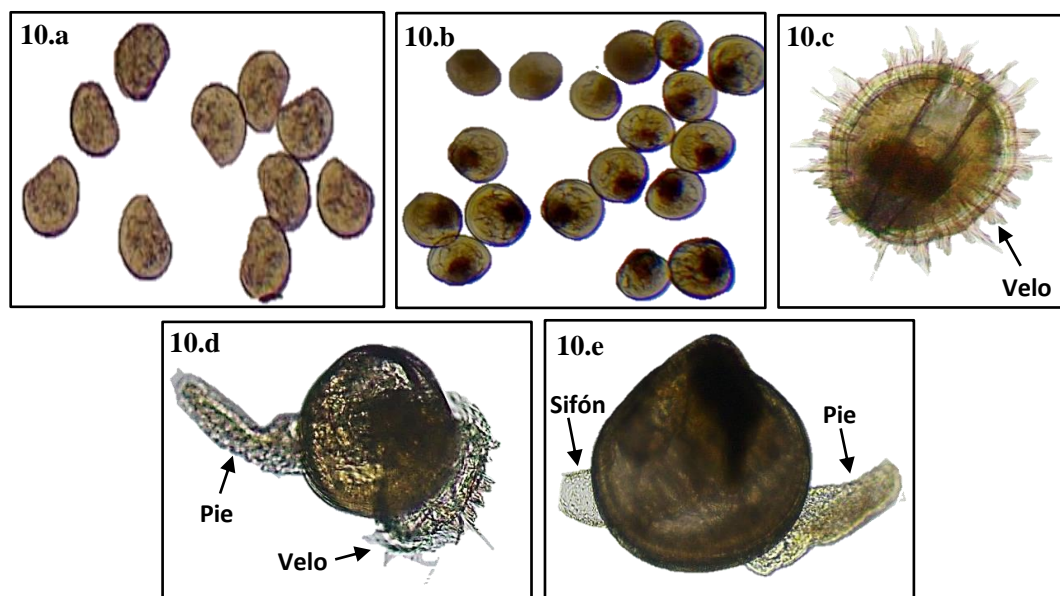


Figura 10: Etapas del desarrollo larvario en *R. philippinarum*. **10.a)** Larva D con charnela recta; **10.b)** Larva umbonada; **10.c)** Larva veliger con velo ciliado; **10.d)** Larva pediveliger con pie bien desarrollado y velo en proceso de reabsorción; **10.e)** Postlarva con pie sacando uno de los sifones.

Durante los diferentes muestreos y tamizados, a medida que aumentaba el tamaño de las larvas fue necesario incrementar también la luz de malla de los tamices y, posteriormente, de los tambores utilizados en dichos procesos. Según los resultados generales obtenidos en este trabajo, las fases larvarias natatorias quedan retenidas en tamices de 45-60 μm (larva D) y 90-120 μm (larva umbonada), mientras que las larvas pediveliger y postlarvas hacen lo propio sobre mallas

de 150-170 μm y 200-500 μm , respectivamente. En el caso de las postlarvas, se ha considerado como tamaño máximo el último estudiado hasta el momento en el que finalizó la prueba.

La Figura 11 muestra el crecimiento y la talla media diarios registrados en cada uno de los muestreos realizados en los 40 días que duró el cultivo larvario. Como se puede observar, la velocidad de crecimiento experimentada por las larvas en fase D (103-130 μm) es similar a la registrada en el caso de las larvas umbonadas (130-217 μm), pero superior a la que tiene lugar en la fase pedivelíger (217-246 μm). Los mayores crecimientos se registraron en la etapa postlarvaria, con tamaños medios que van de 246 μm a 566 μm . El crecimiento en longitud de *R. philippinarum* durante toda la fase larvaria se ajusta a un modelo lineal, siendo los incrementos diarios medios registrados de 7,64 μm para la etapa de natación y de 15,74 μm en la de fijación. El crecimiento medio total a lo largo del cultivo fue de 10,7 $\mu\text{m}/\text{día}$. Entre los días 15 y 22 posteriores a la puesta, correspondientes al final de la fase umbonada y prácticamente la totalidad de la etapa pedivelíger, el crecimiento larvario se detuvo como consecuencia del proceso de metamorfosis. Durante este periodo, las larvas invierten prácticamente la totalidad de su energía en desarrollar el pie para la fijación; por este motivo, el crecimiento registrado fue de tan solo 29 μm .

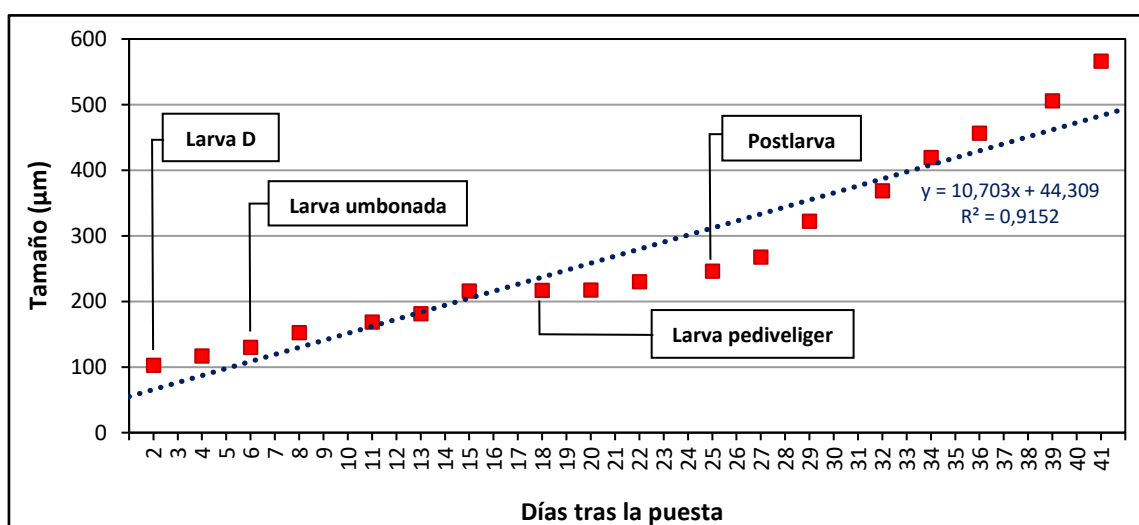


Figura 11: Crecimiento diario (μm) experimentado por las larvas de *R. philippinarum* durante los 40 días posteriores a tener lugar la puesta.

4.2. Pruebas con sistemas de cultivo de semilla

4.2.1. Prueba 1: Cultivo de almeja fina y almeja japonesa

La escasa duración de esta prueba no nos permite obtener unos resultados y unas conclusiones tan representativas como las obtenidas en la Prueba 2; sin embargo, sirven para hacerse una ligera idea de la posible tendencia que presentarían las dos especies objeto de estudio al ser cultivadas en un criadero mediante los sistemas abierto y cerrado. Los resultados obtenidos en la Prueba 2 servirán para verificar las conclusiones obtenidas en esta primera experiencia.

