



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

AVANCES EN ACUARIOLÓGÍA Y CONSERVACIÓN DE  
ESPECIES MARINAS.

**D. Emilio Cortés Melendreras**  
**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
TESIS DOCTORAL

AVANCES EN ACUARIOLÓGÍA Y CONSERVACIÓN DE ESPECIES  
MARINAS.

Autor: D. Emilio Cortés Melendreras

Director/es: D. Ezequiel Martínez Ortega

D<sup>a</sup> Francisca Gimenez Casalduero





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Emilio Cortés Melendreras

doctorando del Programa de Doctorado en

Biodiversidad y Gestión Ambiental

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Avances en Acuariología y Conservación de Especies Marinas

y dirigida por,

D./Dña. Ezequiel Martínez Ortega

D./Dña. Francisca Giménez casalduero

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 25 de septiembre de 2023

Fdo.: Emilio Cortés Melendreras

**CORTES  
MELENDRERAS  
EMILIO -  
27474769G**

Firmado digitalmente por  
CORTES MELENDRERAS  
EMILIO - 27474769G  
Fecha: 2023.09.25  
19:30:23 +02'00'

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

El presente trabajo se ha llevado a cabo en las instalaciones del Acuario de la Universidad de Murcia, Centro de Investigación y Divulgación dependiente del Vicerrectorado de Investigación de dicha Universidad y ha sido cofinanciado con los proyectos:

*Banco de Especies Protegidas y Singulares del Mar Menor* (S/Ref. Decreto 65//2020) promovido por la Dirección General del Mar Menor, de la Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente (CARM).

LIFE PINNARCA (LIFE20-NAT/ES/001265)

## AGRADECIMIENTOS

En algunos momentos llegué a pensar que nunca me vería en la situación de tener que escribir los agradecimientos de mi tesis. No porque no tenga a quien agradecer la ayuda y el apoyo mostrado durante tanto tiempo, sino porque desde que la dejé apartada hace ya casi 20 años, ha habido ocasiones en las que no tenía claro que llegase a terminarla. Cada uno recorre los caminos de la vida de una manera y la mía no ha sido siempre la más ortodoxa, pero al final todo barco llega a puerto.

En primer lugar, me gustaría reconocer a mis directores de tesis, por una parte, Ezequiel, por ser mi hermano mayor durante los últimos treinta años y porque sin él, no habría sido posible el Acuario. Por otra, Paqui, todo un referente en ecología marina y una de mis mejores amigas, por tener tanta fe en mí, sin su esfuerzo y ayuda nunca habría llegado a terminar este trabajo.

A Paco Gomariz y Paco Alonso por todo lo aprendido sobre tratamiento de datos y modelización. Los dos funcionan a otro nivel y oírlos abre la mente para hacer fácil lo difícil.

A mis compañeros de trabajo del Acuario de la Universidad de Murcia. El mantenimiento de los cultivos auxiliares para alimentar a las nacras o el esfuerzo necesario para intentar sacar adelante sus larvas es algo sobrehumano que sólo los que lo han sufrido saben realmente lo que significa y Juan, Michel, Chito y Ana siempre han estado allí con la ilusión y la implicación necesaria. El trabajo con animales vivos solo funciona si hay vocación.

A Javier Giménez en las campañas de campo, por su inestimable compañía en kilómetros y kilómetros de transectos en aguas del Mar Menor, unas veces claras como el día, y otras oscuras como el café con leche, y siempre bajo la atenta vigilancia de nuestra querida Ana Mercader desde el barco. Junto a Paqui, hicimos un perfecto equipo de trabajo en los momentos más duros de crisis de eutrofización y pandemias globales.

A Javier Murcia, gran amigo, fantástico fotógrafo y una fuente de sabiduría en especies del Mar Menor y el Mediterráneo.

A Pilar Martínez por su gran ayuda prestada en el laboratorio, en el ordenador y en el mar.

Todo este trabajo no habría sido posible, además, sin la implicación de la Dirección General del Mar Menor y la Dirección general de Medio Natural, gracias a Faustino, Emilio, Alicia, María, Carlos y por supuesto a Antonio Luengo, Miriam Pérez y a Víctor Serrano por hacer posible el proyecto Banco de Especies del Mar Menor, plataforma desde la que se ha realizado el presente trabajo

Me gustaría agradecer, con especial cariño, a todos los que siempre han creído en el proyecto del Acuario de la Universidad de Murcia y me han animado a seguir adelante: Guillermo Díaz, Mercedes Farias, Antonio Juan García, Paco Esquembre, Senena Corbalán, Alfonsa García, María Ángeles Esteban, Pepe Galian, Alfonso Ramos, Alfonso Ros, Felipe Aguado, Juan Carlos Calvín, Elisa y Chelu, mis queridos primos Arturo y Amalia, mi tía Chito y muchos más que, aunque no nombre, están ahí.

Por último, a mi compañera en la vida, Nieves, y a mis hijos Nievécicas y Emilico, por el tiempo que me han facilitado para las miles de cosas en las que me ido embarcando.

La tesis se la dedico a mis padres y a mi tía Concha, mi segunda madre, que ya no están y que seguro que este momento lo habrían disfrutado más que yo.

## INDICE

## AVANCES EN ACUARIOLOGÍA Y CONSERVACIÓN DE ESPECIES MARINAS

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1. DIAGNÓSTICO Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE <i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus, 1758) EN LA LAGUNA DEL MAR MENOR.</b> .....	<b>8</b>
1.1 RESUMEN - ABSTRACT.....	9
1.2 INTRODUCCIÓN .....	11
1.3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
1.3.1 Área de estudio .....	14
1.3.2 Periodos de estudio y fuentes de información sobre <i>P. nobilis</i> .....	17
1.3.2.1 Periodo de colonización y dispersión. Estima de datos históricos (1983 + 2003 y 2004) .....	18
1.3.2.2 Periodo pre-colapso poblacional. Conjunto integrado de datos de 2013-2014 .	20
1.3.2.3 Periodo post colapso poblacional. Conjunto integrado de datos de 2017 a 2020 .....	22
1.3.3 Selección de variables ambientales determinantes en la distribución de <i>P. nobilis</i> ..	24
1.3.3.1 Descripción de variables ambientales y fuentes de información en los periodos de colonización, dispersión y pre-colapso poblacional .....	24
1.3.3.2 Descripción de variables ambientales y fuentes de información en el periodo post-colapso poblacional.....	25
1.3.4 Marco conceptual para la Modelización espacial de Distribución de Especies (SDMs) .....	25
1.3.4.1 Modelos de clasificación y regresión para los datos históricos (2003 y 2004) y el conjunto de datos integrados de 2013-2014. Validación de modelos .....	26
1.3.4.2 Marco de modelización para el conjunto de datos integrado de 2017-2020 .....	27
1.3.4.3 Modelos de clasificación y regresión para el conjunto de datos integrados de 2017-2020 Validación de modelos .....	28
1.3.5 Selección de Variables .....	29
1.3.5.1 Selección de variables medioambientales en los periodos de colonización, dispersión y pre-colapso poblacional .....	29
1.3.5.2 Selección de variables ambientales en el periodo post-colapso 2017-2020.....	30
1.4 RESULTADOS .....	31
1.4.1 Caracterización de la población en los periodos de dispersión y pre-colapso (2003-2004 y 2013-2014) .....	31
1.4.1.1 Evaluación global de los modelos .....	31
1.4.1.2 Selección de variables y efectos de los predictores en los modelos seleccionados .....	31
1.4.1.3 Predicción espacial de los modelos SDM .....	37
1.4.2 Caracterización de la población en periodo post-colapso poblacional (2017-2020) .	41

1.4.2.1	Estructura de la densidad de población .....	41
1.4.2.2	Evaluación global de los modelos .....	43
1.4.2.3	Selección de variables y efectos de los predictores en los modelos seleccionados .....	45
1.4.2.4	Predicción espacial de los modelos SDM .....	51
1.5	DISCUSIÓN.....	55
1.6	CONCLUSIONES .....	65
<b>CAPÍTULO 2. AVANCES EN EL MANTENIMIENTO EX SITU DE <i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus, 1758)..</b>		<b>68</b>
2.1	RESUMEN - ABSTRACT.....	69
2.2	INTRODUCCIÓN .....	71
2.3	METODOLOGÍA.....	74
2.3.1	Diseño de los tanques .....	74
2.3.2	Sustrato .....	74
2.3.3	Agua.....	75
2.3.4	Sistemas de filtrado .....	75
2.3.4.1	Filtración mecánica.....	76
2.3.4.2	Filtración Química .....	77
2.3.4.3	Filtración biológica .....	77
2.3.4.4	Filtración germicida .....	80
2.3.5	Elementos de Control de Tª .....	83
2.3.6	Iluminación.....	83
2.3.7	Movimiento de agua en los tanques.....	83
2.3.8	Control de parámetros ambientales.....	84
2.3.9	Condiciones de mantenimiento .....	86
2.3.9.1	Ejemplares de <i>Pinna nobilis</i> .....	86
2.3.9.2	Disposición de los ejemplares en los tanques.....	87
2.3.9.3	Control de epibiontes .....	88
2.3.10	Alimentación ex situ de ejemplares de <i>Pinna nobilis</i> .....	89
2.3.11	Tratamiento de salinidad y temperatura en ejemplares positivos en <i>Haplosporidium pinnae</i> .....	89
2.4	RESULTADOS .....	91
2.4.1	Supervivencia de ejemplares de <i>Pinna nobilis</i> en laboratorio .....	91
2.4.2	Parámetros ambientales .....	94
2.4.3	Control de epibiontes .....	98
2.4.4	Tratamiento de salinidad y temperatura en ejemplares positivos en <i>H. pinnae</i> .....	98
2.5	DISCUSIÓN.....	100

2.5.1 Mortalidad de ejemplares de <i>Pinna nobilis</i> .....	100
2.5.2 Control de epibiontes.....	101
2.5.3 Evolución de los parámetros ambientales .....	102
2.5.4 Posición de los ejemplares .....	105
2.5.5 Tratamiento de salinidad y temperatura en ejemplares positivos en <i>H. pinnae</i> .....	106
2.6 CONCLUSIONES .....	107
<b>CAPÍTULO 3: AVANCES EN PROTOCOLOS DE REPRODUCCIÓN DE <i>Pinna nobilis</i>. .....</b>	<b>109</b>
3.1 RESUMEN - ABSTRACT.....	110
3.2 INTRODUCCIÓN .....	112
3.3 METODOLOGÍA.....	116
3.3.1 Área de estudio .....	116
3.3.2 Evento reproductor en el medio natural en la laguna del Mar Menor.....	117
3.3.3 Diseño de sistemas para mantenimiento de reproductores.....	117
3.3.4 Experiencia 1. 2020: Densidad larvaria, optimización de dietas y caracterización de fases de desarrollo larvario. ....	118
3.3.4.1 Maduración de ejemplares. ....	118
3.3.4.2 Inducción, liberación de gametos y fertilización. ....	120
3.3.4.3 Desarrollo larvario .....	122
3.3.4.4 Experiencia de densidad larvaria y optimización de dietas.....	123
3.3.4.5 Caracterización del desarrollo embrionario y larvario. ....	125
3.3.5. Experiencia 2. 2023: Maduración ex situ e in situ y caracterización de fases de desarrollo larvario. ....	127
3.3.5.1 Maduración de ejemplares. ....	127
3.3.5.2 Inducción, liberación de gametos y fertilización. ....	130
3.3.5.3 Caracterización del desarrollo embrionario y larvario. ....	131
3.4 RESULTADOS .....	133
3.4.1 Evento reproductor en el medio natural en la laguna del Mar Menor.....	133
3.4.2 Experiencia 1: 2020: Densidad larvaria, optimización de dietas y caracterización de fases de desarrollo larvario. ....	134
3.4.2.1 Sistemas de mantenimiento de reproductores. Tablas de parámetros. ....	134
3.4.2.2 Maduración de ejemplares. ....	136
3.4.2.3 Inducción, liberación de gametos y fertilización. ....	137
3.4.2.4 Resultados de la experiencia de densidad larvaria y optimización de dietas. ..	137
3.4.2.5 Caracterización del desarrollo embrionario y larvario. ....	143
3.4.3 Experiencia 2. 2023: Maduración ex situ e in situ y caracterización de fases de desarrollo larvario. ....	145
3.4.3.1 Sistemas de mantenimiento de reproductores. Tablas de parámetros. ....	145

3.4.3.2	Maduración de ejemplares. ....	147
3.4.3.3	Inducción, liberación de gametos y fertilización. ....	147
3.4.3.4	Caracterización del desarrollo embrionario y larvario. ....	149
3.4.3.4.1	Evento 16/06/23. Tanque Pinna 3C. ....	149
3.4.3.4.2	Evento 21/06/23-A. Tanque Pinna 3B. ....	151
3.4.3.4.3	Evento 21/06/23-B. Tanque Pinna 3C. ....	153
3.4.4	Secuencia de desarrollo larvario en <i>Pinna nobilis</i> . ....	155
3.5	DISCUSIÓN.....	159
3.5.1	Evento reproductor en la laguna del Mar Menor. ....	159
3.5.2	Diseño de sistemas. ....	160
3.5.3	Acondicionamiento de reproductores. Maduración gonadal. ....	160
3.5.4	Inducción, liberación de gametos y fertilización. ....	164
3.5.5	Experiencia de densidad larvaria y optimización de dietas.....	167
3.5.6	Caracterización de desarrollo larvario.....	168
3.6	CONCLUSIONES .....	172
	CONCLUSIONES GENERALES .....	175
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>181</b>



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

El rápido crecimiento demográfico desde mitad del SXX ha tenido como consecuencia un incremento de la presión sobre los ecosistemas. En las últimas décadas se ha podido advertir un creciente deterioro del medio ambiente provocado principalmente por factores de origen antrópico, que en algunos casos ha determinado la viabilidad de ciertos ecosistemas (McMichael, 2002; Foley et al., 2005). Según la Unión internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) en este momento hay más de 42.100 especies amenazadas de extinción, es decir el 28% de las especies evaluadas por la IUCN se encuentran a punto de desaparecer.

En la actualización de la lista roja de *especies en peligro* que la IUCN publicó en 2019, de las 150.732 especies evaluadas 873 se han extinguido ya (<https://www.iucnredlist.org/>). Se estima que la pérdida de biodiversidad global ha llevado a la extinción de cientos de especies, por lo que es necesario abordar acciones de conservación destinadas a mitigar las amenazas a las especies en peligro (Gilbert et al., 2017).

Al mismo tiempo que la comunidad global se enfrenta a crecientes desafíos medioambientales, se hacen necesarias políticas de conservación tajantes que consigan frenar el creciente deterioro ambiental y las amenazas a las que se enfrentan las especies (Unsworth et al., 2019).

Las estrategias de conservación de especies en peligro de extinción necesitan enfoques multidisciplinares y requieren una combinación de acciones *in situ* y *ex situ*, seleccionadas teniendo en cuenta las necesidades específicas de cada especie y las amenazas a las que se enfrenta (Zegeye, 2017).

Las acciones *in situ* están encaminadas a la conservación de las especies en sus hábitats naturales fundamentalmente estableciendo medidas de protección del hábitat donde viven dichas especies (Heywood, 2015). Algunos aspectos clave en la conservación *in situ* incluyen además de la conservación del hábitat, el establecimiento de medidas regulatorias que ayuden a preservar los ecosistemas de daños potenciales, la monitorización de las especies y el seguimiento de sus poblaciones, o la promoción de prácticas sostenibles para comunidades locales y los diferentes actores relacionados con los ambientes a conservar (Caldecott et al., 1996).

Las acciones *ex situ* suelen implicar el traslado de las especies en peligro desde sus hábitats naturales a ambientes controlados con el principal objetivo de estudiar su biología, lo que permite obtener importantes conocimientos destinados, entre otras cosas, al desarrollo de protocolos que permitan garantizar la viabilidad de estas especies. Los protocolos de mantenimiento y reproducción ofrecen la posibilidad de abordar, si el caso lo requiere, proyectos de recuperación en el medio natural (Fitzsimons et al., 2020). Por otra parte, la

creación de bancos de material genético garantiza la viabilidad de las especies en el tiempo (Brush, 2000).

La conservación de organismos acuáticos y en concreto marinos supone un nivel mayor de complejidad, relacionado con la necesidad de proporcionar un ambiente adecuado y de calidad a las especies con las que se va a trabajar *ex situ* (Leal et al., 2016).

En relación con las especies marinas más amenazadas, los elasmobranquios (tiburones y rayas) son los más afectados con un 37% de las especies evaluadas, amenazadas de extinción (Cashion et al., 2019). Entre los corales formadores de arrecifes son un 36% de las especies amenazadas (Descombes et al., 2015) y en otros invertebrados como los crustáceos, alrededor de un 28% de los evaluados se encuentran en peligro. En el grupo de los moluscos también hay un gran número de especies catalogadas en peligro debido a distintos factores, principalmente sobrepesca u otros factores antrópicos, aunque es interesante destacar el caso de *Pinna nobilis*, en el Mediterráneo.

La nacra, *Pinna nobilis*, es un molusco bivalvo endémico del Mediterráneo que tradicionalmente se extendía por toda su cuenca litoral, en rangos batimétricos muy amplios con sustratos diversos (Guallart y Templado, 2012). Como especie sésil, es muy vulnerable a determinados impactos sobre el medio natural como la pesca de arrastre, la degradación del hábitat o el fondeo de embarcaciones entre otros (Basso et al., 2015b). Además, hace pocas décadas se recolectaba para decorar, para la producción de seda con su biso o para su uso en gastronomía (Katsanevakis et al., 2021). Esto llevó a su clasificación como especie *Vulnerable* a la extinción dentro del Catálogo Español de Especies Amenazadas (Guallart y Templado, 2012; Prado et al., 2020b). Sin embargo, en 2016 comenzó un evento de mortalidad masiva de individuos de *P. nobilis* que continúa hasta la (Vázquez -Luis et al., 2017). En septiembre de 2016 se detectó la muerte de algunos individuos de nacra en las costas españolas. La mortalidad de individuos comenzó a observarse en otras partes del Mediterráneo en 2017, y en 2018 ya se había extendido por toda la cuenca mediterránea, dejando mortalidades del 99% de los individuos en la mayoría de las zonas (Cabanellas-Reboredo et al., 2019). Estas dramáticas tasas de mortalidad llevaron a la recategorización de la especie como *En Peligro Crítico*, con un nivel de protección mucho mayor (BOE 2018, UICN, 2019). La causa de la muerte de los individuos era desconocida durante las primeras etapas del evento de mortalidad, pero en 2017 se detectó una nueva especie de protozoo del género *Haplosporidium*, que infecta a los organismos y ataca sus sistemas digestivos. Este protozoo fue reconocido como *Haplosporidium pinnae*, una especie que solo infecta a *P. nobilis* y a ningún otro bivalvo (Darriba, 2017; Catanese et al., 2018).

Posteriormente se detectó la presencia de otros parásitos que, en sinergia con *H. pinnae*, agravan la situación y provocan una muerte más rápida de las nacras, como bacterias del género *Mycobacterium* (Carella et al., 2019). No es descartable que actúen otros patógenos en este grave episodio.

En la actualidad, las únicas poblaciones supervivientes de *Pinna nobilis* conocidas en todo el Mediterráneo han quedado relegadas a ciertas zonas donde, debido a las características específicas del medio, *H. pinnae* parece no haberse expandido o tiene poca capacidad de dispersión; principalmente lagunas costeras, deltas y bahías (Katsanevakis et al., 2021). En la costa española, las dos únicas poblaciones supervivientes de *P. nobilis* conocidas, se encuentran en la laguna costera del Mar Menor (Murcia) y en el Delta del Ebro (Cataluña). Se cree que las diferencias en los niveles de salinidad con respecto al Mediterráneo han impedido la propagación del patógeno en ambas zonas (Prado et al., 2020b). *H. pinnae* tiene un rango óptimo de salinidad entre 36,5 y 39 ups (Prado et al., 2022), mientras que el Mar Menor tiene una salinidad más alta (alrededor de 42 ups), y la salinidad del Delta del Ebro es inferior a 36 ups. Desafortunadamente, ambos ecosistemas presentan una importante influencia antropogénica, por lo que es necesario implementar medidas de conservación para asegurar la supervivencia de la especie. El Delta del Ebro se ve impactado por los vertidos de los arrozales adyacentes y las actividades relacionadas con el sector turístico o la acuicultura (Prado et al., 2020a).

A pesar de colonizar recientemente la laguna, *Pinna nobilis* llegó a ser una especie muy abundante en el Mar Menor, con densidades relativamente altas y más de un millón y medio de ejemplares, ocupando el 60% de su superficie en 2014 (capítulo 1 del presente trabajo) Sin embargo, desde 2016, la laguna está sufriendo graves episodios de eutrofización y colapso ambiental que han provocado la muerte de un enorme porcentaje de los individuos de nacra, entre otras muchas especies (Sandonnini et al., 2021). La entrada constante en la laguna de agua con una alta concentración de sedimentos, materia orgánica y nutrientes procedentes principalmente de la agricultura, pero también de las aguas residuales, y de la ganadería, provoca un crecimiento masivo del fitoplancton, lo que conlleva una reducción de la luz y la muerte y descomposición de la materia orgánica de la laguna. Esto, a su vez, provoca hipoxia, anoxia e incluso euxinia tanto en la columna de agua como en el sedimento, especialmente a partir de los 3 metros de profundidad (Ruiz et al., 2019, Sandonnini et al., 2020). En 2017, todos los individuos de *P. nobilis* que vivían por debajo de 3 metros de profundidad murieron, y por encima de los 3 metros, la tasa de mortalidad se acercó al 90% (capítulo 1 del presente trabajo).

En 2021, se estimaba que los supervivientes no superaban los 1.500 ejemplares en toda la laguna (capítulo 1 del presente trabajo).

Entre las acciones que se han activado para intentar la conservación de esta especie se encuentra tanto el seguimiento de las poblaciones *in situ*, como el avance en el conocimiento del mantenimiento y cría *ex situ*.

A la hora de plantear una plan de trabajo apropiado para el cultivo de *Pinna nobilis*, es importante tener en cuenta que se trata de una especie catalogada en peligro crítico (*Orden TEC/1078/2018* (MITECO, 2018)) cuya población natural en el Mediterráneo se ha reducido en un 99-100% (Darriba 2017, Catanese et al. 2018, Cabanellas-Reboredo et al. 2019), de la cual solo quedan grupos de ejemplares en áreas costeras reducidas caracterizadas por unas condiciones de salinidad fuera del rango de tolerancia de *Haplosporidium pinnae*, entre 36,5 y 39 ups (Prado et al., 2022). En el Delta del Ebro, estas condiciones de salinidad fluctúan por debajo del rango óptimo para el parásito (< 36 ups), con una población total cercana a los 90.000 ejemplares. En el Mar Menor la salinidad se sitúa por encima del rango óptimo del parásito (42-45 ups) aunque la estima de población no alcanza los 1500 ejemplares. Es por ello que cada ejemplar de la especie, especialmente de la población del Mar Menor, tiene un valor excepcional y debe ser tratado con sumo cuidado, evitando procedimientos que impliquen técnicas invasivas capaces de dañar al ejemplar, los cuales podrían debilitarlo e incluso provocar su muerte.

El presente trabajo está dedicado a la conservación de *Pinna nobilis*, y se estructura en tres bloques principales.

El primero de ellos es un estudio *in situ* sobre el diagnóstico y la evolución de la población de *Pinna nobilis* en el Mar Menor, que ofrece una idea sobre la historia de la nacra en la laguna. En este bloque se ha caracterizado la población de *P. nobilis* antes y después del colapso ambiental ocurrido en la laguna en 2016. Se han identificado las principales vías de entrada en la laguna de esta especie desde los primeros ejemplares; se ha analizado el proceso de colonización de *P. nobilis* desde los primeros ejemplares en los años 80's hasta los años previos al colapso ambiental de 2016; se han localizado los principales factores que determinaron la distribución de la especie en la laguna; posteriormente se ha realizado una evaluación de la situación de la población de *P. nobilis* tras la crisis de eutrofización y su declive en los años posteriores y se han identificado los principales factores que describen la distribución de la especie en la actualidad.

El segundo bloque está dedicado al establecimiento de los protocolos de mantenimiento de *Pinna nobilis ex situ*, en el cual se han diseñado los sistemas de recirculación apropiados para la especie, se ha seleccionado la tecnología apropiada para reproducir las condiciones ambientales

y sus variaciones anuales en ambientes controlados de laboratorio y se han realizado avances en la elaboración de dietas adecuadas para asegurar su viabilidad en el tiempo en instalaciones.

El tercer y último bloque se ha dedicado a uno de los objetivos clave para evitar el declive de la población de *Pinna nobilis* y su extinción, avanzar en el desarrollo de protocolos de reproducción *ex situ*, teniendo en cuenta los procedimientos de maduración *in situ* y *ex situ*, así como la puesta a punto de la metodología para asegurar la supervivencia larvaria.



**CAPÍTULO 1. DIAGNÓSTICO Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE  
*Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 EN LA LAGUNA DEL MAR MENOR**

## 1.1 RESUMEN

Las poblaciones de nacra (*Pinna nobilis*) han disminuido progresivamente en las últimas décadas como consecuencia de actividades antropogénicas. La regresión de la especie se ha incrementado desde 2016, año en el que se produjo un evento de mortalidad masiva desencadenado por el parásito *Haplosporidium pinnae*, aunque existen pruebas de que bacterias del género *Mycobacterium* e incluso otros patógenos, pueden haber desempeñado un papel importante en el evento. De hecho, la epidemia se ha extendido por todo el Mediterráneo, relegando a sus poblaciones a lagunas costeras o estuarios con salinidades fuera del rango de 36,5-39,7 ups. El Mar Menor es una de las dos localizaciones con estas características en el litoral español. A principios de la década de 1980, *P. nobilis* apareció en la laguna del Mar Menor y rápidamente se convirtió en un componente importante del bentos. Sin embargo, la colonización de la laguna por la nacra se vio interrumpida en 2016, en paralelo a la mortalidad masiva que tenía lugar en el Mediterráneo, cuando la población fue diezmada por una crisis que afectó a más del 99% de los ejemplares como consecuencia de las deficientes condiciones ambientales y los eventos de eutrofización y anoxia, que llegaron a ser críticos en 2016, 2019 y 2021.

En el presente trabajo se ha estimado las variaciones de la distribución potencial y la densidad de *P. nobilis* en los diferentes periodos desde la colonización de la laguna hasta el momento, para lo que se han utilizado modelos de distribución de especies en dos etapas (estimación de presencia/ausencia y modelización de la densidad). Se han estudiado las principales variables ambientales que determinaron la dispersión y colonización del Mar Menor por el bivalvo en etapas anteriores a 2016, así como las variables que han modificado su distribución en la laguna tras las sucesivas crisis de eutrofización. Se estima una superficie potencial de 200,97 ha y una densidad media de 1,05 ind.100 m<sup>2</sup> para 2020.

La viabilidad de la población del Mar Menor depende de acciones de gestión diseñadas tanto para la especie como para mejorar el estado ambiental de la laguna.

**PALABRAS CLAVE:** Laguna costera del Mar Menor - *Pinna nobilis* - Hipersalinidad - Crisis eutrónica - Modelos de distribución de especies – MDE- Machine learning – Random Forest- Regresion kriging

## 1.1 ABSTRACT

Populations of the Mediterranean pen shell (*Pinna nobilis*) have progressively declined in recent decades because of anthropogenic activities. The species' regression has increased since 2016, when a mass mortality event triggered by the parasite *Haplosporidium pinnae* occurred, although there is evidence that bacteria of the genus *Mycobacterium* and even other pathogens may have played an important role in the event. In fact, the epidemic has spread throughout the Mediterranean, relegating its populations to coastal lagoons or estuaries with salinities outside the range of 36.5-39.7 psu. The Mar Menor is one of two such locations on the Spanish coast. In the early 1980s, *P. nobilis* appeared in the Mar Menor lagoon and quickly became an important component of the benthos. However, the colonisation of the lagoon by the pen shell was interrupted in 2016, in parallel to the mass mortality taking place in the Mediterranean, when the population was devastated by a crisis that affected more than 99% of the specimens as a consequence of poor environmental conditions and eutrophication and anoxia events, which became critical in 2016, 2019 and 2021.

In the present work, we estimated the variations in the potential distribution and density of *P. nobilis* in the different periods from the colonisation of the lagoon to the present, using two-stage species distribution models (presence/absence estimation and density modelling). The main environmental variables that determined the dispersion and colonisation of the Mar Menor by the bivalve in stages prior to 2016 have been studied, as well as the variables that have modified its distribution in the lagoon after the successive eutrophication crises. A potential surface area of 200.97 ha and an average density of 1.05 ind.100 m<sup>2</sup> is estimated for 2020.

The viability of the Mar Menor population depends on management actions designed both for the species and to improve the environmental status of the lagoon.

KEY WORDS: Mar Menor coastal lagoon - *Pinna nobilis* - Hypersalinity - Eutrophic crisis - Species distribution models - DEM- Machine learning - Random Forest- Regression kriging

## 1.2 INTRODUCCIÓN

A finales de 2016 se registró un evento de **mortalidad masiva** de *Pinna nobilis*, en el Mediterráneo español, en el que se alcanzó en poco tiempo una pérdida de individuos próxima al 100%. En pocos meses el episodio se extendió a otras zonas, llegando a afectar a todo el Mediterráneo (Vázquez-Luis et al. 2017). El principal causante de esta epidemia es un parásito nuevo para la ciencia, *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al. 2018). Debido al estrecho rango de tolerancia del parásito a las variaciones de salinidad (Prado et al, 2021) los ambientes donde todavía se pueden encontrar poblaciones de nacra son las lagunas costeras y los estuarios, zonas donde la salinidad está fuera de ese rango de tolerancia. En España, el Delta del Ebro y el Mar Menor son los sitios relictos donde todavía es posible encontrar ejemplares vivos de *Pinna nobilis* (Cita). En el resto de países Mediterráneos las localidades en las que sobreviven nacras vivas están asociadas principalmente a este tipo de ambientes marinos lagunares. Las lagunas costeras mediterráneas son en este momento el hábitat más importante para las poblaciones remanentes del segundo bivalvo más grande del planeta. Se trata de son zonas transicionales y dinámicas separadas del océano por barreras geográficas y ecológicas; son masas de agua continentales poco profundas conectadas al mar por una o más entradas restringidas que permanecen abiertas al menos de forma intermitente (Kjerfve 1994). Las lagunas costeras están controladas por complejas interacciones entre la tierra, el océano y la atmósfera. El carácter de ecotono de estos ambientes los convierte en sistemas diversos, dinámicos y frágiles (Giménez-Casalduero 2006, Viaroli et al. 2007). Sin embargo, las actividades humanas provocan cambios en los procesos e interacciones ecológicas de estos ecosistemas (Basset et al. 2008), y la actividad agrícola cada vez más intensiva que se desarrolla en las tierras de los alrededores aumenta los aportes de nutrientes y puede llegar a provocar episodios graves de eutrofización (McGlathery et al. 2007).

La laguna costera del Mar Menor ha sido el hábitat de *Pinna nobilis* desde su primer registro a principios de los años 80 's (Rodríguez Babio y Navarro Tarrega, 1983; Murillo y Talavera, 1983) hasta la actualidad. En todo este periodo de tiempo la nacra ha pasado por una importante fase inicial de expansión hasta 2015, seguida de un significativo periodo de regresión, que coincide con las sucesivas crisis de eutrofización observadas en la laguna.

Para entender el patrón de colonización de esta especie hasta 2015, es importante identificar las vías de entrada de los primeros pulsos de colonización, los factores ambientales que determinaron su dispersión y preferencias de hábitats en la laguna. Y de igual forma, el declive

poblacional debe ser explicado a partir de los distintos episodios ocurridos en la laguna desde 2016.

