

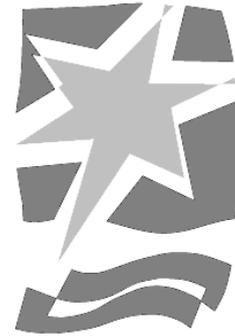
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

MÁSTER UNIVERSITARIO EN EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO AMBIENTAL DE
ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA
SUPERIOR DE GANDIA

“Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)”

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Autora:

Idoia Palomares Sala

Tutores:

Miguel Rodilla Alama

José Rafael García March

GANDIA, 2020

Resumen:

En los últimos años, *Pinna nobilis* prácticamente se ha extinguido de nuestras costas, con la excepción del Delta del Ebro y el Mar Menor, debido al protozoo *Haplosporidium pinnae*, que provoca una enfermedad mortal en las nacras. Para recuperar esta especie, los proyectos de cría en cautividad son una de las mejores opciones. En estos, la alimentación es un aspecto crítico y de los más complicados de ajustar. En el presente trabajo, se estudiaron las tasas de filtración de nacras a 8.5°C, 14.0°C y 18.0°C, suministrando una concentración de 2mm³ de fitoplancton y midiendo su disminución. A 8.5°C, se obtuvo una tasa de filtración de 3.3±2.4L/h, a 14.0°C, de 25.4±7.1L/h y a 18.0°C, de 22.9±9.7L/h. Además, se estudió la respiración, ya que se puede relacionar con la dieta que necesita la nacra, en un recipiente hermético. Se obtuvo que las tasas de respiración fueron de 4.12±0.59mgO₂/h para 14.0°C y de 4.87±0.90mgO₂/h para 18.0°C. Para 14°C, un individuo de *P. nobilis* requiere una dieta correspondiente al 1.77%±0.27 de su peso seco y para 18°C, al 1.83%±0.33. Los resultados obtenidos permiten mejorar las dietas suministradas a nacras en cautividad para desarrollar su maduración.

Palabras clave: cría en cautividad, dieta, fitoplancton, bivalvo, tasa de respiración.

Abstract:

During the last years, *Pinna nobilis* has almost become extinct in our coasts, except in Delta del Ebro and Mar Menor, due to the protozoan *Haplosporidium pinnae*, which causes a mortal illness to these bivalves. Captive breeding projects are among the best solutions to recover the specie. In them, feeding is a critic aspect and one of the most difficult parameters to adjust. In this project, filtration rates of fan mussels have been studied for three temperatures – 8.5°C, 14°C and 18°C – supplying a concentration of phytoplankton of 2mm³ and measuring its decrease. For 8.5°C, the filtration rate was 3.3±2.4L/h; for 14.0°C, it was 25.4±7.1L/h; and for 18°C, it was 22.9±9.7L/h. Besides, respiration was studied since it can be related to the diet the fan mussel needs. A hermetic bucket was used to do it. Respiration rates were 4.12±0.59mgO₂/h for 14°C and 4.87±0.90mgO₂/h for 18.0°C. The optimal diet was an 1.77±0.27% of dry weight of the fan mussel for 14°C and 1.83±0.33% for 18.0°C. The results obtained might improve the diets supplied to captive fan mussels and, develop its maturation.

Keywords: captive breeding, diet, phytoplankton, bivalve, respiration rate.

Resum:

En els últims anys, *Pinna nobilis* pràcticament s'ha extingit de les nostres costes, amb l'excepció del Delta de L'Ebre i el Mar Menor, degut al protozou *Haplosporidium pinnae*, que provoca una malaltia mortal en les nacres. Per a recuperar esta espècie, els projectes de cria en captivitat són una de les millors opcions. En aquests, l'alimentació es un aspecte crític i dels més complicats d'ajustar. En el present treball, es varen estudiar les taxes de filtració de nacres a 8.5°C, 14.0°C i 18.0°C, subministrant una concentració de 2mm³ de fitoplàncton i mesurant la seua disminució. A 8.5°C, es va obtindre una taxa de filtración de 3.3±2.4L/h, a 14.0°C, de 25.4±7.1L/h i a 18.0°C, de 22.9±9.7L/h. A més, es va estudiar la respiració, ja que es pot relacionar amb la dieta que necessita la nacra, en un recipient hermètic. Es va obtindre que les taxes de respiració foren de 4.12±0.59mgO₂/h per a 14.0°C i de 4.87±0.90mgO₂/h per a 18.0°C. Per a 14°C, un individu de *P. nobilis* requereix una dieta corresponent al 1.77%±0.27 del seu pes sec i per a 18°C, al 1.83%±0.33. Els resultats obtinguts permeten millorar la dieta subministrada a nacres en captivitat per a desenvolupar la seua maduració.

Paraules clau: cria en captivitat, dieta, fitoplàncton, bivalve, taxa de respiració.

Agradecimientos

Primeramente, me gustaría agradecer el trabajo de mis tutores para ayudarme en lo que he requerido a lo largo de todo el proceso de realización del Trabajo Final de Máster, así como por todas las correcciones y apuntes. Estoy muy agradecida con José Rafael García March, además, por permitirme realizar este trabajo junto con el grupo de investigación del IMEDMAR-UCV.

La ayuda de todo el grupo de investigación ha sido imprescindible para redactar este trabajo y, en especial, de las técnicas de laboratorio por ayudarme a tomar todos los datos, aunque no fueran horas de trabajo. También me gustaría agradecer todo el trabajo realizado por Sebastián Hernandis, tanto para hacer funcionar el experimento, como toda la ayuda y explicaciones prestadas a la hora de analizar los datos.

Por último, quisiera remarcar la importancia que han tenido mis amigos en los momentos de estrés y toda la ayuda que me han brindado, haciendo posible este trabajo.

Índice

1. Antecedentes	1
2. Introducción	3
2.1. Filtración.....	3
2.2. Respiración	4
2.3. Reproducción	5
2.4. Efectos fisiológicos de la temperatura	6
2.3. Objetivos	6
3. Materiales y métodos	7
3.1. Alimentación de las nacras.....	7
3.2. Ejemplares de nacras utilizados para la experimentación	9
3.3. Sistema de acuarios.....	10
3.4. Aclaramiento	12
3.5. Respiración	12
3.6. Análisis estadístico	14
4. Resultados	15
4.1. Alimentación de mantenimiento	15
4.2. Aclaramiento	17
4.3. Respiración	20
5. Discusión	24
6. Conclusión	27
Referencias	28

Índice Figuras

Figura 1. Esquema de <i>Pinna nobilis</i>	1
Figura 2. Tubos de fitoplancton	8
Figura 3. Cepas y balones de fitoplancton	8
Figura 4. Recta de calibración del espectrofotómetro	9
Figura 5. Sistema de acuarios	10
Figura 6. Sonda multiparamétrica.....	11
Figura 7. Cubo para la respiración	13
Figura 8. Alimentación de mantenimiento	16
Figura 9. Diagrama de cajas: Aclaramiento por individuo	18
Figura 10. Diagrama de cajas: Aclaramiento por largo de valva.....	19
Figura 11. Diagrama de cajas: Aclaramiento por peso seco	19
Figura 12. Diagrama de cajas: Respiración por individuo	21
Figura 13. Diagrama de cajas: Respiración por largo de valva.....	22
Figura 14. Diagrama de cajas: Respiración por peso seco	22
Figura 15. Diagrama de cajas: Dieta.....	23

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

Índice Tablas

Tabla 1. Datos biométricos	9
Tabla 2. Datos tasas de filtración a 8.5 °C	17
Tabla 3. Datos tasas de filtración a 14.0 °C	17
Tabla 4. Datos tasas de filtración a 18.0 °C	18
Tabla 5. Datos tasas de respiración a 14.0 °C.....	20
Tabla 6. Consumo de energía a 14.0 °C.....	20
Tabla 7. Datos tasas de respiración a 18.0 °C.....	21
Tabla 8. Consumo de energía a 18.0 °C.....	21
Table 9. Volumen de l. galbana que requieren nacras de 30 cm para cada temperatura estudiada.....	24

ANTECEDENTES

La nacra (*Pinna nobilis* Linneo, 1758) es un bivalvo endémico del Mar Mediterráneo, cuya longitud puede superar el metro, siendo el bivalvo más grande de este mar y el segundo más grande del mundo, después de *Tridacna gigas* (L., 1758) (García-March *et al.*, 2007; Addis *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2015). Es una especie muy longeva, con citas de hasta 45 años (Rouanet *et al.*, 2015). Habita praderas marinas, especialmente de *Posidonia oceanica* (L.) Delile, 1813 y *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, 1870, aunque también se encuentra en fondos de arena y de maërl (Ramos, 1998; Katsanevakis, 2006; Basso *et al.*, 2015) y ocupa un rango de profundidad desde 0.5 m hasta 60 m (Butler *et al.*, 1993), parcialmente enterrada en el sedimento y anclada por el biso (Figura 1). Pertenece a la familia Pinnidae, que comparte con los géneros *Streptopinna* y *Atrina*.

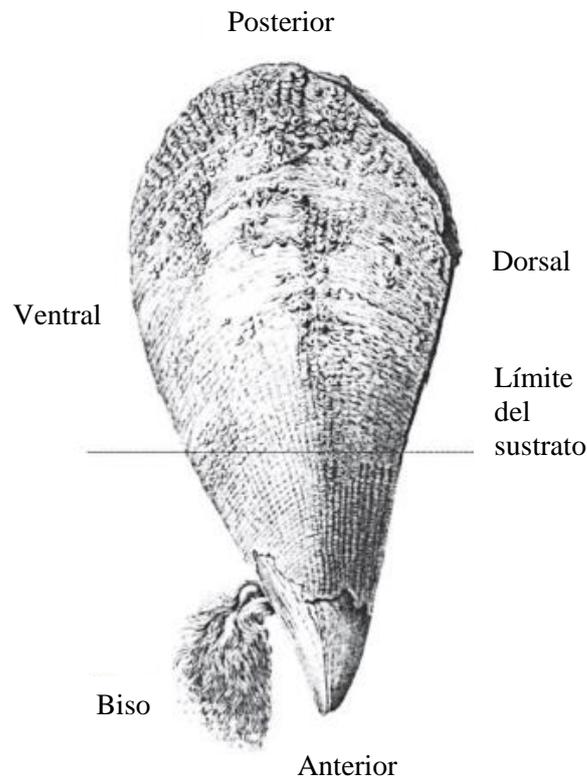


Figura 1: Esquema de *Pinna nobilis*. La línea marca la parte de la nacra que queda enterrada. Traducido de Basso *et al.*, 2015.

A finales de 2016 se detectó una infección masiva de las poblaciones de *P. nobilis* debida al protozoo *Haplosporidium pinnae* (Catanese *et al.*, 2018) que provocó una mortalidad masiva. En verano de 2017, la mortalidad en la mayoría de las poblaciones españolas ya era del 100% y actualmente, la enfermedad se ha extendido por todo el Mar Mediterráneo, con similares tasas de mortandad (IUCN, 2020).

Debido a esta situación, el mantenimiento en cautividad de *Pinna nobilis*, así como la cría de esta especie, son fundamentales para su recuperación, ya que permitirían la reproducción de individuos resistentes a la enfermedad. Sin este tipo de medidas, es muy probable que la especie se extinga (García-March *et al.*, 2020).

Uno de los aspectos más importantes para la cría en cautividad es, además de ajustar los parámetros fisicoquímicos del agua a las mejores condiciones para las nacras, conseguir una dieta adecuada para mantenerlas sanas y en condiciones de reproducirse. La composición de la dieta puede afectar a la reproducción en bivalvos (Pettersen *et al.*, 2010). Es más, Padro *et al.* (2020) observaron que esta puede afectar incluso a la supervivencia en *Pinna nobilis*.

Desde el centro IMEDMAR-UCV se pretende mantener individuos de esta especie y, en última instancia conseguir gametos y larvas viables de estos. Para ello, estudios como el que se proponen en este trabajo, de alimentación de las nacras, cuánto filtran y, en general su fisiología energética, son muy importantes. Especialmente, conocer los efectos que tiene la temperatura es crucial, ya que se plantean futuros experimentos que incluyen cambio de esta con la intención de conseguir gametos de *P. nobilis*.

INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XX las poblaciones de *Pinna nobilis* empezaron a decrecer, debido principalmente a actividades antrópicas, especialmente el anclaje de los barcos, las redes de arte menor y la pesca de arrastre (Katsanevakis, 2007; Guallart y Templado, 2012; Hendriks *et al.*, 2013), y a la fragmentación y pérdida de las praderas de *Posidonia oceanica* a las que suelen estar asociadas (Marbà *et al.*, 2005). Por ello, se han ido aplicando distintas figuras de protección a estos bivalvos. La nacra está incluida en la lista de especies amenazadas del Mar Mediterráneo (Anexo II de la Convención de Barcelona, 1995) y protegida por la Directiva Hábitats de la UE (Anexo IV, Directiva 92/43/CEE) y hasta hace poco, en el Catálogo Español de Especies Amenazadas bajo la categoría de “vulnerable” (Real Decreto 139/2011), aunque más recientemente su estado se ha modificado a “en peligro de extinción” (Orden TEC/596/2019).