4.2.1.1. Evolución de la talla

La Figura 12 recoge la talla media registrada para cada especie en los diferentes tanques de cultivo. Los mayores tamaños alcanzados en la semilla de almeja fina tuvieron lugar al ser cultivada en sistema abierto, mientras que en la almeja japonesa esto sucedió en el sistema cerrado. Al inicio de la experiencia, la semilla depositada en los tanques de cultivo presentó un tamaño medio muy similar ($1.755 \pm 17 \mu\text{m}$), creciendo finalmente la almeja fina hasta los $1.899 \mu\text{m}$ (sistema abierto) y $1.779 \mu\text{m}$ (sistema cerrado) y la almeja japonesa hasta tallas de $1.879 \mu\text{m}$ (sistema abierto) y $2.033 \mu\text{m}$ (sistema cerrado). Estos incrementos de talla se traducen en una tasa de crecimiento en *R. decussatus* del 9,17% para el sistema abierto y del 1,74% en el sistema cerrado, mientras que en *R. philippinarum* dichos valores fueron del 6,06% y un 16,97%, respectivamente. Los resultados obtenidos únicamente mostraron diferencias significativas al comparar entre sí la talla final de ambas especies ($p\text{-valor} = 0,0041 < 0,05$). Estos resultados hacen suponer que la tasa de crecimiento de la almeja japonesa es superior a la de la almeja fina, lo cual podría ser explicado por la presencia de un metabolismo más activo en la primera de las especies.

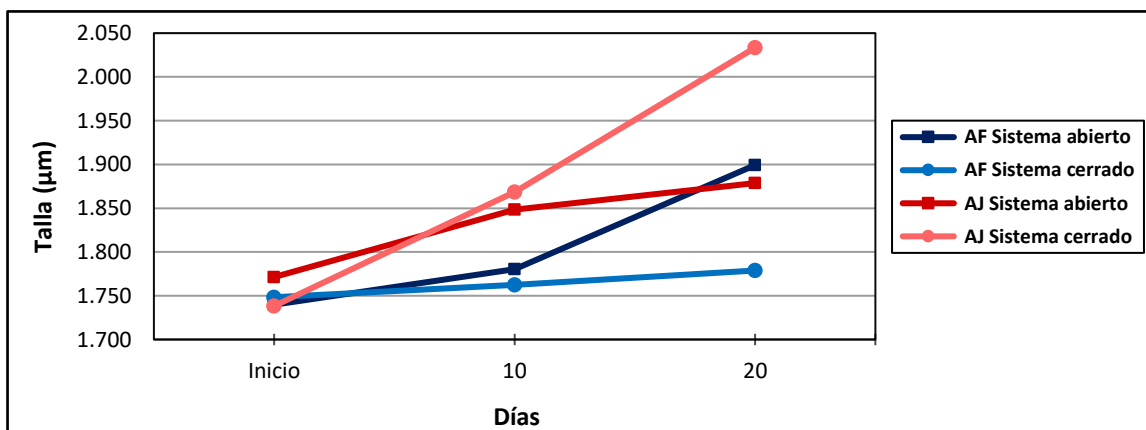


Figura 12: Evolución de la talla (μm) registrada en las semillas de *R. decussatus* (AF) y *R. philippinarum* (AJ) a lo largo de los 20 días que duró la Prueba 1.

4.2.1.2. Evolución de los pesos fresco y seco

El crecimiento experimentado por las semillas en los pesos fresco y seco a lo largo de los 20 días que duró la Prueba 1 aparece representado en las Figuras 13 y 14, respectivamente. Ambos parámetros mostraron, al igual que en el caso anterior, una tendencia creciente a lo largo de toda la experiencia, obteniéndose también los mayores resultados para la almeja fina en el sistema abierto y para la almeja japonesa en el sistema cerrado.

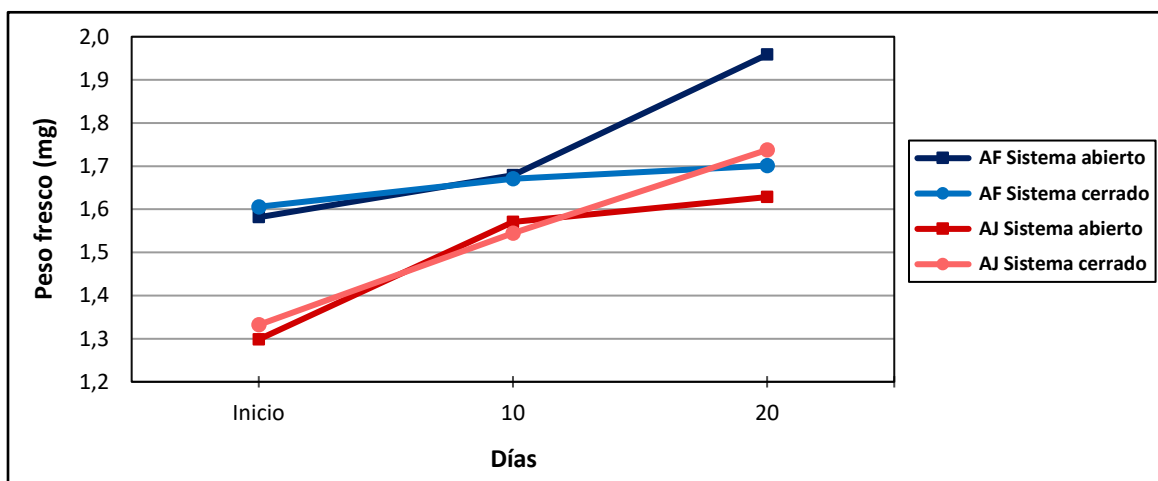


Figura 13: Evolución del peso fresco (mg) registrado en las semillas de *R. decussatus* (AF) y *R. philippinarum* (AJ) a lo largo de los 20 días que duró la Prueba 1.

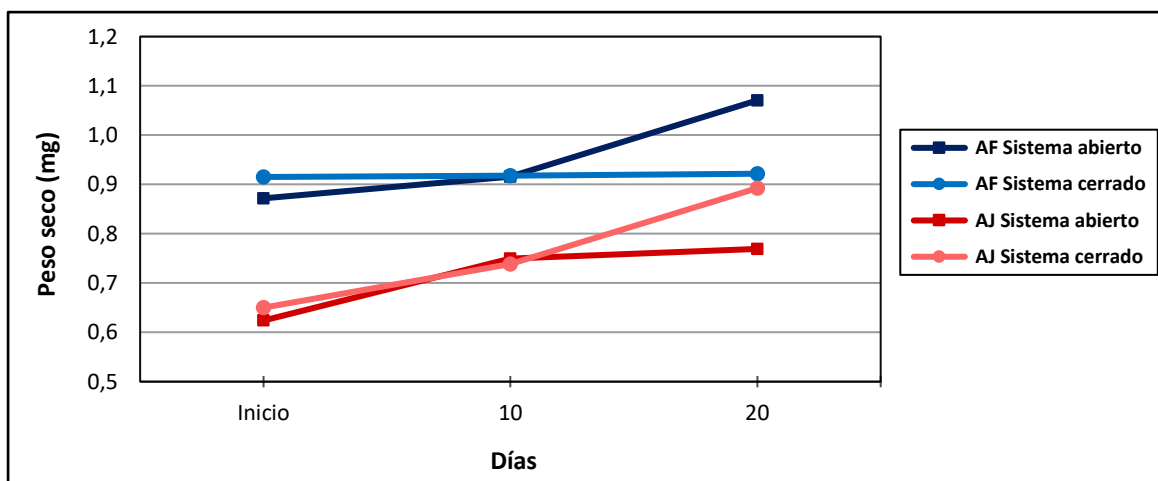


Figura 14: Evolución del peso seco (mg) registrado en las semillas de *R. decussatus* (AF) y *R. philippinarum* (AJ) a lo largo de los 20 días que duró la Prueba 1.