Tras el primer periodo de colonización y estabilización, en 2016 se produjo un evento de alta mortalidad de esta especie en el Mar Menor, pero todas las evidencias indican que la causa de esta mortalidad no fue la epidemia de *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al. 2018) que diezmaba la población del Mediterráneo, sino las devastadoras consecuencias del colapso ambiental ocurrido en la laguna desde la segunda mitad de 2015 (CACMM, 2017; Ruiz et al., 2020). La laguna del Mar Menor sufrió un episodio de floración de algas nocivas (FAN) que culminó en una crisis de eutrofización tras décadas de recibir aportes de nutrientes y fitosanitarios procedentes principalmente de las actividades agrícolas cercanas (Aguilar-Escribano et al., 2016). En la primavera de 2016, la elevada concentración de fitoplancton impidió la entrada de luz, lo que inhibió la fotosíntesis provocando la muerte del fitobentos por debajo de los 3 m de profundidad, esta situación afectó a más del 85% de la superficie de la laguna (Belando et al. 2017). Las nuevas condiciones ambientales de hipoxia incluso anoxia en algunos puntos, provocaron, a su vez, la mortalidad masiva de muchos organismos bentónicos, entre ellos un alto porcentaje de individuos de *P. nobilis* (Giménez-Casalduero et al., 2020).

Posteriormente, durante el verano de 2019, se activó una crisis de eutrofización similar a la de 2016. Con un nuevo evento de "sopa verde" en ciernes y la columna de agua cargada de materia orgánica en descomposición, la laguna sufrió una entrada masiva de agua cargada de nutrientes procedente de la gran avenida asociada a un evento de precipitación extrema (DANA). Esta intensa descarga de agua dulce procedente de la cuenca hidrológica provocó la estratificación de la laguna en dos masas de agua

Una masa de agua de baja salinidad, proveniente de la avenida, que alcanzó la laguna "patinando" sobre la segunda masa de agua típicamente lagunar de alta salinidad. Por lo tanto, se formaron dos capas diferenciales: i) la superficial de baja densidad, cargada de nutrientes procedentes de los arrastres del Campo de Cartagena y, ii) la profunda más densa, donde el proceso de eutrofización del verano había llevado previamente al consumo de oxígeno y al predominio de bacterias anaeróbicas. Esta situación derivó en un proceso de euxinia (Ruiz et al., 2019). La descomposición de la materia orgánica debida a la acción de las bacterias anaerobias generó compuestos tóxicos resultantes del metabolismo como sulfuros y metano. La situación de anoxia y presencia de estos compuestos altamente tóxicos acabó de nuevo con toda la vida existente por debajo de los 3 m de profundidad (Giménez-Casalduero y Martínez-Fernández, 2020; Ruiz et al., 2019; Sandonnini et al., 2021b). Esta masa de agua anóxica y tóxica

emergió en la zona norte de la laguna el 12 de octubre de 2019, por efecto de los vientos de levante lo que provocó la basculación entre las capas estratificadas y el afloramiento de la capa profunda, provocando la muerte de un alto porcentaje de la macrofauna, incluida la colonia de nacras geolocalizadas en la zona de la playa de Villananitos. Se ha estimado que una superficie superior a las 9.000 has fue devastada de nuevo en el fondo de la laguna (Giménez-Casaldueiro y Martínez-Fernández, 2020; Ruiz et al., 2020).

En el presente trabajo se han estimado las variaciones de la distribución potencial y la densidad de *P. nobilis* en los diferentes periodos desde la colonización de la laguna, para lo que se han utilizado modelos de distribución de especies (SDM). La ventaja de este tipo de método es que la información ambiental/geográfica se utiliza para explicar patrones observados de presencia o abundancia y densidad de especies (Elith y Graham 2009). En este estudio, se ha utilizado un enfoque de aprendizaje automático, que es una alternativa más robusta a los métodos paramétricos. La naturaleza compleja de los sistemas ecológicos dificulta la capacidad para generar modelos precisos utilizando el modelo de datos de frecuencias tradicional. Problemas como las interacciones no lineales complejas, la autocorrelación espacial y temporal, la alta dimensionalidad, la homocedasticidad o la normalidad multivariante son difíciles de abordar con estos métodos, mientras que son más fáciles de tratar con algoritmos de aprendizaje automático (Evans et al. 2011). Aunque la aplicación de los SDM al medio marino no ha sido generalizada, los recientes avances tecnológicos en la recopilación y el análisis de datos han facilitado cada vez más su uso en la evaluación del hábitat de la fauna silvestre. Reiss et al. (2015) destacaron la importancia de estos métodos en los ecosistemas bentónicos marinos y revisaron ampliamente los métodos más utilizados y sus aplicaciones.

Los principales objetivos de este estudio han sido (1) caracterizar la población de *P. nobilis* en la laguna del Mar Menor antes y después del colapso ambiental de 2016, (2) identificar las principales vías de entrada en la laguna y analizar el proceso de colonización de *P. nobilis* antes de 2016, (3) identificar los principales factores que determinaron la distribución de la especie en la laguna, (4) realizar una primera evaluación de la situación de la población de *P. nobilis* en la laguna tras la crisis de eutrofización e (5) identificar los principales factores que describen actualmente la distribución de la especie.

## 1.3 MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.3.1 Área de estudio

El Mar Menor situado en el suroeste del Mar Mediterráneo (37° 42' N, 00° 47' O), en una región semiárida del sureste de España, es la mayor laguna costera del Mediterráneo occidental (Fig. 1.1). Cubre un área de 135 km<sup>2</sup>, con una profundidad media de 3,5 m y una profundidad máxima de 7 m. La zona se caracteriza por una baja precipitación (< 300 mm año<sup>-1</sup>), alta insolación e irradiación, y altas tasas de evaporación. Debido a esto, la laguna es hipersalina (38-47 ups), cálida y con cambios extremos de temperatura estacionales y diarios (8-32 °C). La laguna es la zona más baja de la cuenca sedimentaria del Campo de Cartagena, que se extiende 12500 km<sup>2</sup> y recibe aportes de agua de 13 canales efímeros que desembocan en la laguna. La Rambla del Albuñón (66700 ha) es la cuenca hidrológica más importante tanto en extensión como en flujos de sedimentos y nutrientes (Fig. 1.1B).

El aislamiento del Mar Menor sumado a otras características geomorfológicas provoca unas condiciones ambientales particulares, como estrés térmico y alta salinidad, por lo que estaba dominada por especies eurihalinas y euritermas (Mas et al., 2017).

La conexión de la laguna con el Mar Mediterráneo estaba históricamente limitada debido a la presencia de una barra de arena conocida como La Manga, atravesada por 5 canales o golos muy poco profundos, la del Charco, Torre, Ventorrillo, El Estacio y Marchamalo (Lillo 1979, López-Bermúdez et al. 1981). La de la Torre y la del Ventorrillo son pasos naturales situados en el paraje de la Encañizada, San Pedro del Pinatar. Las otras tres (Marchamalo, el Estacio y El Charco), fueron creadas total o parcialmente de forma artificial (Díaz del Río, 1993).

Las Encañizadas reciben su nombre debido a un arte de pesca creada en la época andalusí, un sistema de trampas de pesca realizado con estacas y cañas que se continúa aun utilizando en la actualidad para pescar mújol, langostino y otras especies típicas del Mar Menor (Palmero, 1972). Es una zona de transición natural entre el Mar Menor y Mar Mediterráneo cuyo nivel de agua sufre grandes oscilaciones, dando como resultado una zona pseudomareal poco frecuente en el Mediterráneo, con una extensión total de unos 2 km<sup>2</sup>. Las variaciones del nivel hídrico de las Encañizadas responden principalmente a cambios en la acción del viento, balance precipitación-evaporación y a variaciones de presión atmosférica transmitidas a la laguna desde el Mediterráneo a través de las golos (Baraza et al., 2004). Las Encañizadas constan de un conjunto de islotes y canales colonizados por vegetación halófila como las salicornias anuales. Es una zona

de escasa profundidad (entre 0,1 y 2,1 m), por lo que se produce la emersión de extensas superficies de sedimentos y praderas marinas cuando la marea está baja o la presión atmosférica es alta (“secas”). Este humedal, incluido dentro del Parque Regional “Salinas y Arenales de San Pedro del Pinatar” y del LIC “Salinas y Arenales de San Pedro del Pinatar” (ES0000175), ha sido identificado en diferentes estudios como hábitat 1140 de la Directiva de Hábitat (llanuras no cubiertas por agua cuando hay marea baja) en el litoral español (Baraza et al., 2004; Belando et al., 2014).

En 1976 se dragó y ensanchó la gola del Estacio, transformándola en un canal de 30 m de ancho y 5 m de profundidad (Mas 1994), aumentando la conexión entre la laguna y el Mediterráneo. En total, las entradas a la laguna suman una anchura de 645 m (Pérez-Ruzafa et al., 2005). Esta conexión modificó el régimen hidrodinámico de la laguna, alterando la tasa de renovación del agua. Como consecuencia, cambió su naturaleza sedimentaria, provocó un descenso de la salinidad desde una media de 52 hasta 42 ups en 2015 y se amortiguaron los cambios anuales y diarios de temperatura, acercándose a valores similares a los del Mediterráneo (Baraza et al. 2003, Lloret et al. 2005). Las barreras ecológicas se debilitaron, permitiendo la entrada y colonización de nuevas especies procedentes del Mediterráneo en la laguna, entre las cuales se encontraba *P. nobilis*. Las prospecciones realizadas por Murillo y Talavera (1983) en 1981, durante un estudio malacológico del Mar Menor, no detectaron la presencia de *Pinna nobilis* en la laguna. Los primeros ejemplares fueron identificados en 1983 (Rodríguez Babio y Navarro Tárrega 1983).

Las especies que han colonizado la laguna desde la ampliación del Estacio varían desde la típicamente mediterránea *P. nobilis*, hasta especies consideradas invasoras, incluyendo el bivalvo *Bursatella leachii* De Blainville, 1817 (Zenetos et al. 2004), o el cangrejo azul (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) (Gimenez-Casalduero et al. 2016). En pocos años, la nacra se convirtió en un componente importante del bentos (Belando et al. 2014) y una especie clave dentro de la laguna.

El Mar Menor ha sufrido en las últimas décadas una fuerte influencia antropogénica, debido principalmente a la expansión de la agricultura intensiva de regadío y del turismo. Tales actividades ocurren muy cerca de la laguna, y su intensificación ha generado muchos problemas ambientales, incluyendo una modificación de los flujos de agua y nutrientes (Esteve-Selma et al. 2016).

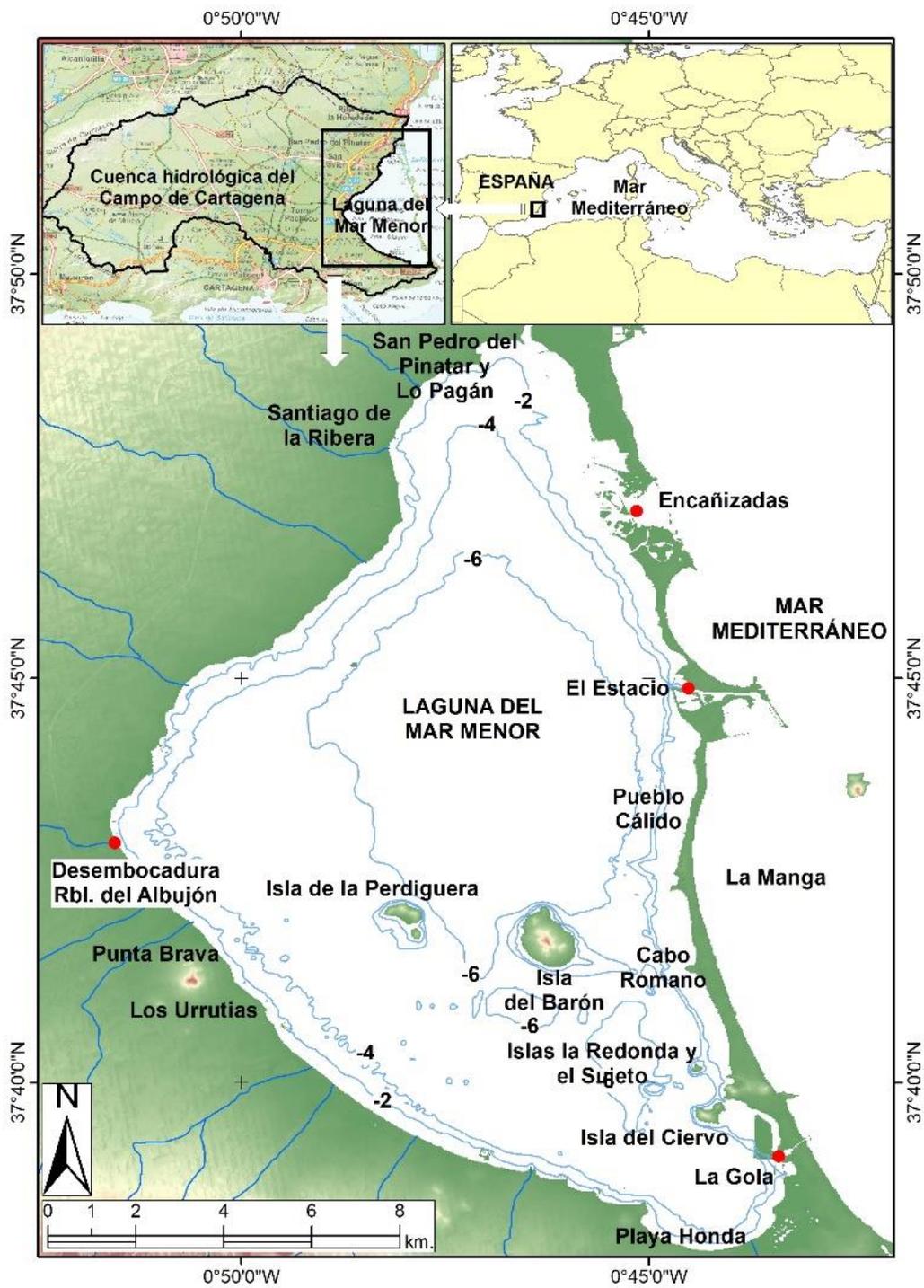


Figura 1.1: Localización de la laguna costera del Mar Menor. Fuente: BTN25 2006-2019 CC-BY 4.0 ign.es (datos administrativos); Datos derivados de MDT25 2015 CC-BY 4.0 ign.es; DGSCM (2009) (batimetría).

### 1.3.2 Periodos de estudio y fuentes de información sobre *P. nobilis*

En este estudio se han identificado tres periodos relacionados con la historia, colonización y declive de la población de *Pinna nobilis* en la laguna del Mar Menor. Para ello se han utilizado varias fuentes de información, concretamente para analizar los procesos de colonización y dispersión de *P. nobilis* en la laguna: (1) datos históricos correspondientes al periodo de entrada y dispersión de la especie 1983, 2005, procedentes de la bibliografía publicada (Rodríguez Babio y Navarro Tárrega 1983) y de la base de datos de Lugares de Importancia Comunitaria (LIC) de la Región de Murcia (CARM 2003); (2) un conjunto de datos integrado de 2013-2014, obtenidos de muestreos específicos realizados para el presente estudio (2013) y de datos publicados (Belando et al. 2014) y (3) datos obtenidos de muestreos y censos visuales entre 2017 y 2020 (Tabla 1.1).

**Tabla 1. 1** Detalles de las fuentes de información de los datos de *Pinna nobilis* utilizadas en este estudio.

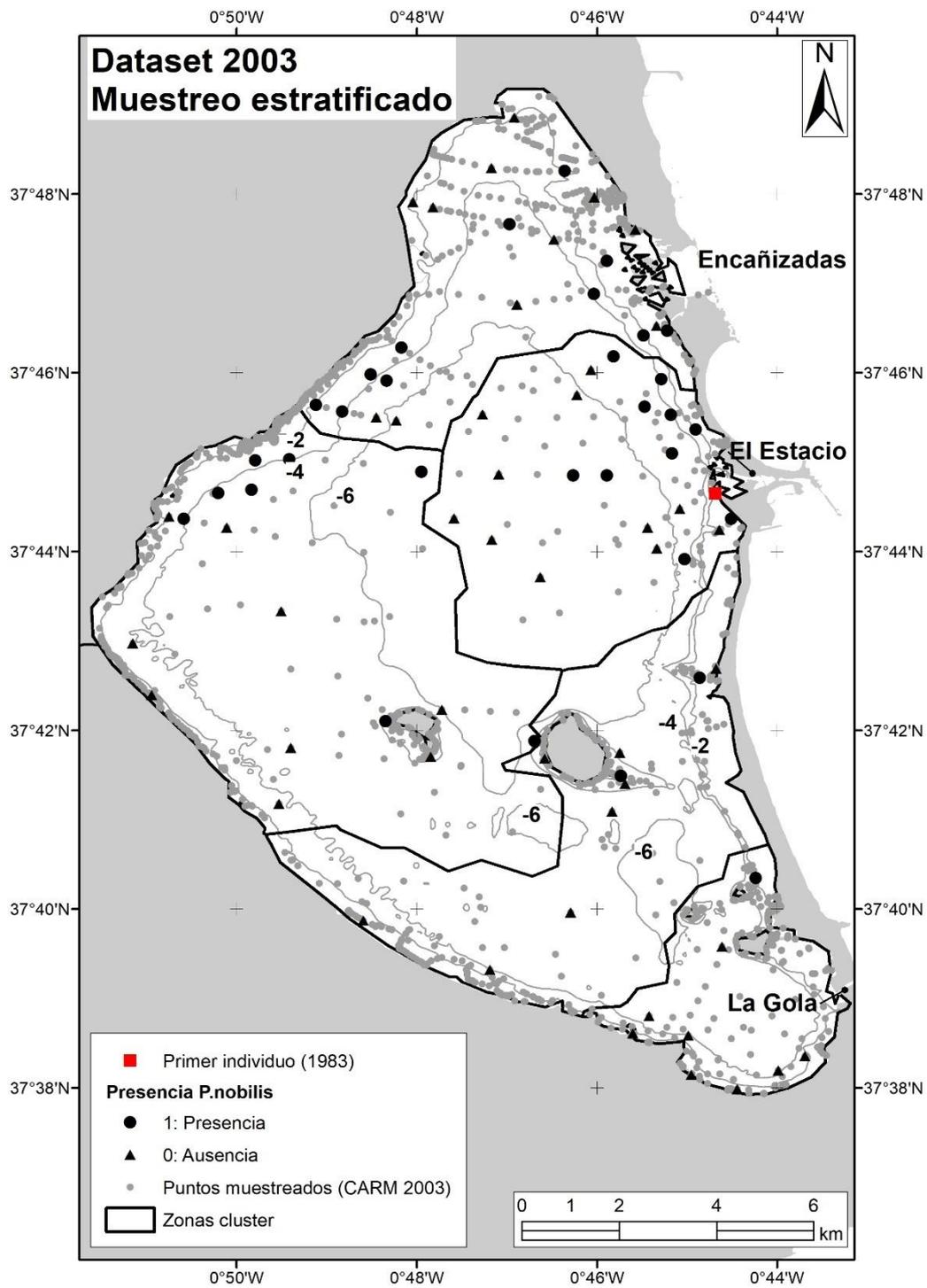
SERIE DE DATOS	CAMPAÑA (AÑO)	METODOLOGÍA	FUENTE	NÚMERO DE PUNTOS		
				Presencia	Ausencia	Total
Histórica	1983	Visual	Rodríguez Babio y Navarro Tárrega (1983)	1	0	1
Seguimiento Hábitat	2003-2004	Buceo Scuba; snorkel	CARM (2003)	34	49	83
		transectos; dron submarino				
Integrado 2013-2014	2013	Buceo Scuba; acuaplano;	Presente trabajo	31	29	60
		dron submarino				
	2014	Buceo Scuba	Belando et al. (2014)	21	36	57
Integrado 2017-2020	2017-2020	Buceo Scuba; snorkel	Presente trabajo	389	456	845

### 1.3.2.1 Periodo de colonización y dispersión. Estima de datos históricos (1983 y 2003-2004)

La localidad donde se registraron los primeros ejemplares de *P. nobilis* en 1983 se muestra en la Fig. 1.2-A (Rodríguez Babio y Navarro Tárrega 1983). Para caracterizar la distribución de la especie en 2003-2004, se utilizó la base de datos de la Zona de Protección Marina (ZPM) de la Región de Murcia (Fig.1.2-A). Esta base de datos incluye 1646 puntos de observación de presencia-ausencia muestreados durante 2003 y 2004; sin embargo, se trata de un conjunto de datos muy desequilibrado, con 34 observaciones de presencia y 1611 puntos de ausencia debido al tipo de muestreo realizado orientado al seguimiento de los hábitats lagunares. Los datos proceden de la base de datos de LIC marinos de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Para cartografiar las biocenosis se realizaron transectos de buceo con escafandra autónoma y snorkel y se registró la presencia de especies clave como caballitos de mar, agujas de mar o nacras (CARM 2003). Algunas biocenosis (como las zonas arenosas cercanas a la costa), con una presencia muy escasa de *P. nobilis*, fueron sobremuestreadas.

El uso de un conjunto de datos desequilibrado para entrenar un algoritmo de clasificación puede producir un sesgo hacia la clase más frecuente, lo que afecta negativamente al rendimiento del modelo (Krawczyk 2016).

Se puede obtener una alta especificidad, pero un bajo grado de sensibilidad, lo que afecta a los resultados a la hora de calcular la probabilidad de presencia. Kuhn y Johnson (2013) describieron varias estrategias para resolver este tipo de problemas al modelizar, y recomendaron una estrategia de selección basada en clústeres, con objeto de especificar puntos con condiciones ambientales similares, en función de las covariables de entrada. Para aplicar esta estrategia, en primer lugar, se realizó un filtrado basado en la distancia. Se eliminaron las observaciones, con una distancia inferior a 20 m entre sí (el conjunto de datos incluye 674 observaciones que tienen al menos un segundo punto a esta distancia). En segundo lugar, se realizó un muestreo estratificado descendente a esta distancia. Los estratos (5 áreas) se obtuvieron mediante un método de clusters jerárquico basado en Strauss y von Maltitz (2017): Distancia Manhattan para la disimilitud, método *de Wald* para la agregación (Gonçalves, 2019) y las mismas variables utilizadas para ajustar el modelo (Fig. 1.2-A). Dentro de cada estrato, se eliminó aleatoriamente un número de puntos proporcional al total de puntos que componían dicho estrato. Como resultado, se obtuvo un nuevo conjunto de datos con 84 puntos (35 presencias y 49 ausencias), Fig. 1.2-A. Con estos datos solamente se trabajó en observaciones de presencia - ausencia, sin tener en cuenta su abundancia.



**Figura 1.2:** Muestreo. (A) Datos de 2003 incluida la primera cita (Rodríguez Babio y Navarro Tárrega 1983, CARM 2003), incluidos todos los puntos, los puntos obtenidos por remuestreo y las 5 áreas de conglomerados utilizadas para el remuestreo, obtenidos mediante el método jerárquico basado en clusters.

### 1.3.2.2 Periodo pre-colapso poblacional. Conjunto integrado de datos de 2013-2014

Se realizaron seis muestreos durante un periodo de 8 meses, entre marzo y octubre de 2013 (Fig. 1. 3-A). La laguna se dividió en una cuadrícula de 49 cuadrados (Fig. 1. 3-A) con una resolución base de 2000 m para obtener la máxima cobertura espacial para caracterizar la presencia y distribución de la densidad del bivalvo. Se realizaron un total de 60 mediciones para evaluar la densidad de nacras. En concreto, se realizaron inmersiones con escafandra autónoma en 29 estaciones, y en cada una de ellas se estudiaron 3 transectos lineales (30 m de largo y 2 m de ancho). Se contaron todos los individuos observados en cada transecto. Además, se realizaron 25 mediciones de densidad usando un dron submarino, con el que se realizó un muestreo visual de 200 m de longitud por 2 m de ancho. Se contaron todos los ejemplares dentro de la zona del transecto.

Este muestreo se complementó con 2 transectos lineales utilizando un acuaplano sostenido por un submarinista. El primer transecto tenía 2007 m de longitud y el segundo 2633 m; ambos tenían 2 m de ancho en las zonas más profundas (Buckland et al. 2001). El buceador con el acuaplano fue arrastrado a una velocidad aproximada de  $0,5 \text{ m s}^{-1}$  a una profundidad de trabajo de 1-1,5 m sobre el fondo.

Como medida de seguridad, el buceador arrastraba una pequeña boya. La línea de seguimiento se georreferenció desde la embarcación mediante un GPS (Garmin e-Trex 20) y, cada minuto a lo largo de la línea, se midió la profundidad con una sonda portátil (Hondex PS7). Las horas de inicio y fin de la línea fueron registradas y sincronizadas entre el buceador y la embarcación. El buceador registró el número de ejemplares encontrados a lo largo del recorrido y el minuto de la observación. El primer recorrido se dividió en 11 transectos y el segundo en 14 transectos a una distancia aproximada de 175 m. Se estimó la densidad media de 3 transectos seleccionados al azar al principio, en medio y al final del recorrido. Así se obtuvieron 3 valores de densidad para cada línea de acuaplano. La posición de cada transecto se calculó cruzando el tiempo registrado por el muestreador con los datos de la derrota del buque.

Se incorporaron un total de 57 estaciones de muestreo de Belando et al. (2014). Según los autores, el muestreo se llevó a cabo mediante buceo con escafandra autónoma a lo largo de 3 transectos, cada uno de 200 m de largo y 2 m de ancho (Belando et al. 2014).

El conjunto de datos del muestreo de campo de 2013 y el conjunto de datos de 2014 se fusionaron y se utilizaron para ajustar un modelo de presencia-ausencia en la laguna. Tras comprobar la calidad de los puntos, se seleccionaron 117 con 65 ausencias y 52 presencias (Fig. 1. 3-C).

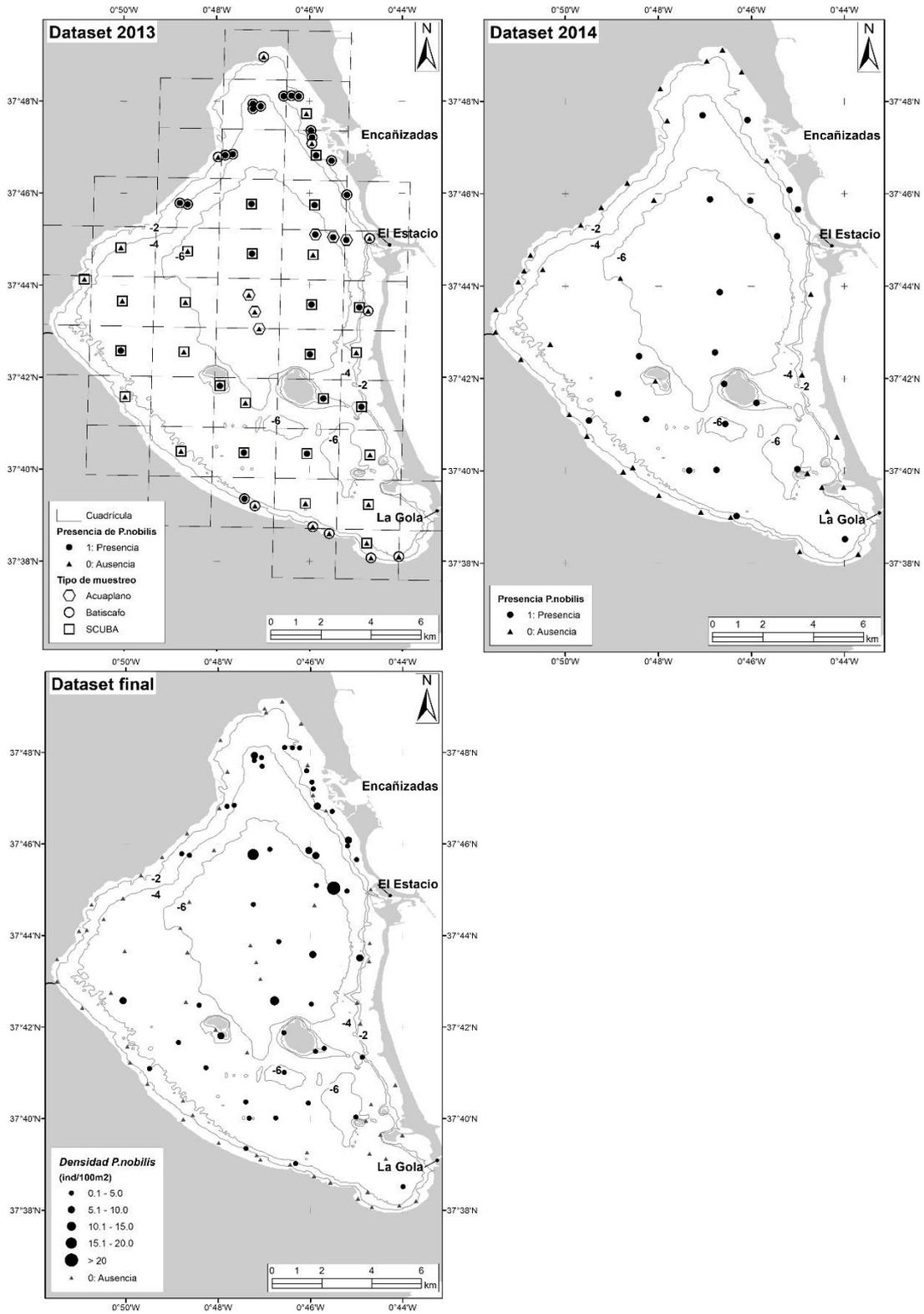


Figura 1.3: (A) Datos de 2013 (campaña específica realizada en este trabajo); (B) datos de 2014 de Belando et al. (2014); (C) conjunto integrado de datos de 2013-2014.

### 1.3.2.3 Periodo post colapso poblacional. Conjunto integrado de datos de 2017 a 2020

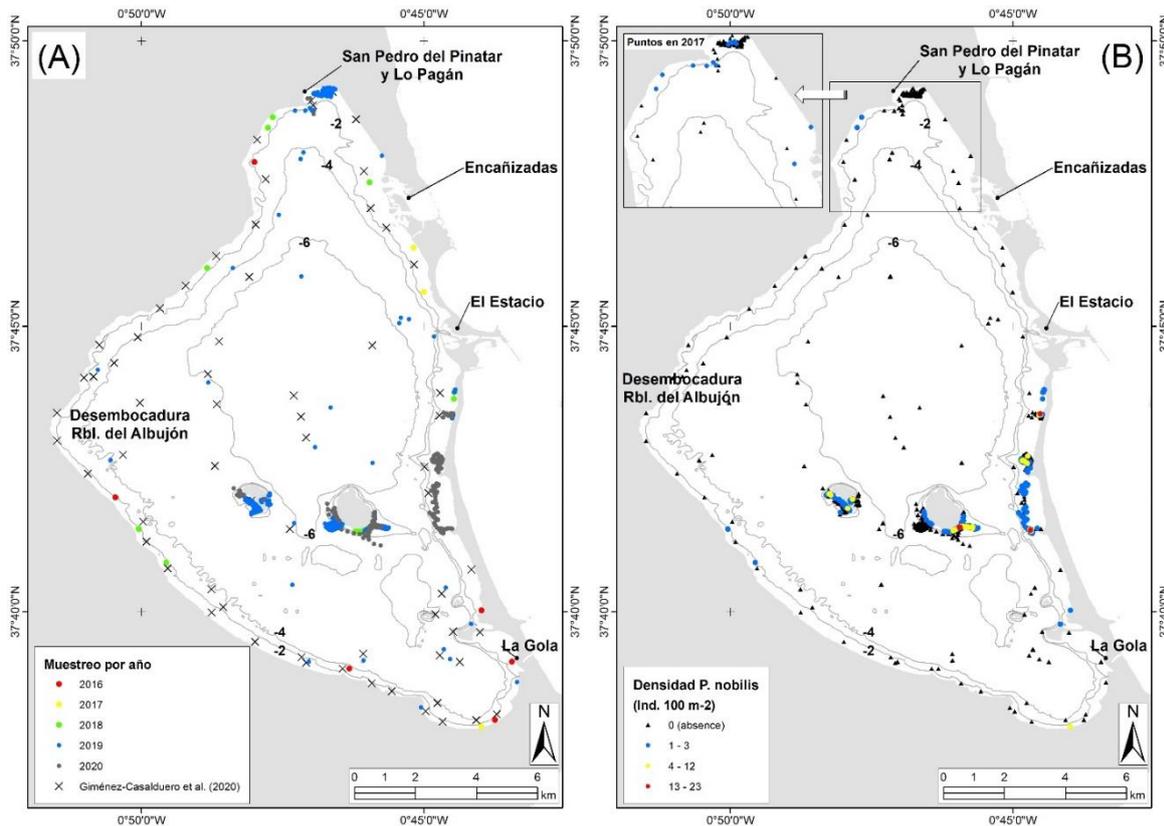
Tras constatar la muerte de toda la comunidad bentónica por debajo de los 3 m (Belando et al., 2014), se llevaron a cabo muestreos intensivos entre 0 y 3 m de profundidad.