Hasta el año 2016, las medidas aplicadas habían tenido un éxito variable, dependiendo de la zona. Mientras que en algunos sitios las densidades seguían siendo bajas (Guallart y Templado, 2012), en otros las poblaciones se estaban claramente recuperando (García-March *et al.*, 2020).

Las nacras cumplen un rol ecológico muy importante, ya que sirven como sustrato a muchas especies sésiles, de forma que en cada uno de estos organismos se crea un microecosistema. Debido a esto, se las considera ingenieras de ecosistemas, ya que pueden modificar las características fisicoquímicas de su hábitat, como por ejemplo aumentan la claridad del agua al ser grandes filtradores (Trigos *et al.*, 2014). Incluso pueden provocar un aumento de la diversidad local (Rabaoui *et al.*, 2015). Cabe destacar, además, que *Pinna nobilis* se puede usar como bioindicador (Morató Trobat *et al.*, 2013).

FILTRACIÓN

Estos bivalvos son filtradores y, como tales, se alimentan tanto de materia orgánica que se encuentra en las partículas de detritos, como de fitoplancton y zooplancton, que se encuentran en la columna de agua. Las nacras de menor tamaño consumen preferentemente detritos, mientras que la proporción ingerida de este disminuye conforme aumenta el tamaño de los bivalvos. En cambio, aumenta la ingesta de fitoplancton y zooplancton cuanto mayor es la talla de las nacras (Nadjek *et al.*, 2013; Trigos *et al.*, 2014). En cuanto al tipo de zooplancton que ingieren, Davenport *et al.* (2011) mediante análisis estomacales indican que se trata de copépodos principalmente, aunque hay una gran variedad de especies, que incluye incluso larvas de otros bivalvos. Este tipo de alimentación muestra que las nacras podrían ser depredadores oportunistas, conclusión expresada por Morton y Puljas (2018) a partir de un estudio anatómico además de un análisis del contenido estomacal de las nacras.

En cuanto al mecanismo de filtración, las nacras no tienen sifones, estructuras que permiten a otros bivalvos filtrar el agua, por lo que necesitan tener su manto extendido para llevar a cabo este proceso. Esto tiene ciertas ventajas, como el mantenimiento de un alto nivel de bombeo de agua sin el alto coste energético derivado del uso de sifones, pero también desventajas, como una mayor entrada de sedimento en la concha (Butler *et al.*, 1993).

Este manto, además, no está unido a la concha, lo que permite a la nacra extenderlo y retraerlo. Esta habilidad, junto con la composición única de sus valvas, son las responsables de su gran tamaño y estilo de vida. Al levantarse sobre el sustrato considerablemente, las valvas de las nacras se dañan fácilmente por depredadores, olas o corrientes fuertes, barcos y redes de

pesca..., pero las nacras son capaces de regenerar las partes rotas de las valvas rápidamente, gracias a las dos características mencionadas anteriormente (Schultz y Huber, 2013).

Conocer la tasa de filtración y saber cómo se alimentan las nacras son aspectos muy importantes para comprender su fisiología y así poder proporcionarles las mejores condiciones posibles para su correcto mantenimiento en cautividad.

Para estudiar los mecanismos de filtración y alimentación en bivalvos se han usado distintas técnicas que relacionan las tasas de aclaramiento y filtración del agua con la tasa de ingesta de alimento por parte del bivalvo. Midiendo la cantidad de comida disponible y como esta disminuye con el tiempo, se puede calcular la tasa de aclaramiento, es decir, como el agua se vuelve más clara, y se puede relacionar con la tasa de filtración del bivalvo. En ambientes controlados, el aclaramiento del agua será directamente proporcional a la filtración e ingesta por parte del animal, de forma que estas variables se pueden relacionar entre ellas. Para ello, se pueden usar modelos como los de Riisgard (2001), Hildreth y Crisp (1976) o Conover (1966), para tasas de aclaramiento, filtración e ingesta, respectivamente, que permiten relacionarlas con la concentración de fitoplancton en el agua.

Elliot *et al.* (2008) usaron fluorimetría para calcular la concentración de fitoplancton filtrada por mejillones zebra (*Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)) e inferir la tasa de aclaramiento a partir de la fluorescencia de la clorofila. Estos bivalvos filtraron hasta 570 ± 20 mL/(h*g peso húmedo).

Nieves-Soto *et al.* (2013) usaron, en cambio, un contador de partículas tipo Coulter Counter para medir los cambios en el fitoplancton con el que alimentaban *Atrina tuberculosa* (G. B. Sowerby I, 1835), otra especie de nacra, y así ver sus tasas de aclaramiento y filtración. Encontraron que la capacidad de filtración del bivalvo varió con la temperatura y la concentración del fitoplancton, sin llegar a un óptimo claro, con un rango entre 0.37 y 3.96 L por hora y gramo, según las condiciones experimentales. De la misma forma, pero mediante un microscopio y un contador de células, Ackerman (1999) estudió las tasas de filtración en dreisénidos (*Dreissena sp.*).

Otra forma de estudiar la filtración de los bivalvos es mediante las heces y pseudoheces producidas por los mismos. Las pseudoheces son alimento que es captado por estos animales, pero que no se digiere, de forma que se expulsa nada más captarlo. Suelen producirse cuando la concentración de alimento en el agua es demasiado alta o cuando se trata de alimento poco nutritivo (Newell, 2004). Hoellein *et al.* (2014) usaron las heces en el ostión de Virginia (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)), de las que obtuvieron información de la cantidad de comida que habían digerido los bivalvos, y las pseudoheces, que les dio información del alimento captado, pero no digerido. Estos datos, junto con el peso de los ostiones y análisis de las partículas del medio, les sirvieron para calcular las tasas de filtración e ingestión. Encontraron que diversos grupos de esta especie presentaban tasas de filtración distintas, desde 3.5 L/(g·h) y 10 L/(g·h), mientras que el porcentaje de partículas no digeridas era el mismo.

RESPIRACIÓN

Otro aspecto que puede aportar mucha información sobre la fisiología de las nacras es la respiración. La velocidad a la que se consume el oxígeno está relacionada con la actividad metabólica que presenta el organismo. Además, restringe la densidad de organismos que pueden ocupar en un hábitat determinado, ya que, si las tasas de respiración son elevadas, el

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

oxígeno disponible es menor y, por tanto, las densidades de las poblaciones han de ser menores (Breitburg *et al.*, 2003).

El oxígeno disponible en el agua, especialmente para animales en cautividad, es un factor muy importante a tener en cuenta, ya que puede disminuir muy rápidamente si las condiciones no son adecuadas, lo que provocaría la muerte de estos animales.

Estudiar la respiración de los bivalvos es relativamente más sencillo que en el caso de la capacidad de filtración, ya que existe una gran variedad de sensores de oxígeno, principalmente en cuanto a tamaño y precisión. Por esto, junto a su facilidad de uso, actualmente suelen usarse los sensores ópticos. El estudio de consumo de oxígeno solo requiere, además de estos sensores, un recipiente hermético donde poner al bivalvo. De esta forma, Freitas *et al.* (2020) encontraron que en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) la tasa de respiración disminuía en presencia de contaminantes.

Usando el mismo método, Saavedra *et al.* (2018) midieron la tasa de respiración del mejillón patagónico (*Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819)) para estudiar cómo les afectarían cambios en la presión de CO₂. Detectaron que, a niveles altos de esta, la respiración y, por tanto, el metabolismo de estos bivalvos se reducía.

Otra forma de calcular la medir la concentración de oxígeno es mediante cámaras CALMAR (*Chambre Autonome Légère MANipulable par ROV*). Se usan principalmente para bivalvos en libertad, ya que no requiere la manipulación directa del individuo, aunque también se puede usar para bivalvos en cautividad. Este tipo de aparatos miden el flujo de oxígeno (en mol), mientras que los sensores ópticos miden la concentración en mg de O₂. Khripounoff *et al.* (2017) usan este método para medir la respiración de bivalvos Vesicomidae y Mytilidae. Observaron que la respiración de los primeros (16 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g peso seco})$) fue menor que la de los segundos (33 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g peso seco})$).

REPRODUCCIÓN

Las nacras son hermafroditas, con capacidad para cambiar de sexo durante cada periodo de reproducción anual. A partir de los 2 años, cuando alcanzan la madurez sexual, se empieza a producir la maduración de los gametos, que es asincrónica, evitando así la autofecundación. A partir de marzo, los individuos empiezan a formar los gametos, que serán liberados entre junio y agosto. Además, en septiembre se produce una segunda fase de maduración y liberación de gametos, antes de entrar en reposo sexual hasta marzo del año siguiente (De Gaulejac, 1995).

Las larvas son el único estado pelágico de la especie, y también el más vulnerable, como ocurre con muchos otros moluscos. Por ello, requieren las mejores condiciones posibles, que, en el caso de las nacras se dan verano, cuando las temperaturas son más altas (Todd y Doyle, 1981; Przeslawski *et al.*, 2005).

La delicadeza de las larvas es uno de los motivos por los que aún no se han conseguido juveniles mediante cría en cautividad. También influye, además, que hay muy poca información respecto a las nacras y, en concreto, a su reproducción y su estado larvario (Basso *et al.*, 2015).

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA TEMPERATURA

La temperatura puede tener efectos muy diversos en los bivalvos, ya sean de comportamiento, fisiológicos o, incluso, cambios en la transcripción de los genes.

Juárez *et al.* (2018) observaron que, en función de la temperatura a la que eran sometidas las almejas gigantes (*Panopea globosa* Dall, 1898), su transcripción genética cambiaba, tanto si los cambios de temperatura eran agudos, es decir se daban de forma repentina, como si se dejaba que los bivalvos se aclimatasen.

Tuszer-Kunc *et al.* (2020) observaron que la actividad metabólica de la rangia atlántica (*Rangia cuneata* (G. B. Sowerby I, 1832)) aumentó cuando expusieron a este bivalvo a un aumento de temperatura. A 20 °C su tasa metabólica era 6.5 veces mayor que a 10 °C.

Además, la temperatura influye en la reproducción de las nacras, los gametos se producen en verano cuando aumentan las temperaturas (Deudero *et al.*, 2017; Kersting y García-March, 2017). Este dato es considerado imprescindible para que la cría en cautividad tenga éxito.

Las tasas de aclaramiento y filtración también se pueden ver afectadas por la temperatura (Nieves-Soto *et al.*, 2013), por lo que para la cría en cautividad es muy importante estudiar la cantidad de alimento que requiere dentro de los rangos de temperatura experimentales.

Trigos *et al.* (2015) observaron que la temperatura también afecta a las tasas de respiración de las nacras. El consumo de oxígeno en esta especie era mayor a 20 °C en comparación con temperaturas más altas (25 °C) y bajas (16 °C), es decir, a temperaturas más extremas su respiración y, por ende, su actividad, se reducía.

Por otra parte, estudiar la fisiología de *Pinna nobilis* en función de la temperatura también puede aportar datos sobre los individuos que quedan en libertad, ya que la mayoría viven en zonas confinadas, como el Mar Menor, donde las temperaturas pueden variar con rapidez, siendo, normalmente, más extremas que en mar abierto, tanto en cuanto a máximas en verano, como a mínimas en invierno (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005; García-March *et al.*, 2020).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es mejorar las condiciones de mantenimiento en cautividad de *P. nobilis* para conseguir la maduración gonadal de forma artificial. Para conseguirlo, se han planteado los siguientes objetivos secundarios:

- Estudiar la capacidad de filtración y respiración de *Pinna nobilis* en función de la temperatura del agua.
- Calcular las dietas óptimas de fitoplancton vivo dependiendo de la temperatura y el volumen de los tanques de circuito cerrado.
- Comparar los datos obtenidos con los ya existentes de *P. rudis*, para establecer similitudes fisiológicas entre las dos especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

ALIMENTACIÓN DE LAS NACRAS

La especie de fitoplancton utilizada para el experimento es *Isochrysis galbana* Parke, 1949. Se trata de un alga unicelular del filo Haptophyta, grupo que compone entre un 30% y un 50% de la producción fotosintética mundial en los océanos (Liu *et al.*, 2009). Esta microalga ha sido ampliamente usada como alimento en acuicultura, especialmente para la cría de moluscos, ya que presenta una gran cantidad de PUFAs (*polyunsaturated fatty acids*, ácidos grasos poliinsaturados), entre otras biomoléculas esenciales, y se puede cultivar con relativa facilidad (Lin *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2020).