Los valores medios iniciales de peso fresco mostrados por los lotes de almeja fina fueron de 1,58 mg en el sistema abierto y de 1,61 mg para el sistema cerrado, siendo en el caso de la almeja japonesa de 1,3 mg y 1,33 mg, respectivamente. El aumento del peso fresco durante los 10

primeros días de cultivo no mostró diferencias significativas entre los dos sistemas estudiados, siendo en el caso de *R. decussatus* de 0,01 mg y en *R. philippinarum* de 0,03 mg. En el sistema abierto, se produce un incremento en el peso fresco de la almeja fina de aproximadamente 0,1 mg, siendo este en la almeja japonesa de 0,27 mg; el aumento obtenido en el sistema cerrado fue de 0,06 mg en la almeja fina y de 0,21 mg en la almeja japonesa. La evolución experimentada a partir de este momento difiere para cada sistema y permite determinar cuál de los sistemas utilizados es el más adecuado para llevar a cabo el cultivo de cada especie. El incremento de peso fresco registrado en el sistema abierto durante los últimos 10 días de la Prueba 1 fue de 0,28 mg en la almeja fina y de 0,06 mg en la almeja japonesa, mientras que en el sistema cerrado tomo valores de 0,03 mg y 0,19 mg, respectivamente. Teniendo en cuenta la evolución descrita anteriormente, se puede concluir que el peso fresco de *R. decussatus* creció un 23,84% en el sistema abierto y solamente un 5,94% en el sistema cerrado, siendo dichos valores en *R. philippinarum* del 25,41% y 30,44%, respectivamente.

Los resultados obtenidos hacen pensar que, aunque la semilla de almeja japonesa presenta un menor peso fresco inicial, este aumenta a mayor velocidad y con mayores diferencias a como lo hace la almeja fina, pudiendo llegar a sobrepasarlo a medida que se desarrolla el cultivo, especialmente en el sistema cerrado. El mayor peso inicial descrito en la almeja fina podría ser debido a las elevadas mortalidades registradas en el cultivo de esta especie, lo cual provoca que la densidad presente en los cilindros sea menor y, por lo tanto, al ser menor el número de individuos, que la ración alimentaria para cada semilla sea mayor.

La relación descrita para el peso fresco de las semillas se mantiene también para el peso seco, registrándose las mayores diferencias de la almeja fina en el sistema abierto (0,2 mg) y en el sistema cerrado para la almeja japonesa (0,15 mg). Los valores medios iniciales de cada uno de los tanques fueron de 0,87 mg (sistema abierto) y 0,92 mg (sistema cerrado) para la almeja fina y 0,62 mg y 0,65 mg, respectivamente, para la almeja japonesa. Trascurridos los 10 primeros días de cultivo, el peso seco no mostró prácticamente diferencias entre los dos sistemas estudiados, siendo en la almeja fina de 0,002 mg y en la almeja japonesa de 0,012 mg. Los datos registrados al final de la prueba mostraron pesos secos de 1,07 mg (sistema abierto) y 0,92 mg (sistema cerrado) en *R. decussatus* y de 0,77 mg y 0,89 mg, respectivamente, en *R. philippinarum*. En este caso, las tasas de crecimiento que tuvieron lugar en la almeja fina fueron del 22,8% (sistema abierto) y un 0,71% (sistema cerrado), alcanzándose en la almeja japonesa los mayores porcentajes (23,27% en el sistema abierto y 37,29% en el sistema cerrado).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, es posible concluir que la almeja fina cultivada en sistema cerrado apenas incrementó su peso durante la Prueba 1, siendo su crecimiento en el sistema abierto lento durante la primera mitad de la misma y notable en la segunda. Por el contrario, los pesos de la almeja japonesa evolucionaron, hasta el día 10 de la experiencia, de manera similar en ambos sistemas, estabilizándose en el sistema abierto durante los días posteriores y manteniendo la tasa de crecimiento en el sistema cerrado. Por lo tanto, el crecimiento registrado durante los 10 primeros días de la Prueba 1 fue similar tanto al comparar especies como sistemas, observándose a la finalización del experimento un mayor crecimiento de la almeja fina en el sistema abierto y de la almeja japonesa en el sistema cerrado. Las diferencias registradas al comparar los pesos finales obtenidos para cada sistema y entre las dos especies objeto de estudio, no mostraron en ninguno de los casos diferencias significativas ($p\text{-valor} > 0,05$).

4.2.1.3. Evolución de la mortalidad

Como ya se mencionó anteriormente, las evadas mortalidades registradas en la almeja fina propiciaron la finalización de la Prueba 1, siendo utilizada la almeja japonesa de esta experiencia para llevar a cabo la Prueba 2. En el caso de la primera de las especies, los resultados obtenidos mostraron una mortandad del 70% en los tanques del sistema abierto y de un 75% en los del sistema cerrado, siendo estos valores en la almeja japonesa del 1,6% y 4,3%, respectivamente. Estas menores mortalidades observadas en la almeja japonesa hacen suponer una mayor facilidad a la hora de realizar el cultivo de dicha especie. Una de las posibles causas atribuida a las desproporcionadas mortalidades registradas en la almeja fina es el haber empleado las colas de cultivos previos, es decir, semillas procedentes de un mismo desove que presentaron una tasa de crecimiento inferior a la del resto de la puesta, motivo por el cual permanecían todavía en la *hatchery*.

4.2.2. Prueba 2: Cultivo de almeja japonesa

4.2.2.1. Evolución de la talla

Los resultados obtenidos en esta experiencia coinciden y verifican los alcanzados en la Prueba 1 pues reflejan un mayor crecimiento de *R. philippinarum* en los tanques del sistema cerrado. La evolución que tuvo lugar en la talla se puede observar en la Figura 15. Las semillas cultivadas con el sistema abierto presentaron una talla inicial de 1803 μm y final de 2.537 μm , mientras que en el sistema cerrado estas fueron de 1.904 μm y 2.821 μm , respectivamente. A pesar de existir una diferencia inicial de 101 μm en su talla media, esta desigualdad prácticamente

desapareció al tercer muestreo realizado, tomando valores de 28 μm (2.030 μm en el sistema abierto y 2.058 μm en el cerrado); a partir de este punto tuvo lugar un crecimiento dispar entre las semillas de cada sistema que concluyó con una diferencia final de 284 μm . Los mayores crecimientos registrados tuvieron lugar entre los días 30-40 y 50-60. Al término de la Prueba 2, las semillas cultivadas en sistema abierto vieron aumentado su tamaño un 40,71%, mientras que en el sistema cerrado el incremento registrado fue del 48,17%. Estas diferencias registradas al comparar ambos sistemas de cultivo al término de la prueba mostraron significación entre sí ($p\text{-valor} = 0,00791 < 0,05$).