Se recopilaron datos de 101 días de muestreo y 267 censos visuales entre 2017 y 2020 utilizando tres enfoques:

A) Se realizaron 82 transectos lineales (LT) en un rango de 0-3 m de profundidad (Katsanevakis, 2007), incluyendo la línea de costa de las islas principales El Barón, La Perdiguera y El Ciervo (Fig 1.1). Todos los ejemplares localizados a menos de 3 m de la línea fueron contados y georreferenciados. Los recorridos de los transectos fueron registrados por un Sistema de Posicionamiento Global (GPS GARMIN eTrex 20x y Montana 680t); B) Para estudiar la densidad y tamaño de la población de *P. nobilis*, se utilizó una metodología de transecto lineal modificado (MLT) (Siletic y Peharda, 2003); consistente en un transecto de 50 m de longitud y 3 m de ancho (área total por transecto de 150 m<sup>2</sup>). Se utilizaron un total de 121 MLT a diferentes profundidades en dos actividades complementarias: i) Se realizaron campañas complementarias entre 0 y 3 m dentro de una actividad de ciencia ciudadana para completar la información obtenida con los muestreos de LT. Se llevaron a cabo cuatro muestreos en tres localidades (San Pedro del Pinatar, La Ribera, Cabo Romano) con un total de 43 censos visuales. En cada censo se midieron los ejemplares encontrados según la metodología de Garcia-March y Ferrer (1995). Antes de la actividad de muestreo, se impartió una charla formativa a los participantes sobre la metodología a utilizar, por parte del personal especializado. ii) Se realizó un muestreo intensivo MLT (IS) en dos localidades (islas El Barón y La Perdiguera) para identificar nuevos ejemplares y analizar los cambios poblacionales de *P. nobilis* en profundidad y tamaño. Dos submarinistas con escafandra autónoma realizaron un total de 78 transectos lineales y submarinos perpendiculares a la costa, contando los ejemplares vivos y muertos dentro de cada cuadrante con observaciones visuales directas entre 2,5 y 6 m de profundidad. Se contaron la densidad y el tamaño de los ejemplares vivos y muertos. Para cada individuo se registró la longitud máxima de la concha (Garcia-March y Ferrer, 1995); C) Para completar la información espacial de las ausencias de *P. nobilis*, se añadieron 64 puntos muestreados en las campañas de 2013-2014 tras comprobar que *P. nobilis* seguía ausente.

Una vez obtenidas las localizaciones mediante los métodos anteriores, los datos procesados se añadieron a celdas regulares de 10 x 10 m, obteniendo como resultado recuentos de *P. nobilis* cada 100 m<sup>2</sup>. El resultado fue un número de registros de presencia por unidad de superficie como medida de abundancia y no de probabilidad (Renner et al., 2015). Este conjunto de datos

final se utilizó para calibrar y validar los SDM (Fig. 1.4), computando un total de 845 puntos, 389 con presencia de *P. nobilis* y 456 de ausencia, y un valor máximo de abundancia de 23 individuos por 100 m<sup>2</sup> en la isla de El Barón. No obstante, para estudiar la evolución de 2017 a 2020, se han incluido los puntos de presencia en Lo Pagán (9 puntos) y Las Encañizadas (2 puntos) (zoom en la Fig. 1.4, cuyos individuos habían desaparecido en 2020).



**Figura 1.4:** (A) Distribución espacial de los puntos de muestreo y (B) conjunto de datos final obtenido como resultado de su procesamiento. El mapa ampliado incluye la presencia de *P. nobilis* en 2017 en Lo Pagán y Las Encañizadas que desapareció en 2020.

Se tomaron medidas de talla de la longitud anteroposterior fuera del sustrato (*H<sub>s</sub>*). La altura total de la concha (*H<sub>t</sub>*) se estimó a partir de la anchura máxima de las valvas (*l<sub>c</sub>*) utilizando la siguiente ecuación (García-March y Ferrer, 1995):

$$H_t = 1.79 \cdot l_c + 0.5 \pm 0.2$$

Se realizó un recuento adicional de los ejemplares muertos, incluyendo el tamaño de la concha.

La distribución de frecuencias de la densidad para la clase de tamaño y la profundidad se estudió utilizando su asimetría y curtosis (Espinosa, 2009). Las diferencias en la distribución de tallas y densidad entre individuos vivos y muertos se comprobaron con un *t-test* (nivel de significación

= 0,05), basada en una tabla de contingencia de las clases de talla y los tipos de hábitat (Zar, 2009). El resumen y el análisis estadístico se realizaron con el programa informático PAST (Hammer et al., 2001).

### 1.3.3 Selección de variables ambientales determinantes en la distribución de *P. nobilis*

#### 1.3.3.1 Descripción de variables ambientales y fuentes de información en los periodos de colonización, dispersión y pre-colapso poblacional

De forma preliminar, se identificaron once variables ambientales distribuidas espacialmente que *a priori* podrían determinar la dispersión de la especie dentro de la laguna. Para las variables obtenidas a partir de datos puntuales (granulometría del sedimento, contenido en materia orgánica, salinidad y profundidad), se estimaron superficies de interpolación mediante *ordinary kriging* (OK) y semivariogramas direccionales, o un semivariograma omnidireccional en caso de no encontrar diferencias significativas entre los semivariogramas direccionales. Utilizamos el paquete *R 'automap'* (Hiemstra et al. 2009), que permite la automatización de una estimación óptima por mínimos cuadrados ponderados de los parámetros del semivariograma utilizando el algoritmo de Gauss-Newton (Bruno, 1988).

Para caracterizar el sedimento durante la campaña de 2013, se recogieron 2 cores (de 5 cm de diámetro y 20 cm de longitud) por cuadrado en la zona de muestreo (Fig. 1.3A). El análisis granulométrico se realizó manualmente en una columna de tamices según la escala granulométrica de Wentworth, y la materia orgánica del sedimento se determinó mediante el método de Walkley y Black (Buchanan 1984). Las variables fisicoquímicas de la columna de agua (temperatura y salinidad) se tomaron en el epicentro de cada cuadrado (Figura 1.3A) utilizando un sensor CTD simultáneamente con las campañas de densidad.

A continuación se describen las variables con sus fuentes y métodos de procesamiento: (1) DEPTH: profundidad, obtenida a partir de las curvas batimétricas y puntos de profundidad disponibles en los estudios ecocartográficos de la Dirección General de Sostenibilidad de la Costa y el Mar (MITECO 2009); (2) DSH: distancia a la costa; los cuatro siguientes corresponden con la distancia a los canales que conectan la laguna y el Mar Mediterráneo y a la desembocadura de la rambla del Albuñón como principal fuente de entrada de agua dulce y nutrientes, todas medidas en metros (m) (Fig. 1); (3) DEST: distancia a Canal del Estacio; (4) DENC: distancia a Canal de las Encañizadas; (5) DMAR: distancia a Canal de Marchamalo; (6) DALB: distancia a la desembocadura de la Rambla del Albuñón; (7) SILT: porcentaje de limo (diámetro < 0,063 mm),

(8) SAND: porcentaje de arena ( $1 \geq \text{diámetro} \geq 0.063 \text{ mm}$ ), (9) GRAV: porcentaje de grava (diámetro  $>1 \text{ mm}$ ); (10) MO: materia orgánica; (11) SAL: salinidad interpolada *con* Kriging ordinario a partir de datos recopilados previamente (González-Wangüemert et al. 2006, 2009). Además, las coordenadas x e y (XCOORD e YCOORD) también se utilizaron como predictores como una alternativa sencilla para indicar tendencias en el espacio geográfico (Evans et al. 2011), proximidad y conexión geográfica entre observaciones (Hengl et al. 2018).

### **1.3.3.2. Descripción de variables ambientales y fuentes de información en el periodo post-colapso poblacional**

Inicialmente se consideraron 11 variables ambientales con información de distribución espacial determinante para la presencia potencial de supervivientes post colapso poblacional. Se incluyeron seis variables auxiliares estáticas en el tiempo, todas ellas medidas en metros (m): (1) DSH: Distancia a la costa; (2) DEPTH: Profundidad, variable obtenida por interpolación espacial (Kriging Ordinario, como en el periodo anterior) a partir de curvas batimétricas y puntos de profundidad disponibles en los estudios ecocartográficos (DGSCM, 2009); (3) DEST: Distancia al canal del Estacio ; (4) DENC: Distancia al canal de Las Encañizadas; (5) DMAR: Distancia al canal de Marchamalo; (6) DALB: Distancia a la desembocadura de la Rambla del Albuñón.

Se promediaron cinco variables dinámicas para el periodo 2017 y 2020: (7) CHL: concentración de clorofila ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ); (8) TURB: turbidez (Turbidez nefelométrica - NTU); (9) O: oxígeno disuelto ( $\text{ml}/\text{l}$ ); (10) SAL: salinidad (ups) y (11) TEMP: temperatura del mar ( $^{\circ}\text{C}$ ). Estas variables con información espacial se obtuvieron del nivel L2 de la UPCT (2022).

### **1.3.4. Marco conceptual para la Modelización espacial de Distribución de Especies (SDMs)**

Los Modelos de Distribución de Especies (SDMs) son modelos estadísticos de las relaciones especie-ambiente basados en la localización de las especies y las medidas de las variables ambientales que limitan su distribución (Elith y Franklin, 2017) para explicar los patrones observados. Los SDM se utilizan cada vez más en el medio marino; Guillaumot et al. (2021) y Robinson et al. (2017) realizaron amplias revisiones y evaluaciones de varios de estos métodos cuando se aplican al medio marino. Martin et al. (2014) lo aplican a hábitats de coralígeno y maërl en la cuenca mediterránea; y Lauria et al. (2017) para investigar la distribución de dos octocorales en peligro crítico en el Mediterráneo central. Proponen un modelo de hábitat preferente (también conocido como modelo delta) basado en Modelos Aditivos Generalizados

(GAM) de dos partes: un modelo de ocurrencia que utiliza datos de presencia-ausencia (familia binomial) y un modelo de solo presencia que utiliza una distribución gaussiana; el modelo de hábitat preferente final se obtuvo multiplicando las predicciones de ambos modelos. Más recientemente, los SDM se han utilizado para evaluar el impacto del cambio climático en las especies marinas (Allyn et al., 2020; Roberts et al., 2022).

#### 1.3.4.1 Modelos de clasificación y regresión para los datos históricos (2003 y 2004) y el conjunto de datos integrados de 2013-2014. Validación de los modelos

Se utilizó un modelo random forest (RF) (Breiman 2001) para obtener la probabilidad de presencia de *P. nobilis* en cada periodo y determinar el área de presencia potencial. Este modelo se seleccionó de entre 4 métodos de clasificación que se probaron previamente para identificar el más preciso (F. Gomariz-Castillo, F. Giménez- Casalduero y F. Alonso-Sarría, datos inéditos): modelos lineales generalizados, máquinas de vectores soporte y regression-kriging (RK). Estos métodos para la selección de variables se implementaron en el paquete R 'caret' (Kuhn 2015) y están descritos en su totalidad por Hastie et al. (2009) y James et al. (2013). Tal y como proponen Lauria et al. (2017), la abundancia (densidad de individuos) se predijo solo en zonas de alta probabilidad de presencia que se estimaron previamente con los mismos métodos.

RF es un algoritmo no paramétrico que construye un conjunto de árboles de decisión. Cada árbol se calibra utilizando una submuestra de casos obtenidos mediante *boot strapping* (Dahlke et al., 2009). Además, las características para realizar cada división se seleccionan a partir de una submuestra aleatoria de todo el conjunto de características. Cuando todos los árboles han sido entrenados, pero no podados, cada nuevo caso es analizado por todos los árboles, y la predicción final se obtiene como el resultado más frecuente (clasificación) o promediando los resultados (regresión). RF utiliza 2 parámetros: (1) número de árboles ( $n_{tree}$ ); utilizamos el valor por defecto (500) ya que el algoritmo no es muy sensible a este parámetro (Liaw y Wiener 2002); y (2) número de características muestreadas aleatoriamente en cada división ( $m_{try}$ ). Este último parámetro se calibró para maximizar el área bajo la curva *receiver operating characteristic* (ROC) (AUC) en la clasificación y minimizar el error cuadrático medio (RMSE) en la regresión (Mandrekar, 2010). También proporciona una medida de la importancia de las variables que refleja el aumento de la precisión que producen en el modelo.

Para el conjunto de datos de 2013-2014, se utilizó random forest regression-Kriging (RFRK), que incluye un componente global y otro local. RK (Hengl et al. 2004) es una técnica de predicción espacial que combina una regresión de la variable dependiente sobre variables auxiliares

(componente global) con una interpolación ordinary kriging (OK) de los residuos de la regresión (componente local).

Los modelos se calibraron mediante una estrategia de validación cruzada de k-block (k-block-CV) (Dabbs y Junkers, 2016). Este método permite evitar la sobreestimación de la precisión debida a la dependencia espacial entre los datos de entrenamiento y los de validación. Los bloques y los pliegues en k-fold-CV son similares; la diferencia fundamental es que estos últimos se muestrean aleatoriamente, y los primeros corresponden a subconjuntos espaciales. El tamaño de dichos bloques se define tras un análisis de autocorrelación de los datos de estudio. Esta metodología fue propuesta por Valavi et al. (2019) y se implementa en el paquete R 'block CV'. El estudio de los semivariogramas reveló que la distancia por encima de la cual se puede considerar que no existe autocorrelación espacial es de 6000 m, por este motivo, se generaron  $k = 6$  bloques, distribuidos en 9 celdas espaciales. Para validar los modelos de presencia-ausencia se utilizaron el AUC (Fielding y Bell 1997), la precisión global (Acc) y la kappa (Cohen 1960). El valor umbral de probabilidad para decidir si la especie estaba presente se calculó mediante el método de Youden (1950), que intenta maximizar tanto la especificidad como la sensibilidad. El RMSE se utilizó para validar los modelos de abundancia. El AUC y el RMSE se estimaron mediante intervalos de confianza y los resultados se utilizaron para comparar y seleccionar el mejor modelo.

#### **1.3.4.2 Marco de modelización para el conjunto de datos integrados de 2017-2020**

El marco de modelización utilizado para el análisis de este periodo consiste en un SDM de dos etapas en el que primero se estima la presencia/ausencia con un modelo de clasificación binomial y la optimización del primer umbral de probabilidad para dividir presencia y ausencia basado en el método del índice de Youden (Fluss et al., 2005). A continuación, se modela la densidad (mediante modelo de regresión) dentro del área de presencia identificada con el anterior. Este tipo de método ha sido utilizado con buenos resultados por autores como Lauria et al. (2017) o Allyn et al. (2020), quienes destacan dos ventajas: a) el enfoque en dos etapas se acomoda a situaciones en las que el número de observaciones de ausencia excede las esperadas de las distribuciones tradicionales de "conteo", obteniendo un mejor ajuste y b) en el caso del marco propuesto, no requiere supuestos *a priori* y puede reproducir relaciones no lineales. La metodología descrita se implementó con el software R (R Core Team, 2022). Este enfoque permite obtener tanto la probabilidad de ocurrencia como la densidad al mismo tiempo, así como los efectos de los predictores.

### 1.3.4.3. Modelos de clasificación y regresión para el conjunto de datos integrados de 2017-2020. Validación de los modelos

Tanto los SDM de presencia/ausencia como los de densidad se obtuvieron utilizando Random Forest Regression-Kriging (RFRK), de forma similar a Hengl et al. (2007), tal y como se ha procedido con el conjunto de datos integrados de 2013-2014. De este modo, es posible integrar los efectos globales de los predictores sobre la distribución espacial de la variable con efectos locales autocorrelacionados. En este caso, de los dos parámetros utilizados por RF (Breiman, 2001) se duplicó el valor por defecto en  $nTree=1000$ , y  $mtry$  se calibró para maximizar el AUC en clasificación y minimizar el RMSE en regresión, siguiendo el esquema de validación cruzada (LLO-CV) expuesto en la subsección 2.4.1. RF tiene varias ventajas: es un método no paramétrico y no lineal que produce resultados más precisos que otros métodos de clasificación-regresión, incluso cuando la mayoría de las características generan ruido, es menos propenso que otros al sobreajuste, dando más capacidad de generalización. Además, proporciona una métrica de la importancia de los predictores basada en las diferencias de precisión cuando un predictor se incluye o no en el modelo (Gomariz-Castillo et al., 2017).

La validación cruzada estándar fuera de la muestra puede ser demasiado optimista si los datos no son espacialmente independientes, lo que potencialmente conduce a modelos que se ajustan en exceso a la estructura local de los datos y a una interpretación errónea, una visión demasiado optimista de los modelos resultantes (Meyer et al., 2018; Roberts et al., 2017). Para resolver este problema se pueden utilizar técnicas de re-muestreo por bloques. En este trabajo se ha utilizado una estrategia de muestreo cruzado de validación de bloques espaciales (LOO-BUF-CV) implementada en Valavi et al. (2019), utilizada en el medio marino por Smith et al. (2021) entre otros. Este enfoque es similar a la validación cruzada *leave-one-out* (LOO-CV), donde el número de pliegues es igual al número de instancias del conjunto de datos, utilizando en cada iteración un único punto para validar el modelo y el resto de instancias para calibrarlo; da como resultado una estimación fiable y no sesgada del rendimiento del modelo (Hastie et al., 2009). La diferencia con respecto a LOO-CV es que LOO-BUF-CV genera datos de entrenamiento y de prueba separados espacialmente considerando buffers circulares de radio especificado alrededor de cada punto de observación, y no utilizando los puntos más cercanos al punto de validación como conjunto de entrenamiento. De esta forma aumenta la independencia en la validación cruzada. Para este conjunto de datos se utilizó un radio de 500 metros, tanto para validar los modelos como para seleccionar las covariables. Para validar los modelos de presencia/ausencia, se utilizó la función AUC, la precisión global (Acc) y el índice kappa. El valor umbral de probabilidad para decidir si la especie está o no presente se calculó mediante el método de Youden, que trata de

maximizar tanto la especificidad como la sensibilidad. Para validar los modelos de abundancia, utilizamos el RMSE, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la eficiencia de Kling-Gupta (KGE) (Gupta et al., 2009). Este último es quizás el menos conocido en este tipo de estudios, se interpreta de forma muy similar a  $R^2$  (oscila entre  $-\infty$  y 1) y resume correlación, sesgo y variabilidad en un único índice, solventando algunas deficiencias de  $R^2$  (Ruiz-Álvarez et al., 2021).

### 1.3.5 Selección de Variables

#### 1.3.5.1 Selección de variables ambientales en los periodos de colonización, dispersión y pre-colapso poblacional

Aunque la Random Forest es un procedimiento robusto frente a predictores no informativos o redundantes, tales características pueden aumentar la incertidumbre, reducir la eficacia general del modelo (Kuhn y Johnson 2013), aumentar la dificultad de interpretación e impactar negativamente en la estimación de parámetros. Existen dos enfoques básicos para la selección de características: filtrado y envoltura.

El filtrado es un enfoque previo a la modelización, en el que se calcula una medida de importancia y se eliminan las características que no alcanzan un valor adecuado. En este caso, utilizamos el filtrado para evitar la multicolinealidad. En este estudio, la multicolinealidad se analizó estimando un índice de correlación global obtenido promediando los valores absolutos de las columnas de la matriz de correlaciones (Kuhn y Johnson 2013).

Los métodos de ajuste eliminan características mientras calibran el modelo con el fin de seleccionar el conjunto de características que maximiza la precisión del modelo. La mayoría de los métodos de envoltura añaden o eliminan características una a una. En la eliminación recursiva de características (RFE) (Guyon et al. 2002), las características se eliminan en subconjuntos por razones de eficiencia. Se calibra un modelo, y la importancia de las características utilizadas para su calibración se estima utilizando RF. A continuación, se eliminan todas las características cuya importancia esté por debajo de un umbral determinado y se vuelve a empezar el proceso hasta que todas las características del modelo se consideren suficientemente importantes. La RFE se aplicó utilizando el esquema de validación cruzada descrito anteriormente. En la RFE, el modelo se calibra utilizando todas las características, luego se calcula la bondad de ajuste del modelo (utilizando AUC para la clasificación y RMSE para la regresión) y la importancia de las características; a continuación, el modelo se vuelve a calcular sólo con las características más importantes; estos procesos se repiten recursivamente hasta que

se obtiene el número mínimo de variables que maximizan la bondad de ajuste. La metodología descrita se implementó con el software R (R Core Team 2018), un programa de análisis de datos de código abierto, que permite la reproducibilidad a otras áreas de estudio y conjuntos de datos.

#### **1.3.5.2. Selección de variables ambientales en el periodo post-colapso 2017-2020**

El número de predictores en los SDM se redujo utilizando dos enfoques complementarios: Se realizó una evaluación general de la multicolinealidad entre predictores mediante el factor de inflación de la varianza (VIF). Primero se estimó el VIF de cada una de las 11 variables frente al resto y se eliminó la variable con el valor más alto; este proceso se repitió iterativamente hasta que el VIF de todas las variables restantes fuera inferior a 5 (Kutner et al., 2005). Además, en el proceso de estimación de cada SDM, se realizó una selección de predictores utilizando una selección de características hacia adelante (forward feature selection, ffs) (Meyer et al., 2019) para mejorar el rendimiento de los modelos de aprendizaje automático espacial. Esta estrategia se basa en el uso de la validación cruzada Leave-Location-Out (LLO-CV). El proceso comienza estimando todos los posibles modelos de dos predictores para seleccionar el más preciso según una LLO-CV de K=10 pliegues (área bajo la curva característica de funcionamiento del receptor - AUC- para modelos de presencia-ausencia y error cuadrático medio -RMSE- en modelos de regresión). A continuación, se prueban todos los modelos de tres predictores que incluyen los dos seleccionados previamente, quedándose con el más preciso. El proceso continúa de forma iterativa hasta que se detiene si ninguna de las variables restantes aumenta significativamente la precisión con respecto al modelo actual.

## 1.4 RESULTADOS

### 1.4.1. Caracterización de la población en los periodos de dispersión y pre-colapso (2003-2004 y 2013-2014)

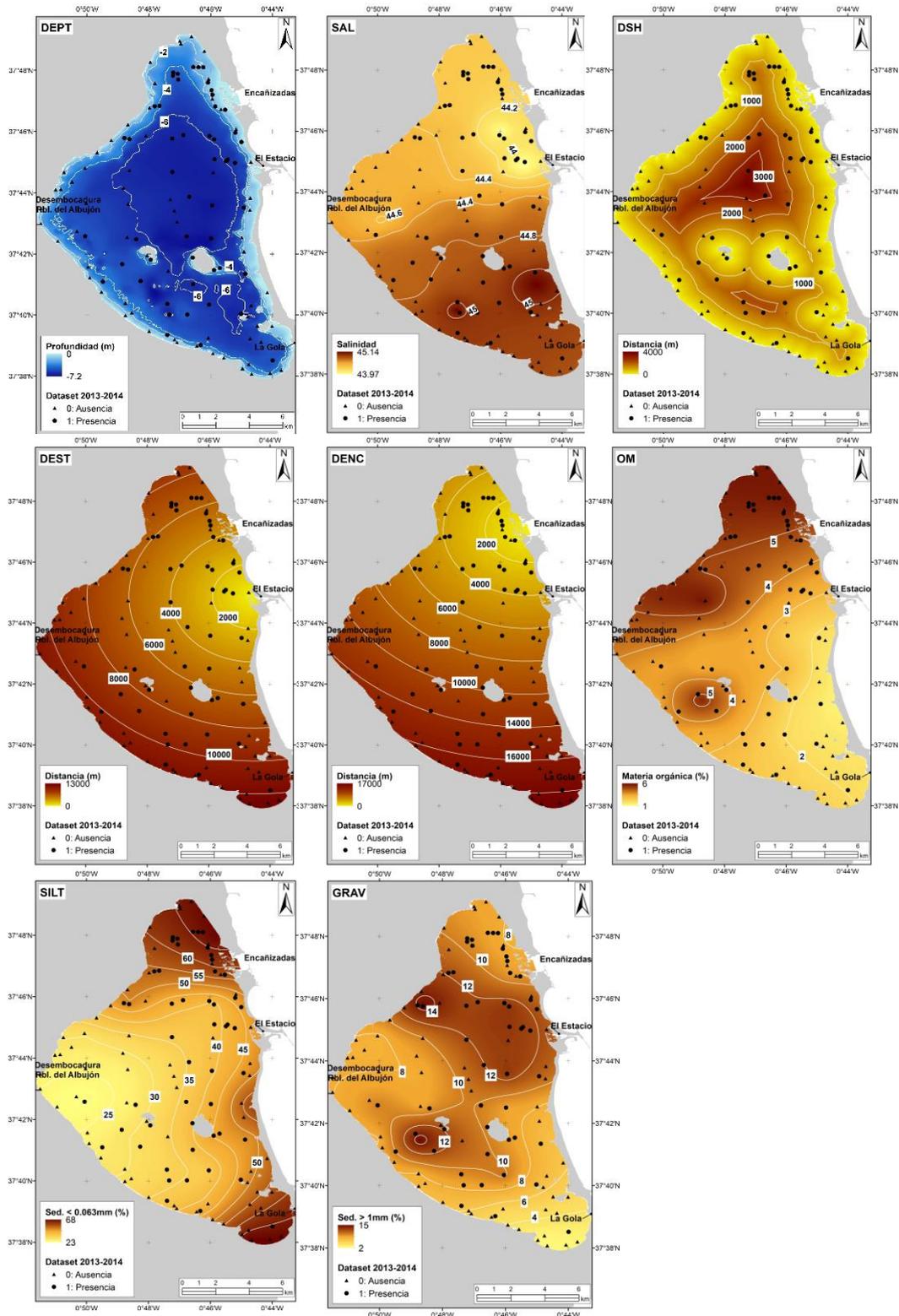
#### 1.4.1.1. Evaluación global de los modelos

El modelo seleccionado para generar las superficies de distribución estimadas fue RF, con el conjunto de variables reducido (tras VIF y RFE) para los conjuntos de datos de presencia-ausencia, y RFRK para el conjunto de datos de densidad de 2013-2014. En los modelos de presencia-ausencia, se alcanzó una precisión muy alta para la calibración (precisión = 100%, AUC = 0,99); los valores de k-fold-CV fueron altos, con AUC =  $0,845 \pm 0,033$  (media  $\pm$  SE) en el conjunto de datos de 2003-2004 y AUC =  $0,85 \pm 0,025$  en el conjunto de datos de 2013-2014. En el modelo de densidad, se obtuvieron valores de RMSE = 1,755 y  $r^2 = 0,798$  en la calibración; sin embargo, la precisión en k-fold-CV se redujo a  $r^2 = 0,162 \pm 0,015$  (media  $\pm$  SE) y RMSE = 2,574. Este valor de RMSE sigue siendo relativamente bajo.

#### 1.4.1.2. Selección de variables y efectos de los predictores en los modelos seleccionados

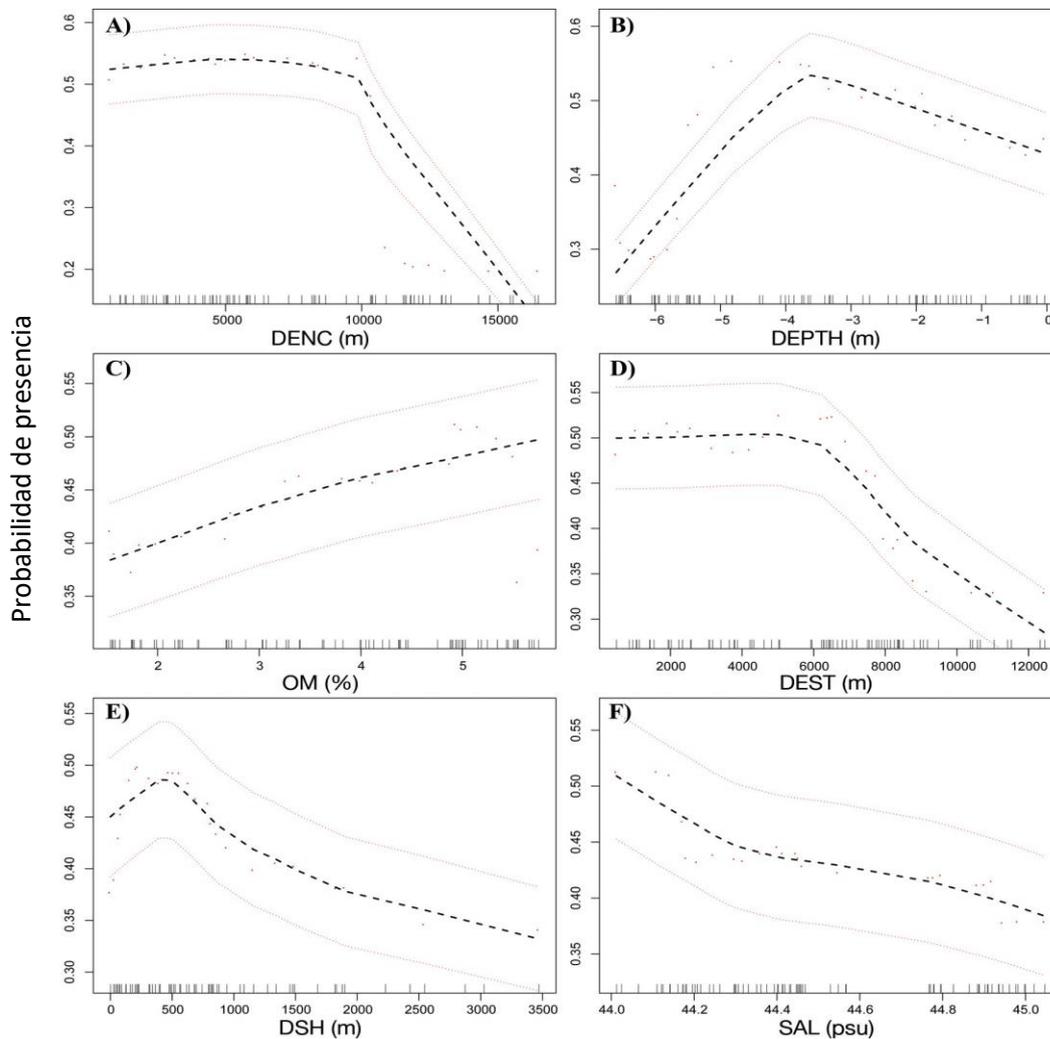
Utilizando un enfoque de filtrado para eliminar la multicolinealidad de las variables en el periodo pre-colapso poblacional, se seleccionaron 8 de las 13 covariables iniciales (Fig. 5). DMAR, SAND, DALB, XCOOR e YCOOR con valores VIF superiores a 0,9 fueron eliminadas del modelo. Cabe destacar la fuerte correlación negativa entre DMAR y SAL (Fig. 5B) ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,8$ ) y la correlación positiva entre DMAR y OM (Fig. 5F) ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,92$ ) y entre DMAR y YCOOR ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,93$ ). 93); SAND estaba altamente correlacionado con SILT (Fig. 5G) ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,98$ ) y DALB ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,84$ ); DALB estaba altamente correlacionado con SILT (Fig. 5G) ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,88$ ) y SAND ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,84$ ). La Fig. 5 muestra la superficie interpolada de las 8 covariables incluidas.

En los modelos de presencia-ausencia para 2003-2004 y 2013-2014, y el modelo de densidad para 2013-2014, se seleccionaron 8 variables independientes para explicar la distribución espacial de *Pinna nobilis*. Las variables más importantes (factores más relevantes) para explicar el patrón de distribución fueron, en general, las distancias a las conexiones con el Mediterráneo (principalmente DENC y en menor medida DEST) y la profundidad (DEPTH); en el conjunto de datos de 2013-2014, GRAV fue la variable más importante en la distribución de *P. nobilis*.