Esta especie se cultivó mediante tubos de metacrilato de 40 L (Figura 2) con luz de 1000 lm y 4000 K (380 nm - 800nm) y aireación continua, en los que se inoculaba 1 L concentrado (entre 1.1 A y 1.2 A de absorbancia, que corresponden a entre $8.6 \cdot 10^8 \mu\text{m}^3/\text{mL}$ y $9.6 \cdot 10^8 \mu\text{m}^3/\text{mL}$) de esta especie. Dentro de los tubos se dejaba crecer durante dos semanas hasta alcanzar aproximadamente 0.9 A, que corresponde a $6.7 \cdot 10^8 \mu\text{m}^3/\text{mL}$ (Figura 3). Las cepas a partir de las que se inocularon los balones de 1 L procedieron de la sede de Mazarrón (Murcia) del IEO (Instituto Español de Oceanografía). A partir estas cepas se inoculaban, además, nuevas cepas para mantener el cultivo lo más limpio y puro posible.

Para conseguir la mayor concentración de fitoplancton posible, se optimizaron las condiciones de los cultivos. En concreto, se aumentó la cantidad de luz que recibían los tubos, así como la cantidad de CO_2 .

Para aumentar la cantidad de luz sobre los tubos, se aumentó el número de leds incidentes en cada uno mediante una malla colocada alrededor de este, al que se le engancharon los leds. Para mejorar la cantidad de CO_2 , se aumentó la aireación de los tubos, mediante un incremento de la presión de aire.

Además, el control de la temperatura fue muy importante para el adecuado crecimiento del alga. Los cultivos se mantuvieron entre los 18-20 °C, ya que mayores temperaturas facilitan el crecimiento de otros organismos competidores, como otras algas y hongos. Para evitar la contaminación, además de mantener la temperatura en este rango, también se procesó el agua mediante filtros mecánicos de 1 μm y el aire mediante filtros de 5 μm .

Para la alimentación de las nacras, cada día se midió la concentración del fitoplancton mediante un espectrofotómetro y se calculó la cantidad que requerían los bivalvos. El espectrofotómetro fue calibrado mediante un contador de partículas Counter Coulter Multisizer III (Figura 4). El rango de absorbancias obtenido durante el experimento fue de 0.600 A a 1.000 A, que corresponde a entre $3.9 \cdot 10^8 \mu\text{m}^3$ y $7.7 \cdot 10^8 \mu\text{m}^3$ (volumen de las células) por mL de cultivo.



Figura 2: Tubos de fitoplancton. El color indica la concentración de fitoplancton que tiene y cuando fue inoculado, aproximadamente. Se puede observar las camisas de malla de plástico fabricadas para enfocar la luz y que incide con mayor eficacia sobre la columna de agua.

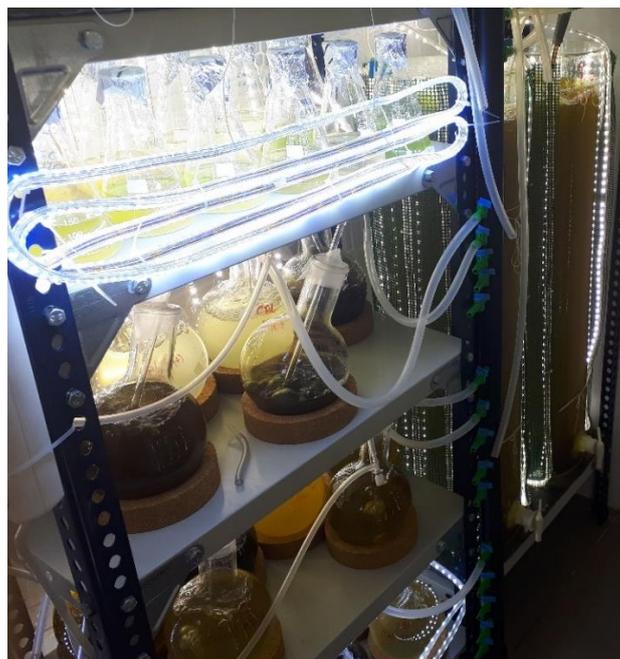


Figura 3: Cepas (matraces de Erlenmeyer) y balones de fitoplancton que se usaron para inocular los tubos.

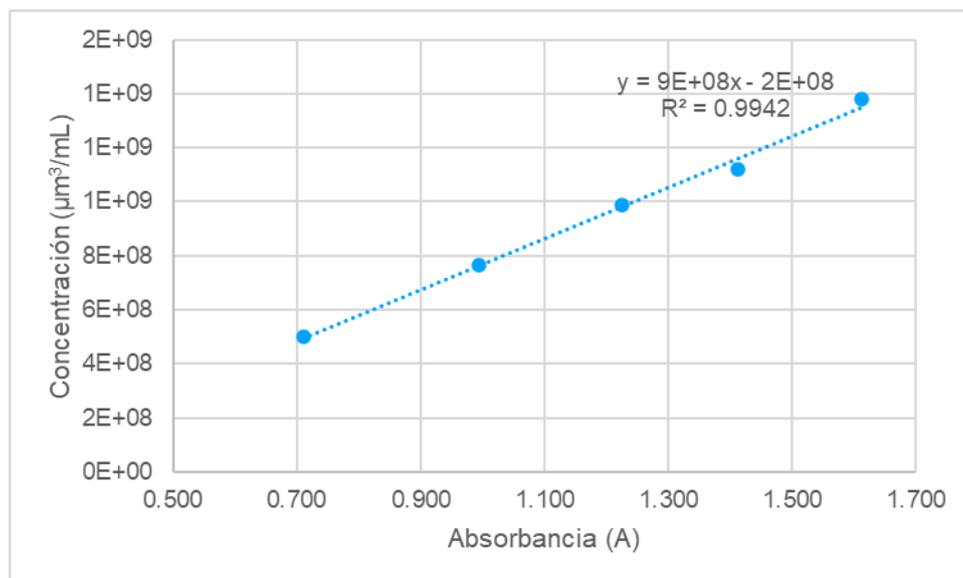


Figura 4: Recta de calibración del espectrofotómetro para la absorción de *Isochrysis galbana* mediante el contador de partículas. Se indica la ecuación de la recta y la R^2 .

EJEMPLARES DE NACRAS UTILIZADOS PARA LA EXPERIMENTACIÓN

Para el experimento se usaron 8 ejemplares jóvenes de *Pinna nobilis* provenientes El Fangar (Delta del Ebro, Tarragona) con 29.4 ± 2 cm de largo y 12.0 ± 1 cm de ancho de media. Mediante estos datos, se puede aproximar el peso seco (DW, *dry weight*) de la nacra, incluido también en la Tabla 1. El peso seco medio fue de 7.0 ± 1.3 g.

Tabla 1: Datos biométricos de los individuos usados en el experimento. AQ se refiere al número del acuario donde se encontraba el individuo, no hay AQ5 porque ese fue el control.

	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ6	AQ7	AQ8	AQ9	Media	SD
Largo (cm)	29.3	32.2	31.4	31.1	29.4	26.5	26.2	29.1	29.4	2.2
Ancho (cm)	11.5	13.2	12.0	12.4	11.3	12	10.4	13.2	12.0	1.0
DW (g)	6.91	8.82	8.26	8.06	6.97	5.33	5.17	6.79	7.0	1.3

Para este estudio no se pudo medir el peso seco de forma directa, ya que para ello se requiere sacrificar al animal. No obstante, se usó una aproximación mediante la ecuación propuesta por Hernadis *et al.* (*en preparación*): $DW = (Largo * 10)^{2.5894} * 2.8291 * 10^{-6}$. Esta ecuación está calculada para *Pinna rudis* L., 1758, especie muy similar a *P. nobilis*, aunque de menor tamaño. Sin embargo, los individuos más grandes de *P. rudis* son similares en tamaño a los que se usaron en el presente experimento, ya que los individuos experimentales fueron jóvenes, por lo que esta aproximación es aplicable. El peso seco es necesario para los cálculos posteriores de metabolismo.

Al ser una aproximación, se usó también la longitud de la valva, tanto largo como ancho. Se usa la longitud de la valva porque se presupone que es proporcional al tamaño de la branquia, es decir, cuanto más grande es la valva, más grande es la branquia. Aunque se proporcionan datos de ambas variables, se usó el largo de la valva para el cálculo del peso seco, porque es más preciso como estima del tamaño total del ejemplar (García-March, 2005).

Para evitar la producción de pseudoheces, la concentración de la dieta en cualquier momento fue menor de $3\text{-}4\text{ mm}^3$ de *I. galbana* por litro de agua, umbral a partir del cual se ha observado que los bivalvos empiezan a tener problemas de filtración del alimento (Widdows *et al.*, 1979; Bayne *et al.*, 1989; Bayne, 1993; Fernández y Albentosa, 2019).

Se mide el volumen que ocupa el fitoplancton (en mm^3 por L de agua) porque es una medida más exacta que el número de células, ya que estas pueden variar de tamaño. El contador de partículas puede medir también esta variable, evitando problemas a nivel metodológico.

SISTEMA DE ACUARIOS

Cada una de las nacras se mantuvo en un acuario individual de 70 L, con un sistema cerrado con reciclado continua del agua y un sumidero común, de forma que el agua de los 9 acuarios estuviera mezclada (Figura 5).

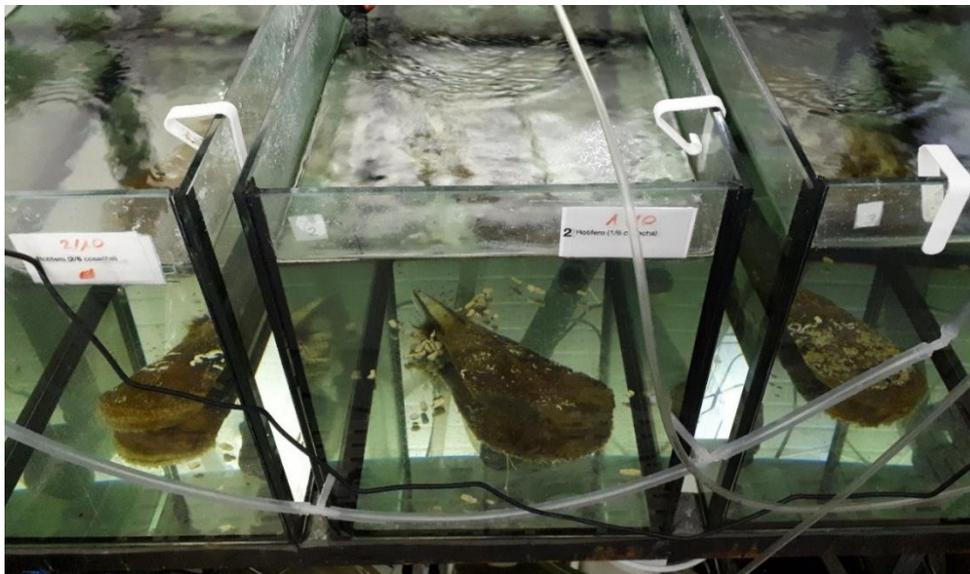


Figura 5: Sistema de acuarios. Arriba: disposición de los individuos usados en el experimento, cada uno de ellos en un acuario individual de 70 L de volumen. Abajo: acuario con bomba de recirculación del agua.

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

Se alimentaron con 2 mm^3 de fitoplancton por litro de agua, aproximadamente de forma constante. Para ello se midió la concentración en el acuario que sirvió de control y que, por tanto, no contenía ninguna nacra que pudiera afectar a la medida. Se usó el sensor de clorofila *a* por fluorescencia de la sonda multiparamétrica AAQ-RINKO (precisión de $\pm 1\%$ FS) para realizar este seguimiento cada día (Figura 6). A primera hora, se suministraba al sumidero una dosis con la concentración adecuada y ya medida de fitoplancton. Cuando esta disminuía a la mitad, comprobado con la sonda, se suministraba media dosis nuevamente. El tiempo aproximado que tardaron los individuos en consumir el fitoplancton para cada temperatura se usó para establecer los intervalos de tiempo en los que se tomarían muestras para el experimento de aclaramiento.