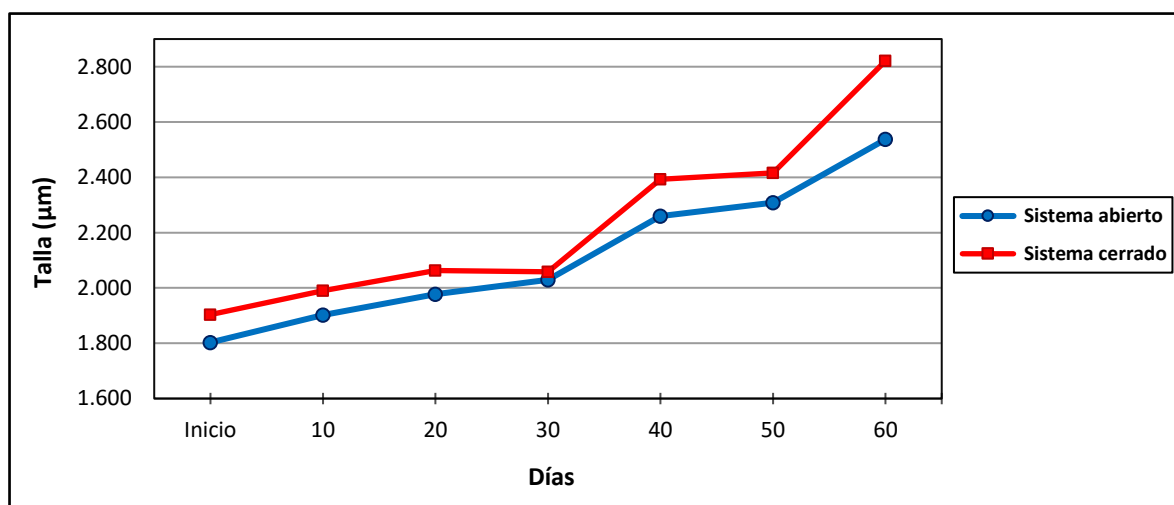


Figura 15: Evolución de la talla (μm) registrada en las semillas de *R. philippinarum* a lo largo de la Prueba 2.

El número de semillas agrupadas en el proceso de tamizado de los dos sistemas estudiados, así como el porcentaje que estas representan, aparece representado en la Figura 16. Como se puede observar, las semillas de mayor tamaño fueron recogidas en el sistema cerrado, quedando estas retenidas en tamices con una luz de malla de 3.500 μm (0,14% del total); en el sistema abierto, la mayor luz de malla utilizada fue de 3.000 μm y en ella quedaron retenidas un 2% de semillas frente al 3,65% presente para ese mismo tamaño en el sistema cerrado. Las tallas medias registradas únicamente fueron superiores en el sistema abierto para los dos tamices de menor tamaño, registrándose las mayores diferencias en los tamices con mallas de 1.000 μm (82,65 μm) y 3.000 μm (254,371 μm); las desigualdades restantes presentaron valores de 54,32 μm (malla de 1.500 μm) y 36,24 μm (malla de 2.500 μm). La presencia de un número de semillas superior en los tamices de 2.500-3.500 μm explica el mayor crecimiento que tuvo lugar en *R. philippinarum* al ser cultivada esta mediante el sistema cerrado.

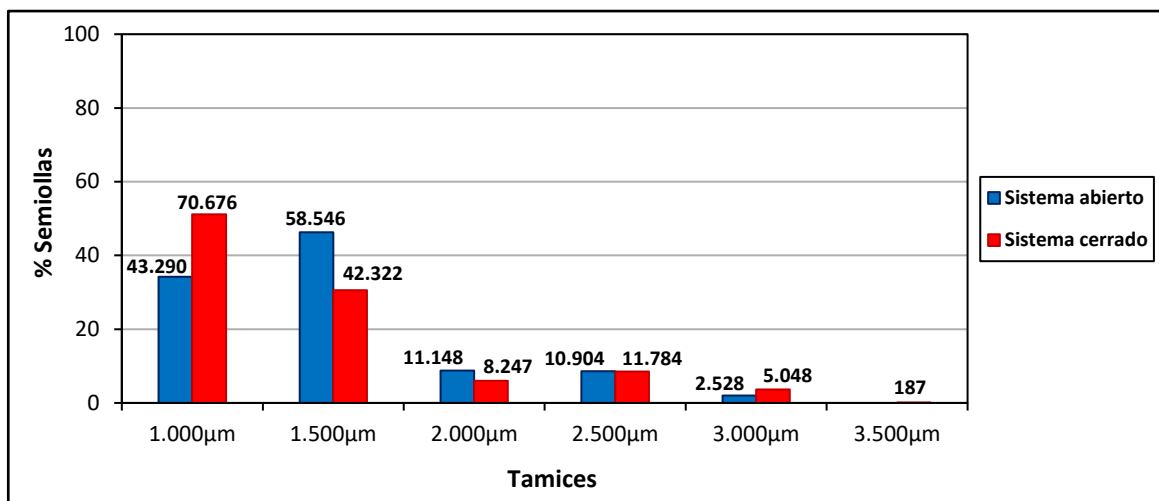


Figura 16: Número y porcentaje de semillas retenidas en cada luz de malla al final de la Prueba 2.

4.2.2.2. Evolución de los pesos fresco y seco

Los pesos frescos y secos registrados durante esta segunda experiencia muestran, al igual que en Prueba 1, una marcada tendencia creciente, alcanzándose también sus mayores valores en las semillas cultivadas mediante el sistema cerrado. Como se puede apreciar en la Figura 17, el peso fresco en los sistemas abierto y cerrado durante los 20 primeros días de la Prueba 2 es prácticamente idéntico. El peso fresco inicial del sistema abierto fue de 1,49 mg mientras que el del sistema cerrado fue de 1,56 mg, los valores obtenidos para dicho parámetro en el segundo muestreo realizado fueron de 2,12 mg y 2,06 mg, respectivamente. A partir de este punto, el peso fresco del sistema abierto se situó siempre por debajo del registrado en el sistema cerrado, tomando en el primero de los casos valores finales de 3,46 mg y en el segundo de 3,65 mg. Las diferencias registradas al finalizar la prueba no fueron significativas ($p\text{-valor} = 0,75 > 0,05$).