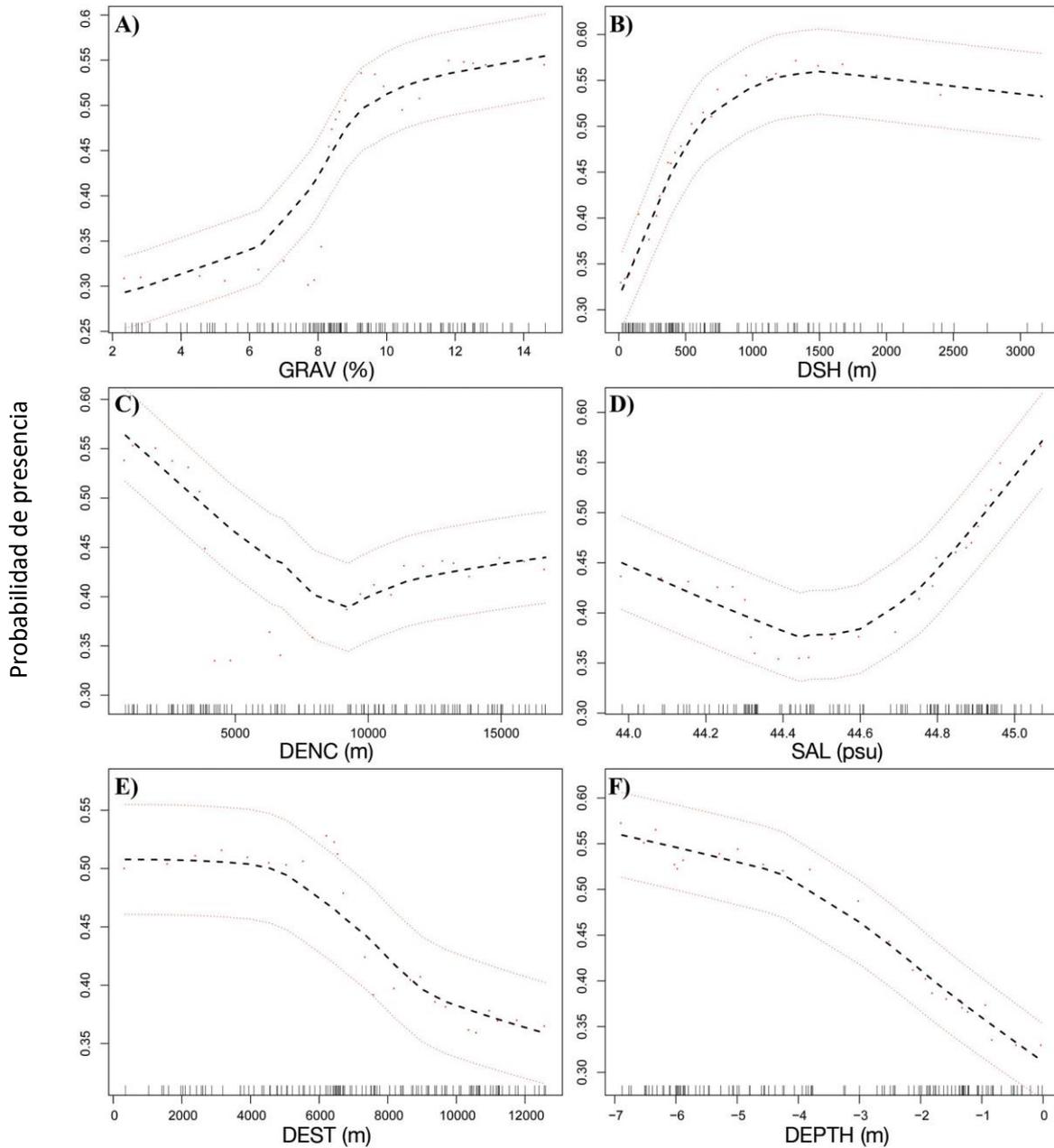
**Figura 1. 5:** Variables ambientales utilizadas como predictores en los modelos. Se incluyen las 8 variables seleccionadas tras el filtrado de multicolinealidad. (A) DEPTH: profundidad obtenida a partir de curvas batimétricas y puntos de profundidad; (B) SAL: salinidad; (C) DSH: distancia a la costa; (D) DEST: distancia al canal del Estacio; (E) DENC: distancia al canal de las Encañizadas; (F) OM: materia orgánica; (G) SILT: porcentaje de limo; (H) GRAV: porcentaje de grava. Los detalles de las variables figuran en la sección 2.3.1.

La Figura 1.6 muestra los efectos de los predictores sobre la probabilidad de presencia de *P. nobilis* para el conjunto de datos 2003-2004 desde el predictor más importante hasta el menos importante para este periodo. Los 4 más relevantes son DENC, DEPTH, OM y DEST, es decir, las distancias a los puntos de entrada de colonización, profundidad y materia orgánica.



**Figura 1.6:** Efectos de los predictores en el modelo presencia-absencia de random forest con las variables seleccionadas por eliminación recursiva de características (RFE), 2003-2004. Las variables están ordenadas de mayor a menor importancia en el modelo. El resto de las variables no se consideran relevantes. La línea negra discontinua representa el efecto estimado, las líneas rojas discontinuas los intervalos de confianza del 95 % y los puntos rojos indican los valores parciales de los valores observados. (A) DENC: distancia al canal de las Encañizadas; (B) DEPTH: profundidad obtenida a partir de curvas batimétricas y puntos de profundidad; (C) OM: materia orgánica; (E) DSH: distancia a la costa; (F) SAL: salinidad; (D) DEST: distancia al canal del Estacio. Los detalles de las variables figuran en la sección 2.3.1

Para DENC y DEST, se observa un valor algo estable, con probabilidades de aparición de alrededor de 0,5 hasta una distancia de 10000 m para DENC y 6000 m para DEST; para distancias mayores, la probabilidad disminuye.



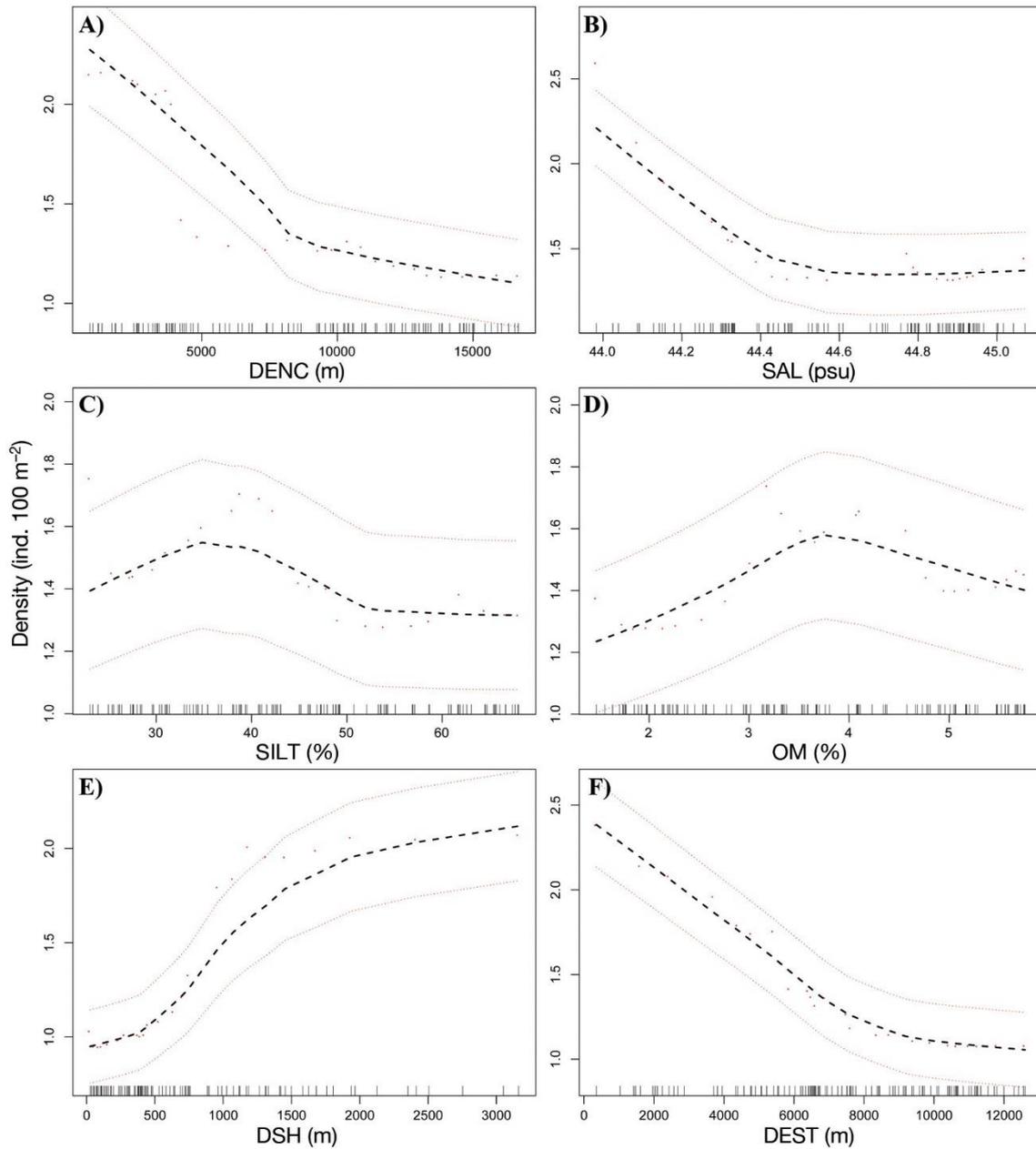
**Figura 1.7:** Efectos de los predictores en el modelo presencia-ausencia de random forest con las variables seleccionadas por eliminación recursiva de características (RFE), 2013-2014. Las variables están ordenadas de mayor a menor importancia en el modelo. El resto de las variables no se consideran relevantes. La línea negra discontinua representa el efecto estimado, las líneas rojas discontinuas los intervalos de confianza del 95 % y los puntos rojos indican los valores parciales de los valores observados. (A)GRAV: porcentaje de grava; (B) DSH: distancia a la costa; (C) DENC: distancia al canal de las Encañizadas;(D) SAL: Salinidad; (E) DEST: distancia al canal del Estacio; (F) DEPTH: profundidad obtenida a partir de curvas batimétricas y puntos de profundidad. Los detalles de las variables figuran en la sección 2.3.1

En cuanto a la profundidad (DEPTH), se observa un aumento más o menos lineal de la probabilidad de aparición desde los puntos más profundos hasta una profundidad de 3,75 m, donde se alcanza la máxima probabilidad, tras lo cual se observa un punto de inflexión.

El comportamiento de esta curva parece estar relacionado con una preferencia por zonas poco profundas enmascarada por la presión costera antropogénica. Para el MO, se observa un aumento de la probabilidad de encontrar el bivalvo cuando la concentración de MO alcanza valores > 5%. Para DSH, se observa una preferencia máxima a una distancia de aproximadamente 500 m, un resultado coherente con el encontrado para la profundidad óptima. La SAL en el periodo 2003-2004 osciló entre 44 y 45 ups, y la probabilidad de presencia de nacra disminuyó al aumentar la salinidad (González-Wangüemert et al. 2009).

El mismo resultado se observa en relación con el DEST, que crea una zona tampón de alta probabilidad de encuentro en los primeros 5000 m desde el punto de conexión. En relación con la PROFUNDIDAD, la probabilidad de presencia de *P. nobilis* fue mayor por debajo de los 3 m de profundidad. El patrón en relación con la SAL muestra una mayor probabilidad de aparición en zonas de mayor salinidad dentro del rango que caracteriza a la laguna, aunque las diferencias son sutiles.

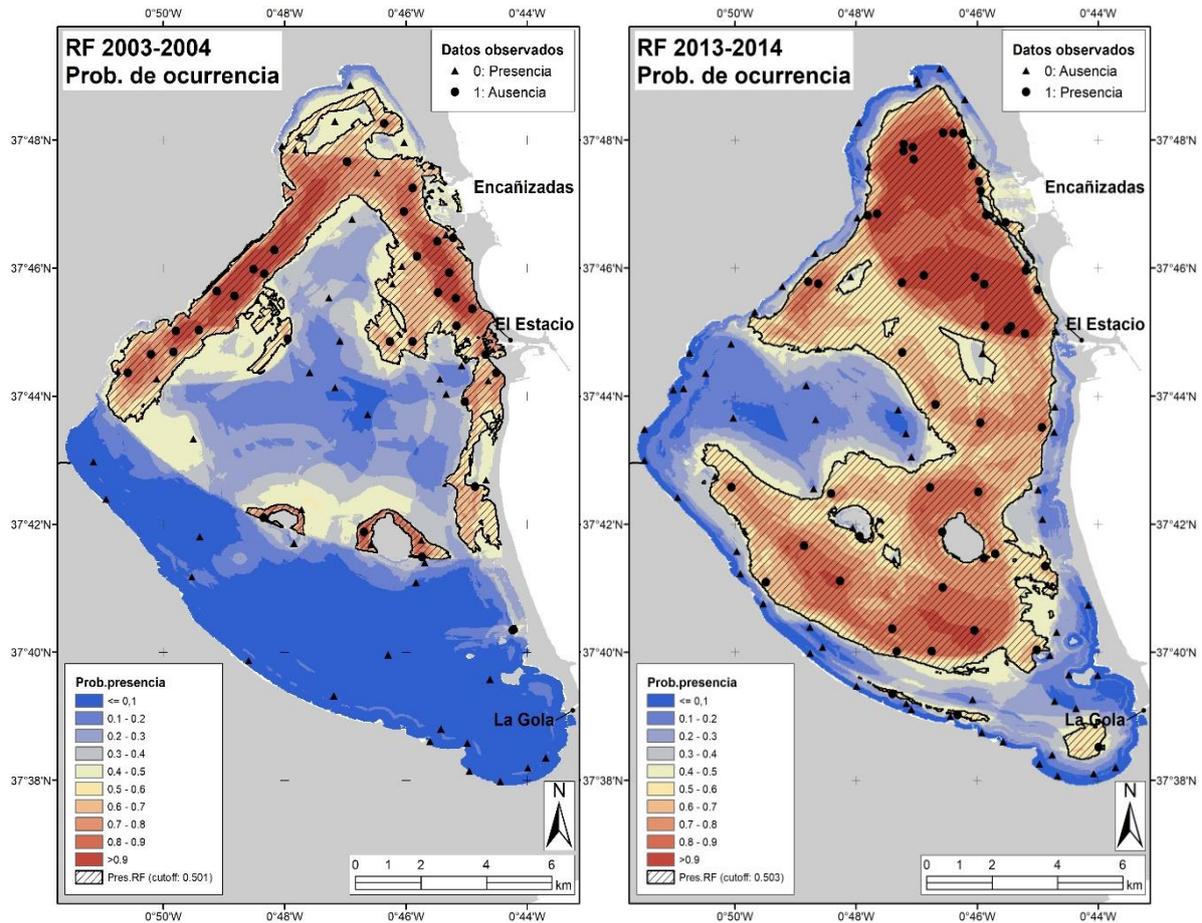
Los resultados de densidad de especímenes (Fig. 1.8) muestran patrones similares a los encontrados con el modelo de presencia-ausencia en términos de DENC y DEST o DSH, mientras que parámetros como SAL muestran tendencias opuestas. Se observa una alta densidad de *P. nobilis* con valores mínimos de salinidad dentro del rango descrito en la laguna, y existe un pico de densidad del bivalvo asociado con SAL alrededor del 40 ups y MO del 4% en el sedimento.



**Figura 1.8:** Efectos de los predictores en el modelo de densidad de población de random forest con las variables seleccionadas por la RFE, 2014. Las variables están ordenadas de mayor a menor importancia en el modelo. El resto de las variables no se consideran relevantes. La línea negra discontinua representa el efecto estimado, las líneas rojas discontinuas los intervalos de confianza del 95 % y los puntos rojos indican los valores parciales de los valores observados. (A) DENC: distancia al canal de las Encañizadas; (B) SAL: Salinidad; (C) SILT: Porcentaje de limos ;(D) MO: Materia orgánica; (E) DSH: distancia a la costa; (F) DEST: distancia al canal del Estacio. Los detalles de las variables figuran en la sección 2.3.1

### 1.4.1.3. Predicción espacial de los modelos SDM

La Fig. 1. 9 muestra la distribución potencial de *P. nobilis* según la probabilidad de ocurrencia predicha y la zona potencial, obtenida a partir de la reclasificación de la probabilidad utilizando como punto de corte el método de Youden (1950) (0,501 en 2003-2004 y 0,503 en 2013-2014). Hay que tener en cuenta que, aunque una de las ventajas de RF es que predice la presencia o ausencia de la especie en todos los puntos observados, la fiabilidad de la superficie resultante dependerá de la calidad de los datos muestreados; por lo tanto, la distribución en 2003-2004 (Fig. 1.9-A), que se obtuvo a partir de muestreos realizados con un objetivo distinto a la observación de *P. nobilis*, puede ser menos fiable. Sin embargo, los resultados obtenidos en 2003-2004 tras el proceso de remuestreo y su modelización permiten comprender mejor la distribución potencial de *P. nobilis* respecto a los estudios parciales de este periodo.



**Figura 1.9:** Predicciones espaciales para *Pinna nobilis*. Probabilidad de ocurrencia de *P. nobilis* en (A) 2003-2004 y (B) 2013-2014; modelos random forest (RF) de presencia-ausencia con selección de variables; las áreas sombreadas se refieren a las áreas potenciales de distribución (probabilidad de aparición por encima del punto de corte).

Comparando el área potencial en 2003-2004 (Fig. 1.9-A; 2985 ha, 22% de la laguna costera del Mar Menor) con la de 2013-2014 (Fig. 1.9-B; 7385 ha, 54,7% de la laguna costera del Mar Menor), aparece en el primer muestreo una concentración en la parte norte de la laguna, limitada por las islas centrales, siendo la única excepción un punto donde se evidencia la presencia del bivalvo junto a la entrada de la conexión del canal de La Gola (Gola de Marchamalo). Este patrón espacial podría explicarse por la alta probabilidad de presencia del bivalvo en las entradas de la laguna (principales vías de entrada) y su progresiva expansión hacia las demás zonas. En 2013- 2014 (Fig. 1.10), aunque la expansión hacia el sur es evidente, la mayor probabilidad se sigue observando en las zonas más cercanas a las entradas (principales vías de entrada), lo que concuerda con los efectos mostrados en la Fig. 8. Aparece un máximo secundario al norte de las islas. También se observa una tendencia a extenderse hacia el sur desde las entradas a las islas, y una expansión gradual desde allí, de nuevo hacia el sur, que puede estar relacionada con el patrón de colonización.

El modelo de densidad estima valores que varían entre 0,01 y 21,6 ind. 100 m<sup>-2</sup>, y una densidad media de  $2,181 \pm 0,004$  (media  $\pm$  SE) ind. por 100 m<sup>-2</sup> (excluyendo los valores de densidad fuera del área de distribución potencial en 2013-2014), por lo que el número total estimado en la laguna para 2013-2014 es de  $1\ 609\ 943 \pm 3309$  (media  $\pm$  SE) individuos.

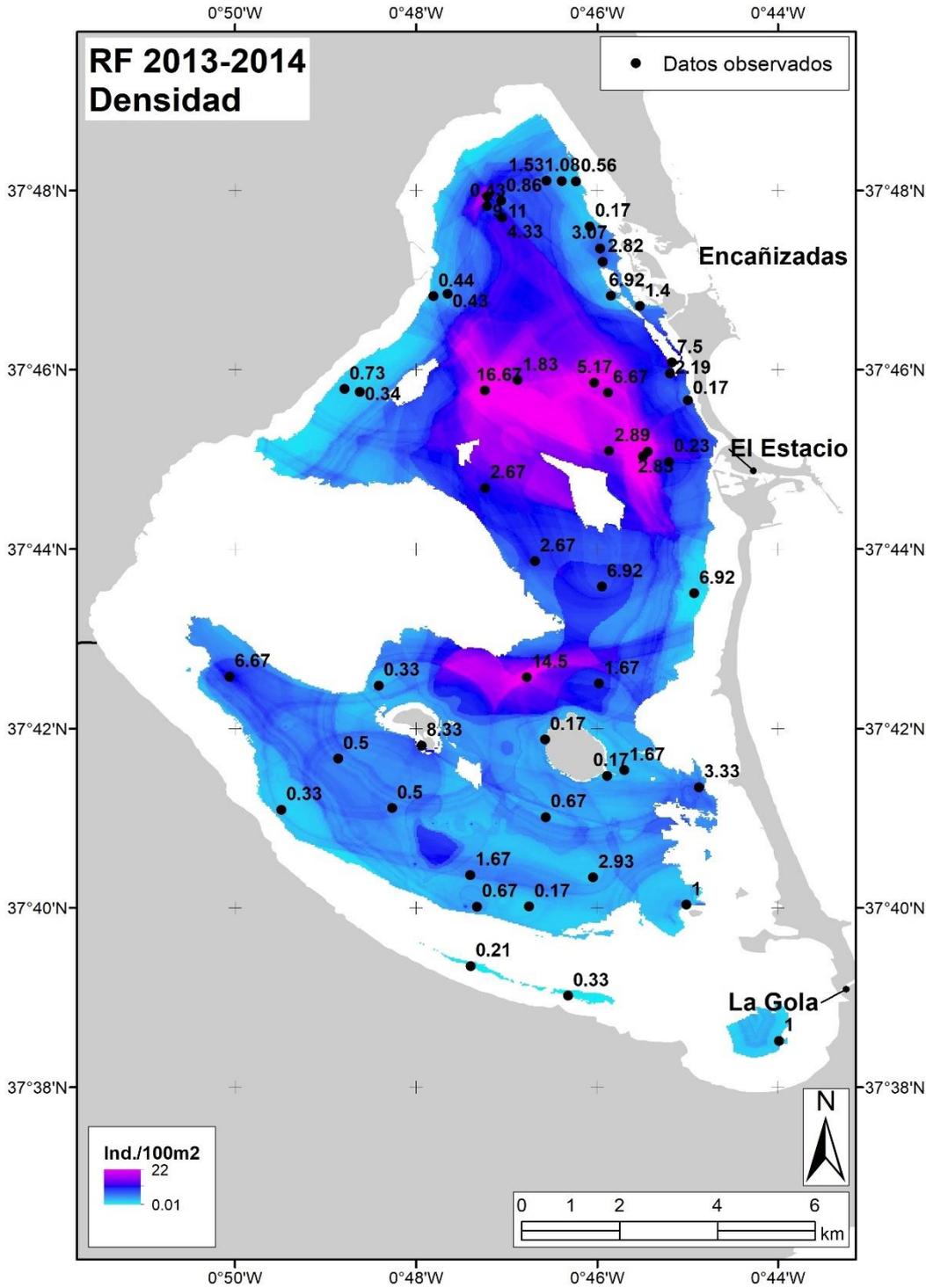
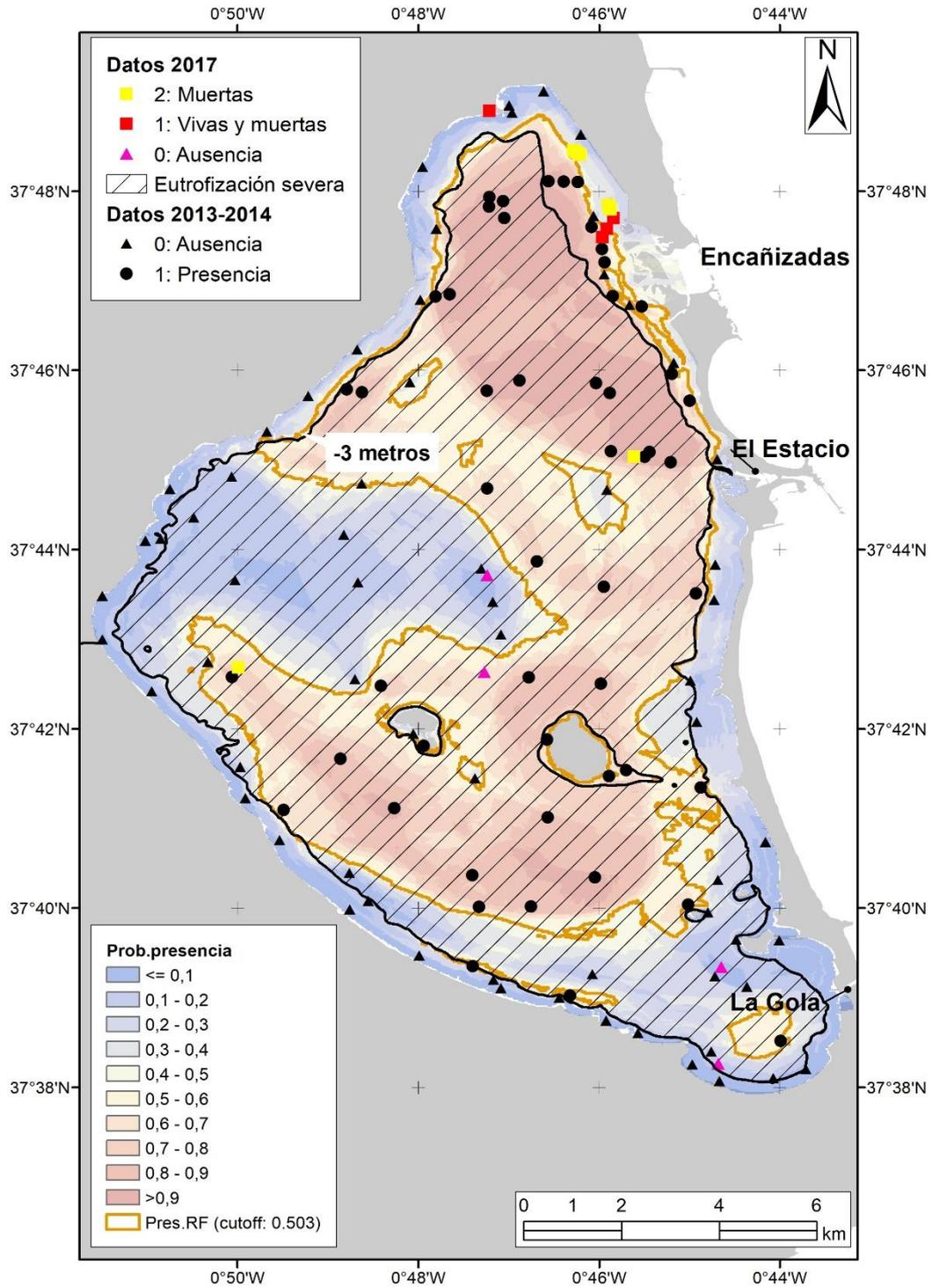


Figura 1.10: Predicción espacial de la densidad de *Pinna nobilis* para el conjunto de datos de 2013- 2014; modelo random forest regresión-kriging (RFRK) con selección de variables utilizando áreas potenciales en 2013- 2014 como máscara.



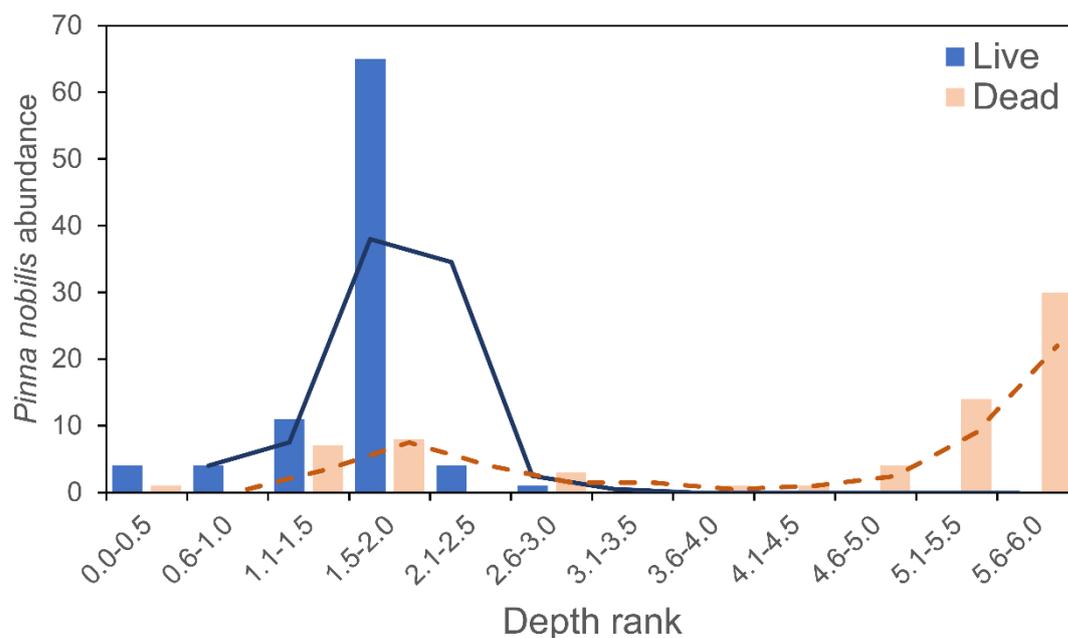
**Figura 1.11:** Distribución potencial de *Pinna nobilis* en 2013-2014. 2014 (modelo random forest de presencia-ausencia [RF] y áreas potenciales áreas basadas en la probabilidad de ocurrencia por encima del punto de corte de corte) frente a los datos de 2017. Se incluyen los datos muestreados en 2017 y 2013-2014 están incluidos. La zona de "eutrofización grave se refiere a zonas por debajo de los 3 m de profundidad.

## 1.4.2. Caracterización de la población en periodo post-colapso poblacional (2017-2020)

### 1.4.2.1. Estructura de la densidad de población

La longitud media de los 82 transectos lineales de snorkel (LT) fue de  $2314 \pm 268$  m con un tiempo de seguimiento de  $93 \pm 9$  minutos. Estos transectos, y los 121 transectos lineales modificados (MLT), registraron un total de 686 individuos vivos de nacra, de los cuales el 86 % fueron georreferenciados.

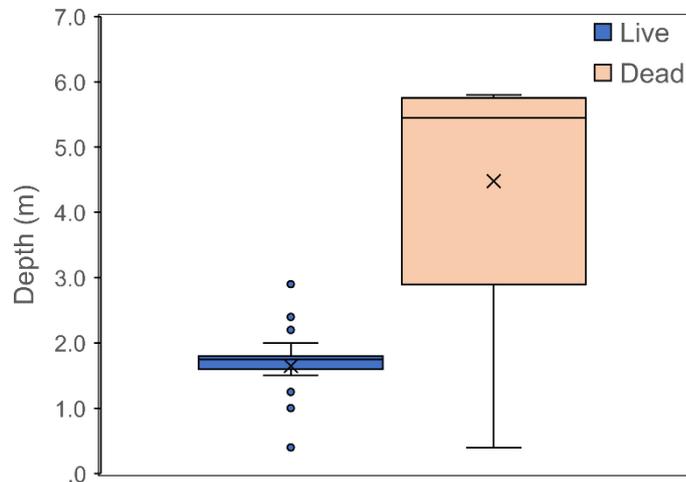
Durante el muestreo intensivo (IS), se encontraron 89 ejemplares vivos y 69 muertos. Los individuos vivos se localizaron entre 0,4 y 2,9 m de profundidad, y el 85% de ellos entre 1,1 y 2 m. El rango de profundidad observado para los individuos muertos se situó entre 0,4 y 5,8 m, el 71 % de ellos a profundidades superiores a 4 m. En el rango de profundidad donde se encontraron ejemplares vivos (0-3 m), sólo el 17,5% de los ejemplares estaban muertos, mientras que por debajo de los 3 m de profundidad fue del 100% (Fig. 1.12).



**Figura 1.12:** Distribución de la abundancia de individuos vivos y muertos de *P. nobilis* en el rango de profundidad. Las líneas coinciden con la línea de tendencia de la media móvil.