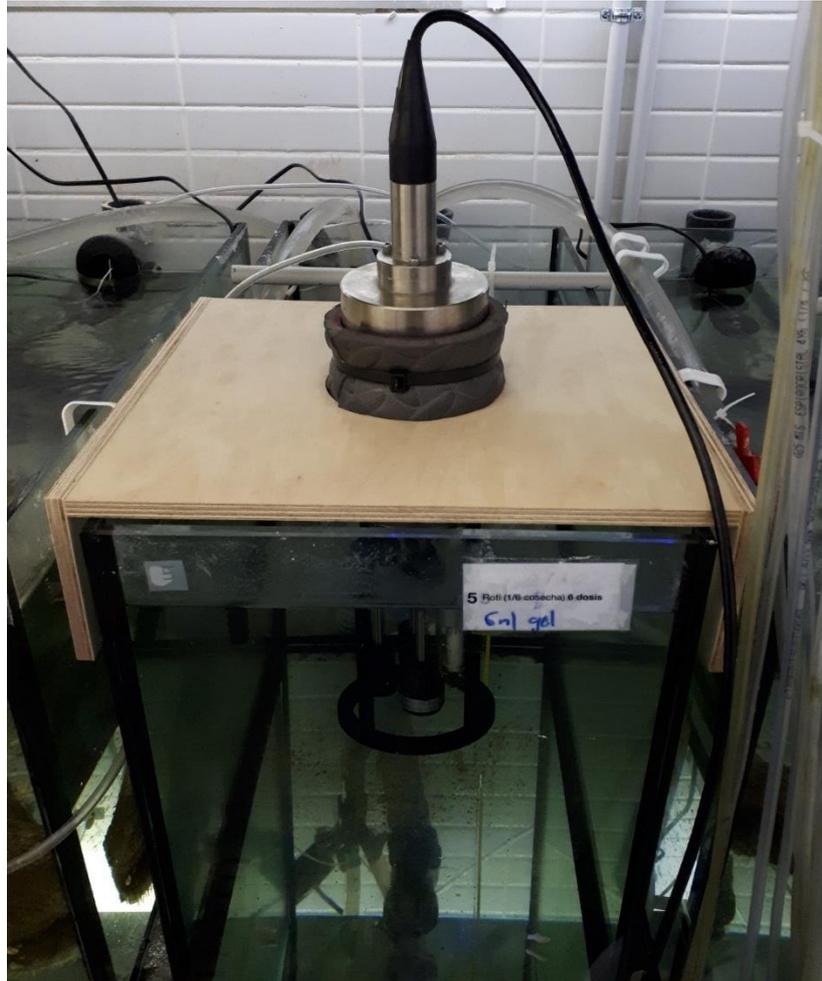


Figura 6: Sonda multiparamétrica instalada en el acuario mediante un soporte fabricado con madera náutica. Obsérvese que está colocada en el acuario 5, que sirvió de control.

Por la noche, las nacras no se alimentaron y, en cambio, se ponía en marcha el sistema de limpieza del agua mediante Skimmers. Además, para eliminar el exceso de nitratos, nitritos y amonio producido por las nacras, se dispuso también de un filtro bacteriano.

La temperatura de los acuarios se controló mediante climatizadores. Los datos de aclaramiento y respiración se tomaron a $8.5 \text{ }^\circ\text{C}$, $14.0 \text{ }^\circ\text{C}$ y $18.0 \text{ }^\circ\text{C}$. Se dejó a los individuos aclimatarse durante una semana a cada temperatura antes de comenzar la toma de datos. La subida de la temperatura se produjo de forma gradual durante 24h.

ACLARAMIENTO

La metodología usada para el experimento se basó en la propuesta por Albentosa *et al.* (2012) aplicada a un sistema sin un flujo continuo de alimento. Para ello se usaron las ecuaciones que propone Coughlan (1969), en vez de las usadas por Albentosa *et al. opus cit.* Los datos se tomaron siempre después de al menos una semana de aclimatación.

Antes de medir, se paró el sistema de acuarios de forma que no hubiera renovamiento de agua. Se alimentó individualmente a cada nacra en su acuario con la cantidad de fitoplancton adecuada y se tomó una muestra de agua de cada uno de los acuarios. Se tomaron otras 4 medidas más a diferentes intervalos para poder medir las tasas de aclaramiento y filtración. También se suministró fitoplancton al acuario 5, que sirvió de control, para comprobar que no hubiera sedimentación de las células que pudiera afectar a los cálculos.

Según la temperatura, el tiempo entre toma de muestras fue distinto y se dedujo a partir de los datos obtenidos de la sonda multiparamétrica. Para los 8.5 °C se tomaron datos cada 30 minutos, para los 14.0 °C cada 20 minutos y para los 18.0 °C cada 15 minutos.

Después de tomar la quinta muestra de agua, se volvió a encender el sistema, junto con los Skimmers, y se colocaron filtros mecánicos de 1 µm para eliminar el fitoplancton restante en el agua. Se usó la sonda multiparamétrica para saber cuándo el agua estaba lo suficientemente limpia para repetir el experimento. En total, se realizaron 4 réplicas distintas para cada temperatura, excepto para los 8.5 °C, por límite de tiempo, ya que a esta temperatura la filtración por parte de las nacras era muy lenta.

Todas las muestras de agua se analizaron al día siguiente de realizar el experimento mediante el Counter Coulter. A partir de la diferencia de concentraciones medidas y el tiempo transcurrido entre estas, se puede calcular la tasa de aclaramiento y la de filtración, según el tamaño de la nacra. Esta última se puede expresar en función de la longitud de la valva o del peso seco.

Para ello se usó la ecuación que propone Coughlan (1969) cuando la sedimentación del fitoplancton es despreciable: $m = \frac{M}{n \cdot t} * \ln \frac{C_0}{C_t}$, donde m es la tasa de filtración, M es el volumen, n es el número de filtradores (en este experimento 1, ya que los acuarios son individuales), t es el tiempo, C_0 es la concentración de fitoplancton en el acuario inicial y C_t la concentración en el tiempo t . Como se tomaron 3 medidas además de la inicial y final (en total 4 intervalos y 5 medidas), se aplicó el segundo factor de la ecuación ($\ln \frac{C_0}{C_t}$) a las 5 medidas y se realizó una regresión lineal simple con estos datos. La pendiente de la recta fue el valor que se usó en el segundo factor de la ecuación.

Cabe destacar que los botes usados para la toma de muestra se dejaron sumergidos en agua de mar durante 3 días antes de ser usados, para evitar cualquier resto del plástico que pudiera interferir en las medidas.

RESPIRACIÓN

La metodología usada para el experimento se basó en la propuesta por Albentosa *et al.* (2012) modificada para *P. nobilis*, por su gran tamaño.

Para medir las tasas de respiración de las nacras se usó el sensor de oxígeno por fosforescencia de la sonda multiparamétrica (precisión de ±2% FS). La sonda se colocó dentro de un cubo de 15

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

L junto con una bomba para que el agua circulara dentro del cubo y el oxígeno disuelto fuera homogéneo en toda la columna de agua. Además, se colocaron un plástico rígido con agujeros para proteger a la nacra, una bolsa hermética de plástico resistente y un bote lleno de agua y cerrado herméticamente para reducir el volumen del cubo y así conseguir que el oxígeno en el agua disminuyera más rápidamente (Figura 7). Fue necesario utilizar esta configuración debido al tamaño de la sonda multiparamétrica, que requería un cubo donde cupiera a lo largo. Se realizaron controles a cada temperatura con la misma metodología, pero sin colocar ninguna nacra. Una vez realizada la toma de datos, se midió el volumen de agua del cubo en todas las ocasiones.

Cada nacra se mantuvo dentro del cubo durante 1.5 horas a 8.5 °C y durante 2 horas a 14.0 °C y 18 °C para observar una bajada significativa del oxígeno.



Figura 7: Cubo donde se midió la respiración de las nacras en cada temperatura. A la izquierda: el cubo una vez listo para medir, se colocó cinta americana para mejorar la estanqueidad y usó el grifo para llenar de agua el cubo por completo. A la derecha: el cubo por dentro, se puede observar la nacra y el plástico para protegerla, así como la sonda y los diversos recipientes para disminuir el volumen.

La tasa de respiración (RR) se calculó a partir de la diferencia de concentraciones de oxígeno durante el experimento, de la siguiente forma: $RR = \left((C_i - C_f) * \frac{60}{t} \right) * V$, donde C_i y C_f son las concentraciones en mg de O₂ inicial y final, t es el tiempo que se mantiene el individuo dentro del cubo y V es el volumen de agua dentro de este último. La RR se expresa en mg O₂ por individuo y hora. También se puede expresar por longitud de valva o peso dividiendo por estos.

A partir de la RR en función del peso seco, se calculó la energía mínima que requiere la nacra para mantenerse, mediante las siguientes conversiones: 1 mg de oxígeno es equivalente a 0.6998 ml de oxígeno (Ansell, 1973) y 1 ml de oxígeno es equivalente a 20.33 J (Widdows y Johnson, 1988).

Mediante estos datos, se puede calcular la materia orgánica que requeriría un individuo, por g de peso seco, si asimilara el 100% de esta, ya que 1 mg de esta equivale a 23 J (Widdows y Johnson, 1988). Si, además, se tiene información de la eficiencia de absorción, es decir, la cantidad de comida que está asimilando, se puede calcular la cantidad de materia orgánica real que necesita el organismo para mantenerse, que se puede expresar en mg MO o en porcentaje respecto al peso seco del individuo. Se calcularon los mg MO requeridos si hubiera un 100% de eficiencia de absorción y si hubiera un 57%, ya que este porcentaje es el que se ha observado en *P. rudis* (Hernandis *et al.*, *en preparación*). Con este último valor se calculó la dieta requerida en función del peso seco, expresada en porcentaje de este último.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de los experimentos de aclaramiento y respiración se analizaron mediante un ANOVA para medidas repetidas. Para ello, primero se comprobó la normalidad de los datos mediante el test de Saphiro-Wilk y, a continuación, se aplicó el ANOVA. Al tratarse de los mismos individuos para todas las medidas, los grupos no son independientes, por lo que fue necesario utilizar este tipo de ANOVA.

Se aplicó, también, una comparación por parejas (*pairwise test*) mediante la corrección de Bonferroni, para identificar entre que temperaturas hubo diferencias significativas.

Todos los datos se analizaron con el programa de libre acceso R.

RESULTADOS

ALIMENTACIÓN DE MANTENIMIENTO

Durante los días de aclimatación y para la alimentación de mantenimiento se detectó que la concentración de fitoplancton tardó 3 h en disminuir a la mitad a 8.5 °C, 1.5 h a los 14.0 °C y 1.25 h a los 18.0 °C.

En la Figura 8 se pueden observar cómo disminuyó la concentración de fitoplancton para cada temperatura. Estos datos corresponden al día anterior a la toma de muestras para el experimento de aclaramiento, por lo que los individuos ya estaban aclimatados a la temperatura indicada.

Cabe destacar que a 8.5 °C la mayoría de los individuos presentaban las valvas cerradas gran parte del tiempo. Cuando se abrieron, fue mínimamente. A 14.0 °C y 18.0 °C estuvieron la mayor parte del tiempo con las valvas abiertas, aunque a 18.0 °C la abertura fue mayor.

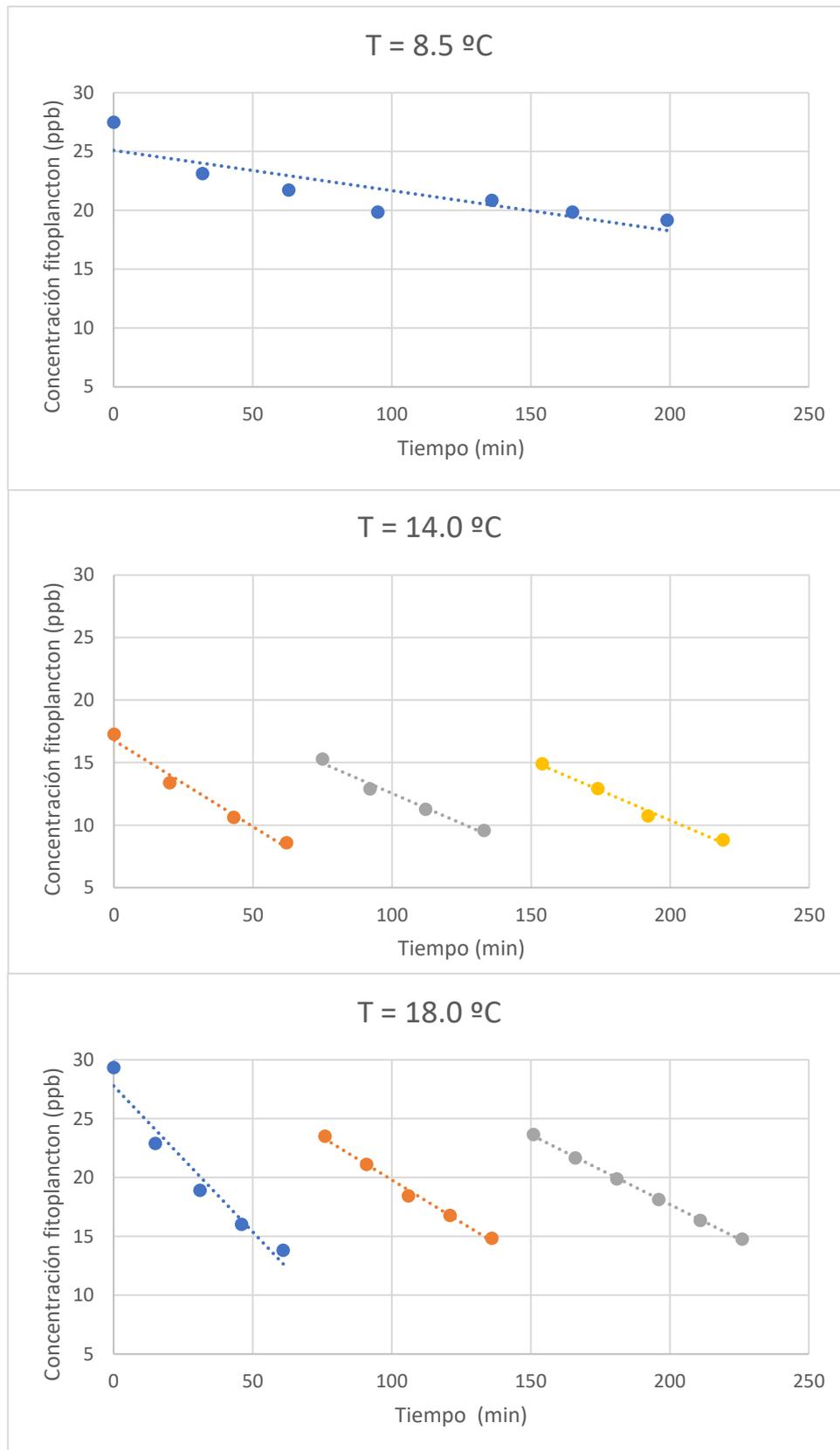


Figura 8: Disminución de la concentración de fitoplancton a lo largo del tiempo. Para los 8.5 °C solo se midió un ciclo, mientras que para los 14.0 °C y 18.0 °C se midieron 3 ciclos (marcados con colores distintos en la figura). La concentración aumenta en cada ciclo porque se suministra media dosis cada vez. A 8.5 °C cuando la concentración aumenta ligeramente de una medida a la siguiente se debe al límite de imprecisión de la sonda.