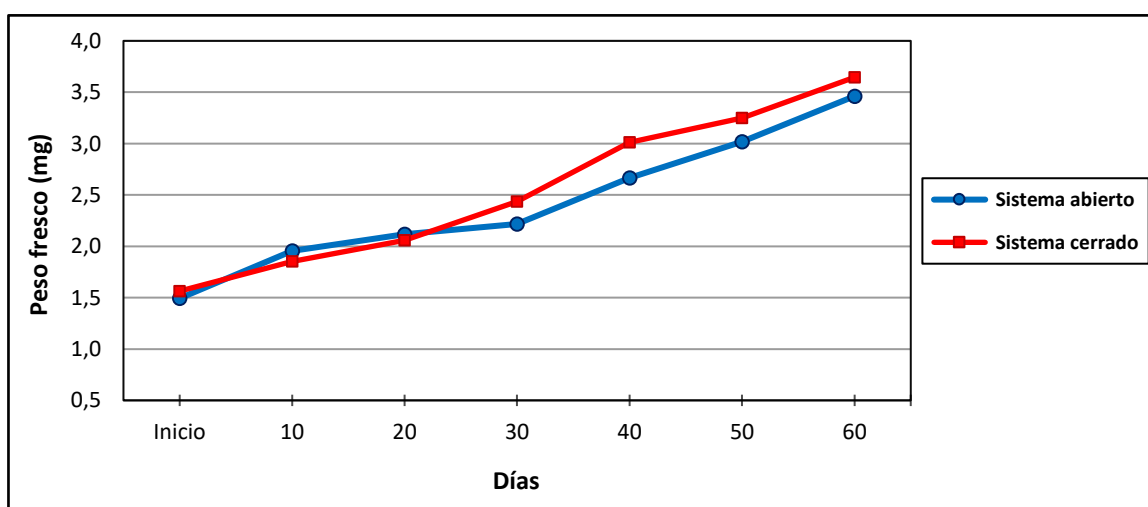


Figura 17: Evolución del peso fresco (mg) en las semillas de *R. philippinarum* a lo largo de la Prueba 2.

La tendencia observada en la evolución del peso seco de las semillas es idéntica a las descritas anteriormente para el peso fresco y en la Prueba 1. Los datos iniciales del sistema abierto fueron ligeramente superiores a los del sistema cerrado, siendo sus valores de 0,73 mg y 0,79 mg, respectivamente. Los pesos registrados transcurridos 20 días de prueba muestran una diferencia de 0,09 mg entre ambos sistemas, momento a partir del cual el peso seco del sistema cerrado toma valores superiores a los del sistema abierto. Tal y como sucede con el peso fresco, las mayores diferencias registradas tuvieron lugar a los 40 días de iniciarse la prueba, siendo en el caso del peso fresco de 0,34 mg y de 0,22 mg para el peso seco. Los valores finales obtenidos en el peso seco de *R. philippinarum* fueron de 1,68 mg en el sistema abierto y de 1,82 mg en el sistema cerrado. La Figura 18 muestra la evolución que tuvo lugar en el peso seco de las semillas de almeja japonesa a lo largo de la Prueba 2. Al igual que en el caso anterior, las diferencias alcanzadas al final del cultivo no fueron significativas ($p\text{-valor} = 0,625 > 0,05$).

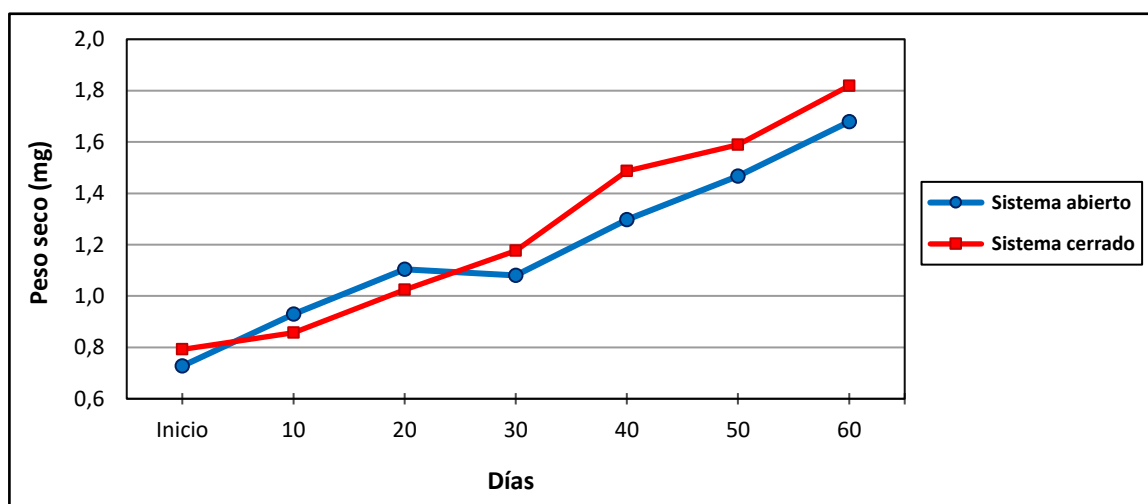


Figura 18: Evolución del peso seco (mg) en las semillas de *R. philippinarum* a lo largo de la Prueba 2.

4.2.2.3. Evolución de la mortalidad

Partiendo de mortalidades iniciales del 2,77% para el sistema abierto y un 3,5% en el sistema cerrado, dichos valores se van incrementando a lo largo de la experiencia hasta alcanzar porcentajes del 18,23% y 19,65%, respectivamente. Los mayores incrementos registrados tuvieron lugar entre los días 20 y 40, pasándose en el sistema abierto de mortalidades del 4,5% al 14,49% y de un 4,41% a un 15,64% en el sistema cerrado. A partir de este último muestreo la tasa de mortalidad disminuye, produciéndose un incremento medio del 1,87% y un 2%, respectivamente. Al término de la experiencia, la mortalidad en el sistema abierto no fue significativamente diferente a la registrada en el sistema cerrado ($p\text{-valor} = 0,5625 > 0,05$).

5. DISCUSIÓN

5.1. Seguimiento de un cultivo larvario de almeja japonesa

La aparición de las etapas de larva D y larva umbonada en el trabajo realizado con *R. philippinarum* tuvieron lugar a los 2 y 6-7 días desde la obtención del desove, con una talla en torno a 97-108 μm y 132-147 μm , respectivamente. Por su parte, el inicio de la fase de fijación se produjo a los 17-18 días posteriores a la puesta, midiendo las larvas pediveliger 230-247 μm ; transcurridos 27-28 días desde la puesta, la totalidad del cultivo se había transformado en postlarvas. Los resultados obtenidos en la duración del cultivo larvario son similares a los obtenidos por Aranda-Burgos *et al.* (2009), Cerviño-Otero (2011), Martínez-Patiño *et al.* (2001) y Nóvoa (2007) en sus estudios con *R. decussatus* y *V. corrugata*.

Tabla V: Tallas (μm) y tiempos de aparición (horas o días tras el desove) de las distintas fases de cultivo en *R. philippinarum* y en el resto de especies cultivadas en el CIMA de Ribadeo. Elaborado a partir de Aranda-Burgos *et al.* (2009), Cerviño-Otero *et al.* (2008), da Costa (2009), Louzán *et al.* (2007), Martínez-Patiño *et al.* (2001), Martínez-Patiño *et al.* (2008), Martínez-Patiño (2002), Nóvoa (2007) y Ojea *et al.* (2008).