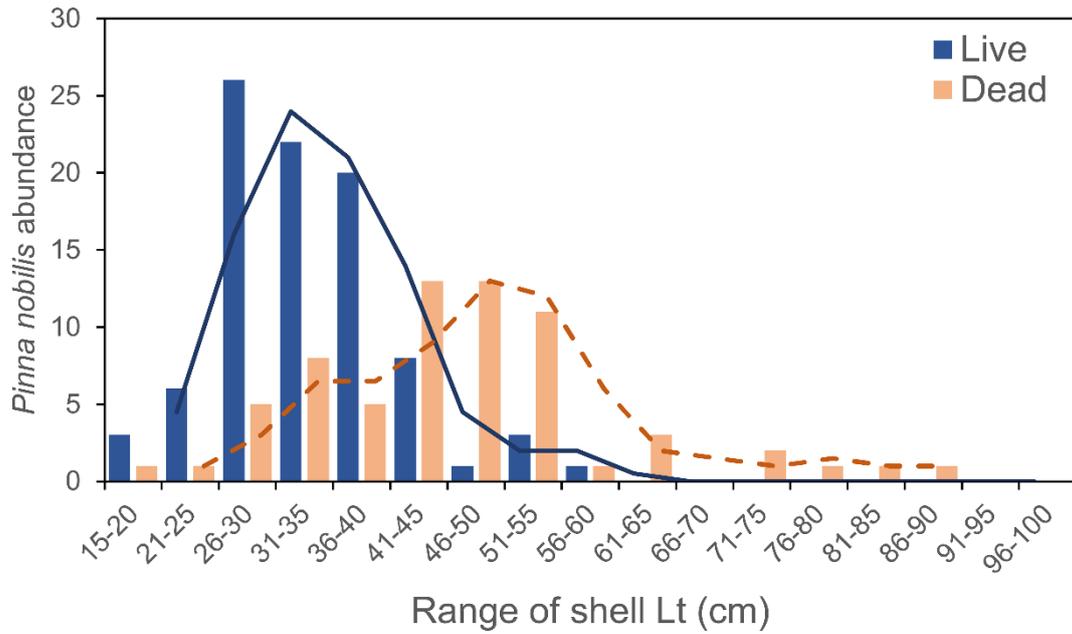
La distribución de los especímenes vivos por profundidad fue ligeramente platicúrtica con un valor de curtosis próximo a 3 ( $g_2: 2,8$ ) y una asimetría moderadamente negativa ( $g_1: -0,69$ ), pero la distribución de los especímenes muertos (D) por profundidad fue extremadamente platicúrtica ( $g_2: -0,67$ ) con una distribución asimétrica muy negativa ( $g_1: -1,04; <-1$ ).

El análisis estadístico mostró que la profundidad media de los especímenes vivos ( $1,65 \pm 0,04$  m) era significativamente menor que la profundidad media de los especímenes muertos ( $4,48 \pm 0,21$  m) (prueba T,  $p < 0,001$ ). Los especímenes muertos se encuentran generalmente a mayor profundidad, y no hay ningún espécimen vivo por debajo del umbral de los 3 m (Fig. 1.13).

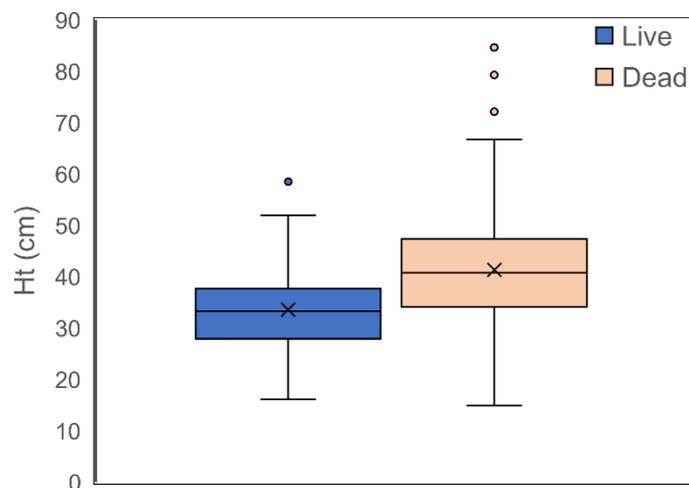


**Figura 1.13:** Diagrama de cajas de la profundidad de los individuos de *P. nobilis* vivos (n=89) o muertos (n=69). Las cajas representan los percentiles 25º y 75º de la distribución de los datos. Los bigotes representan la dispersión mediante el error estándar. El aspa dentro del recuadro marca la media, la línea dentro de las cajas representa la mediana y los puntos representan los valores fuera de rango.

En relación a la distribución por clases de tamaño de los especímenes vivos y muertos de *P. nobilis* y se observaron diferencias significativas (prueba T,  $p < 0,001$ ) (Fig. 1.14). Los especímenes muertos eran más grandes, con un tamaño máximo de 84,63 cm y una media de  $41,32 \pm 1,66$  cm, mientras que en los vivos se la talla máxima era 58,48 cm y  $33,57 \pm 0,82$  cm de valor medio. Tanto los especímenes vivos como los muertos (Fig. 1.15) mostraron una distribución de frecuencias de tallas moderadamente sesgada hacia las clases de talla de mayor tamaño, parte derecha de la tabla (Lg1: 0,61; Dg1: 0,88), y ambas pueden considerarse como platicúrticas (L g2: 0,93; D g2: 1,58) (Fig. 14).



**Figura 1.14:** Distribución por clases de tamaño de los individuos vivos y muertos de *P. nobilis* en el rango de profundidad. Las líneas discontinuas coinciden con la línea de tendencia de la media móvil.



**Figura 1.15:** Diagrama de cajas de la altura total de la concha (Ht) de individuos de *Pinna nobilis* vivos (n=88) o muertos (n=66). Las cajas representan los percentiles 25º y 75º de la distribución de los datos. Los bigotes representan la dispersión mediante el error estándar. El aspa dentro del recuadro marca la media, la línea dentro de las cajas representa la mediana y los puntos representan los valores fuera de rango.

#### 1.4.2.2 Evaluación global de los modelos

La Tabla 1. 2 resume los estadísticos de bondad de ajuste LOO-BUF-CV obtenidos en los modelos de presencia/ausencia y densidad. Para comparar los resultados de RF y RFRK con otros métodos

ampliamente utilizados, se incluyen los resultados de validación de un Modelo Lineal Generalizado (GLM) y un Modelo Aditivo Generalizado (GAM), utilizando regresión logística para presencia-ausencia y regresión de Poisson para densidad. En los modelos GAM se utilizan splines cúbicos como función de suavizado (Hastie y Tibshirani, 1990).

RFRK tiene el mejor ajuste tanto en presencia-ausencia (AUC: 0.786, CI: 0.030) como en densidad (KGE: 0.772, CI: 0.055), resultados muy similares a los obtenidos usando RF; lo que significa que la mayor parte de la variabilidad es abordada por RF, incluyendo la autocorrelación espacial. En cuanto al resto de estadísticos de bondad de ajuste, destacan RFRK y RF, con valores R2 muy elevados en los modelos de densidad y RMSE significativamente inferiores a GLM y GAM. También cabe destacar los valores R2 muy bajos de GLM y GAM para el conjunto de validación, y los valores KGE negativos en el caso de los modelos basados en GLM; dichos valores indican que estos modelos no son adecuados para predecir el patrón espacial de *P. nobilis* en la laguna. La precisión en los modelos de presencia-ausencia no es muy alta, pero puede estar subestimada teniendo en cuenta que el sistema de validación elimina los puntos más cercanos a cada punto evaluado, y que el patrón espacial actual de *P. nobilis* en la laguna está muy concentrado en unos pocos puntos. Además, tanto RF como RFRK en el modelo final (etapa de calibración) consiguen clasificar bien el 100% de los puntos del modelo final, obteniendo un KGE muy cercano a 1.

**Tabla 1.2:** Media e intervalos de confianza del 95% de los cinco estadísticos de validación estimados para los seis métodos y LOO-BUF-CV en enfoque de dominio espacial. RF: Ramdon Forest; GLM.....AUC:

Modelos	Presencia-ausencia		Densidad		
	AUC	Acc	RMSE	R2	KGE
<b>RF</b>	0.744 ± 0.031	0.692 ± 0.032	0.728 ± 0.033	0.899 ± 0.014	0.771 ± 0.048
<b>GLM</b>	0.744 ± 0.035	0.250 ± 0.029	2.078 ± 0.095	0.012 ± 0.010	-0.109 ± 0.092
<b>GAM</b>	0.670 ± 0.036	0.427 ± 0.034	2.357 ± 0.107	0.012 ± 0.010	0.063 ± 0.095
<b>RFRK</b>	0.786 ± 0.030	0.688 ± 0.033	0.726 ± 0.033	0.902 ± 0.013	0.772 ± 0.055
<b>GLMRK</b>	0.682 ± 0.035	0.499 ± 0.034	2.020 ± 0.092	0.035 ± 0.020	-0.050 ± 0.092
<b>GAMRK</b>	0.509 ± 0.039	0.553 ± 0.034	2.356 ± 0.107	0.013 ± 0.011	0.065 ± 0.095

1.4.2.3. Selección de variables y efectos de los predictores en los modelos seleccionados

Para el periodo 2017-2020, se incluyeron siete variables tras el análisis VIF: DEST, DEPTH, DENC, CHL, TURB, DSH y O.

La Fig. 1.16 incluye la matriz de correlación de Pearson de las variables analizadas en 2020; las Figs. 1.17 y 1.19 muestran sus distribuciones espaciales.

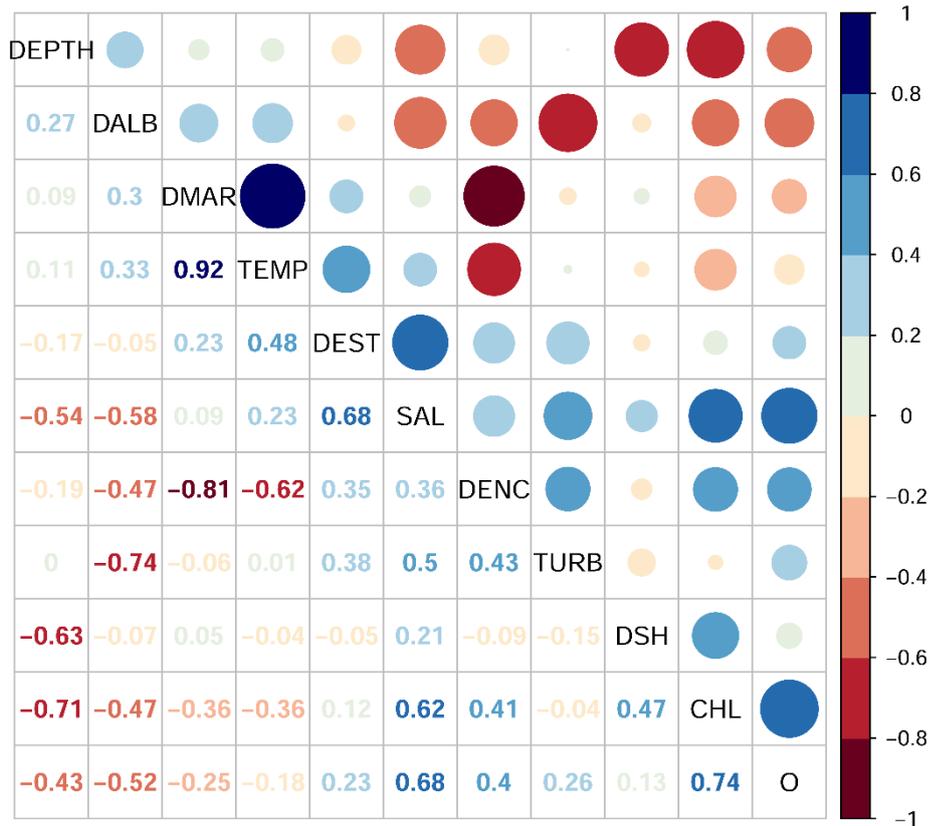
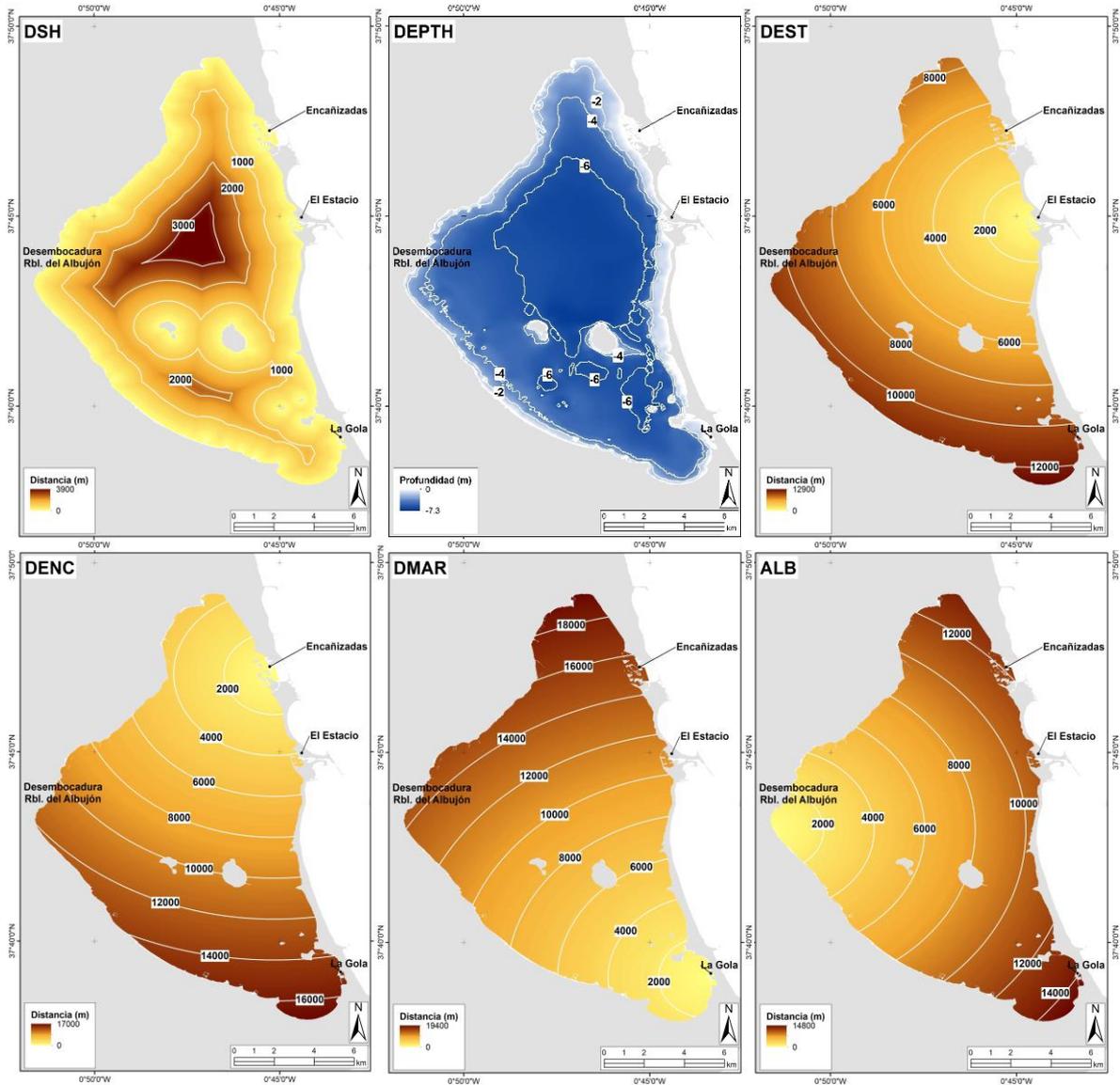


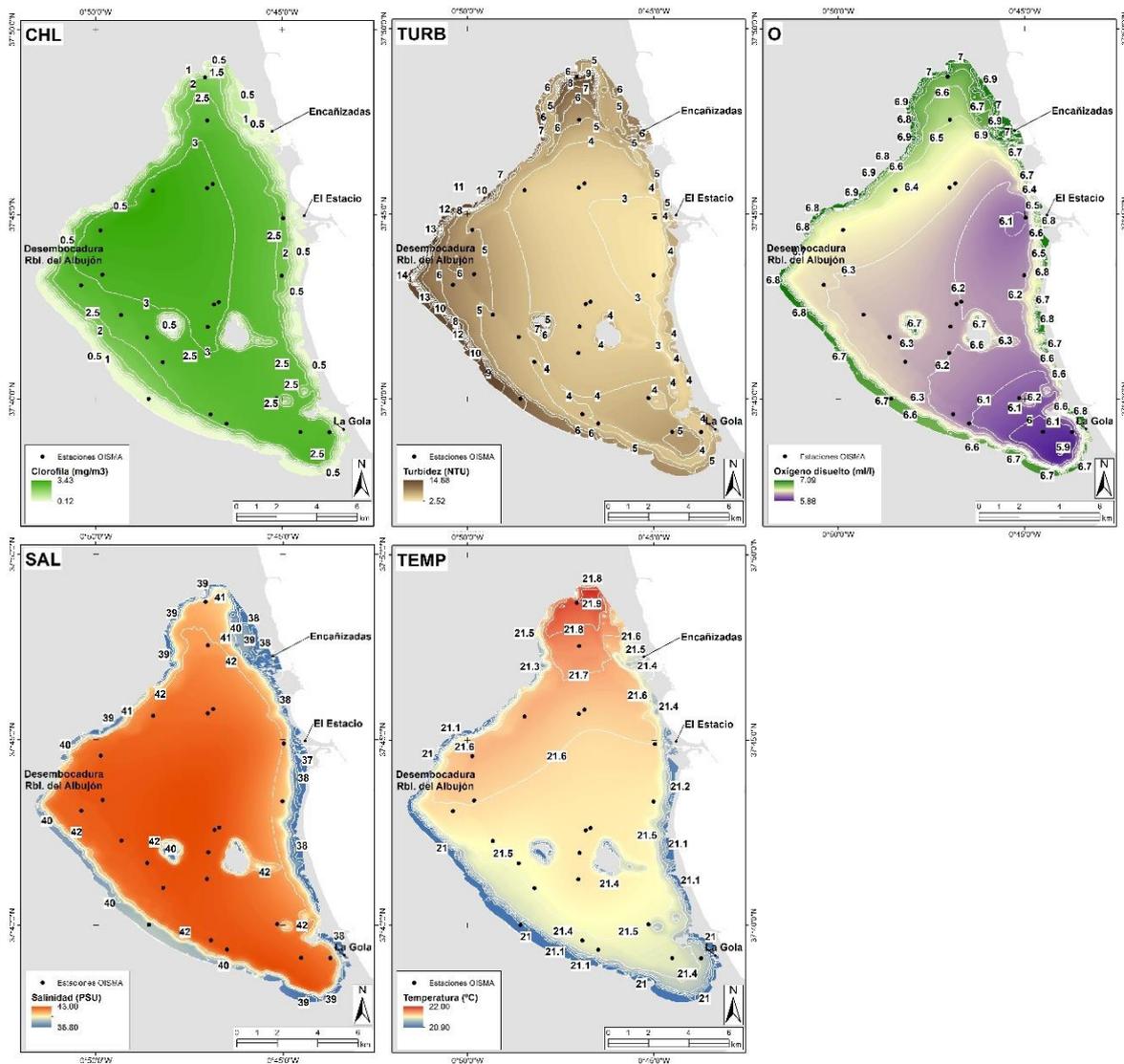
Figura 1.16: Matriz de correlación de Pearson. 2020. La matriz diagonal muestra los nombres de las variables. Arriba a la diagonal, los círculos de área muestran el valor absoluto de los coeficientes de correlación correspondientes. Inferior a la diagonal muestra los coeficientes de correlación. DEPTH: Profundidad; DALB: Distancia; DMAR: Distancia a la gola de Marchamalo; TEMP: Temperatura; DEST: Distancia al Estacio; SAL: Salinidad; DENC: Distancia a las Encañizadas; TURB: Turbidez; DSH: Distancia a la costa; CHL: Nivel de Clorofila; O: Niveles de Oxígeno disuelto.

En la Fig. 1. 16, DALB, la distancia a la entrada principal de aportes de aguas superficiales y subterráneas a la Cuenca del Mar Menor está correlacionada negativamente con TURB ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.74$ ), y en menor medida con SAL ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.58$ ), O ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.52$ ), CHL ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.47$ ) y DENC ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.47$ ). DMAR está muy correlacionada positivamente con TEMP ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.92$ ) y negativamente con DENC ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.81$ ), y en menor medida con CHL y O.

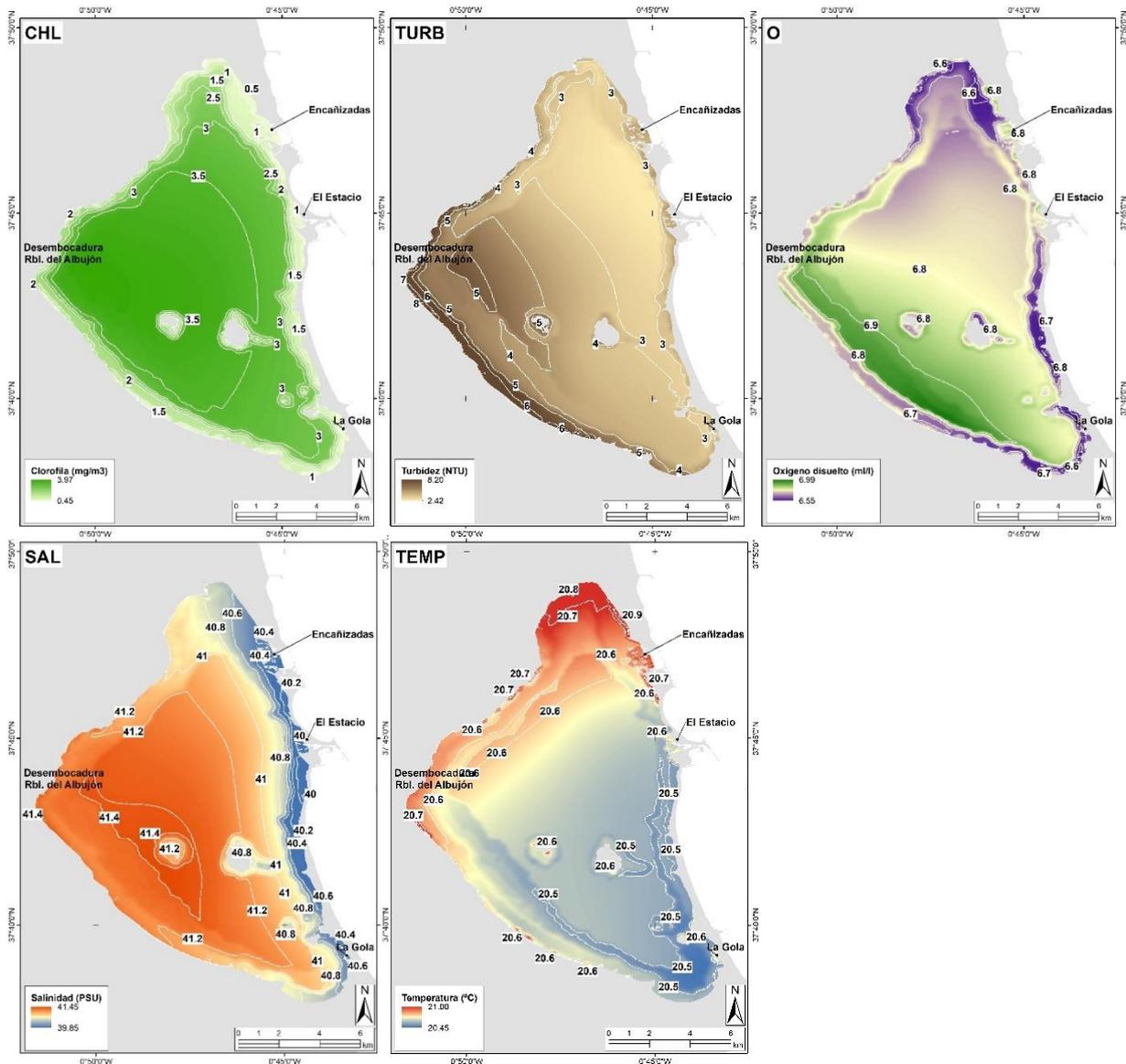
TEMP también está correlacionada con DENC ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,62$ ), y en menor medida con DEST ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,48$ ) y CHL ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,36$ ). La correlación de SAL con DEST, CHL, O y TURB es superior a 0,5, y con DALB y DEPTH es inferior a -0,5.



**Figura 1.17:** Variables ambientales distribuidas espacialmente utilizadas en los modelos SDMs. (A) DSH: distancia a la costa, (B) DEPTH: profundidad, (C) DEST: distancia al canal del Estacio, (D) DENC: distancia al canal de las Encañizadas, (E) DMAR: distancia al canal de Marchamalo y (F) DALB: distancia a la desembocadura de la Rambla del Albujón.



**Figura 1.18:** Variables medioambientales distribuidas espacialmente utilizadas en los modelos SDMs. Estimaciones para 2017. (G) CHL: clorofila, (H) TURB: turbidez, (I) O: oxígeno disuelto, (J) SAL: salinidad y (K) TEMP: temperatura del mar.



**Figura 1.19:** Variables medioambientales distribuidas espacialmente utilizadas en los modelos SDMs. Estimaciones para 2020. (G) CHL: clorofila, (H) TURB: turbidez, (I) O: oxígeno disuelto, (J) SAL: salinidad y (K) TEMP: temperatura del mar.

La Fig. 1.20 muestra la importancia de las variables en los modelos de RF, el análisis de selección de características (ffs) identificó cuatro variables como variables finales a incluir en los modelos de presencia-ausencia y abundancia: DEST, DEPTH, DENC y CHL en los modelos de presencia-ausencia (Fig. 1.20(A)) y DEST, DEPTH, O y CHL en el modelo de densidad (Fig. 1.20(B)). Las

variables más relevantes para explicar el patrón de distribución fueron DEST y DEPTH. DENC se incluye en tercer lugar sólo en el modelo de presencia-ausencia, mientras que O es la tercera variable en el modelo de densidad. Por último, CHL es la cuarta variable en ambos modelos.

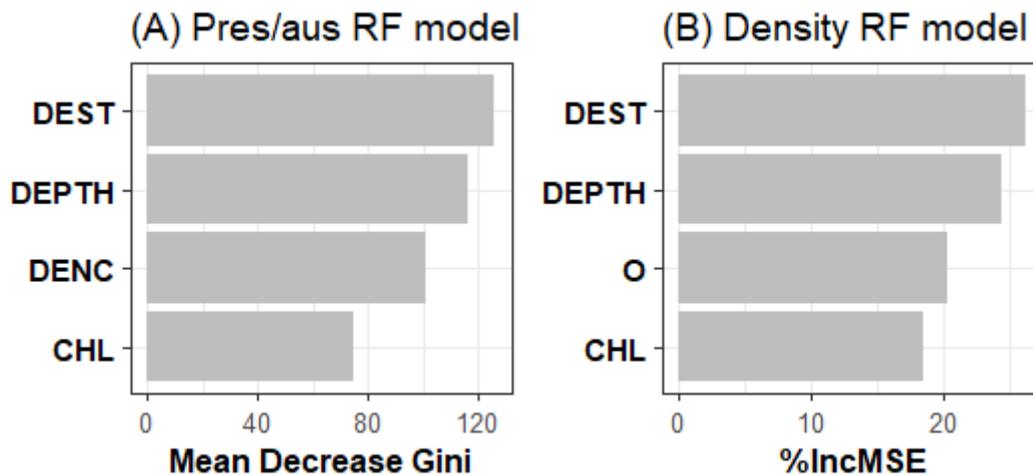
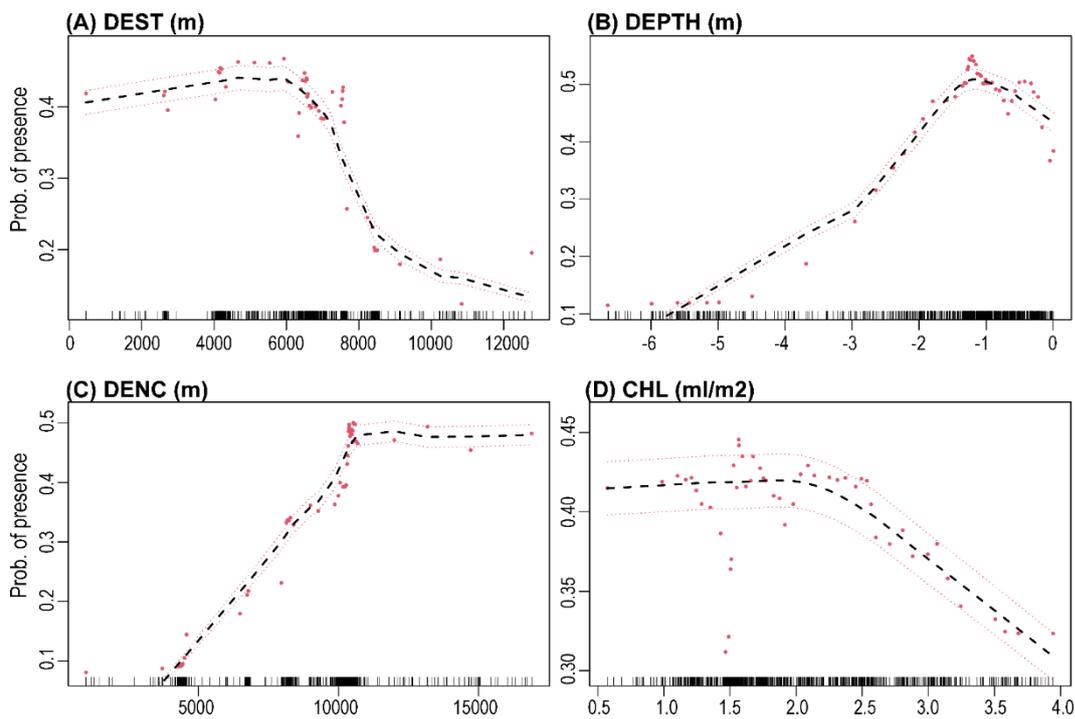


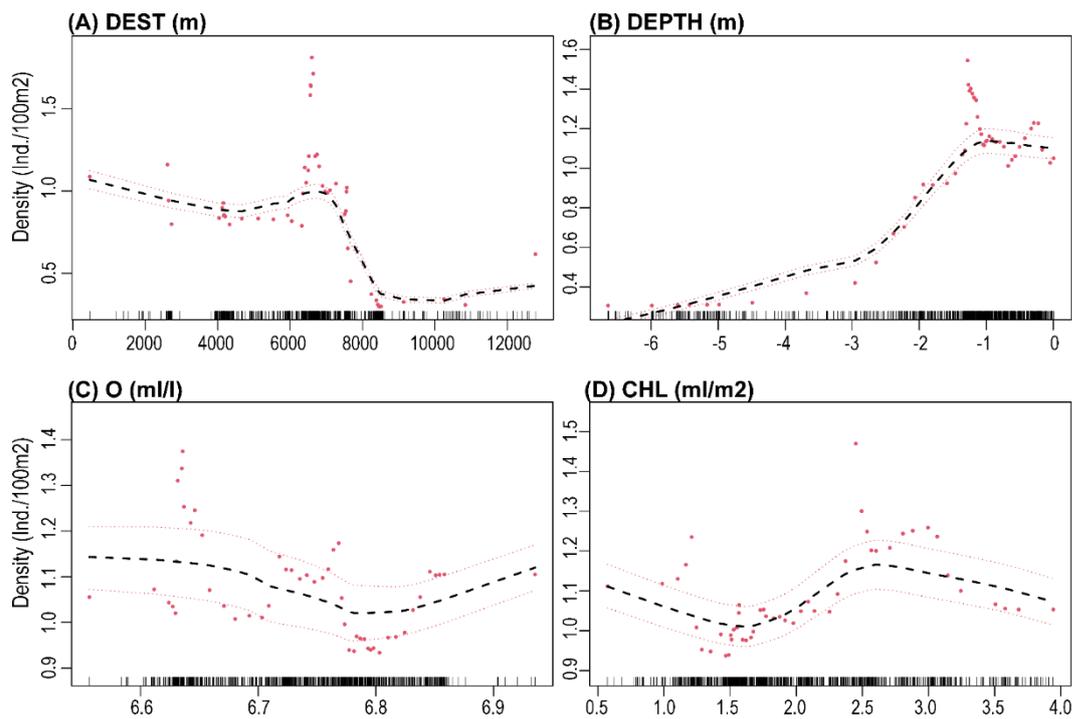
Figura 1.20: Importancia de las variables para los modelos (A) presencia-ausencia y (B) densidad RF. Los valores se han desescalado utilizando la relación media/error estándar.