ACLARAMIENTO

En los controles para cada temperatura no se observó ninguna disminución de la concentración de fitoplancton. En el anexo 1 se puede observar el cambio de la concentración de fitoplancton a lo largo del experimento para cada individuo y temperatura.

A 8.5 °C cada individuo filtró de media 3.3 ± 2.4 L/h. A partir de los datos biométricos se calculó también la filtración por largo de la valva (0.11 ± 0.08 L/(cm*h)), por ancho de la valva (0.27 ± 0.20 L/(cm*h)) y por peso seco (0.48 ± 0.38 L/(g*h)). Los valores medios de cada réplica se indican en la Tabla 2.

Tabla 2: Tasas de filtración medias para cada réplica por individuo y en función de los datos biométricos para 8.5 °C. R se refiere a cada réplica, ind a individuo, L a largo de la valva y W al ancho. No se incluyen los resultados del acuario control.

	R1	R2	R3	Media	SD
L/(ind*h)	5.82	2.09	1.90	3.27	2.21
L/(cm L*h)	0.20	0.07	0.06	0.11	0.08
L/(cm W*h)	0.49	0.18	0.15	0.27	0.18
L/(cm DW*h)	0.86	0.31	0.28	0.48	0.33

A 14.0 °C cada individuo filtró de media 25.4 ± 7.1 L/h. A partir de los datos biométricos se calculó también la filtración por largo de la valva (0.87 ± 0.26 L/(cm*h)), por ancho de la valva (2.11 ± 0.56 L/(cm*h)) y por peso seco (3.76 ± 1.36 L/(g*h)). Los valores medios de cada réplica se indican en la Tabla 3.

Tabla 3: Tasas de filtración medias para cada réplica por individuo y en función de los datos biométricos para 14.0 °C. R se refiere a cada réplica, ind a individuo, L a largo de la valva y W al ancho. No se incluyen los resultados del acuario control.

	R1	R2	R3	R4	Media	SD
L/(ind*h)	22.71	27.86	22.75	28.14	25.37	7.10
L/(cm L*h)	0.78	0.95	0.78	0.96	0.87	0.26
L/(cm W*h)	1.90	2.31	1.89	2.35	2.11	0.56
L/(cm DW*h)	3.44	4.11	3.38	4.10	3.76	1.36

A 18.0 °C hubo un problema con los datos de las primeras réplicas, por lo que solo se dispone de las réplicas 3 y 4.

Cada individuo filtró de media 22.9 ± 9.7 L/h. A partir de los datos biométricos se calculó también la filtración por largo de la valva (0.77 ± 0.32 L/(cm*h)), por ancho de la valva (1.91 ± 0.79 L/(cm*h)) y por peso seco (3.28 ± 1.44 L/(g*h)). Los valores medios de cada réplica se indican en la Tabla 4.

Tabla 4: Tasas de filtración medias para cada réplica por individuo y en función de los datos biométricos para 18.0 °C. R se refiere a cada réplica, ind a individuo, L a largo de la valva y W al ancho. No se incluyen los resultados del acuario control.

	R3	R4	Media	SD
L/(ind*h)	23.3968	22.4012	22.9	9.7
L/(cm L*h)	0.79	0.76	0.77	0.32
L/(cm W*h)	1.96	1.85	1.91	0.79
L/(cm DW*h)	3.32	3.24	3.28	1.44

Se encontraron diferencias significativas entre las tasas de filtración a cada temperatura. A 8.5 °C la tasa de filtración fue significativamente menor que a 14.0 °C y 18.0 °C (con un p-valor de $3.51 \cdot 10^{-8}$ y $1.38 \cdot 10^{-6}$ respectivamente). Entre estas 14.0 °C y 18.0 °C no se encontraron diferencias significativas (p-valor de 0.472). En las Figuras 9 – 11 se pueden observar estas diferencias.

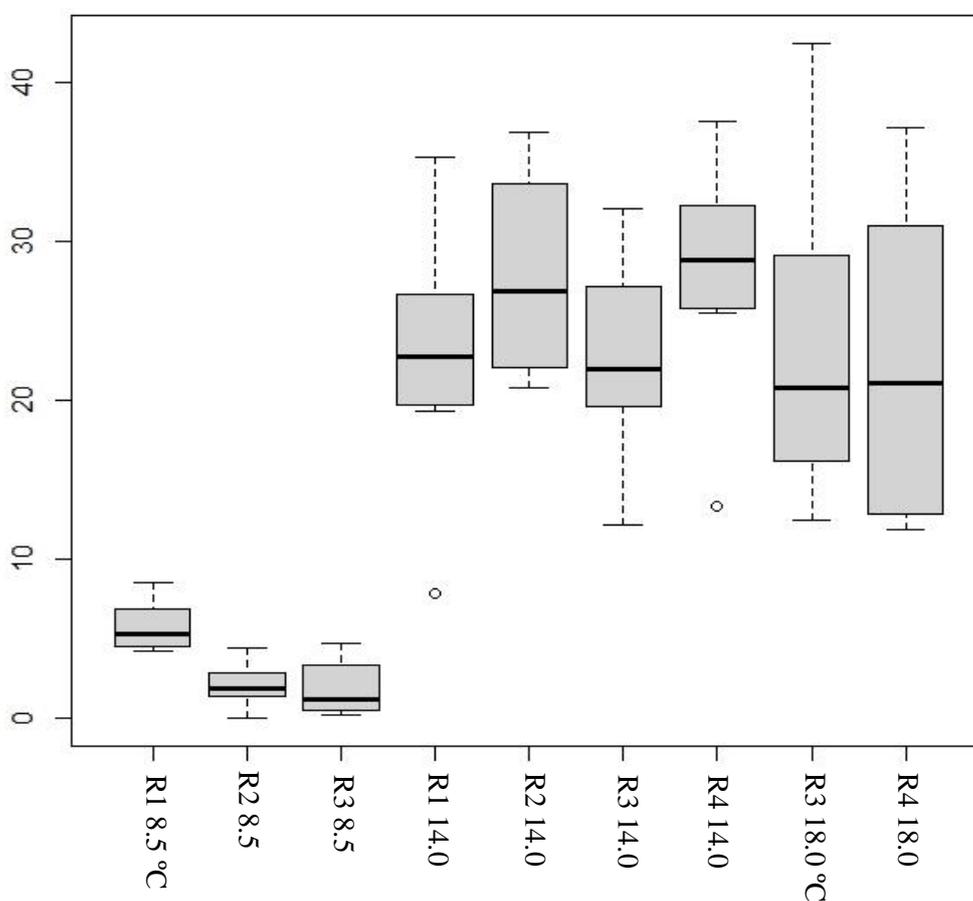


Figura 9: Diagrama de cajas de las tasas de filtración en L/(individuo*h) para cada temperatura y réplica.

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

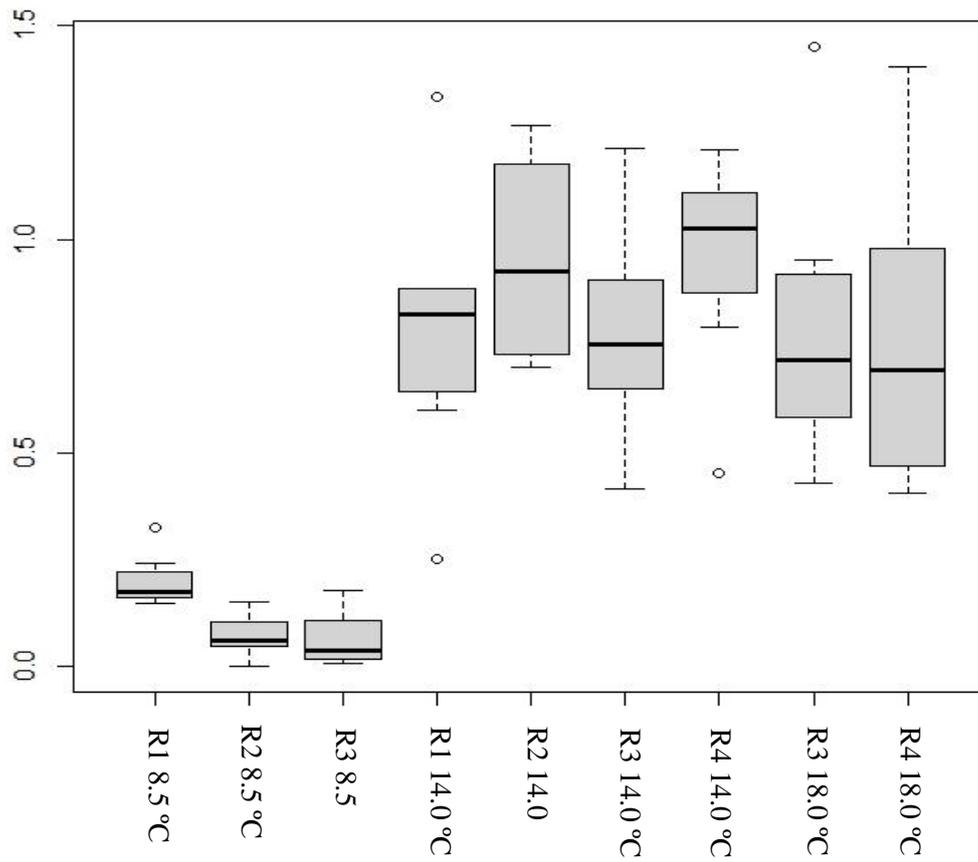


Figura 10: Diagrama de cajas de las tasas de filtración en función del largo de la valva ($L/(cm \cdot h)$) para cada temperatura y réplica.

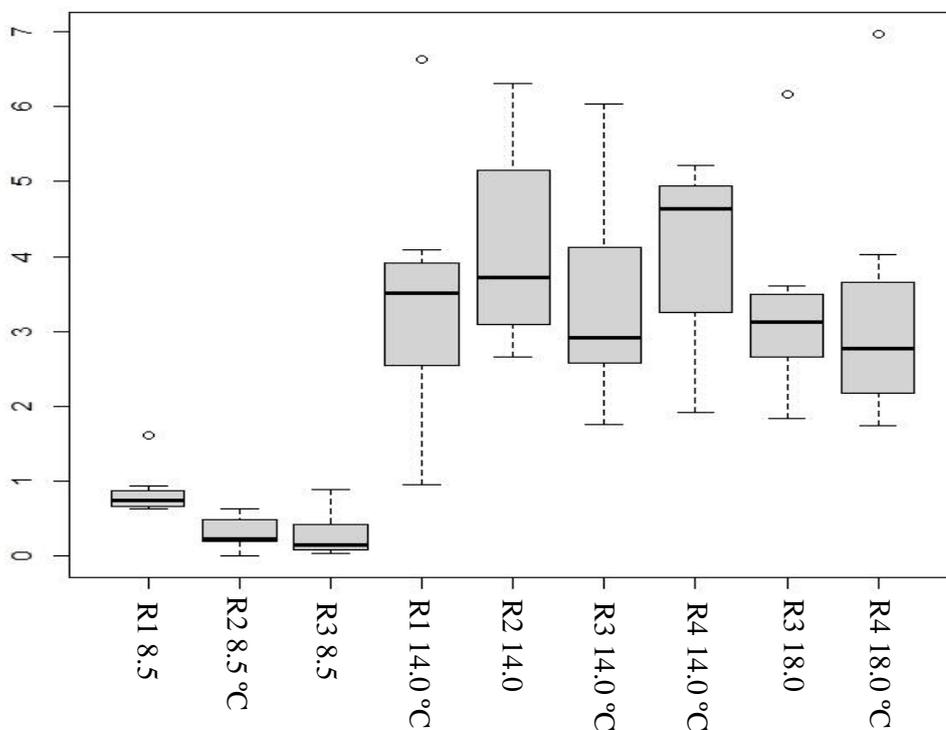


Figura 11: Diagrama de cajas de las tasas de filtración en función del peso seco ($L/(g \cdot h)$) para cada temperatura y réplica.