	Fase de natación				Fase de fijación y metamorfosis			
	Larva D		Larva umbonada		Larva pediveliger		Postlarva	
	Talla	Horas	Talla	Días	Talla	Días	Talla	Días
<i>R. philippinarum</i>	95-105	30	145-160	8	215-240	20-25	280-350	30-35
<i>R. decussatus</i>	95-100	26	130-150	8	200-220	25-27	260-330	35-40
<i>V. corrugata</i>	100-105	30	140-150	8	210-250	16-18	300-350	22-25
<i>D. trunculus</i>	105-110	42	160-170	8	200-250	20-25	200-300	30
<i>E. magnus</i>	110-125	24	160-200	7	250-310	14	330-380	20
<i>E. siliqua</i>	120-140	24	200-210	5	240-270	10	360-400	14
<i>S. marginatus</i>	160-170	24	200-210	3	230-240	5-6	260-300	8-9

La Tabla V recoge una comparativa de los resultados de crecimiento obtenidos en las distintas especies de venéridos y solénidos con interés comercial en Galicia y cuyo cultivo es llevado a cabo en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo: *R. decussatus*, *R. philippinarum*, *V. corrugata*, *D. trunculus*, *E. magnus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Teniendo en cuenta los resultados mostrados en esta tabla y los obtenidos en el presente trabajo, la fijación y finalización de la etapa

natatoria de *R. philippinarum* (días 17-18 tras la puesta) tuvo lugar más tardíamente que en los solénidos *E. siliqua*, *E. magnus* y *S. marginatus*, al mismo tiempo que *V. corrugata* y antes que *R. decussatus* y *D. trunculus*. En las tres especies de solénidos mencionadas, la fijación y metamorfosis tiene lugar hacia los días 14 (*E. magnus*), 10 (*E. siliqua*) y 5-6 (*S. marginatus*) desde el inicio del cultivo, presentando en el momento de la fijación un tamaño superior al de todos los venéridos. Las tallas alcanzadas en este último grupo al inicio del proceso de fijación son muy similares entre sí; no obstante, los tiempos necesarios para alcanzar dichas tallas difieren de unas especies a otras, siendo en *R. decussatus* de 25-27 días, en *V. corrugata* de 16-18 días y en *D. trunculus* de 20-25 días.

Los tiempos de aparición registrados en cada etapa larvaria de la almeja japonesa fueron menores en este estudio en comparación a los registrados por Aranda-Burgos *et al.* (2009); sin embargo, el rango de tallas alcanzado en este último trabajo fue superior para todas las fases de desarrollo, a excepción del observado en las larvas D, el cual fue prácticamente idéntico. Además, en el presente trabajo tuvieron que transcurrir 28 días desde el desove para que la totalidad del cultivo se hubiese transformado en postlarvas, siendo el tamaño de estas de 260-360 μm ; Aranda-Burgos *et al.* (2009) lograron el mismo resultado pasados 30-35 días desde el inicio del cultivo, pero el rango de tamaños de las postlarvas fue de 280-350 μm .

El proceso de metamorfosis de *R. philippinarum* (30-35 días) es más rápido que el *R. decussatus* (35-40 días), pero más lento que el que tiene lugar en *V. corrugata* (22-25 días). El venérido cuyas postlarvas presentan las mayores tallas es la almeja babosa (300-350 μm), seguida por la almeja japonesa (280-350 μm), la almeja fina (260-330 μm) y, finalmente, la coquina (200-300 μm). En los solénidos *E. siliqua*, *E. magnus* y *S. marginatus*, la finalización del proceso de metamorfosis tiene lugar, tal y como sucedía en la fase de natación, antes que en *R. philippinarum*.

El crecimiento de *R. philippinarum* durante la fase larvaria se ajusta a un modelo lineal, siendo el incremento diario medio obtenido a lo largo de este estudio de 10,7 μm . Los mayores crecimientos registrados en *V. corrugata* por Cerviño-Otero (2011) y Nóvoa (2007) se asemejan a los obtenidos en el presente trabajo, siendo en dichos casos de 11,45 $\mu\text{m}/\text{día}$ y 10,88 $\mu\text{m}/\text{día}$, respectivamente. Este desarrollo lineal ha sido documentado también en las restantes especies de bivalvos cultivadas en el CIMA. Los resultados alcanzados por Pérez-Camacho *et al.* (1977) en una experiencia con larvas mantenidas a diversas temperaturas, hacen pensar que el crecimiento durante la fase larvaria es directamente proporcional a la temperatura, situándose el máximo en 26°C, momento a partir del cual el crecimiento se ralentiza y aumenta la mortalidad.

La supervivencia larvaria en *R. philippinarum* desde el inicio del cultivo hasta la fase de fijación fue de un 70,4%, porcentaje superior al valor medio alcanzado por Cerviño-Otero (2011) en *V. corrugata* (56%) y da Costa (2009) en *S. marginatus* (46%); dichas autoras lograron en alguno de sus cultivos supervivencias del 87% y 83%, respectivamente. La supervivencia obtenida en el presente trabajo fue también superior a la lograda por Martínez-Patiño *et al.* (2008) en *R. philippinarum* (5-50%), Ojea *et al.* (2008) en *R. decussatus* (9-40%), Louzán *et al.* (2007) y Martínez-Patiño *et al.* (2008) en *D. trunculus* (5-10%) y da Costa (2009) en *E. siliqua* (20-52,7%) y *E. magnus* (4,8-24,8%). Por lo general, la supervivencia larvaria en *V. corrugata* y *S. marginatus* son altas, mientras que las mayores mortalidades tienen lugar en *D. trunculus*; la supervivencia en *R. philippinarum* y *R. decussatus* es variable (da Costa *et al.*, 2012).

5.2. Pruebas con sistemas de cultivo de semilla

La fase de preengorde es uno de los cuellos de botella más importante en la obtención de cantidad suficiente de semilla que pueda proveer de forma regular una industria de cultivo de almeja. Por lo general, a pesar de haber trabajado con las colas de un cultivo previo, las mortalidades registradas durante el cultivo de la semilla de almeja fina son más elevadas que las obtenidas para las almejas japonesa y babosa. Las pruebas realizadas para el Informe Final Extenso “Desarrollo de la tecnología de producción y cultivo de almejas” (JACUMAR, 2007) muestran como, de las tres especies estudiadas, la que presenta mayor dificultad para su cultivo es la almeja fina, registrándose elevadas mortalidades en cualquiera de las etapas del proceso. Además, se pone de manifiesto que la manera más adecuada para llevar a cabo el preengorde de semilla durante los meses invernales es haciéndolo en criaderos puesto que en el mar se produce un estancamiento en su crecimiento y una mortalidad importante.

Los resultados obtenidos en la experiencia realizada con *R. decussatus* y *R. philippinarum* mostraron una mayor tasa de crecimiento en esta última especie, pudiendo ser explicadas las diferencias obtenidas por la presencia de un metabolismo más activo en la almeja japonesa. Trabajos realizados por da Costa *et al.* (2012), Figueras (2011), Juanes *et al.* (2012), Munari *et al.* (2011) y Serdar *et al.* (2007) corroboran este supuesto. Los resultados alcanzados por García-Fernández *et al.* (2003) en un estudio comparado entre *R. decussatus*, *V. corrugata* y *R. philippinarum*, coinciden también con los obtenidos en el presente trabajo, proponiendo además una mayor reducción del crecimiento de la almeja fina durante el otoño e invierno. En esta prueba, los autores concluyen que la especie que presenta una mayor tasa de crecimiento a lo largo del cultivo es la almeja babosa.