Las Figuras 1.21 y 1.22 incluyen gráficos de dependencia parcial que exploran los efectos de las covariables sobre la probabilidad de presencia (en el modelo presencia-ausencia) y la respuesta (en el modelo de regresión). La Fig. 1.21(A) muestra cómo la máxima probabilidad de presencia se produce a cierta distancia del canal del Estacio (DEST), coincidiendo con las poblaciones de La Manga próximas a esta vía de comunicación, y alcanza la máxima probabilidad de presencia a unos 7.000 m de distancia, disminuyendo drásticamente a partir de este umbral. Algo similar se observa en la Fig. 1.22 (A); curiosamente, la densidad aumenta en el rango 6.000-7.000 m, coincidiendo esta distancia con las poblaciones de máxima densidad en la isla de El Barón. En el caso del DENC en presencia-ausencia (Fig. 1.21 (C)) el patrón describe un aumento lineal de la probabilidad a medida que nos alejamos de Las Encañizadas hasta un máximo en torno a los 10.000 m, distancia que coincide con las poblaciones de La Manga. Este patrón es diferente en 2017, ya que en ese año aún existía una población importante en las inmediaciones de Lo Pagán y Las Encañizadas y en la parte norte de la laguna (zoom en Fig. 1.4-B). Ambos núcleos poblacionales desaparecieron en 2018 y 2019 respectivamente.



**Figura 1.21:** (A-D) Efectos de los predictores en el modelo de presencia-ausencia de RF con las variables seleccionadas por ffs. Las variables están ordenadas de mayor a menor importancia en el modelo (Fig. 1.20 (A)). La línea negra discontinua representa el efecto estimado, las líneas rojas discontinuas los intervalos de confianza del 95 % y los puntos rojos indican los valores parciales de los valores observados.

El efecto de la DEPTH observados en los datos de presencia-ausencia y los valores de densidad son similares (Figs. 1.21(B) y 1.22(B)). Las mayores concentraciones aparecen en el rango -1,1 a -2,5 m, disminuyendo hacia la línea de costa y de forma más drástica a medida que aumenta la profundidad hasta alcanzar un claro límite a los 3 m, tal y como se observa en los estudios de Giménez-Casaldueiro et al. (2020) o Ruiz et al. (2020). En cuanto a las variables fisicoquímicas, CHL (Figs 1.21(D) y 1.22(D)) la presencia de nacra desciende para valores superiores a 3 ml/m<sup>3</sup>, pero la máxima densidad se observa en niveles cercanos a esta concentración, lo que podría deberse al carácter filtrante de la especie (Davenport et al., 2011). En cuanto al oxígeno O (Fig. 1.22(C)), no se reflejan los valores en profundidad de situaciones anóxicas y/o hipóxicas debido a que la variable utilizada contempla valores medios para el periodo estudiado, no los episodios concretos en los que se produjo esta situación.

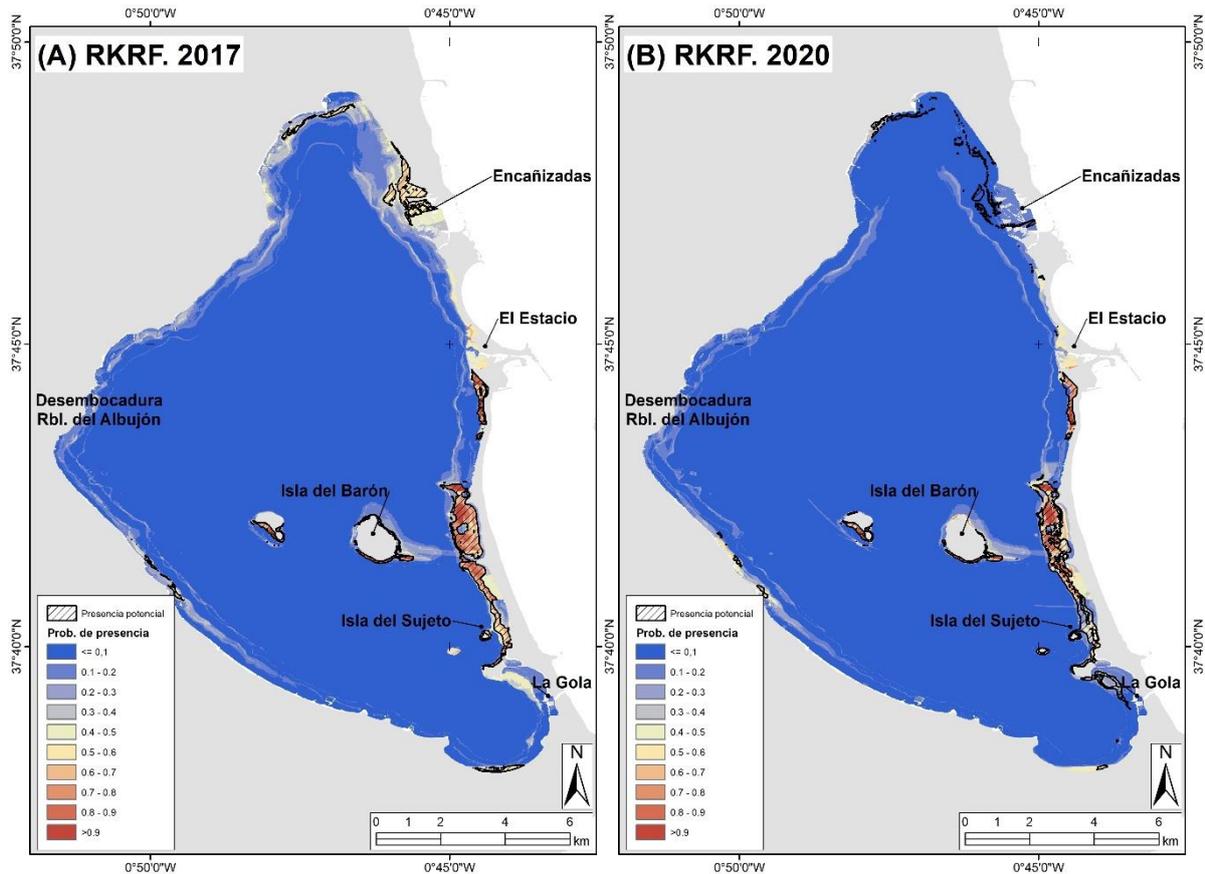


**Figura 1.22:** (A-D) Efectos de los predictores en el modelo de densidad de Random Forest (RF) con las variables seleccionadas por ffs. Las variables están ordenadas de mayor a menor importancia en el modelo (Fig. 1.22(B)). La línea negra discontinua representa el efecto estimado, las líneas rojas discontinuas los intervalos de confianza del 95 % y los puntos rojos indican los valores parciales de los valores observados.

#### 1.4.2.4. Predicción espacial de los modelos SDM

La Fig. 1.23 muestra la predicción en términos de probabilidad de presencia para (A) 2017 y (B) 2020 y las áreas de presencia potencial (áreas cuya probabilidad de presencia está por encima del punto de corte optimizado: 0,49). El patrón espacial es muy similar en ambos casos, salvo por la drástica reducción entre 2017 y 2020 en el norte de la laguna, en la zona de Las Encañizadas (Fig. 1.21-C), y San Pedro del Pinatar y Lo Pagán (zoom en Fig. 1.4-B).

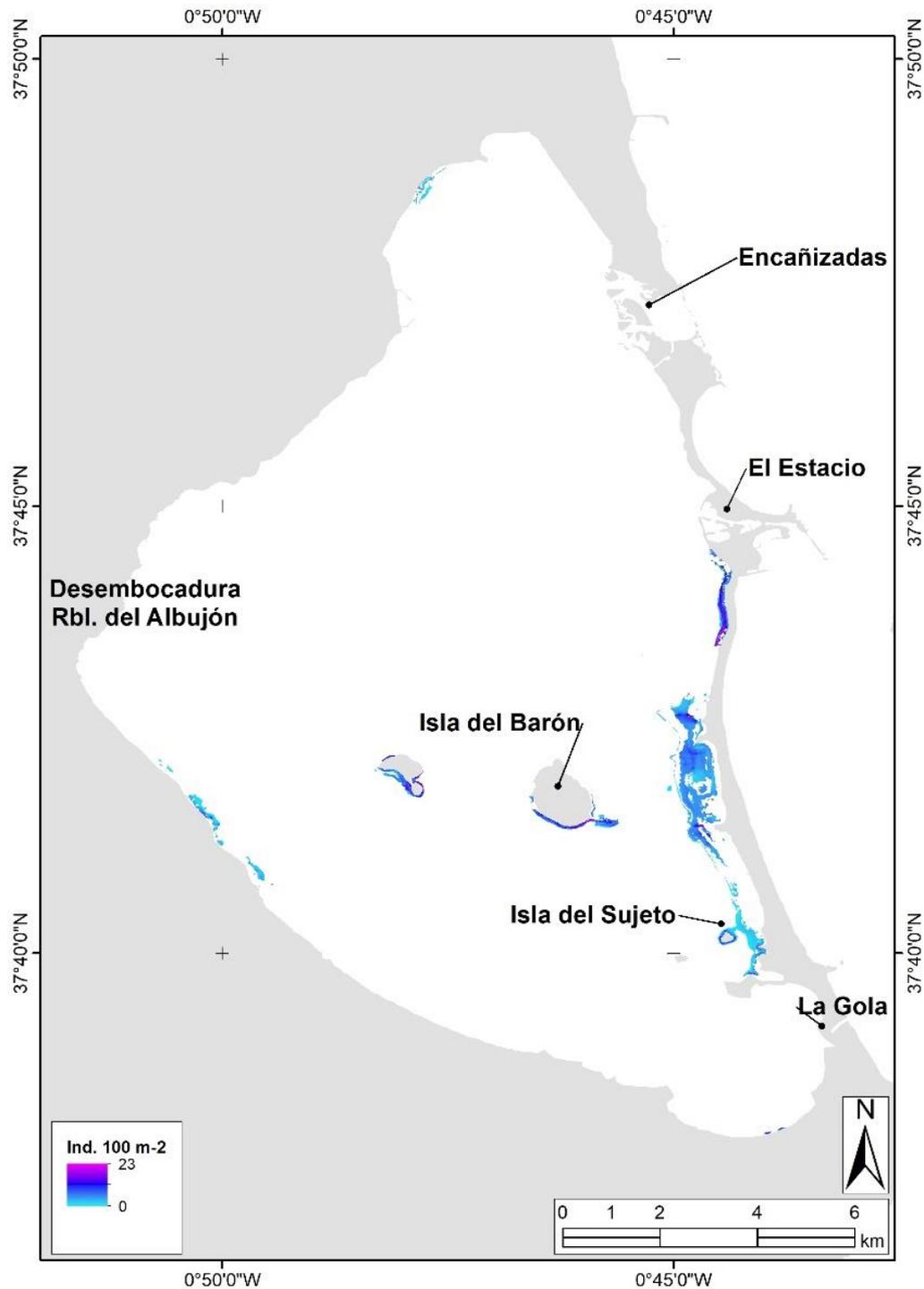
Como resultado, el área de presencia potencial en 2017 fue de 323,34 ha (2,40 % del área del Mar Menor), mientras que en 2020 se estima en unas 200,97 ha (1,50 %). La zona del norte de la isla de El Barón, aunque no está inventariada, se incluye en ambas fechas como área de presencia potencial de *P. nobilis* en función de su probabilidad de presencia prevista.



**Figura. 1.23:** Distribución potencial de *P. nobilis* en (A) 2017 y (B) 2020. Presencia-ausencia para modelos RKRf con selección de variables (las áreas sombreadas se refieren a áreas potenciales de distribución basadas en la probabilidad de ocurrencia por encima del punto de corte).

En 2020 las áreas potenciales, coincidentes con los puntos muestreados donde *P. nobilis* está presente, se identifican en una franja de baja profundidad cerca de La Manga, desde El Estacio hasta la isla de El Ciervo (Figs. 1.21 y 1.22). El modelo también recoge un cierto aumento de la probabilidad de presencia en La Gola, aunque sin llegar a 0,495, casi conectando esta zona con el área potencial identificada al sur de la laguna, en Playa Honda. También es destacable la alta probabilidad de presencia en torno a las islas El Barón y La Perdiguera, también en el rango de profundidades identificado en las Figs. 1.23 y 1.24. Por último, se identifican dos áreas potenciales, donde se muestrearon unos pocos individuos, al suroeste de la laguna, en Punta Brava y Los Urrutias, y en la zona de La Ribera al noreste de la laguna, siendo los únicos individuos aún vivos del grupo muestreado en 2017 en la zona de San Pedro del Pinatar y Lo Pagán (zoom en Fig. 1.4B).

La Fig. 1.24 muestra la predicción del modelo de densidad. La densidad media estimada en la zona de presencia es de  $1,055 \pm 0,006$  ind. por  $100 \text{ m}^{-2}$  (media  $\pm$  SE) con valores que varían entre 0,01 y 23 ind. por  $100 \text{ m}^{-2}$ .



**Figura 1.24:** Predicción espacial de la densidad de *P. nobilis* en 2020: Modelo RFRK con selección de variables usando las áreas potenciales de la Fig. 1.22 (A) como máscara.

Durante las campañas de seguimiento de 2018 y 2019 se encontraron ejemplares arrancados y derribados durante el calado y retirada de redes de pesca e incluso directamente extraídos. En una de las localidades donde se observó esta situación, la isla de La Perdiguera, la colonia desapareció por completo, posiblemente debido a las redes de pesca ilegales.

## 1.4 DISCUSIÓN

La población de *Pinna nobilis* se ha visto muy reducida en una gran parte del Mediterráneo en las últimas décadas debido a la presión antropogénica (García- March et al. 2007, Katsanevakis 2007, Katsanevakis y Thessalou-Legaki 2009, Rabaoui et al. 2011). Sin embargo, desde 1983, año de la primera observación de *P. nobilis* en el Mar Menor (Rodríguez Babio y Navarro Tárrega 1983), hasta 2014, la laguna fue testigo de la colonización y estabilización de la nacra, con un total de 7385 ha de hábitat potencial. Para entender este proceso de colonización de *P. nobilis* en el Mar Menor, es necesario interpretar el modelo de dispersión y la influencia de los principales factores que determinan el proceso de colonización.

Algunos de los mecanismos más comunes para la transferencia de especies en aguas cercanas a la costa incluyen el movimiento de comunidades foráneas en los fondos de los barcos o la conexión de cursos de agua a través de canales artificiales (Ruiz et al. 1997). El establecimiento de especies foráneas facilita cambios importantes en la composición de la fauna de muchas zonas cerradas y semicerradas como los estuarios, puertos y lagunas costeras del Mediterráneo occidental (Cognetti y Maltagliati 2000). Esta invasión podría producirse tras años o décadas de oportunidades de dispersión desde la región de origen a la receptora. El establecimiento satisfactorio de especies exóticas suele requerir muchas inoculaciones, y el éxito dependerá en parte del tamaño del inoculante, del estado fisiológico de los individuos y de las condiciones locales en el momento de la llegada (Roughgarden 1986). Es evidente que la ampliación artificial del canal del Estacio ha provocado la entrada de numerosas especies en la laguna. El descenso de la salinidad debido al mayor intercambio de agua con el Mediterráneo ha generado condiciones más favorables para la supervivencia de estas especies (Giménez-Casalduero et al. 2016). En el caso de *P. nobilis*, los canales parecen haber jugado un papel importante en la entrada de larvas procedentes de las poblaciones mediterráneas cercanas. Los resultados de este estudio muestran que no sólo el canal artificial de El Estacio, sino también los canales naturales de las Encañizadas han sido una importante puerta de entrada a la laguna.

El rango de tolerancia a la salinidad para *P. nobilis* se ha descrito entre 35 y 42 ups (Schlieper et al. 1960, Butler et al. 1993). Es razonable suponer que esta especie no podría tolerar los altos niveles de salinidad (valores medios de 52 ups) en la laguna antes de la apertura del canal del Estacio (Aravio-Torre y Arévalo 1971). Sin embargo, la presencia de nacra desde principios de los años 80, varios años después de la apertura del canal de comunicación entre las 2 masas de agua y justo cuando la salinidad en la laguna empezó a disminuir hasta un valor medio de 44,5 ups (Azzati et al. 1987), demuestra que el límite superior de tolerancia de este bivalvo está muy por

encima de los valores descritos anteriormente (Schlieper et al. 1960, Butler et al. 1993). En el presente trabajo, comprobamos que *P. nobilis* colonizó ampliamente la laguna, soportando un rango de salinidad entre 44 y 45 ups durante varias décadas (1983-2014) antes de que se produjera la crisis de eutrofización.

Es probable que su presencia en zonas menos salinas dentro de esta área de distribución esté más relacionada con la distancia de los puntos de colonización que con la salinidad en sí misma.

Desde el primer momento de la colonización hasta principios de la década del 2000, la distribución de los individuos estuvo marcada por la distancia a los puntos de entrada a los canales de las Encañizadas y del Estacio, probablemente porque las larvas entraban por estos puntos procedentes de los eventos reproductivos de la importante población situada en la vertiente mediterránea y cuya mayor población se encontraba a lo largo de una franja litoral de aproximadamente 500 m de la costa y a 4 m de profundidad.

Tras la colonización de las larvas llegadas del Mediterráneo, los ejemplares alcanzaron la madurez reproductiva y comenzaron a colonizar zonas más alejadas de los puntos de entrada y de la línea de costa, y la profundidad óptima de distribución de la población aumentó porque colonizaron zonas más profundas. Resulta interesante el hecho de que uno de los principales factores que explican la población en 2013-2014 es la presencia de grava. La alta correlación entre la distribución de nacra y la presencia de altos niveles de grava (GRAV) en el sedimento puede explicarse por el hecho de que, aunque *P. nobilis* es común en zonas arenosas (Katsanevakis 2005), necesita fijarse mediante sus numerosos filamentos de biso a partículas de gran tamaño, rizomas de praderas marinas o estructuras sólidas del sustrato (Katsanevakis y Thessalou- Legaki 2009, Basso et al. 2015b). El Mar Menor se caracterizaba durante esa época por la presencia en muchas zonas de una alta concentración de partículas como gravas de origen conchífero, y muchos de los ejemplares de la laguna están adheridos a rizomas de *Cymodocea nodosa* pero también a *Bittium reticulatum* o fragmentos de otras conchas (Mas et al., 2017; Giménez Casalduero et al., 2020).

En el presente trabajo, encontramos una relación inversa altamente significativa entre la distribución potencial del bivalvo hasta 2016 y la distancia a las zonas más eutróficas e hipóxicas de la laguna (ALB: la desembocadura de la Rambla del Albuñón), aunque esta variable fue eliminada de los modelos tras detectar una alta colinealidad en el análisis VIF con la variable XCOOR y las variables de textura (SAND, SILT). La desembocadura de la Rambla del Albuñón es un punto donde el oxígeno alcanzó un valor medio de 5 mg l<sup>-1</sup>, y valores mínimos de 0,47 mg l<sup>-1</sup> (Velasco et al. 2006). Investigaciones previas han demostrado que los juveniles de *P. nobilis* son

relativamente resistentes a una exposición moderada a la hipoxia ( $3,07 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ ) (Basso et al. 2015a).

La distribución de *P. nobilis* suele ser irregular (de Gaulejac y Vicente 1990, Butler et al. 1993), y el reclutamiento puede estar influido por factores ambientales que sincronicen el desove (Philippart et al. 2003, Cabanellas-Reboredo et al. 2009). Esta hipótesis está siendo analizada actualmente en el Mar Menor por nuestro grupo de investigación. En el Mar Menor se ha observado una distribución en parches, zonas de alta densidad rodeadas de zonas sin ejemplares; este comportamiento ha sido descrito por diferentes autores como una peculiaridad de esta especie (Butler et al., 1993; García-March y Ferrer, 1995; Prado et al., 2022). El tamaño de los individuos dentro de un grupo parece ser bastante homogéneo, lo que sugiere que el reclutamiento en la laguna se produjo en pulsos, probablemente asociados a eventos clave de condiciones ambientales favorables que sincronizan el desove, como un aumento de la temperatura del agua de mar (Philippart et al., 2003; Cabanellas-Reboredo et al., 2009; Kersting y García-March 2017). Las temperaturas fluctuantes, que son comunes en la laguna, pueden ser determinantes en los procesos reproductivos de *P. nobilis*, y es importante observar la relación entre factores ambientales como la temperatura y los periodos de desove y reclutamiento de nacra (de Gaulejac 1993, Richard-son et al. 1999). También hay otros factores que parecen influir en el éxito del evento reproductor y su viabilidad larvaria (Capítulo 3 del presente trabajo).

En la laguna se han observado episodios de pulsos reproductivos sincronizados asociados a pequeños cambios en la temperatura del agua (Kersting y García-March, 2017; Gimenez-Casalduero, F. y Cortés E., obs pers). Desde 2017 se ha observado reclutamiento de juveniles en el interior de la laguna, algunos de los cuales permanecen viables a lo largo del tiempo (Murcia, obs pers).

En el Mediterráneo se ha descrito una segregación de tallas relacionada con la profundidad, con individuos de menor tamaño y ausencia de los más grandes en aguas menos profundas (Barberá et al., 1996; Moreteau y Vicente, 1982). La distribución de ejemplares en el Mar Menor, antes de la crisis de eutrofización de 2016, se corresponde con este patrón. La distribución de ejemplares muertos, con una mayor densidad e individuos de mayor tamaño en las zonas más profundas (entre 5 y 6 m de profundidad), también coincide con ese patrón. Esto contrasta con la situación posterior a 2016, donde, además, el tamaño medio de los ejemplares supervivientes es significativamente menor que los existentes antes de 2015.

Es interesante valorar que la nacra, al colonizar la laguna se encontró con un entorno con cambios estacionales de temperatura, que son más extremos (de  $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en aguas menos

profundas y cambios bruscos de salinidad superficial, debidos a la entrada de agua dulce durante la época de lluvias o de agua mediterránea por tormentas. Esto puede explicar por qué la primera zona de colonización de *P. nobilis* fue la zona más estable y profunda como muestran los modelos. Del mismo modo estos ejemplares crecieron más porque llevaban mucho más tiempo en la laguna y con menos presiones antrópicas (en 2012 se encontró un ejemplar de 80 cm que podría tener 30 años). Tras años de adaptación, *P. nobilis* consiguió colonizar el resto de la laguna, incluso las zonas menos profundas (Giménez-Casalduero et al., 2020).

Según García-March et al. 2020, los individuos de la población del Mar Menor pueden alcanzar tamaños mayores que los de otras poblaciones debido a que suelen estar al abrigo de hidrodinámicas perjudiciales. Aunque esto puede ser válido únicamente para las poblaciones profundas, ya que las superficiales están sometidas a las presiones continuas de los fondeos de barcos, principalmente en verano, y el abundante calado de redes durante todo el año.

La ausencia de grandes ejemplares en el rango de profundidad de 0-3 m, puede estar relacionada con extracciones por parte de pescadores o turistas (Cortés-Melendreras et al., 2021). Durante las últimas décadas, la densa población de *P. nobilis* ha dificultado el calado y arrastre de redes de pesca en algunas zonas. Así mismo, la alta densidad de ejemplares ha sido un atractivo para los turistas que los recogían como curiosidades, aunque este comportamiento es minoritario (Richardson et al., 1999). La desaparición de los ejemplares de mayor tamaño, localizados en las zonas profundas de la laguna, puede haber influido en la disminución de la tasa de reproducción de la población del Mar Menor, aunque este hecho parece estar más relacionado con la drástica disminución del número de ejemplares reproductores que con su tamaño, ya que en las zonas someras también existían reproductores en etapas anteriores a los problemas de eutrofización. Comparando la superficie de ambas áreas potenciales actuales con las estimadas para 2013-2014 (7.385 ha) a la superficie estimada en el último periodo post-colapso poblacional 2020 (200,97 ha), es evidente el retroceso de *P. nobilis* en la laguna.

Todos los procesos de colonización y establecimiento de *P. nobilis* en la laguna se vieron interrumpidos por 2 eventos simultáneos ocurridos en la zona del Mar Menor y el Mediterráneo durante 2016: (1) el dramático episodio de eutrofización de la laguna que provocó una elevada mortalidad de ejemplares; y (2) el evento de mortalidad masiva de *P. nobilis* en el Mediterráneo que provocó la desaparición de los reproductores que eran la fuente original de larvas colonizadoras de la laguna.

Un estudio realizado entre abril y junio de 2017, después de la primera crisis y colapso de eutrofización en el Mar Menor, confirmó la mortalidad de más del 90% de los ejemplares adultos

en la laguna. Se observaron dos situaciones diferentes. En primer lugar, no se encontraron individuos vivos por debajo de los 2,5 m de profundidad, incluso en zonas en las que, hasta 2014, había habido una gran probabilidad de aparición de individuos (Fig. 1.22). Esta profundidad coincide con la descrita por Belando et al. (2017) que confirmaron la desaparición total de macrófitos bentónicos por debajo de una media de 2,5 m de profundidad en toda la laguna, tras el episodio de eutrofización de 2016 y su sustitución por sedimento extremadamente viscoso y anóxico. Es muy probable que, en estas zonas, la pérdida de luz producida por la elevada concentración de fitoplancton en la columna de agua, fuera la responsable de la muerte de los macrófitos, mientras que la descomposición de la materia orgánica dio lugar a intensos procesos de anoxia que provocaron la muerte de la macrofauna, incluida *P. nobilis* (Giménez Casalduero et al., 2020; Sandonnini et al., 2021a).

Sin embargo, en la población localizada por encima de los 3 m de profundidad se estimó una tasa de supervivencia del 10% (Fig. 1.22), superior a la descrita para poblaciones afectadas por *Haplosporidium pinnae* en el Mediterráneo (Vázquez-Luis et al. 2017). Durante 2017 se realizó un análisis de PCR a un individuo de la laguna procedente de Las Encañizadas, zona de conexión entre el Mar Menor y el Mediterráneo, resultando negativo a la presencia de *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al. 2018). En ese periodo no se realizaron análisis de micobacterias ni pruebas de presencia de *Vibrio spp.* No se detectaron células infectivas en la glándula digestiva, ni hemocitosis que pudieran sugerir la existencia de infección (A. Grau com pers). Sin embargo, se observó una infección de las branquias por protozoos ciliados (parásitos oportunistas saprofitos), posiblemente debido a la elevada carga orgánica existente. Las pruebas para detectar la infección por micobacterias y vibrios podrían ayudar a resolver muchas dudas sobre la mortalidad en la laguna.

Al comparar el patrón de distribución de la especie en la laguna, en el año 2021, en relación con el descrito en 2014, se observa una importante regresión y la población se limita a zonas relictas en un estrecho rango de profundidad entre 0,5 y 2,8 m, el 90% de los ejemplares supervivientes se concentran en una estrecha franja entre 1-2 m a una distancia media de 450 m de la costa. Los ejemplares a distancias superiores a 1000 m de la costa se localizan en las islas (El Barón y La Perdiguera). El patrón observado en 2014 era el contrario, con una menor probabilidad de presencia en el litoral que aumentaba con la distancia a la costa y se estabilizaba a 1000 m en un 50 %.

Este patrón de distribución corrobora el límite de profundidad marcado por los episodios de hipoxia y anoxia de la segunda mitad de 2015 y 2016 (Belando et al., 2017; Jiménez-Martínez et

al., 2016). Las condiciones ambientales asociadas al proceso de eutrofización determinan la distribución actual de *P. nobilis* en el Mar Menor; no se han encontrado ejemplares supervivientes por debajo de los 3 m de profundidad, coincidiendo con el umbral de destrucción de la comunidad bentónica tras la crisis de eutrofización (Belando et al., 2017; Ruiz et al., 2020). Estos resultados, que coinciden con los datos obtenidos en el presente trabajo, no coinciden con los resultados publicados en Nebot-Colomer et al., 2021, respecto a la presencia de ejemplares vivos de nacra en 2017, en la zona cero del episodio de eutrofización de 2016. Este episodio provocó la muerte de más del 90% de la población existente en 2014. Los resultados obtenidos de las conchas encontradas de ejemplares de muertos recientes demuestran un cambio significativo en la distribución de la abundancia por profundidad, en comparación con la distribución actual de ejemplares vivos. Mientras que la mayor densidad de conchas muertas (muchas de ellas aún ancladas en el sedimento) se encontraba entre los 5,6 y 6 m. de profundidad, los ejemplares vivos se restringen ahora a zonas por encima de los 3 m.

Es probable que el episodio de eutrofización también afectara a un porcentaje de ejemplares por encima de este umbral de profundidad, ya que allí se encontró el 17 % de conchas de ejemplares muertos. La fragilidad de la concha hace improbable que se encuentren ejemplares enteros pasado cierto tiempo, por lo que estos datos podrían ser un indicador aproximado de cómo las zonas menos profundas se vieron afectadas por este evento de 2016.

Las distancias a los canales que conectan con el Mediterráneo no muestran un patrón de gradiente para la distribución de *Pinna nobilis* en el periodo post-colapso. La probabilidad de encontrar ejemplares en zonas cercanas es del 30 %, muy inferior a la encontrada en 2014 (55 %). Llama la atención que la distancia a la que comienza a aumentar esta probabilidad coincide con las localizaciones poblacionales más importantes de la laguna: Pueblo Cálido (2750 m. DEST), Cabo Romano (6055 m. DEST), Isla del Barón (6580 m. DEST) e Isla Perdiguera (7200 m. DEST). Este patrón con un máximo a 10000 m de distancia, no se detectó en 2014. La probabilidad de presencia observada en las proximidades del Estacio es aproximadamente del 35%, lo que contrasta con los valores superiores al 50% detectados en 2014, pero mientras que en 2014 la estabilización comenzó a disminuir más allá de los 5000 m, en el presente estudio se detecta un aumento de la probabilidad desde los 2500 m (distancia aproximada a la población superviviente de Pueblo Cálido) hasta un máximo en torno a los 6500 m, con dos mesetas coincidentes con la distancia a las poblaciones de la Isla Perdiguera, Cabo Romano y la Isla del Barón.

Las colonias de *P. nobilis* en zonas por encima de los 3 m se mantuvieron estables, con tasas de mortalidad muy bajas. Sin embargo, en el área de influencia de las Encañizadas, la cuenca norte,

se observó un abundante número de ejemplares a principios de 2017 (Giménez-Casaldueiro et al. 2017) que sufrió una importante regresión durante los meses siguientes, finalizando con la muerte de toda la colonia en 2018, probablemente debido a la infección por Haplosporidio.

El periodo comprendido entre octubre de 2016 y enero de 2017 fue el más lluvioso de los últimos 75 años en la región (AEMET, 2022). Las abundantes precipitaciones en el entorno del Mar Menor provocaron un descenso de la salinidad incluso mayor que durante el evento de 2019 (36,13 ups el 5 de abril de 2017) (Fig. 1.25).



**Figura 1.25:** Salinidad media mensual en el Mar Menor durante 2017, 2018 y 2019. La línea discontinua roja indica el umbral superior de infección parasitaria en 39,7 ups y la línea discontinua verde indica el umbral inferior de infección parasitaria en 36,5 ups. Datos obtenidos de la UPCT (2022).

Esta bajada de salinidad coincide con la posible entrada de agua mediterránea desde los canales de las Encañizadas y el Estacio producida por diferentes temporales en enero y febrero de 2017 con un oleaje de hasta 6 m en la boya de Cabo de Palos (MITMA, 2022) ofreciendo una oportunidad para la entrada de *Haplosporidium pinnae* desde el Mediterráneo, esto explica la desaparición de *P. nobilis* cerca de las entradas en esas fechas, tal y como se observó en el censo del presente estudio. Sin embargo, la posible entrada del protozoo estuvo aparentemente controlada por el rápido aumento de la salinidad de la laguna, que alcanzó los 42 ups en menos de tres meses (UPCT, 2022), valores que deberían reducir la viabilidad del patógeno (36,5-39,7 ups) e impedir su expansión (Cabanelas-Reboredo et al., 2019). Esta idea también arroja algo de luz sobre los datos de infestación de algunos ejemplares por *H. pinnae* en 2019, en zonas más alejadas de Encañizadas y Estacio, hacia el sur de la laguna encontrados en Nebot-Colomer et al., 2021.

Además, en la segunda mitad de 2017, se detectó un extraordinario crecimiento de serpúlidos del género *Hydroides* (*H. dianthus* y *H. elegans*), respondiendo a la disponibilidad de materia orgánica en suspensión y bacterioplancton (Sandonnini et al., 2021a, 2021b). Su rápido crecimiento sobre algunos ejemplares de *P. nobilis* fue la causa de un nuevo episodio de mortalidad, ya que bloqueaban sus conchas y colapsaban su capacidad de filtración.