RESPIRACIÓN

Los datos de las tasas de respiración a 8.5 °C no se pudieron usar por errores con la sonda multiparamétrica. En los controles para cada temperatura no se observó ninguna variación en la concentración de oxígeno.

En el anexo 2 se puede observar el cambio en el O₂ a lo largo del experimento para cada individuo y temperatura.

A 14.0 °C cada individuo consumió de media 4.12 ± 0.59 mg O₂/h. A partir de los datos biométricos se calculó también el consumo por largo de la valva (0.14 ± 0.01 mg O₂/(cm*h)), por ancho de la valva (0.34 ± 0.04 mg O₂/(cm*h)) y por peso seco (0.60 ± 0.09 mg O₂/(g*h)). Los valores individuales se indican en la Tabla 5.

Tabla 5: Tasas de respiración de cada individuo y en función de los datos biométricos para 14 °C. AQ se refiere al número del acuario donde se encontraba el individuo, previamente al experimento. No hay AQ5 porque ese fue el control. ind se refiere a individuo, L a largo de la valva y W al ancho.

	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ6	AQ7	AQ8	AQ9	Media	SD
mg O₂/(ind*h)	4.37	5.27	4.32	4.28	3.61	4.09	3.47	3.56	4.12	0.59
mg O₂/(cm L*h)	0.15	0.16	0.14	0.14	0.12	0.15	0.13	0.12	0.14	0.01
mg O₂/(cm W*h)	0.38	0.40	0.36	0.34	0.32	0.34	0.33	0.27	0.34	0.04
mg O₂/(cm DW*h)	0.63	0.60	0.52	0.53	0.52	0.77	0.67	0.52	0.60	0.09

En cuanto a niveles energéticos, se encontró que las nacras consumieron de media 203.32 ± 30.73 J/(g*día). Con un 100% de eficiencia de absorción, requerirían 8.84 ± 1.34 mg MO/(g*día); con un 57%, 17.68 ± 2.67 mg MO/(g*día). Por tanto, a 14.0 °C y para esa eficiencia de absorción, se tendría que alimentar a las nacras con una dieta mínima de un $1.77\% \pm 0.27$ de su peso seco. Los valores individuales se indican en la Tabla 6.

Tabla 6: Consumo energía y requerimientos de materia orgánica de cada individuo para 14 °C. AQ se refiere al número del acuario donde se encontraba el individuo, previamente al experimento. No hay AQ5 porque ese fue el control. ind se refiere a individuo, L a largo de la valva y W al ancho.

	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ6	AQ7	AQ8	AQ9	Media	SD
J/(DW*día)	216	204	179	181	177	262	229	179	203	31
mg MO/(DW*día) 100% eficiencia	9.4	8.9	7.8	7.9	7.7	11.4	10.0	7.8	8.8	1.3
mg MO/(DW*día) 50% eficiencia	16.5	15.6	13.6	13.8	13.5	20.0	17.5	13.7	15.5	2.3
% dieta	1.6	1.6	1.4	1.4	1.3	2.0	1.7	1.4	1.5	0.2

A 18.0 °C cada individuo consumió de media 4.87 ± 0.90 mg O₂/h. A partir de los datos biométricos se calculó también el consumo por largo de la valva (0.17 ± 0.02 mg O₂/(cm*h)), por ancho de la valva (0.41 ± 0.06 mg O₂/(cm*h)) y por peso seco (0.70 ± 0.13 mg O₂/(g*h)). Los valores individuales se indican en la Tabla 7.

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

Tabla 7: Tasas de respiración de cada individuo y en función de los datos biométricos para 18.0 °C. AQ se refiere al número del acuario donde se encontraba el individuo, previamente al experimento. No hay AQ5 porque ese fue el control. ind se refiere a individuo, L a largo de la valva y W al ancho.

	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ6	AQ7	AQ8	AQ9	Media	SD
mg O ₂ /(ind*h)	4.55	6.8	5.09	4.91	4.77	4.86	4.32	3.65	4.87	0.90
mg O ₂ /(cm L*h)	0.15	0.21	0.16	0.16	0.16	0.18	0.16	0.12	0.17	0.02
mg O ₂ /(cm W*h)	0.39	0.51	0.42	0.40	0.42	0.40	0.41	0.28	0.41	0.06
mg O ₂ /(cm DW*h)	0.66	0.77	0.62	0.61	0.68	0.91	0.84	0.54	0.70	0.13

En cuanto a niveles energéticos, se encontró que las nacras consumieron de media 239.91 ± 43.25 J/(g*día). Con un 100% de eficiencia de absorción, requerirían 10.43 ± 1.88 mg MO/(g*día); con un 57%, 18.30 ± 3.30 mg MO/(g*día). Por tanto, a 18.0 °C y para esa eficiencia de absorción, se tendría que alimentar a las nacras con una dieta mínima de un 1.83% ± 0.33 de su peso seco. Los valores individuales se indican en la Tabla 8.

Tabla 8: Consumo energía y requerimientos de materia orgánica de cada individuo para 18.0 °C. AQ se refiere al número del acuario donde se encontraba el individuo, previamente al experimento. No hay AQ5 porque ese fue el control. ind se refiere a individuo, L a largo de la valva y W al ancho.

	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ6	AQ7	AQ8	AQ9	Media	SD
J/(DW*día)	226	263	210	208	234	311	285	184	240	43
mg MO/(DW*día) 100% eficiencia	9.8	11.4	9.1	9.0	10.2	13.5	12.4	8.0	10.4	1.9
mg MO/(DW*día) 50% eficiencia	19.5	22.9	18.3	18.1	20.3	27.1	21.8	14.0	18.3	3.3
% dieta	1.9	2.3	1.8	1.8	2.0	2.7	2.2	1.4	1.8	0.3

Se encontraron diferencias significativas entre las tasas de respiración a 14 °C y las de 18 °C (p-valor de 0.002). En las Figuras 12 – 15 se pueden observar estas diferencias.

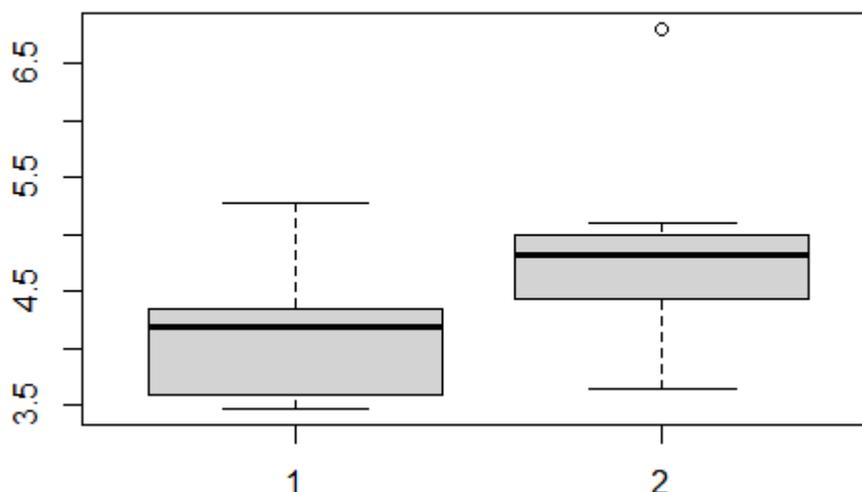


Figura 12: Diagrama de cajas de las tasas de respiración por individuo. La caja de la izquierda (nombrada con un 1) representa los datos de 14 °C y el de la derecha (nombrada con un 2), los de 18 °C.

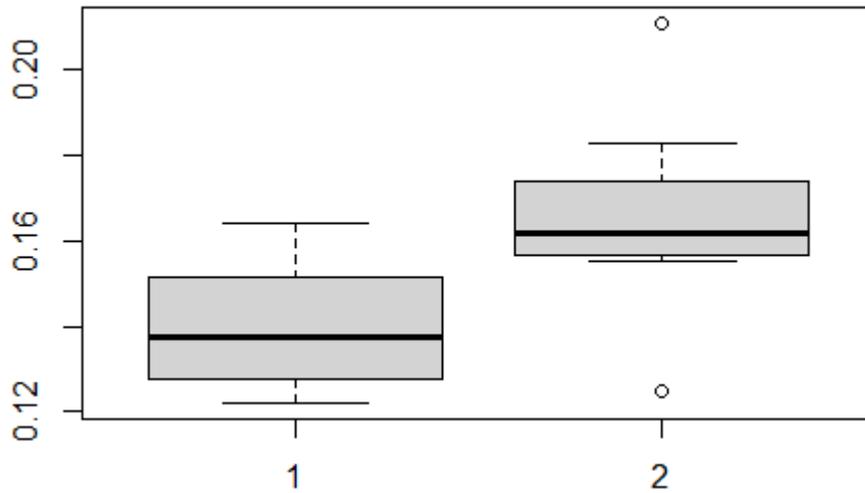


Figura 13: Diagrama de cajas de las tasas de respiración en función del largo de la valva. La caja de la izquierda (nombrada con un 1) representa los datos de 14 °C y el de la derecha (nombrada con un 2), los de 18 °C.

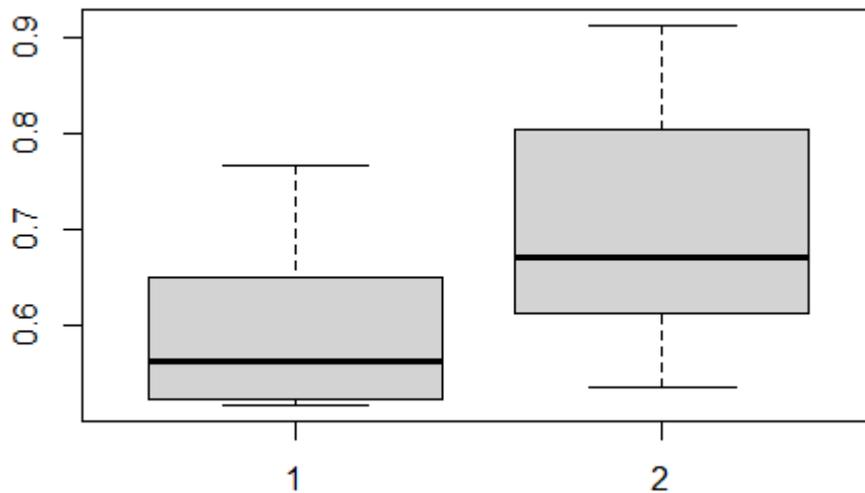


Figura 14: Diagrama de cajas de las tasas de respiración en función del peso seco. La caja de la izquierda (nombrada con un 1) representa los datos de 14 °C y el de la derecha (nombrada con un 2), los de 18 °C.

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

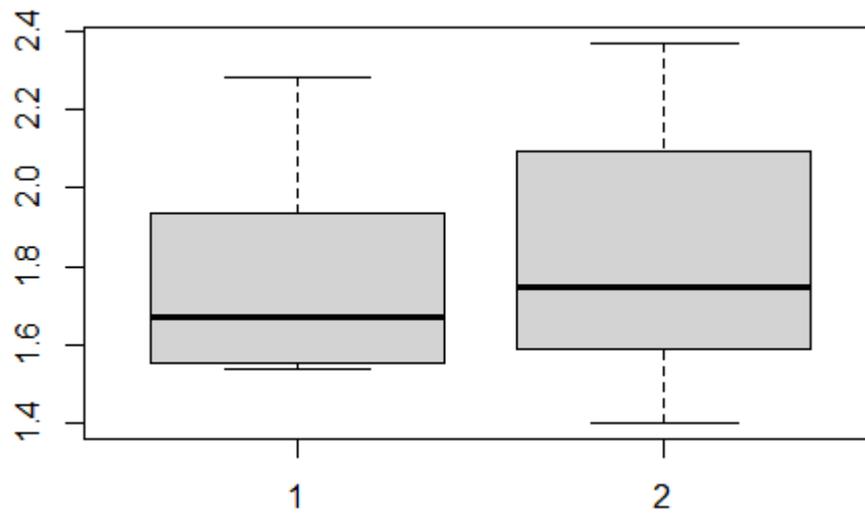


Figura 15: Diagrama de cajas de la dieta requerida si se da un 57% de eficiencia de absorción. La caja de la izquierda (nombrada con un 1) representa los datos de 14 °C y el de la derecha (nombrada con un 2), los de 18 °C.