Para favorecer el crecimiento de las semillas y larvas, Cerviño-Eiroa *et al.* (2005), Jara-Jara *et al.* (1997), Juanes *et al.* (2012), Ruano *et al.* (2015) y Yan *et al.* (2006) proponen el uso de densidades reducidas y una luz de malla lo más grande posible. Estas medidas reducirían el estrés de los individuos al disminuir la acumulación de desechos metabólicos en el agua y la competencia existente por el espacio y el alimento.

La temperatura es uno de los factores más importantes que regulan el crecimiento, la alimentación y el metabolismo de las almejas en los criaderos, pudiendo presentar efectos negativos cuando sus valores son muy elevados (Cerviño *et al.*, 2005; Munari *et al.*, 2011; Ruano *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2006). Los mejores resultados alcanzados por da Costa *et al.* (2012) para el cultivo de *R. philippinarum* se produjeron a temperaturas de 20°C, siendo menores para *R. decussatus* y *V. corrugata* (15-20°C y 20°C, respectivamente). La capacidad de crecimiento de *R. decussatus* está limitada por su sensibilidad a las bajas temperaturas de otoño-invierno, incrementándose su tasa de crecimiento en primavera (García-Pérez *et al.*, 2007). Este resultado se asemeja al obtenido en Martínez *et al.* (1997), mientras que Cerviño-Eiroa *et al.* (2005) encuentran el máximo crecimiento al inicio del verano. Esta última autora propone que el crecimiento experimentado por *R. philippinarum* durante el otoño-invierno es el motivo por el cual completa su desarrollo en un menor tiempo. Fernández-Reiriz *et al.* (2003) mostraron que el consumo de oxígeno en *R. decussatus* a temperaturas de 11°C y 18°C es significativamente inferior al observado en *V. corrugata* bajo las mismas condiciones; no obstante, cuando la temperatura alcanza los 25°C, las diferencias desaparecen. Jara-Jara *et al.* (1997) proponen como concentraciones de oxígeno idóneas para realizar el cultivo de venéridos aquellas con valores de 5.9-7 mg/L.

6. CONCLUSIONES

1- El estudio del desarrollo larvario de *Ruditapes philippinarum* comienza con la formación de la fase de larva D a los 2 días de tener lugar la puesta, siendo los tiempos de aparición de las etapas posteriores de 6-7 días (larva umbonada), 17-18 días (larva pediveliger) y 24-25 días (postlarva). Estos resultados se consiguen con una temperatura de cultivo de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una dieta mixta a base de *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* y *C. muelleri*.

2- La etapa de natación del cultivo larvario de *R. philippinarum* comienza 48 horas después de la puesta y finaliza aproximadamente a los 17-18 días, siendo la supervivencia del 70,4%. Transcurridos 24-25 días del desove, al menos el 50% del cultivo ya había sufrido la metamorfosis.

3- Una vez finalizada la metamorfosis, las larvas de *R. philippinarum* se transformaron en postlarvas trascurridos 27-28 días desde el inicio de la prueba, alcanzando estas a los 41 días de vida tallas de 430-670 μm .

4- De los dos sistemas de cultivo empleados, el que presenta mejores resultados de producción para *R. philippinarum* es el sistema cerrado mientras que en *R. decussatus* esto se consigue con el sistema abierto.

5- *R. philippinarum* presenta una tasa de crecimiento mayor que *R. decussatus* en términos de talla, peso seco y peso fresco.

6- Al no existir mucha diferencia entre los crecimientos y las mortalidades registradas en los dos sistemas objeto de estudio, se recomienda el cultivo en abierto pues este sistema precisa de un menor manejo y mantenimiento.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aranda-Burgos, J.A., da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J. & Martínez-Patiño, D. (2014). Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture*, 420-421:38-48.
- Aranda-Burgos, J.A., Ojea, J., Nóvoa, S. & Martínez-Patiño, D. (2009). Primeros datos de la calidad de las puestas, en relación al estado de los reproductores de dos especies de almejas: *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*. *Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*, 12:617-624.
- Aranguren, R., Gómez-León, J., Balseiro, P., Costa, M.M., Novoa, B. & Figueras, A. (2014). Abnormal mortalities of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1756) in natural bed populations: a practical approach. *Aquaculture Research*, 45:1303-1310.
- Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos, APROMAR. (2016). *La Acuicultura en España 2016*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente. España. 88 pp.
- Cerviño-Eiroa, A., García-Fernández, A. & De Coo-Martín, A. (2005). Resultados de preengorde de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758), en diversos sistemas en las Rías Bajas de Galicia. *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía. 33-34.
- Cerviño-Eiroa, A., García-Fernández, A. & De Coo-Martín, A. (2005). El preengorde de la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), en diversos sistemas de cultivo en las Rías Bajas y litoral de Galicia. *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía. 35-36.
- Cerviño-Otero, A. (2011). *Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa Venerupis pullastra (Montagu, 1803)*. Tesis doctoral en Biología por la Universidade de Santiago de Compostela. 288 pp.
- Cerviño-Otero, A., da Costa, F., Ojea, J., Nóvoa, S. & Martínez-Patiño, D. (2008). Desarrollo embrionario y larvario de tres especies de bivalvos: navaja (*Ensis arcuatus*), longueirón (*Ensis siliqua*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*). *XI Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. 317-320.
- 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*. Tesis doctoral en Biología por la Universidade de Santiago de Compostela. 336 pp.
- da Costa, F., Aranda-Burgos, J.A., Cerviño-Otero, A., Fernández-Pardo, A., Louzán, A., Nóvoa, S., Ojea, J. & Martínez-Patiño, D. (2012). Clam hatchery and nursery culture. En: da Costa, F. (coord.), *Clam fisheries and aquaculture*. Nova Science Publishers, Inc. New York. 217-254.
- Drummond, L., Mulcahy, M. & Culloty, S. (2006). The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture*, 254:326-340.
- Fernández-Reiriz, M.J., Vis, E. & Labarta, U. (2003). Temperature influence on the metabolism of *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*. *IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz. 315-316.
- Fisher, R.A. (1935). *The Design of Experiment*. Hafner Publishing Company. New York. 252pp.
- García-Fernández, A., Cerviño-Eiroa, A., De Coo, A., Bao, M. & Domínguez, M. (2003). Tasa de crecimiento y mortalidad en el preengorde de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758), la almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), en batea en las Rías Bajas. *Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz. 311-313.
- García-Pérez, J.A., Carrasco, J.F., Rodríguez, C. & Arronte, J.C. (2007). Experiencias de preengorde de almeja fina (*Ruditapes decussatus* L. 1758) en la ría del Eo durante el periodo 2005-2007. *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo. 395-396.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2017). *AlgaeBase*. National University of Ireland [en línea]. Galway. [Consulta: 2 enero 2017]. Disponible en <http://www.algaebase.org>.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., Tall, M.L. & Cigarría, J. (2006). *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. Documento Técnico de Pesca de la FAO. Roma. 184 pp.
- Jara-Jara, R., Pazos, A.J., Abad, M., García-Martín, L.O. & Sánchez, J.L. (1997). Growth of clam seed (*Ruditapes decussatus*) reared in the wastewater effluent from a fish farm in Galicia (N. W. Spain). *Aquaculture*, 158: 247-262.
- Juanes, J.A., Bidegain, G., Echavarri-Erasun, B., Puente, A., García, A., García, A., Bárcena, J.F., Álvarez, C. & García-Castillo, G. (2012). Differential distribution pattern of native *Ruditapes decussatus* and introduced *Ruditapes philippinarum* clam populations in the Bay