Entre enero y septiembre de 2018, las condiciones ambientales generales en el Mar Menor mejoraron debido a las políticas de control de vertidos agrícolas y a unas condiciones meteorológicas favorables con precipitaciones muy escasas (AEMET, 2022). Sin embargo, entre septiembre y noviembre de 2018, varios eventos pluviométricos que afectaron al Mar Menor produjeron nuevos aportes de nutrientes coincidiendo con el descenso invernal de la temperatura del agua, por lo que no tuvo consecuencias inmediatas de eutrofización, aunque pudo tener un efecto acumulativo.

El primer semestre de 2019 fue seco con la excepción del mes de abril (AEMET, 2022). En la campaña de muestreo de julio se detectó un inicio de eutrofización en la cuenca sur, posiblemente debido a la acumulación previa de nutrientes durante los meses de invierno. En agosto, las abundantes precipitaciones produjeron entradas de nutrientes coincidiendo con temperaturas máximas del agua y un proceso de eutrofización ya activado. Además, se observó una relajación de las medidas de control de vertidos, lo que aceleró el proceso de eutrofización.

Los días 12 y 13 de septiembre de 2019, una Depresión Aislada en Niveles Altos (DANA) afectó a la cuenca del Mar Menor con cantidades de precipitación superiores a 300 l/m<sup>2</sup>, registrándose el récord histórico de precipitación en 24 horas (MITECO, 2019) que provocó una subida del nivel del mar de 80 cm con consecuencias muy negativas por coincidir con el episodio de eutrofización. Esta subida del nivel del mar generó salidas de agua hacia el Mediterráneo a través de las Encañizadas y el Estacio durante un periodo de unos 20 días. Las diferencias de salinidad entre el agua dulce que entró durante las lluvias y el agua de la laguna favorecieron la estratificación de la masa de agua (Romero-Díaz y Pérez Morales, 2021). Se detectó una masa de agua somera, de baja salinidad, con un nuevo proceso de eutrofización en marcha, que se incrementó aún más con el aporte de nutrientes arrastrados por el agua de lluvia, y por otro lado, una masa de agua profunda, de alta salinidad, donde la descomposición de la materia orgánica iniciada meses antes seguía su curso provocando situaciones extremas de anoxia y generación de compuestos tóxicos a partir del metabolismo de las bacterias anaerobias dominantes en esa capa de agua. Una vez equilibrada la salida masiva de agua entre el Mar

Menor y el Mediterráneo, debido a la situación anticiclónica se produjo un periodo de tiempo sin prácticamente intercambio de agua entre ambas masas de agua (Gilabert, J., com pers).

Es probable que la reinfección de individuos en diferentes zonas de la laguna, observada en noviembre de 2019 (Nebot-Colomer et al. ,2021), se debiera a la activación de formas de resistencia del parásito, presentes en el Mar Menor desde su primera entrada en 2017, durante el nuevo episodio de baja salinidad.

En octubre de 2019, un movimiento basculante de esta masa anóxica y tóxica, favorecido por los vientos dominantes, provocó un nuevo evento de mortandad masiva de peces e invertebrados que afectó a la colonia de nacra situada en el "punto cero" de este afloramiento: la Playa de Villananitos.

En agosto de 2021, se detectó un nuevo proceso de anoxia en diferentes zonas del fondo de la laguna, de nuevo relacionado con un exceso de nutrientes en el agua y periodos de eutrofización. En esta ocasión, una situación de hipoxia prolongada afectó a zonas someras próximas a La Manga del Mar Menor, provocando una situación de estrés en las colonias situadas en esa zona con una mortalidad del 14,3% (Cortés et al., 2021).

En cuanto al uso de SDM para caracterizar la distribución espacial de *P. nobilis*, Katsanevakis y Thessalou-Legaki (2009) estiman la densidad de *P. nobilis* en la bahía de Souda utilizando un modelo GAM; Rabaoui et al. (2010) hacen lo propio utilizando modelos GLM y GAM en Túnez, y comparan sus resultados con otros trabajos en el Mediterráneo; en España, Vázquez-Luis et al. (2014) utilizan regresión-kriging para predecir la distribución potencial en el Parque Nacional de Cabrera y Giménez-Casalduero et al. (2020) utilizan RFRK en dos etapas para caracterizar su evolución temporal y distribución espacial en 2003 y 2016 en la laguna del Mar Menor. Hemos visto en este estudio que los estadísticos de bondad de ajuste obtenidos por RFRK indican una mayor precisión que los de los modelos GLM y GAM; así, RFRK es una buena alternativa a los métodos SDMs normalmente utilizados. Los mejores resultados pueden atribuirse a su mayor flexibilidad para ajustar relaciones altamente no lineales (Figs. 1.21 y 1.22) y a la incorporación de la autocorrelación espacial, frente a los métodos puramente globales, lo que puede mejorar la predicción en situaciones en las que la distribución espacial de las especies muestra una alta concentración en zonas localizadas.

Para mantener la viabilidad de la población de nacras en el Mar Menor y lograr su recuperación se han diseñado diferentes actuaciones tanto *in situ* como *ex situ*.

Las actuaciones *in situ* incluyen el seguimiento de la población actual y la vigilancia frente a eventos críticos puntuales que puedan afectar a áreas concretas de su distribución, junto con la caracterización de áreas adecuadas para su supervivencia donde poder translocar ejemplares en peligro, así como el seguimiento de eventos reproductivos y el reclutamiento de juveniles mediante colectores larvarios.

La detección de sucesivos eventos reproductivos anuales junto con la observación de la viabilidad de gametos y diferentes estadios larvarios (obs pers) indica que puede existir un reclutamiento efectivo. Aunque no se han obtenido larvas en los colectores larvarios, se han observado juveniles en diferentes zonas de la laguna. En 2021 se detectó la presencia de un ejemplar (etiqueta: 331 Bis) que posiblemente sea de nuevo reclutamiento. La edad estimada es de aproximadamente 2 años y no fue detectado durante el marcaje del ejemplar nº 331, en 2019 aun estando a menos de 30 cm de este (Cortés et al., 2021).

El deterioro de la calidad ambiental afecta directamente a la efectividad reproductiva. Por un lado, la viabilidad de las larvas se ve limitada en un medio acuático con altas concentraciones bacterianas (Helm et al, 2006) como consecuencia de procesos de eutrofización y anoxia. Por otro lado, cuando el evento reproductivo tiene éxito y los juveniles se asientan, a menudo se ven afectados por la depredación, causada principalmente por gasterópodos como *Hexaplex trunculus* (obs pers).

Entre las actuaciones *ex situ* que podrían considerarse más eficaces para la recuperación de la especie no sólo en el Mar Menor, sino en toda su área de distribución, destacan el establecimiento de protocolos de mantenimiento y reproducción en cautividad, así como la experimentación en protocolos de criogenización, encaminados a conservar en el tiempo gametos, embriones y larvas trocóforas de la especie.

Todas estas acciones encaminadas a la recuperación de la especie no tienen sentido si no van acompañadas de un conjunto de medidas eficaces encaminadas a mejorar las condiciones ambientales de la laguna, que a día de hoy siguen siendo inestables.

Recuperar el Mar Menor prístino de los años 50 y 60 parece una tarea imposible, pero alcanzar el estado ambiental observado en la laguna durante la época dorada de las nacras, en los años 90 y la primera década de este siglo, sólo requiere que política y sentido común vayan de la mano.

## 1.6 CONCLUSIONES

En esta contribución se ha estudiado la distribución espacial de *P. nobilis* desde su entrada en la laguna y posteriores periodos de colonización y expansión hasta la actualidad, incluyendo los factores que determinan su regresión y/o supervivencia.

- El marco de modelización utilizado en este estudio, basado en un modelo RFRK de dos etapas, ha resultado determinante para caracterizar la distribución espacial de las especies como variable de apoyo para la planificación y gestión del uso del suelo.
- Los ejemplares de nacra de mayor tamaño y las concentraciones de mayor densidad se encontraban en las áreas de mayor profundidad en la laguna, antes del colapso ambiental. Podían considerarse como zonas “refugio” protegidas de la presión de las redes de “pantasana” y de la extracción de turistas y furtivos.
- La concentración de grava en sedimento era uno de los factores que determinaba la presencia de ejemplares en el periodo pre-colapso, debido a la necesidad de anclaje mediante el viso de los juveniles en la fase de asentamiento.
- Otro de los factores ambientales determinantes que explican la distribución de la especie en la laguna en los años previos al colapso ambiental de 2016 era la distancia al Estacio y las Encañizadas como vías de entrada de larvas a la laguna procedentes de la población Mediterránea.
- La mortandad masiva producida por el patógeno *Haplosporidium pinnae* en las poblaciones Mediterráneas no afectó en la misma medida a la población lagunar
- Tras el episodio de crisis de eutrofización se produjo una mortandad total de ejemplares por debajo de los 3 m de profundidad
- La talla media de los individuos supervivientes disminuyó de los 41,32 cm a los 33,57 cm.
- En la actualidad, la población estimada no supera los 1.500 ejemplares y el número de ejemplares etiquetados y geolocalizados no llega a 600, por lo que se estima que la mortandad de la especie en la población lagunar desde 2016 supera el 99,9%-
- Se han identificado las diferentes presiones antrópicas que afectan a la población lagunar. La inestabilidad del sistema debido a eventos de eutrofización, el vandalismo, la extracción ilegal de ejemplares sanos y el calado de redes ilegales en zonas de nacra por parte de algunos pescadores, amenazan la supervivencia de la especie en el Mar Menor.
- Tras el colapso ambiental la distribución de especie estuvo marcada por la profundidad, pero con un cambio determinante de patrón en relación al periodo pre-colapso

- La distancia a los canales de conexión paso de ser un factor determinante para la interpretación de la alta densidad de ejemplares a un factor de ausencia de individuos, debido a la mayor probabilidad de entrada del patógeno desde el Mediterráneo.
- Se ha contrastado la mortandad de núcleos poblacionales relacionada con la entrada de agua masiva desde el Mediterráneo en momentos de baja salinidad debido a la entrada del patógeno *H. pinnae*.
- El efecto de la caída de salinidad es determinante para la presencia de la especie. Las soluciones propuestas, como el dragado de los canales de conexión de las golas, podrían provocar una disminución de la salinidad al permitir la entrada de agua del Mediterráneo, lo que favorecería la propagación del patógeno y la desaparición de los ejemplares supervivientes.
- La supervivencia de la especie en el Mar Menor depende de unas condiciones ambientales adecuadas, sobre todo en los factores determinantes como son la salinidad, o concentración de oxígeno, al igual que el régimen de intercambio de aguas con el Mediterráneo. Por lo tanto, la aplicación de las medidas necesarias para garantizar la recuperación de la laguna y la restauración de la población de nacra se contempla como una prioridad.
- Estos resultados obtenidos en la identificación de factores ambientales son determinantes a la hora de identificar los “puntos calientes” de supervivencia de la especie y el umbral de tolerancia de los diferentes factores ambientales a partir de los cuales se produce la muerte de los ejemplares en las zonas que han sobrevivido a la pandemia de *Haplosporidium pinnae*.

-

La supervivencia de la especie en el Mar Menor depende de unas condiciones ambientales adecuadas. Por lo tanto, la aplicación de las medidas necesarias para garantizar la recuperación de la laguna y la restauración de la población de nacra se contempla como una prioridad.



**CAPÍTULO 2. AVANCES EN EL MANTENIMIENTO *EX SITU* DE *Pinna nobilis* L., 1758**

## 2.1 RESUMEN

El trabajo con especies en situación crítica como es el caso de *Pinna nobilis*, requiere una estrategia completa de medidas *in situ* y *ex situ* en el intento de garantizar la viabilidad de la especie en el tiempo. Hay especies en las que resulta sencillo el trabajo *ex situ*, presentando escasos problemas asociados a su mantenimiento. Hay otras en las que el simple hecho de que se mantengan vivas a largo plazo resulta prácticamente imposible y llegar a conocer los factores clave que lo permitan supone un esfuerzo considerable que requiere tiempo, un tiempo que en el caso de especies en peligro crítico es muy valioso. Este es el caso de la nacra. Después de casi seis años de mantenimiento de ejemplares en laboratorio, se comienzan a entender sus necesidades fisiológicas. En este capítulo se han identificado las condiciones ambientales adecuadas que garantizan la ausencia de estrés *ex situ*. Del mismo modo se ha profundizado en los aspectos técnicos necesarios para el mantenimiento de ejemplares en un ambiente de calidad y se está avanzando en el desarrollo de dietas capaces de garantizar los aportes nutricionales correctos que posiblemente sean la piedra angular que proporcione garantías de mantenimiento a largo plazo.

**PALABRAS CLAVE:** *Pinna nobilis* – Sistemas de recirculación - Mantenimiento en cautividad – Acuariología - Desarrollo de dietas – Tratamiento de salinidad.

## 2.1 ABSTRACT

Working with species in a critical situation, such as *Pinna nobilis*, requires a comprehensive strategy of *in situ* and *ex situ* measures to guarantee the viability of the species over time. There are species for which *ex situ* work is simple, with few problems associated with their maintenance. There are others for which simply keeping them alive in the long term is practically impossible, and getting to know the key factors that make this possible is a considerable effort that requires time, time that in the case of critically endangered species is very valuable. This is the case of *Pinna nobilis*. After almost six years of keeping specimens in the laboratory, their physiological needs are beginning to be understood. This chapter has identified the appropriate environmental conditions that guarantee the absence of *ex situ* stress. In the same way, the technical aspects necessary for the maintenance of specimens in a quality environment have been studied in depth and progress is being made in the development of diets capable of guaranteeing the correct nutritional intake, which may be the cornerstone that provides guarantees of long-term maintenance.

**KEY WORDS:** *Pinna nobilis* - Diet development - Captive husbandry - Aquariology - Diet development - Recirculation systems - Salinity treatment.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

La pérdida de biodiversidad global ha llevado a la extinción de cientos de especies, por lo que es necesario abordar acciones de conservación tanto *in situ* como *ex situ* para mitigar las amenazas a las especies consideradas (Gilbert et al., 2017).

En cuanto a las actuaciones *in situ* para la conservación de *P. nobilis*, es de vital importancia el seguimiento de las poblaciones, así como el estudio de sus amenazas, las condiciones idóneas para la supervivencia de los individuos, identificación de las áreas potenciales y conocimiento exhaustivo de su capacidad reproductiva (MITECO, 2022). Por otro lado, en relación con las actuaciones *ex situ*, dada la gran accesibilidad de las poblaciones de nacra, son fundamentales las acciones de divulgación y ciencia ciudadana dirigidas a la ciudadanía, al sector pesquero, turístico o agrícola, para concienciar sobre la importancia ecológica de *P. nobilis* además de implicarlos en su conservación. Otra medida *ex situ* ampliamente utilizada en la conservación de especies tanto marinas como terrestres corresponde a la cría y mantenimiento de ejemplares en cautividad, con el objetivo principal de "ganar tiempo hasta que la amenaza en el medio natural termine" (Gilbert et al., 2017).

Debido a la elevada mortalidad de individuos en el medio natural, la cría y mantenimiento de *P. nobilis* en laboratorio parece ser una de las acciones más importantes para la conservación de la especie. Ante la situación de alta mortalidad de individuos tanto en el Mediterráneo como en la laguna del Mar Menor, se propuso como meta, conservar un stock de individuos en laboratorio. En relación a la población Mediterránea, en 2017 se aprobó una campaña de rescate de ejemplares procedentes de Cataluña, llevándolos a 5 instituciones para su mantenimiento en cautividad, de los cuales hubo una mortandad generalizada a las pocas semanas (Prado et al., 2020c; MITECO, 2022).

Respecto a los ejemplares del Mar Menor, varios individuos se trasladaron a las instalaciones del Acuario de la Universidad de Murcia, con el objetivo de mantener un stock de supervivientes, y rescatar ejemplares en riesgo de supervivencia, debido a diferentes causas. El Acuario de la Universidad de Murcia es un centro de investigación promovido por la Universidad de Murcia que combina la investigación, y las acciones de conservación con la divulgación, la docencia y la transferencia en el Acuario abierto al público en general. El Acuario participa en diversos proyectos dedicados a la conservación de especies y hábitats acuáticos entre los cuales es interesante destacar el "Banco de Especies Protegidas y Singulares del Mar Menor" (S/Ref. Decreto 65//2020) promovido por la Dirección General del Mar Menor, de la Consejería de Agua,

Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente (CARM). En el marco de este último y conjuntamente con los proyectos RECUPERA PINNA financiado por la Fundación Biodiversidad del Ministerio de Transición Ecológica y Cambio demográfica (MITECO) y LIFE PINNARCA (LIFE20-NAT/ES/001265) a nivel europeo, desde 2019 se han trasladado a las instalaciones del Acuario algunos ejemplares de *Pinna nobilis*, procedentes del Mar Menor, debido a la alarmante situación que atraviesa la especie y con objeto de avanzar en el conocimiento de la supervivencia de esta especie.

El cultivo y mantenimiento de bivalvos en laboratorio se ha estudiado y aplicado ampliamente en relación con entornos marinos, fluviales y de estuarios (Dumbauld et al., 2009). Durante muchos años se han puesto a punto cultivos de distintas especies, con el objetivo de restaurar poblaciones en regresión, como la almeja gigante en Filipinas (*Tridacna gigas*) (Gomez y Mingoa-Licuanan, 2006), las almejas de río en España (Nakamura et al., 2019), o la ostra (*Ostrea edulis*) (Colsoul et al., 2021) entre otras. Sin embargo, en comparación con estas especies, *P. nobilis* sigue siendo considerablemente desconocida en este campo. Existen algunos estudios sobre el cultivo de *P. nobilis* en cajas suspendidas en el medio marino, como en el Mar Egeo (Acarli et al., 2011) o en el Adriático (Kožul et al., 2013).

Prado et al. (2020c) estudiaron las tasas de crecimiento y supervivencia de los juveniles en función de la composición de la dieta. Además, Trigos et al. (2018) realizaron la descripción de las primeras fases de desarrollo larvario de *P. nobilis* en condiciones de cautividad. En cuanto a estudios en adultos, existen experimentos a corto plazo como el de Hernandis et al. (2018) en el que mantuvieron nacras en laboratorio durante 71 días, estudiando los cambios en los patrones de apertura de las valvas y Hernandis et al, 2023 aportaron nuevos conocimientos sobre la puesta a punto del proceso de maduración de ejemplares en cautividad. Aun teniendo en cuenta su situación crítica, hasta el momento no hay registros sobre el mantenimiento a largo plazo, ni sobre las condiciones óptimas para ello.

*Pinna rudis*, es una especie perteneciente al mismo género que *P. nobilis*, con la que comparte área de distribución en el Mediterráneo, por lo que puede servir como modelo de estudio para *P. nobilis*. En relación a esta especie, también existen trabajos sobre su cultivo en el medio marino, concretamente en la costa de Alicante (España) (Hernandis et al., 2021b). Sin embargo, la información sobre el mantenimiento en laboratorio también es limitada. Hernandis et al. (2022) estudiaron el Ámbito de Crecimiento (*Scope for Growth*, SFG) y las necesidades alimentarias de *P. rudis* en cautividad, proporcionando la primera estimación para *Pinna spp.* y ofreciendo algunos datos sobre la dieta de los individuos.

Además de la falta de información disponible sobre el mantenimiento de *Pinna nobilis* en cautividad, estos últimos años, se han observado problemas de mantenimiento debido a pulsos de mortalidad relacionados con la infección por patógenos como *Vibrio mediterranei* o *H. pinnae* en las instalaciones (Prado et al., 2020a). Incluso, el desconocimiento de la dieta apropiada, con el perfil nutricional correcto, que satisfaga los requerimientos de la especie y su alta sensibilidad a infecciones relacionadas con condiciones ambientales no adecuadas en los tanques, pueden suponer importantes retos para el mantenimiento en cautividad.

El objetivo de este trabajo es avanzar en el estudio de las condiciones óptimas para el mantenimiento de *P. nobilis* en sistema cerrado y elaborar un protocolo de mantenimiento para esta especie a partir de los estudios realizados tras varios años de conservación de individuos en el Acuario de la Universidad de Murcia. Para ello se van a tratar aspectos técnicos como el diseño del tanque, la selección del sustrato, el tratamiento del agua y otros parámetros ambientales en el sistema.



## 2.3 METODOLOGÍA

### 2.3.1 Diseño de los tanques

En las instalaciones del Acuario de la Universidad de Murcia hay cuatro sistemas en los que se mantienen nacras (PIN1, PIN2, PIN3 y NP4; integrados en el Proyecto Banco de especies del Mar Menor, (Tabla 2.1) todos ellos fabricados en vidrio sellado con silicona. El volumen de los tanques específicos para nacra es elevado (980 litros para todos excepto NP4, con 1400 litros) con el objetivo de mantener con mayor facilidad la estabilidad de los parámetros físicos y químicos en la masa de agua. La relación anchura-altura de los tanques es elevada (Tabla 2.1); de esta forma, al tener una mayor anchura, se crea una mayor superficie de agua que favorece el intercambio de oxígeno con la atmósfera.

Tabla 2.1. Dimensiones y volumen de cada tanque dedicado al mantenimiento de *P. nobilis*.

Tanque	L (cm)	H (cm)	W (cm)	W/H	Volumen (l)	Volumen del Sistema (l)
PIN1	200	70	70	1	980	3695
PIN2	200	70	70	1	980	3650
PIN3	200	70	70	1	980	3680
NP4	200	100	70	0.7	1400	1565

Los tanques PIN1, PIN2 y PIN3 están integrados en tres sistemas diferentes de tratamiento de agua junto con otros dos depósitos, con lo que el volumen de agua del sistema oscila entre 3.600 y 3.700 litros. En el caso del NP4, se trata de un tanque con un sistema de agua independiente, de unos 1.500 litros (Tabla 2.1).

### 2.3.2 Sustrato

En los diferentes sistemas se han utilizado dos tipos de sustrato, atendiendo a su granulometría, procedentes de dos zonas del Mar Menor: la Isla del Barón y Pueblo Cálido. En ambas, la fracción de arena gruesa (partículas entre 2 y 0,5 mm de diámetro) es mayoritaria, seguida de la fracción de grava (>2 mm) (Tabla 2.2). El predominio de los granos de tamaño grueso es muy importante para que el sustrato no se colmate. Además, teniendo en cuenta la ecología de la especie, se sabe que *P. nobilis* necesita partículas gruesas para anclar el biso (Capítulo 1 del presente trabajo). Por otro lado, estos sustratos se caracterizan por tener un porcentaje de materia orgánica (MO) en torno al 2,3% (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2** Granulometría de los sustratos utilizados en los sistemas procedentes de dos localidades del Mar Menor. Escala granulométrica de Wentworth (Wentworth, 1922): Grava (G), Arena gruesa (CS), Arena media (MS), Arena fina (FS) y Limo (S). Porcentaje de materia orgánica (MO) en el sedimento, obtenido mediante el método de calcinación (Barceló et al., 2008; Karlson et al., 2020).

Fracción (%)	Barón	Pueblo Cálido	Media
<b>G (&gt; 2 mm)</b>	16.20	38.44	27.32
<b>CS (2 – 0.5 mm)</b>	80.13	51.50	65.81
<b>MS (0.5 – 0.25 mm)</b>	0,84	6.95	3,89
<b>FS (0.25 – 0.063 mm)</b>	0.00	0.74	0.37
<b>S (&lt; 0.063 mm)</b>	2.84	2.37	2.61
<b>MO (%)</b>	2.77	1.83	2.30

### 2.3.3 Agua

En instalaciones lejos del mar, debido a la limitada disponibilidad de agua de mar de alta calidad, se hace necesario el uso de agua de mar artificial para el mantenimiento de organismos marinos, convirtiéndola en una opción preferente (Harrison y Berges, 2005). Así, el agua utilizada para el mantenimiento de *P. nobilis* es agua artificial, agua filtrada por ósmosis a la que se añade sal artificial en función de la salinidad deseada en el tanque. En este trabajo se ha utilizado sal marina sintética TMC ProReef.

### 2.3.4 Sistemas de filtrado

El diseño del sistema de tanques para moluscos bivalvos debe atender a los procedimientos y mecanismos que garanticen una calidad apropiada del agua y un suministro adecuado de alimento (Kamermans, 2016). La elección del sistema de filtrado para tanques de mantenimiento de bivalvos en circuito cerrado debe tener en cuenta los requisitos de calidad del agua necesarios para garantizar la salud y el buen estado de los ejemplares según la especie seleccionada (Colt y Huguenin, 2002).

Es importante comprender la función de cada elemento de filtración con el objeto de seleccionar la secuencia de filtrado correcta que normalmente incluirá elementos filtrantes mecánicos, químicos y biológicos (Henley et al., 2002). Los tanques del Acuario dedicados al mantenimiento de *P. nobilis* se integran en cuatro sistemas de filtrado (Fig. 2.1), uno para cada tanque (PIN1, PIN2, PIN3 y NP4).

Todos los sistemas de filtrado utilizados, excepto el usado en PN4, están compuestos por una secuencia común en la que se combina filtración mecánica, química y biológica con el uso de esterilización germicida U.V.

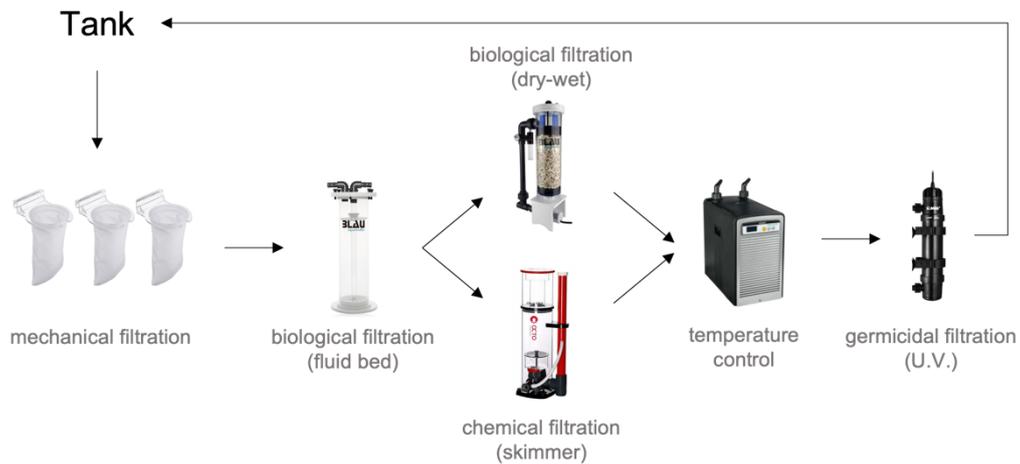


Figura 2.1 Sistema de filtrado y regulación de temperatura (Cortés et al., 2023).

**2.3.4.1 Filtración mecánica:** La filtración mecánica consiste en hacer pasar el agua a través de un material filtrante inerte que retiene partículas de diferentes tamaños suspendidas en el agua del sistema, dependiendo de la porosidad del material (Mac Millan et al., 1994). Es esencial eliminar rápida y eficazmente los residuos sólidos del sistema con el fin de evitar que se degraden y conviertan en compuestos indeseables que puedan contaminar el agua (Turcios y Papenbrock, 2014).

El tipo de filtro necesario depende de i) el caudal de agua a tratar, directamente relacionado con el volumen del sistema, ii) el tamaño de las partículas a eliminar y iii) la transparencia requerida del agua. En algunos sistemas, la filtración mecánica es la fase más crucial y puede determinar la supervivencia de los organismos mantenidos.

En los sistemas diseñados para mantenimiento de nacras en el Acuario UMU se utilizaron cuatro “calcetines” filtrantes de entre 50 y 150  $\mu\text{m}$  en cada uno de los sistemas de filtración.

**2.3.4.2 Filtración química:** Consiste en la captación y eliminación de determinados elementos no deseables, presentes en el agua del acuario, mediante interacción química a nivel molecular con el material filtrante.

Uno de los principales elementos de filtración química ampliamente utilizado en sistemas de recirculación es el *skimmer* y su funcionamiento se basa en el principio de la hidrofobicidad. Las moléculas orgánicas pueden ser hidrofóbicas (como el metano, los aceites, las grasas, el colesterol, el éter, las vitaminas A, D, E, K, los CFC, etc.), hidrofílicas (como el azúcar, la sal, el etileno, el etilenglicol, la glicerina, la glucosa, el amonio, los aminoácidos, las vitaminas B6, B12, la biotina, la niacina, etc.) o anfipáticas, que presentan una parte hidrofóbica y otra hidrofílica (como ácidos grasos, proteínas, detergentes, etc.). El *skimmer* funciona aprovechando la afinidad de la parte hidrofóbica de las moléculas anfipáticas por la zona aérea presente en una burbuja (Tzirita, 2012). Entre los factores importantes a tener presentes para el correcto funcionamiento del *skimmer* se encuentran: i) el tiempo de contacto para la absorción, ii) la formación de la espuma, iii) el estallido de las burbujas y iv) la recogida de la espuma (Delbeek y Sprung, 1994).

Otro ejemplo de elemento filtrante químico muy extendido en los sistemas de recirculación es el carbón activo. El funcionamiento del carbón activo se basa en tres niveles: i) adsorción, donde el carbón activo atrae moléculas con las que interactúa por fuerzas de Vanderwall; ii) absorción, donde se produce una difusión de gases o compuestos en el poro donde tiene lugar una reacción química que los retiene o transforma ( $O_3 \rightarrow O_2$ ); iii) adsorción química, que implica la formación de puentes químicos irreversibles entre el adsorbato y la superficie del carbón (Spotte, 1992).

El carbón activo actúa sobre los compuestos orgánicos disueltos como el carbono orgánico (COD), el ozono, medicamentos e incluso algunos oligoelementos presentes en la composición del agua de mar (Fosså y Nilsen, 1996). Es por ello, que el uso de carbón activo en los tanques del Acuario está sujeto a un protocolo que limita el filtrado de agua por carbón activo a solo dos días al mes. Con esos dos días es suficiente para retirar del agua compuestos indeseables acumulados en el transcurso de los diferentes procesos vitales de los organismos mantenidos.

**2.3.4.3 Filtración biológica:** El proceso de filtración en el que intervienen organismos vivos como elemento filtrante se conoce como filtración biológica. En sistemas cerrados, el proceso de filtración biológica más importante tiene por objeto eliminar los compuestos tóxicos derivados del nitrógeno. La filtración biológica de compuestos nitrogenados consiste en una serie de pasos en los que los compuestos orgánicos de nitrógeno son mineralizados, convertidos en nitrógeno

inorgánico en sucesivas etapas de oxidación, y finalmente eliminados por dos vías: i) Mediante una compleja reacción bioquímica, que implica la liberación final como nitrógeno atmosférico; ii) Asimilados por algas y plantas tras una reducción parcial. Los procesos que tienen lugar en un sistema completo de filtración biológica son Mineralización, Nitrificación, Desnitrificación y Asimilación (Samer, 2015).

La mineralización es el proceso en el que el nitrógeno orgánico se convierte en inorgánico por la acción de los organismos vivos. Ciertos organismos utilizan aminoácidos como fuente de carbono, y el primer paso en la transformación es la separación del grupo amino para formar un ácido orgánico. Diferentes tipos de organismos llevan a cabo estos procesos de mineralización, que incluyen la transaminación (intercambio de grupos amino), la deshidrogenación (formación de amoníaco liberando un ácido orgánico), la descarboxilación (transformación del grupo carboxilo en dióxido de carbono, mientras el aminoácido permanece como grupo amino) y la desaminación (eliminación del grupo amino liberando un ácido orgánico y amoníaco). Cada proceso involucra a un grupo concreto de enzimas y determinados microorganismos pueden llevar a cabo más de un proceso (Jansson y Persson, 1982).

La nitrificación es un proceso clave en la filtración biológica, debido a que consiste en la transformación del amoníaco, un compuesto muy tóxico, en compuestos menos tóxicos. Implica la oxidación secuencial del amoníaco en nitrito y este posteriormente en nitrato. Este proceso lo llevan a cabo principalmente dos grupos de bacterias: las bacterias oxidantes del amoníaco en medio acuático, como *Nitrosospira sp.*, y las bacterias oxidantes del nitrito en medio acuático, como *Nitrospira gracilis* (Abeliovich, 2006). Sin embargo, la eficiencia de la mineralización y nitrificación en lechos filtrantes puede verse alterada por factores que limitan el crecimiento de bacterias nitrificantes o inhiben sus actividades bioquímicas. Algunos de estos factores son la superficie útil con posibilidad de ser colonizada por bacterias nitrificantes, la presencia de tóxicos en el agua, la concentración de oxígeno y CO<sub>2</sub> disueltos, la temperatura, la salinidad y el pH (Thiel, 1989).