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos permiten avanzar en el conocimiento de qué cantidad de dieta requieren las nacras mantenidas en cautividad dado un determinado volumen de agua en los tanques y temperatura del agua. Esto es muy importante para llevar a cabo cualquier tipo de experimentos con esta especie y, especialmente, para la cría en cautividad.

Para nacras de aproximadamente 30 cm (unos 7 g de peso seco), como las usadas en este trabajo, y sabiendo que 1000 μm^3 de *Isochrysis galbana* equivalen a $4.5 \cdot 10^{-10}$ g de materia orgánica (Hernandis *et al.*, en preparación), se requerirían, para proporcionar una dieta adecuada, 23467 mm^3 diarios de esta microalga si las nacras se mantienen a 14 °C y 28160 mm^3 diarios si se mantienen a 18 °C (Tabla 9).

Tabla 9: Volumen de I. galbana que requieren nacras de 30 cm para cada temperatura estudiada. Si indica el porcentaje de g de materia orgánica que requieren en función de su peso, los g de esta para nacras de 7 g (30 cm) y el volumen de la microalga necesario.

	14 °C	18 °C
% dieta	1.5	1.8
g MO requeridos	10.56	12.67
mm^3 <i>I. galbana</i>	23467	28160

Para individuos de mayor tamaño, la relación entre peso y tamaño no es lineal, ya que aumentan en dimensiones distintas (el tamaño aumenta solo en longitud y el peso en volumen). Por ello, nacras cuya longitud fuera el doble que las utilizadas en el presente estudio podrían tener un peso seco hasta 3 o 4 veces mayor. Esto se ha comprobado con algunos individuos muertos tiempo atrás (García-March, observación personal, datos no publicados). Por ello, será necesario completar los estudios con ejemplares más grandes y a temperaturas más elevadas (por ejemplo, 24°C y 28°C), para conocer mejor el rango de necesidades energéticas de *P. nobilis* para su mantenimiento en cautividad.

Puesto que la alimentación es un aspecto básico del mantenimiento de las nacras en cautividad, va a estar presente en cualquier experimento y, si no se trata adecuadamente, podría influir en los resultados, dando lugar a errores importantes. En el caso concreto de experimentos de reproducción, una dieta inadecuada, especialmente si falta comida, podría provocar, por ejemplo, que las nacras no produjeran gametos o estos no fueran viables. Es importante tener en cuenta, además, la temperatura a la hora de establecer la dieta, ya que la primera puede influir en la segunda y, en multitud de ocasiones, los experimentos realizados contienen cambios en la temperatura.

Como era de esperar, tanto la tasa de respiración como la de filtración, aumentan al incrementar la temperatura. Trigos *et al.* (2014) ya observaron este aumento en cuanto a la respiración. Este aumento es especialmente importante de 8.5 °C a 14 °C, ya que a temperaturas extremas estas tasas disminuyen. Trigos *et al. opus cit.* observaron este efecto también al llegar a una temperatura demasiado alta, 25 °C, cuando la tasa de respiración fue mucho menor que a 20 °C. Es más, en el presente estudio, a 8.5 °C, el decaimiento del fitoplancton no fue significativo, ya que en estas condiciones las nacras presentaban un estado de aletargamiento, que se pudo observar no solo con los datos de respiración y filtración, sino también mediante observación directa: las valvas de las nacras estaban la mayor parte del tiempo cerradas y, cuando se abrían,

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

la abertura era pequeña. A esta temperatura, además, se tuvo que alimentar a las nacras una menor cantidad de veces que a mayor temperatura.

La temperatura del mar Mediterráneo en la zona del Golfo de Valencia y Alicante varía de media aproximadamente entre los 13 °C de invierno y los 26 °C de verano (Vargas *et al.*, 2010), por lo que 8.5 °C, es una temperatura extrema para las nacras, alejada del rango de temperaturas típico al que se ven sometidas. Es posible que esta sea la razón de que entre 8.5 °C y 14.0 °C haya diferencias significativas, pero, en cambio, no se encuentren diferencias entre 14.0 °C y 18.0 °C.

Se esperaría, por tanto, que si se siguiera aumentando la temperatura, en una primera instancia las tasas de respiración y filtración también incrementarían hasta alcanzar el límite de confortabilidad de las nacras, donde las tasas disminuirían, tal como indicaron Trigos *et al. opus cit.* Será necesario realizarse más estudios con mayor rango de temperaturas para corroborar este último aspecto, así como comprobar que realmente no existen diferencias entre 14.0 °C y 18 °C, ya que para esta última temperatura se tuvieron pocos datos para analizar.

Aunque queda patente que a 8.5 °C las nacras estaban fuera de su rango óptimo de temperatura, estas se mantienen vivas, en un estado de aletargamiento, con un bajo consumo y filtración. Esto puede ser beneficioso gracias a que, como propusieron García-March *et al.* (2020), se pueden realizar cuarentenas a baja temperatura (8 °C) a las nacras recogidas de poblaciones infectadas por *H. pinnae*. Por debajo de los 13.5 °C, la mortandad causada por el protozoo se reduce considerablemente, lo que, sumado a la baja tasa de filtración, y teniendo en cuenta que las nacras sobreviven a esta temperatura, podría servir para realizar procesos de selección de individuos sanos/enfermos durante la cuarentena, reduciendo la posibilidad de infección cruzada entre los mismos. Además, García-March *et al.* (2020) plantearon la posibilidad de que las bajas temperaturas pudieran ser letales para *H. pinnae*, un aspecto que sería interesante investigar en un futuro cercano, estableciendo los límites de tolerancia de ambas especies (*P. nobilis* y *H. pinnae*) a las bajas temperaturas, para así tratar de prolongar la cuarentena de las nacras el tiempo suficiente como para que consiguieran eliminar al parásito.

Por otra parte, sabiendo la gran capacidad de filtración que tienen las nacras, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede inferir su importante rol ecológico en el Mar Mediterráneo, especialmente en aguas confinadas, como las del Mar Menor. Hoy en día y debido a los múltiples problemas que han sufrido estos bivalvos, sus poblaciones son escasas, pero habían llegado a tener abundancias muy elevadas (Basso *et al.*, 2015).

En el Mar Menor, algunos autores consideran que la población de nacras podría llegar a 1.5 millones de individuos (García-March *com. pers.*), que con una capacidad de filtración de 25 L/h cada uno (tasa de filtración obtenida en el presente trabajo) implica un volumen filtrado de $0.9 \cdot 10^6$ m³ al día. Se estima que el Mar Menor tiene un volumen de entre $5.8 \cdot 10^8$ m³ y $6.1 \cdot 10^8$ m³ (Mar Menor Enclave; Carreño *et al.*, 2005), por lo que, en unos 660 días, no llega a dos años, habrían filtrado toda esta agua. Hay que tener en cuenta, además, que los individuos usados para el experimento eran jóvenes que no llegaban a los 30 cm de largo. Si hubiese una población abundante y saludable, habría individuos mucho más grandes. Aplicando este mismo cálculo, pero para los valores obtenidos de tasa de filtración en función del cm de valva y asumiendo un tamaño medio de 50 cm (García *et al.*, 2007), se obtiene que el volumen filtrado sería de $1.6 \cdot 10^6$ m³ al día y, por tanto, en unos 380 días, poco más de un año, la población residente de nacras habría filtrado todo el volumen de agua del Mar Menor.

Un año puede parecer mucho tiempo, pero a efectos prácticos habría supuesto un gran cambio en la situación de gran eutrofización que se presenta actualmente. Este mismo proceso realizado de forma artificial, con depuradoras, requeriría mucho más tiempo y recursos. La depuradora más grande de España (EDAR Sur, Madrid) filtra $2 \cdot 10^8$ m³ al año a pleno rendimiento por lo que se necesitarían 3 depuradoras como esta para tener la misma capacidad que la población de nacras. Hay que tener en cuenta, además, que estos cálculos se han realizado a partir de la capacidad de la depuradora más grande que hay en el país, la mayoría de las existentes son mucho más pequeñas.

Estos datos dejan constancia de la importancia que tenía *P. nobilis*, y hubiera tenido de no ser por su situación actual, en los ecosistemas del Mar Mediterráneo. Por esto, entre otros muchos aspectos, intentar que esta especie salga de su estado de en peligro de extinción es muy importante.

Los datos de aclaramiento y respiración obtenidos a 18.0 °C se pueden comparar de forma preliminar con los datos de *Pinna rudis* de Hernandis *et al.* (*en preparación*) (no presentados en este estudio) para saber si para tamaños similares, la fisiología energética de *P. rudis* es suficientemente parecida a la de *P. nobilis*, de forma que se pudiera usar *P. rudis* como modelo de *P. nobilis*. La comparación en función del largo de la valva y del peso seco, proporciona diferencias significativas entre las dos especies comparando los datos en función del largo de la valva (p-valor de 0.038), pero no se encontraron diferencias significativas comparando los datos en función del peso seco (0.054). En cuanto a respiración, se encontraron diferencias significativas entre las dos especies comparando, tanto los datos en función del largo de la valva (p-valor de 0.001), como en función del peso seco (p-valor de 0.004). También se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de dieta requerida en función de peso seco y para una eficiencia de absorción de 57% (p-valor de 0.004). Es posible que estas diferencias provengan del diferente tamaño de los individuos utilizados en los ensayos y que no se hubieran encontrado en caso de realizar más series de experimentos con distintos tamaños, tanto en *P. rudis* como en *P. nobilis*. En cualquier caso, a priori, las diferencias observadas indican que se sería necesario calibrar las diferencias fisiológicas entre especies a la hora de utilizar *P. rudis* como modelo de *P. nobilis*, para lo que se requiere profundizar más en estudios comparativos entre ambas especies.

CONCLUSIÓN

A partir de los datos expuestos en este trabajo, se puede elaborar un protocolo de alimentación para el mantenimiento de *P. nobilis* a diferentes temperaturas, aspecto clave para conseguir la reproducción en cautividad de esta especie. Ya sea temperaturas altas para llevar a cabo experimentos de reproducción, o a temperaturas bajas para mantenerlas en cuarentena debido al protozoo *Haplosporidium pinnae*, con los datos obtenidos se puede calcular la dieta que requieren. Así, se les puede aportar la cantidad de nutrientes que necesitan sin excederse, pues un exceso de comida no solo supone un gasto extra a la hora del mantenimiento, sino que puede afectarles negativamente. Para nacras de aproximadamente 30 cm (unos 7 g de peso seco) se requerirían 23467 mm³ diarios de esta microalga si las nacras se mantienen a 14 °C y 28160 mm³ diarios si se mantienen a 18 °C.

Asimismo, se han podido observar los efectos fisiológicos que puede tener la temperatura sobre las nacras, y que estos pueden llegar a ser bastante extremos (a 8.5 °C entraron en un estado de aletargamiento). Aunque se requieren más estudios con un mayor rango de temperaturas, a altas temperaturas se espera un resultado similar al obtenido a 8.5 °C.

Por último, no se han encontrado evidencias suficientes que indiquen que *P. rudis* pudiera servir como modelo para *P. nobilis*, aunque esto podría deberse a que las tasas de filtración y respiración se vieran influidas por el tamaño de la nacra. Serían necesarios más estudios con ejemplares de las dos especies de distinto tamaño para calibrar las diferencias de fisiología energética entre las dos especies.

En general, el objetivo principal de este trabajo se ha cumplido, pues mediante las dietas adecuadas, que ahora se saben, el mantenimiento de las nacras mejorará, así como los futuros experimentos que se realicen con ellas.