- of Santander (Gulf of Biscay): Considerations for fisheries management. *Ocean & Coastal Management*, 69:316-326.
- Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos, JACUMAR. (2007). *Desarrollo de la tecnología de producción y cultivo de almejas*. Informe Final Extenso. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España. España. 216 pp.
- Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos, JACUMAR. (2010). *Almejas*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino del Gobierno de España. España. 4 pp.
- Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos, JACUMAR. (2012). *Acuicultura Integrada: Experiencia Piloto para el Desarrollo de Sistemas de Cultivo Multitróficos (2008-2011)*. Informe Final C.A. de Galicia. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España. España. 128 pp.
- Louzán, A., Cerviño-Otero, A., Nóvoa, S., Ojea, J. & Martínez-Patiño, D. (2007). Seguimiento del ciclo reproductor y desarrollo larvario de una población de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758). *Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*, 10:475-481.
- Martínez, M., Cerviño-Eiroa, A., Coa, A., García, A., Martínez-Patiño, D., Nóvoa, S., Ojea, J., Sebe, M.P., Casal, A., Fariña, J., Mosquera, P. & Rodríguez, R. (1997). Preengorde de almeja fina (*Ruditapes decussata*) en sistemas sobreelevados. *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*. Cartagena. 233-238.
- 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*. Tesis doctoral en Biología por la Universidade de Santiago de Compostela. 240 pp.
- Martínez-Patiño, D. (2013). Balance de las nuevas especies aportadas a la diversificación de la acuicultura y el marisqueo. *Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galega*, 15:73-92.
- Martínez-Patiño, D., Cerviño-Otero, A., Louzán, A., da Costa, F., Ojea, J. & Nóvoa, S. (2008). Producción de especies de interés marisquero en la Planta de Cultivos de Ribadeo. *II Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura*. Cumaná. 629-633.
- Martínez-Patiño, D., Nóvoa, S. & Ojea, J. (2001). Cultivo larvario y postlarvario de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja babosa (*Venerupis senegalensis*) en criadero. *Actas del VIII Congreso Nacional de Acuicultura*. Santander. 304-306.

- Munari, M., Matozzo, V. & Marin, M.G. (2011). Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:1024-1030.
- Nóvoa, S. (2007). *Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, Venerupis pullastra (Montagu, 1803). "Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de microencapsulación lipídica"*. Tesis doctoral en Biología por la Universidade de Santiago de Compostela. 244 pp.
- Ojea, J. (2013). *Estudio del desarrollo gametogénico de la almeja fina, Ruditapes decussatus (Linné, 1758) en el medio natural y optimización de las condiciones del acondicionamiento en criadero*. Tesis doctoral en Biología por la Universidade de Santiago de Compostela. 155 pp.
- Ojea, J., Martínez, D., Nóvoa, S., Pazos, A.J. & Abad, M. (2002). Contenido y distribución de glucógeno en relación con el ciclo gametogénico de *Ruditapes decussatus* (L., 1758) en una población natural de las lagunas de Baldaio (Galicia, noroeste de España). *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 18(1-4):307-313.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Nóvoa, S., Sánchez, J.L. & Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*, 238:451-468.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez-Patiño, D., Nóvoa, S., García-Martínez, P., Sánchez, J.L. & Abad, M. (2008). Effects of temperature regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussatus*. *Journal of Shellfish Research*, 27(5):1093-1100.
- Pérez-Camacho, A. (1991). *Cultivo de almejas en playa*. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura, Xunta de Galicia. A Coruña. 40 pp.
- Pérez-Camacho, A. (2007). El cultivo de moluscos bivalvos en Galicia: entre paradigma y la entelequia. *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo. 373-378.
- Pérez-Camacho, A., Román-Cabello, G. & Torre-Cervigón, M. (1977). Experiencias en cultivos de larvas de tres especies de moluscos bivalvos: *Venerupis pullastra* (Montagu), *Venerupis decussata* (Linnaeus) y *Ostrea edulis* (Linnaeus). *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 235:215-268.
- Pesca de Galicia*. (2016). Xunta de Galicia [en línea]. Galicia. [Consulta: 12 diciembre 2016]. Disponible en <http://www.pescadegalicia.gal>.

- Polanco, E., Corral, M.L., Grizel, H., Montes, J., Gogar, H. & Martínez, F. (2000). *Análisis del desarrollo de los cultivos: medio, agua y especies*. Ed. Mundi Prensa, Tomo I. Madrid. 246 pp.
- Programa de información de especies acuáticas. *Ruditapes decussatus*. Texto de Figueras, A. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 13 enero 2005. [Consulta: 22 noviembre 2016]. Disponible en http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_decussatus/es.
- Programa de información de especies acuáticas. *Ruditapes philippinarum*. Texto de Gouletquer, P. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 1 enero 2005. [Consulta: 22 noviembre 2016]. Disponible en http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/es.
- Rodríguez-Moscoso, E. & Arnaiz, R. (1998). Gamatogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture*, 162:125-139.
- Rodríguez-Moscoso, E., Pazo, J.P., García, A. & Fernández-Cortes, F. (1992). Reproductive cycle of manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in Ria of Vigo (NW Spain). *Scientia Marina*, 56(1):61-67.
- Ruano, F., Batista, F.M. & Arcangeli, G. (2015). Perkinsosis in the clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131:58-67.
- Ruiz-Azcona, M.P. (2013). *Guía de cultivo de almeja en criadero*. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía. Huelva. 20 pp.
- Serdar, S., Lök, A., Köse, A., Yildiz, H., Acarli, S. & Gouletquer, P. (2007). Growth and survival rates of carpet shell clam (*Tapes decussatus* Linnaeus, 1758) using various culture methods in Sufa (Homa) Lagoon, Izmir, Turkey. *Aquacultural Engineering*, 37:89-99.
- Tezuka, N., Kanematsu, M., Asami, K., Sakiyama, K., Hamaguchi, M. & Usuki, H. (2013). Effect of salinity and substrate grain size on larval settlement of the asari clam (Manila clam, *Ruditapes philippinarum*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 439:108-112.

- WoRMS Editorial Board. (2017). *World Register of Marine Species*. Flanders Marine Institute (VLIZ) [en línea]. Bélgica. [Consulta: 2 enero 2017]. Disponible en <http://www.marinespecies.org>.
- Yan, X.W., Zhang, G.F. & Yang, F. (2006). Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture*, 253:350-358.
- Yan, X.W., Zhang, Y., Huo, Z., Yang, F. & Zhang, G.F. (2009). Effects of starvation on larval growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Acta Ecologica Sinica*, 29:327-334.