REFERENCIAS

- Ackerman, J. D. (1999). Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): Implications for trophic dynamics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 56(9), 1551–1561.
- Addis, P., Secci, M., Brundu, G., Manunza, A., Corrias, S., & Cau, A. (2009). Density, size structure, shell orientation and epibiontic colonization of the fan mussel *Pinna nobilis* L. 1758 (Mollusca: Bivalvia) in three contrasting habitats in an estuarine area of Sardinia (W Mediterranean). *Scientia Marina*, 73(1), 143–152.
- Albentosa, M., Viñas, L., Besada, V., Franco, A., & González-Quijano, A. (2012). First measurements of the scope for growth (SFG) in mussels from a large scale survey in the North-Atlantic Spanish coast. *Sci. Total Environ.*, 435-436, 430-445.
- Ansell, A. D. (1973). Oxygen consumption by the bivalve *Donax vittatus* (da Costa). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 11, 311–28.
- Basso, L., Vázquez-Luis, M., García-March, J. R., Deudero, S., Alvarez, E., Vicente, N., ... Hendriks, I. E. (2015). The Pen Shell, *Pinna nobilis*: A Review of Population Status and Recommended Research Priorities in the Mediterranean Sea. In *Advances in Marine Biology* (Vol. 71, pp. 109–160). Academic Press.
- Bayne, B. L. (1993). Feeding physiology of bivalves: time-dependence and compensation for changes in food availability. *Bivalve filter feeders*, Springer, 1-24.
- Bayne, B. L., Hawkins, A. J. S., Navarro, E., Iglesias, I. P., (1989). Effects of seston concentration on feeding digestion and growth in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 55, 47-54.
- Breitburg, D. L., Adamack, A., Rose, K. A., Kolesar, S. E., Decker, M. B., Purcell, J. E., ... Cowan, J. H. (2003). The pattern and influence of low dissolved oxygen in the Patuxent River, a seasonally hypoxic estuary. *Estuaries*, 26(2), 280–297.
- Butler, A., Vicente, N., & de Gaulejac, B. (1993). Ecology of the pteroid bivalves *Pinna bicolor* Gmelin and *Pinna nobilis* L. *Mar. Life*, 3(1–2), 37–45.
- Carreño, M. F., Martínez, J., Pardo, M. T., & Steve, M. A. (2005). Nutrients salt and volume fluxes in the Mar Menor coastal lagoon in the south east Spain. Loicz budget. Thesis. Murcia: Universidad de Murcia.
https://www.academia.edu/30286553/Nutrients_Salt_and_Volume_Fluxes_in_the_Mar_Menor_Coastal_Lagoon_in_the_South_East_Spain_Loicz_Budget [Retrieved: September 8, 2020].
- Catanese, G., Grau, A., Valencia, J. M., García-March, J. R., Vázquez-Luis, M., Alvarez, E., ... Villalba, A. (2018). *Haplosporidium pinnae* sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, *Pinna nobilis*, in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Invertebrate Pathology*, 157, 9–24.
- Conover, R.J. (1966). Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 11, 338-354.

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

- Coughlan, J. (1969). The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar. Biol.*, 2(4), 356–358.
- Davenport, J., Ezgeta-Balić, D., Peharda, M., Skejić, S., Ninčević-Gladan, Ž., & Matijević, S. (2011). Size-differential feeding in *Pinna nobilis* L. (Mollusca: Bivalvia): Exploitation of detritus, phytoplankton and zooplankton. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92, 246–254.
- De Gaulejac, B., 1995. Mise en évidence de l'hermaphrodisme successif à maturation asynchrone de *Pinna nobilis* (L.) (Bivalvia: Pterioidea). *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie. Biol. Pathol. Anim.*, 318, 99–103.
- Deudero, S., grau, A., Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Alomar, C., & Hendriks, I. (2017). Reproductive investment of the pen shell *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 in Cabrera National Park (Spain). *Medit. Mar. Sci.*, 18(2), 271-284.
- Elliott, P., Aldridge, D. C., & Moggridge, G. D. (2008). Zebra mussel filtration and its potential uses in industrial water treatment. *Water Research*, 42(6–7), 1664–1674.
- España. Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. *BOE*, 4 de febrero de 2011, núm. 46, p. 20912-20951.
- España. Orden TEC/596/2019, de 8 de abril, por la que se modifica el anexo del Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. *BOE*, 8 de junio de 2019, núm. 134, p. 58611-58615.
- Europa. Directiva 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. *DOCE*, 22 de julio de 1992, núm. 206, p. 7-50.
- Fang, J., Lin, A., Yuan, X., Chen, Y., He, W., Huang, J., ... Xue, T. (2020). The complete chloroplast genome of *Isochrysis galbana* and comparison with related haptophyte species. *Algal Research*, 50, 101989.
- Fernández, B., & Albentosa, M. (2019). Insights into the uptake, elimination and accumulation of microplastics in mussel. *Environmental Pollution*, 249, 321-329.
- Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Costa, S., Meucci, V., Battaglia, F., ... Faggio, C. (2020). Toxic impacts induced by Sodium lauryl sulfate in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*, 242, 110656.
- García-March, J. R. (2005). Aportaciones al conocimiento de la Biología de *Pinna nobilis* Linneo, 1758 (Mollusca: Bivalvia) en el litoral mediterráneo Ibérico. *Publ. Serv. Univ. Val.* 332 pp
- García-March, J. R., García-Carrascosa, A. M., Peña Cantero, A. L., & Wang, Y. G. (2007). Population structure, mortality and growth of *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 (Mollusca, Bivalvia) at different depths in Moraira bay (Alicante, Western Mediterranean). *Mar. Biol.*, 150, 861–871.

- García-March, J. R., Tena, J., Henandis, S., Vázquez-Luis, M., López, D., Téllez, C., ... Deudero, S. (2020). Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction? *Biological Conservation*, *243*, 108498.
- Gualart, J., & Templado, J. (2012). "Pinna nobilis". In *Bases ecológicas preliminares para la conservación de las especies de interés comunitario en España: Invertebrados* (p. 81). Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Hendriks, I. E., Tenan, S., Tavecchia, G., Marbà, N., Jordà, G., Deudero, S., ... Duarte, C. M. (2013). Boat anchoring impacts coastal populations of the pen shell, The largest bivalve in the Mediterranean. *Biological Conservation*, *160*, 105–113.
- Hernandis, S., Tena, J., López, D., Téllez, C., Prado, P., García-March, J. R. New insights on seasonality and environmental influence on *Pinna rudis* growth. *En preparación*.
- Hildreth, D. I., & Crisp, D. J. (1976). A corrected formula for calculation of filtration rate of bivalve molluscs in an experimental flowing system. *J. Mar. Biol. Ass.*, *56*(1), 111–120.
- Hoellein, T. J., Zarnoch, C. B., & Grizzle, R. E. (2014). Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) filtration, biodeposition, and sediment nitrogen cycling at two oyster reefs with contrasting water quality in Great Bay Estuary (New Hampshire, USA). *Biogeochemistry*, *122*(1), 113–129.
- IUCN. *Mediterranean Noble Pen Shell Crisis (Pinna nobilis)*. <https://www.iucn.org/news/mediterranean/202001/mediterranean-noble-pen-shell-crisis-pinna-nobilis-january-2020-update> [Retrieved: September 8, 2020].
- Juárez, O. E., Lafarga-De la Cruz, F., Leyva-Valencia, I., López-Landavery, E., García-Esquivel, Z., Díaz, F., ... Galindo-Sánchez, C. E. (2018). Transcriptomic and metabolic response to chronic and acute thermal exposure of juvenile geoduck clams *Panopea globosa*. *Marine Genomics*, *42*, 1–13.
- Katsanevakis, S. (2006). Population ecology of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in a marine lake. *Endang Species Res*, *1*, 51–59.
- Katsanevakis, S. (2007). Growth and mortality rates of the fan mussel *Pinna nobilis* in Lake Vouliagmeni (Korinthiakos Gulf, Greece): A generalized additive modelling approach. *Marine Biology*, *152*(6), 1319–1331.
- Kersting, D. K., & García-March, J. R. (2017). Long-term assessment of recruitment, early stages and population dynamics of the endangered Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* in the Columbretes Islands (NW Mediterranean). *Marine Environmental Research*, *130*, 282–292.
- Khripounoff, A., Caprais, J. C., Decker, C., Le Bruchec, J., Noel, P., & Husson, B. (2017). Respiration of bivalves from three different deep-sea areas: Cold seeps, hydrothermal vents and organic carbon-rich sediments. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *142*, 233–243.
- Lin, Y. H., Chang, F. L., Tsao, C. Y., & Leu, J. Y. (2007). Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochem. Eng. J.*, *37*(2), 166–176.

Efecto de la temperatura en las tasas de filtración de la nacra (*Pinna nobilis*)

- Liu, H., Probert, I., Uitz, J., Claustre, H., Aris-Brosou, S., Frada, M., ... De Vargas, C. (2009). Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *PNAS*, *106*(31), 12803–12808.
- Marbà, N., Duarte, C. M., Díaz-Almela, E., Terrados, J., Álvarez, E., Martínez, R., ... Grau, A. M. (2005). Direct evidence of imbalanced seagrass (*Posidonia oceanica*) shoot population dynamics in the Spanish Mediterranean. *Estuaries*, *28*(1), 53–62.
- Morató Trobat, M., Khokhlova, A., Deudero, S., Mateu-Vicens, G., Vázquez-Luis, M., & Campillo, J. (2013). *Pinna nobilis* and epiphytic foraminifera as potential bioindicators of heavy metal pollution in balearic islands (western mediterranean). *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, *40*.
- Morton, B., & Puljas, S. (2018). An improbable opportunistic predator: the functional morphology of *Pinna nobilis* (Bivalvia: Pterioidea: Pinnidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *99*(2), 359–373.
- Najdek, M., Blažina, M., Ezgeta-Balić, D., & Peharda, M. (2013). Diets of fan shells (*Pinna nobilis*) of different sizes: fatty acid profiling of digestive gland and adductor muscle. *Mar. Biol.*, *160*, 921–930.
- Navarro, J. *Descripción geográfica del Mar Menor*.
<https://marmenorenclave.blogspot.com/2010/03/descripcion-geografica.html>
[Retrieved: September 8, 2020].
- Newell, R. (2004). Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review. *J Shellfish Res* *23*(1):51–61.
- Nieves-soto, M., Fernando-Bückle Ramírez, L., Piña-Valdez, P., Alejandra Medina-Jasso, M., Miranda-Baeza, A., Rafael Martínez-Córdova, L., & Antonio López-Elías, J. (2013). Combined effect of temperature and food concentration on the filtration and clarification rates and assimilation efficiency of *Atrina tuberculosa* Sowerby, 1835 (Mollusca: Bivalvia) under laboratory conditions. *Arch. Biol. Sci.*, *65*(1), 99–106.
- Pérez-Ruzafa, A., Fernández, A. I., Marcos, C., Gilabert, J., Quispe, J. I., & García-Charton, J. A. (2005). Spatial and temporal variations of hydrological conditions, nutrients and chlorophyll *a* in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, Spain). *Hydrobiologia*, *550*, 11–27.
- Pettersen, A. K., Turchini, G. M., Jahangard, S., Ingram, B. A., & Sherman, C. D. H. (2010). Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture*, *309*(1–4), 115–124.
- Prado, P., Cabanes, P., Catanese, G., Carella, F., Carrasco, N., Grau, A., ... Andree, K. B. (2020). Growth of juvenile *Pinna nobilis* in captivity conditions: Dietary and pathological constraints. *Aquaculture*, *522*, 735167.
- Przeslawski, R., Davis, A.R., Benkendorff, K., 2005. Synergistic effects associated with climate change and the development of rocky shore molluscs. *Glob. Chang. Biol.*, *11*, 515–522.
- Rabaoui, L., Belgacem, W., Ben Ismail, D., Mansour, L., & Tlig-Zouari, S. (2015). Engineering effect of *Pinna nobilis* shells on benthic communities. *Oceanologia*, *57*(3), 271–279.

- Ramos, M. A. (1998). Implementing the habitats directive for mollusc species in Spain. *Journal of Conchology Special Publication*, 2, 125–132.
- Riisgård, H. U. (2001). On measurement of filtration rates in bivalves - The stony road to reliable data: Review and interpretation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 211, 275-291.
- Rouanet, E., Trigos, S., & Vicente, N. (2015). From youth to death of old age: the 50-year story of a *Pinna nobilis* fan mussel population at Port-Cros Island (Port-Cros National Park, Provence, Mediterranean Sea). *Sci. Rep. Port-Cros natl. Park*, 29, 209–222.
- Saavedra, L. M., Parra, D., Martin, V. S., Lagos, N. A., & Vargas, C. A. (2018). Local Habitat Influences on Feeding and Respiration of the Intertidal Mussels *Perumytilus purpuratus* Exposed to Increased pCO₂ Levels. *Estuaries Coasts*, 41(4), 1118–1129.
- Schultz, P. W. W., & Huber, M. (2013). Shells and their regeneration. In *Revision of the worldwide recent Pinnidae and some remarks on fossil european Pinnidae* (pp. 12–13). Acta Conchyliorum.
- Todd, C.D., Doyle, R.W., 1981. Reproductive strategies of marine benthic invertebrates: a settlement-timing hypothesis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4, 75–83.
- Trigos, S., García-March, J. R., Vicente, N., Tena, J., & Torres, J. (2014). Utilization of muddy detritus as organic matter source by the fan mussel *Pinna nobilis*. *Medit. Mar. Sci.*, 15(3), 667–674.
- Trigos, S., García-March, J. R., Vicente, N., Tena, J., & Torres, J. (2015). Respiration rates of the fan mussel *Pinna nobilis* at different temperatures. *Journal of Molluscan Studies*, 81(2), 217–222.
- Tuszer-Kunc, J., Normant-Saremba, M., & Rychter, A. (2020). The combination of low salinity and low temperature can limit the colonisation success of the non-native bivalve *Rangia cuneata* in brackish Baltic waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 524, 151228.
- Vargas, M., García, M. C., Moya, F., Tel, E., Parrilla, G., Plaza, F., & Lavín, A. (2010). “Distribuciones medias de temperatura y clorofila superficial desde satélite”. In *Cambio climático en el Mediterráneo español*. Madrid: Instituto Español de Oceanografía.
- Widdows, J., & Johnson, D. (1988). Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 46, 113-121.