La desnitrificación es el proceso de transformación del nitrato a través de una vía reductora, hasta su completa eliminación del sistema. Existen dos rutas de desnitrificación: la ruta desasimilatoria, en la que el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sirve como aceptor final de electrones sin ser asimilado por el microorganismo, y la ruta asimilatoria, que es llevada a cabo por organismos que utilizan NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y N<sub>2</sub> para la biosíntesis celular, plantas y algas, por ejemplo. Los factores que afectan a la desasimilación incluyen fuentes de carbono como el Carbono Orgánico Disuelto (COD), etanol, metanol, glucosa, malato y acetato; los niveles de oxígeno disuelto, ya que inhiben la acción de

las enzimas implicadas en la desnitrificación; el pH y la temperatura. Es probable que la desnitrificación sea tan eficaz como la nitrificación en los mismos rangos de pH y temperatura (Bothe et al., 2006).

Por último, la asimilación la realizan principalmente las plantas y las algas. En los sistemas cerrados es interesante disponer de zonas especialmente acondicionadas como filtros de algas. Se basan en la asimilación y retención en los tejidos vegetales de nitrógeno inorgánico, fósforo, urea, etc. Las algas liberan al medio vitaminas y aminoácidos beneficiosos para bacterias y peces. Por otra parte, puede existir cierto problema en la liberación al medio de entre el 1 y el 5% del carbono fijado durante la fotosíntesis, lo que favorece la eutrofización (Boyd y Tucker, 2012).

La filtración biológica elegida para los acuarios destinados a mantener nacras consta de dos etapas. La primera es un filtro de lecho fluido, en el que la corriente de agua pasa a través de un lecho de arena de una granulometría entre 2 y 3 mm, colonizado por bacterias nitrificantes. La segunda etapa es un filtro seco-húmedo, en el que se produce un goteo constante de agua del sistema procedente del lecho fluido, sobre un sustrato de biobolas. Ambos sustratos, la arena del lecho fluido y las biobolas, son materiales filtrantes óptimos para ser colonizados por bacterias nitrificantes del ciclo del nitrógeno (Spotte, 1992; Delbeek y Sprung, 1994 y Fosså y Nilsen, 1996). La capacidad de oxidación del amoníaco hasta nitrato de los filtros de lecho fluido es superior a la de los seco-húmedos, aunque al ser filtros sumergidos las bacterias aerobias obtienen el oxígeno directamente del agua (Rehman, 2016). En los filtros seco-húmedos hay una constante aireación del agua durante el goteo de una biobola a otra. Al utilizar la secuencia lecho fluido – seco-húmedo, la nitrificación, habitualmente tendrá lugar en la primera etapa (lecho fluido) mientras que, en la segunda etapa, el paso de agua a través de las biobolas ayudará a volver a oxigenar el agua hasta niveles próximos a la saturación (Spotte, 1992). La cantidad de bacterias nitrificantes en el filtro depende de la biomasa que hay en el sistema y la cantidad de alimento que se le proporciona (Fdez.-Polanco et al., 1994) Al contar con las dos etapas de filtración biológica se asegura que en el caso de que aparezca un pico de amoníaco puede haber capacidad de respuesta rápida por parte de las colonias de bacterias que podrían colonizar los sustratos disponibles.

Los sistemas de filtración biológica diseñados para el mantenimiento de nacras aseguraron la calidad de agua ante unos niveles de exigencia altos debidos a la abundante tasa de alimentación requerida.

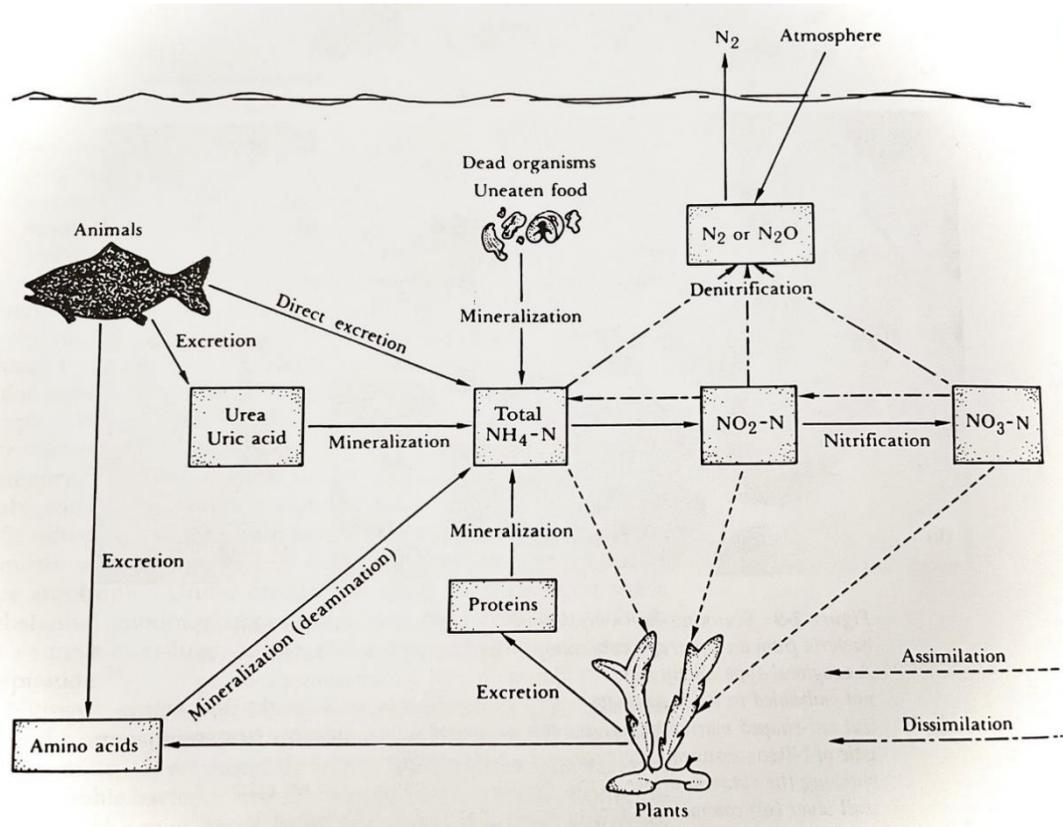


Figura 2.2: Ciclo del Nitrógeno en sistemas marinos. (Spotte,1979).

**2.3.4.4 Filtración germicida:** Ultravioleta es un término utilizado para describir las longitudes de onda comprendidas entre la gama azul-violeta del espectro visible y las longitudes de onda más cortas o rayos X. El espectro ultravioleta se divide en tres bandas distintas: UVa de 315 a 400 nm, UVb de 280 a 315 nm y UVc de 200 a 280 nm. Esta última se conoce como longitud de onda germicida por su capacidad para destruir microorganismos. Los tubos UV utilizados como germicidas en sistemas de recirculación, emiten una amplia gama de UV enfocados a unos 253,7 nm, la longitud de onda más efectiva como germicida (García-Carpintero et al., 2020). Estos garantizan la calidad del agua, libre de patógenos, de origen bacteriano o vírico principalmente. (Yanong, 2003; Xiao et al., 2019)

El funcionamiento eficaz de estos tubos viene determinado principalmente por cuatro factores: temperatura, turbidez, caudal y potencia de la fuente de radiación UV (Spotte, 1992). La temperatura a la que mejor funcionan los filtros germicidas es en torno a los 40°C, siendo ésta la óptima para destruir el ADN de los patógenos (Spotte, 1992). Sin embargo, esta temperatura elevada del agua no puede aplicarse al sistema de tanques, por lo que se trabaja con temperaturas más bajas. En cuanto a la turbidez, hay que tener en cuenta que un exceso de

turbidez en el agua hace que los tubos UV sean menos efectivos (Thiel, 1989). Por otro lado, en cuanto al caudal de circulación del agua, se sabe que cuanto más tiempo tarde el sistema en recorrer el agua, más tiempo estará expuesta a la luz UV y, por tanto, será más efectiva. En este sentido, en función del volumen de los tanques y del caudal de filtración donde se intercala la lámpara germicida, se calcula la potencia en vatios necesaria de radiación UV y se regula el caudal para conseguir los diferentes niveles de esterilización (5 niveles en efecto germicida según TMC para lámparas UV). Cuanto mayor sea la potencia de la lámpara germicida y menor el caudal, más eficaz será el efecto germicida. En las instalaciones del Acuario, los sistemas de mantenimiento de nacras se han diseñado para alcanzar un nivel de esterilización próximo a 4, en el que las bacterias y los virus circulantes se eliminan casi por completo.

La esterilización germicida desempeña una labor fundamental en el mantenimiento de especies con una sensibilidad especial ante bacterias del género *Vibrio*, como puede ser el caso de *Pinna nobilis* (Prado et al.,2020c). En los sistemas diseñados para el mantenimiento de ejemplares en laboratorio se utilizan sistemas de esterilización germicida que incluyen niveles de esterilización entre 3 y 5.

**Tabla 2.3:** Niveles de esterilización germicida según Tropical Marine Centre. <https://www.tropicalmarinecentre.com/es/biosystem/filtration/equipos/sistemas-de-filtrado-por-luz-uv>

Nivel de aplicación	Efecto de esterilización U.V	Tipo y talla de patógenos					Dosis UV (intensidad x Tiempo de exposición)			
		Pequeños a grandes					mJ/ cm <sup>2</sup>	MWsec/ cm <sup>2</sup>	μWsec/ cm <sup>2</sup>	Flujo m <sup>3</sup> /h
		Virus	Bacterias	Algas	Levaduras	Protozoos				
<b>1</b>	Controlado	Algunas sp.	Muchas sp.	Muchas sp.	Algunas sp.	No	<10	<10	<10 000	>6m <sup>3</sup> /h
<b>2</b>	Desactivado	Algunas sp.	Mayoría sp.	Mayoría sp.	Muchas sp.	No	15	15	15 000	4m <sup>3</sup> /h
<b>3</b>	Desactivado	Muchas sp.	Mayoría sp.	Mayoría sp.	Mayoría sp.	Algunas sp.	30	30	30 000	2m <sup>3</sup> /h
<b>4</b>	Letal	Mayoría sp.	Mayoría sp.	Mayoría sp.	Mayoría sp.	Algunas sp.	100	100	100 000	0.6m <sup>3</sup> /h
<b>5</b>	Letal	Mayoría sp..	Mayoría sp.	Mayoría sp.	Mayoría sp.	Muchas sp.	200	200	200 000	0.3m <sup>3</sup> /h

Con el fin de identificar el número de tubos germicidas (55w) necesarios para un sistema concreto, para alcanzar el nivel de esterilización deseado, teniendo en cuenta los patógenos que se desean eliminar es necesario:

1. Seleccionar el nivel de esterilización requerido (Tabla 2.3).
2. Decidir el caudal necesario en m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> para el nivel seleccionado (Tabla 2.3).
3. Dividir el caudal necesario por el caudal por lámpara indicado en la tabla 2.3, para el nivel de aplicación seleccionado.
4. El resultado es el número de lámparas de 55w necesarias.

### 2.3.5 Elementos de control de Temperatura

Los elementos de control de temperatura se incorporan a los filtros. En el caso de los sistemas diseñados para mantener nacras se eligió un medidor controlador de temperatura que actuaba sobre un enfriador con intercambiador de titanio y un calentador de titanio. El uso del titanio permite tener un material inerte como intercambiador de temperatura, sin interaccionar químicamente con el medio liberando posibles elementos tóxicos (Delbeek y Sprung, 1994).

La temperatura es el elemento regulador principal de ciclos vitales en la mayoría de las especies y la posibilidad de programación de ciclos que ofrecen estos sistemas permitió mantener los organismos vivos en condiciones similares a las del medio natural. En los sistemas *ex situ* mantenidos en el laboratorio se reprodujeron los cambios de temperatura anuales observados en el Mar Menor, sin rebasar, los valores estimados como estresantes (<14 y >28°C (Hernandis et al., 2018)).

### 2.3.6 Iluminación

Todos los sistemas de iluminación para el sistema de cultivo de la presente experiencia se han programado de forma que se reproduzca el fotoperiodo existente en el Mar Menor, con sus variaciones anuales. Para ello, se han probado en los diferentes sistemas lámparas tipo HQI, fluorescentes T5 y pantallas LED. (Desde un punto de vista funcional, se ha observado que las pantallas LED reproducen con mayor calidad el fotoperiodo, son más estables y duraderas, incorporan los ciclos lunares y son muy plásticas en cuanto a programación.

### 2.3.7 Movimiento de agua en los tanques

En determinadas especies las corrientes influyen de un modo especial en su comportamiento y en actividades tan necesarias como la alimentación. Esto es de especial importancia en especies de invertebrados sésiles y más aún en los que se alimentan por filtración (Covich et al., 1999). En el caso de *P. nobilis*, las corrientes acercan la comida hasta la cercanía del sifón inhalante en donde tiene lugar la incorporación del alimento que será filtrado a nivel branquial (Santhanam, 2018). Los tanques de mantenimiento de nacras disponen de bombas de recirculación de agua, que además ayudan a disgregar las pseudoheces (restos de partículas filtradas en branquias y no ingeridas, aglutinadas en mucus (Peteiro et al., 2007)), creando un flujo de corriente homogéneo en el acuario. Dentro de cada tanque se han utilizado dos bombas de recirculación,

con un caudal de 3000 l/h cada una. La orientación de los individuos respecto al flujo de agua es de unos 45°, con el fin de que la corriente no les afecte directamente.

### 2.3.8 Control de los parámetros ambientales

Las condiciones ambientales del tanque son de vital importancia para el mantenimiento de los individuos (Babarro et al., 2008). En este sentido, los principales parámetros a considerar son la salinidad, la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto, aunque además se controlan otros como la alcalinidad, los niveles de calcio y magnesio y oligoelementos como el yodo.

En el Mar Menor las variaciones de temperatura son extremas, pudiendo alcanzar valores considerablemente bajos en invierno y muy altos en verano (10 y 32°C respectivamente) (Conesa y Jiménez-Cárceles, 2007), incluso 8 y 32°C (Capítulo 1 del presente trabajo). Teniendo en cuenta la posibilidad de generar un estrés añadido en nacras seleccionadas para los trabajos *ex situ*, si se reproducen las variaciones de temperatura estacionales similares a las que tienen lugar en el Mar Menor, se ha optado por recrear las condiciones de temperatura del Mediterráneo, con sus variaciones estacionales menos extremas.

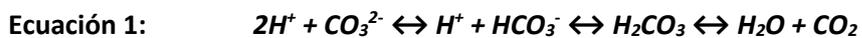
La salinidad es una medida de la concentración de sales inorgánicas disueltas, generalmente expresada en gramos por kilogramo o litro de agua de mar (Kalle, 1971) o *ups* (unidades prácticas de salinidad; UNESCO, 1981). Además, la salinidad se puede determinar a partir de la densidad del agua, en función de la temperatura y la presión (Schmidt et al., 2018). La salinidad es un factor crucial que no solo da forma a las propiedades físicas y químicas del agua de mar, sino que también desempeña un papel importante en la configuración de la fisiología y la ecología de los organismos marinos que dependen de este entorno para sobrevivir y prosperar.

En el mantenimiento de *P. nobilis* en el Acuario, se realizó un seguimiento diario de la densidad del agua, ajustando las variaciones en función de la salinidad de la laguna del Mar Menor, de donde proceden todos los individuos translocados, conservando siempre valores por encima del rango óptimo de infección de *H. pinnae* para mantener las instalaciones libres del patógeno.

El pH es una medida de la concentración de iones de hidrógeno en una solución. Es una propiedad importante del agua de mar que puede tener un impacto significativo en varios procesos químicos y bioquímicos, incluyendo reacciones químicas, condiciones de equilibrio y toxicidad biológica (Marion et al., 2011).

Los niveles de oxígeno disuelto, al igual que los de potencial redox, suelen ser estables en sistemas cerrados como los utilizados en los trabajos realizados con *Pinna nobilis*, sistemas en los que se ha tenido en cuenta una relación de biomasa muy baja y elementos de filtración como los filtros seco-húmedos que adquieren un papel continuo muy importante en el mantenimiento del oxígeno disuelto a saturación (8 mg/l) sin alteraciones por efecto de factores cambiantes como la temperatura o la dosificación de alimento (Spotte, 1992).

La alcalinidad del agua se refiere a su capacidad para resistir cambios en el pH cuando se le añaden sustancias o líquidos ácidos. La alcalinidad del agua suele medirse en meq/l (miliequivalentes por litro) o como mg CaCO<sub>3</sub>/l (miligramos de carbonato cálcico por litro). Alternativamente, puede expresarse como partes por millón (ppm) si hay otras sales disueltas en el agua (Hammer, 2020). Ambos factores están relacionados debido al sistema tampón carbonato-bicarbonato presente en el agua de mar (Katz et al., 2000). En condiciones de pH alto, el equilibrio se desplaza hacia la generación de más HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, mientras que, en condiciones de pH bajo, el CO<sub>2</sub> es más abundante (Ecuación 1). El pH medio del agua de mar, de 8,2, significa que contiene muy poco CO<sub>2</sub> (10 μM a 25 °C) y más del 95% (2,1 mM) de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Hellblom, 1999).



Por otra parte, el agua de mar contiene más de 50 elementos conocidos y numerosos compuestos orgánicos. Dado que la calidad del agua de mar varía a lo largo del año, es necesario controlar las concentraciones de nutrientes y oligoelementos. El carbón activo y el *skimmer* son filtros agresivos que eliminan muchos iones esenciales del agua (Spotte, 1992; Delbeek y Sprung, 1994; Thiel, 1998). Por lo tanto, es necesario mantener el equilibrio iónico en el agua, reponiendo elementos y realizando cambios periódicos de una parte del agua de los tanques para mantener la estabilidad de los parámetros.

El control sobre los niveles de iodo en el agua es importante para ciertos invertebrados por sus implicaciones metabólicas (Delbeek y Sprung, 1994; Fosså y Nilsen, 1996). Del mismo modo las observaciones en la variación de los niveles de iodo en el agua del sistema son interesantes por la idea que ofrece sobre el grado de modificación de los niveles de oligoelementos influidos por determinados elementos de filtración como *skimmers* o filtros de carbón activo.

El mantenimiento de estabilidad iónica en el agua de los sistemas es importante para el correcto mantenimiento de los ejemplares de *Pinna nobilis*. Conocer diariamente las variaciones en la

composición química del agua de los sistemas, implicaría un elevado coste por la necesidad de la realización de analíticas complejas. Por esto, se opta por controlar a diario los parámetros anteriormente citados, sujetos a cambios más importantes por sus implicaciones funcionales, y a protocolizar cambios parciales de agua. Estos cambios de agua ayudan a controlar la acumulación de nutrientes con el paso del tiempo (nitratos y fosfatos, fundamentalmente), al mismo tiempo que ayudan a mantener un equilibrio iónico en los elementos y oligoelementos que van reduciendo su concentración, por acción biológica o bien por la interacción con elementos de filtración.

### 2.3.9 Condiciones de mantenimiento

#### 2.3.9.1 Ejemplares de nacra

Los ejemplares translocados a las instalaciones del Acuario fueron recolectados en diferentes puntos de la franja costera de la laguna o del perímetro de las islas centrales mayores (Fig. 2.3). Estas transferencias tuvieron como objetivo no sólo preservar un stock *ex situ*, sino también rescatar individuos en situación de riesgo, como los individuos localizados a más de 3 metros de profundidad (donde se sabe que los episodios de eutrofización de la laguna son más severos). Cabe destacar que muchos de los individuos trasladados no se encontraban en las condiciones óptimas de salud, por lo que llegaron al Acuario bastante debilitados. Esto ha supuesto un reto adicional para su mantenimiento *ex situ*.

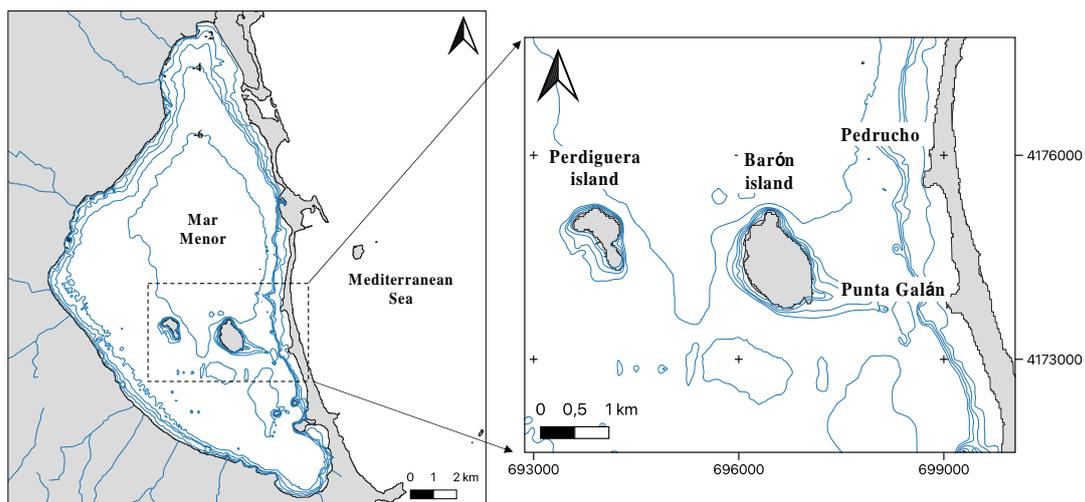


Figura 2.3 Localidades del Mar Menor en las que se han recolectado individuos.

### 2.3.9.2 Disposición de los ejemplares en los tanques

En una primera fase, cada individuo que llegaba al Acuario era sometido a un período inicial de cuarentena. Para ello, los ejemplares se disponían en pequeños tanques aislados, sumergidos en una piscina con agua común, que servía para regular la temperatura en el interior de cada tanque sin necesidad de utilizar calentadores o enfriadores para cada uno de ellos (Fig. 2.4). Los individuos se mantenían en este sistema hasta que se realizaban los análisis genéticos para descartar o detectar *Haplosporidium pinnae*. Estos análisis por PCR requerían la realización de biopsias de manto, según protocolo, para detección de *H. pinnae* (López San Martín et al., 2019).

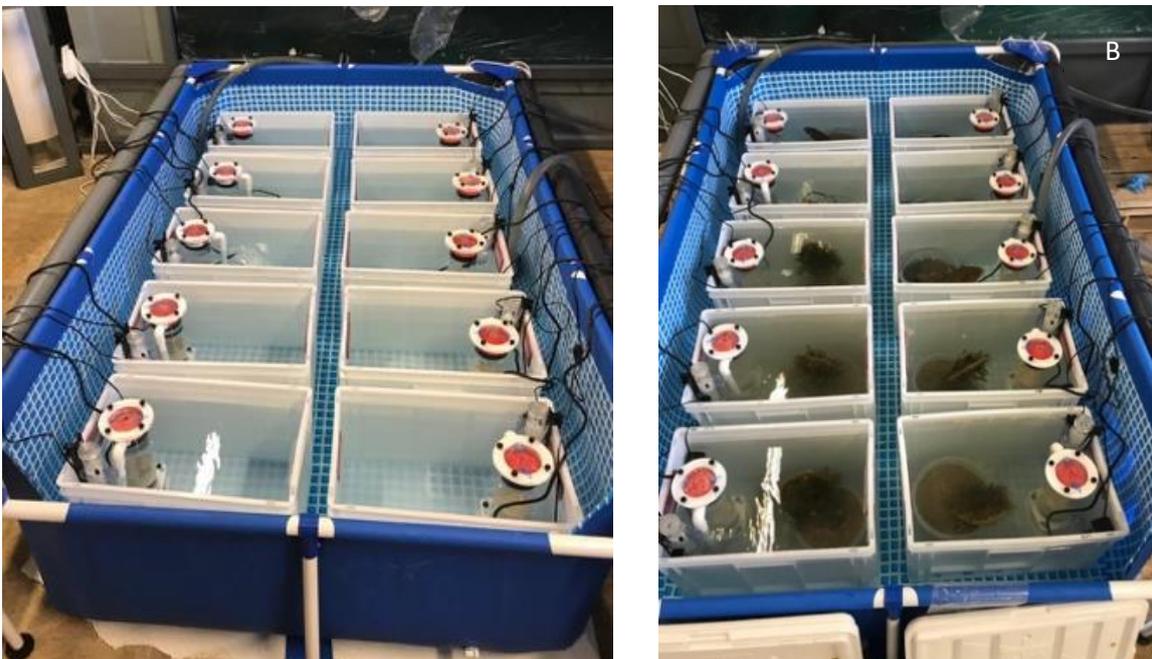


Figura 2.4: Sistema de cuarentena para ejemplares recién trasladados (A: sistema vacío y B: sistema con ejemplares). Esquema de elementos de filtrado en cada sistema (C).

Una vez finalizado el periodo de cuarentena, los ejemplares eran trasladados a los tanques de mantenimiento definitivos, siguiendo la proporción seleccionada de ejemplares por volumen.

Se detectó como las biopsias de manto podían provocar la muerte de los ejemplares por entrada de patógenos a través de las heridas abiertas, concretamente se producían infecciones por *Vibrio mediterranei*.



Tras detectar este tipo de incidencia en los ejemplares *ex situ* se procedió a cambiar el protocolo. Desde ese momento los ejemplares recién llegados se agrupan directamente en sus tanques definitivos y no se someten a ningún procedimiento que implique daño en sus tejidos.

El número óptimo de ejemplares observado se sitúa entre 4 y 5 por tanque, lo que resulta en unos 200-300 litros de agua por cada individuo.

En cuanto a la disposición de los individuos en los tanques, inicialmente eran situados directamente sobre el fondo del acuario, o sobre un pequeño lecho de arena, y mediante un sistema de tubos de PVC se mantenían las conchas en posición vertical (Fig. 2.5 A). Posteriormente se trasladaron a cestas y a cestas perforadas, mucho más estables (Fig. 2.5 B y C).



**Figura 2.5** (A) Sistema de PVC y silicona para mantener los ejemplares erguidos, (B) ejemplar situado en cesta de malla (C) cestas de malla usadas para “plantar” los ejemplares en vertical.

Con el objeto de confirmar el sistema de anclaje más adecuado, se han realizado medidas de potencial redox (Eh) dentro del sedimento de cestas cerradas y cestas de malla, utilizándolo como medida indirecta de las condiciones de hipoxia o anoxia en el sedimento. Como dato control se realizaron medidas de potencial redox en el sedimento de anclaje de una cesta de malla de un ejemplar muerto dentro del acuario.

### 2.3.9.3 Control de epibiontes

Otro aspecto a considerar durante el mantenimiento diario de los ejemplares de nacra es el control de los epibiontes que colonizan sus valvas, pudiendo llegar a afectar a su apertura y cierre. La limpieza se lleva a cabo mediante control biológico de las especies potencialmente

problemáticas y mediante eliminación manual por medio de raspado con cepillos e incluso con elementos cortantes.

### 2.3.10 Alimentación *ex situ* de ejemplares de *Pinna nobilis*

La alimentación de los reproductores de nacras durante su mantenimiento *ex situ* estuvo compuesta por tres especies de microalgas cultivadas en el laboratorio, dos de las cuales eran fijas en la dieta: *Thisochrysis lutea* (T-Iso, Bendif et al., 2013) y *Tretraselmis chuii*; mientras que la otra especie perteneciente al grupo de las diatomeas se alternó entre *Chaetoceros gracilis* y *Phaeodactylum tricornutum*.

Las concentraciones de cada especie variaron en función del tamaño: *Thisochrysis lutea* ( $6 \cdot 10^3$  cel  $\mu\text{l}^{-1}$ ), *Tetraselmis chuii* ( $2 \cdot 10^3$  cel  $\mu\text{l}^{-1}$ ) y *Chaetoceros gracilis* o *Phaeodactylum tricornutum* ( $7 \cdot 10^3$  cel  $\mu\text{l}^{-1}$ ) en los cultivos. La mezcla se realizaba siguiendo una relación 3/3.

La dosis diaria en cada tanque de 940 l. se calculó según García March, 2020, sobre el modelo de aproximación a *Pinna nobilis* de la dieta propuesta por Hernandis et al., 2022 para *Pinna rudis*. Según el estudio se debe alimentar con dosis entre 1,5 y 2,5  $\mu\text{m}^3 \text{ml}^{-1}$  (equivalente a 40.000 – 70.000 cel  $\text{ml}^{-1}$ ). El máximo se elige en relación con el umbral de producción de pseudoheces, (Bayne, 1993).

La dosis diaria se reparte en tres tomas con un periodo de alimentación durante el que se para el sistema de filtrado por dos horas.

La dosis diaria de fitoplancton se complementó con dos especies de zooplancton intentando proporcionara los reproductores un perfil nutricional óptimo rico en ácidos grasos poliinsaturados (cita). Las especies seleccionadas para alimentar a los ejemplares de nacra fueron un rotífero, *Brachionus rotundiformis*, seleccionado por su pequeña talla y un copépodo *Acartia tonsa*, suministrado en forma de nauplio. En el caso de *B. rotundiformis* se alimentó con el alga *Nannochloropsis gaditana*, cuyo perfil nutricional se adecua a los requerimientos tenidos en cuenta. El zooplancton fue incluido en las dosis habituales de fitoplancton a razón de 0,5 unidades  $\text{ml}^{-1}$ .

### 2.3.11 Tratamiento de salinidad y temperatura en ejemplares positivos en *H. pinnae*

En diciembre de 2019 llegaron al Acuario cuatro ejemplares de *P. nobilis*, procedentes de dos poblaciones del Mar Menor, con resultado positivo en PCR para *Haplosporidium pinnae*. Teniendo en cuenta el rango óptimo de salinidad de *H. pinnae* (entre 36,5 y 39,7 ups, Prado et

al., 2022), los ejemplares infectados se sometieron a un experimento de variaciones controladas de salinidad y temperatura del agua durante el mes de enero de 2020, para testar la respuesta de los individuos tras el tratamiento (si mueren, permanecen infectados, pero mejoran sus condiciones de salud, o sobreviven y desaparece el patógeno). La situación de la especie impide ampliar el número muestral partiendo del principio de precaución.

Para este experimento se diseñaron dos sistemas:

Sistema 1: Se aplicó un tratamiento de aumento progresivo de la salinidad del agua hasta alcanzar 45 ups (densidad de 1033 kg/m<sup>3</sup>). En este tanque se colocaron tres de los cuatro ejemplares PCR+.

Sistema 2: sistema de control en el que se mantuvo el mismo valor de salinidad observado en el Mar Menor tras las lluvias torrenciales provocadas por el fenómeno meteorológico tipo DANA (Depresión Aislada en Niveles Altos) en septiembre de 2019 (Capítulo 1 del presente trabajo). La salinidad se mantuvo estable en 39 ups (densidad de 1030 kg/m<sup>3</sup>), con ligeras variaciones. En este tanque se colocó un ejemplar PCR+.

El experimento finalizó a los 60 días y durante los cuales se fue subiendo la temperatura hasta alcanzar una temperatura de 21°C. Posteriormente, se realizaron nuevas PCR, para poder identificar la presencia de *H. pinnae*.

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Supervivencia de ejemplares de *Pinna nobilis* en laboratorio

Alrededor de 43 individuos de *P. nobilis* pasaron por el Acuario, desde 2018, de los cuales 11 sobreviven hasta la fecha (mayo 2023). La Tabla 2.4 recoge los datos de algunos de los individuos que se han mantenido y de los que sobreviven actualmente. La media de supervivencia es de  $19,43 \pm 2,84$  meses, destacando el individuo de 2019 que se ha mantenido más de 48 meses (Tabla 2.5, Fig. 2.6 y 2.7).

Table 2.4. Tiempo de supervivencia en el Acuario hasta 2023.

	Tanque	Origen	Llegada	Longitud (cm)	Fecha de muerte	Años de mantenimiento
P05_19	PIN1	Isla del Barón	Mayo 19		Vivo (May 23)	> 4
P01	PIN2	Isla del Barón	Feb 22	46.5	May 23	1.25
P02	PIN2	Isla del Barón	Feb 22	44	Vivo (May 23)	> 1.25
P03	PIN2	Pedrucho	Feb 22	55	May 23	1.25
P04	PIN2	Pedrucho	Feb 22	48	Vivo (May 23)	> 1.25
P05	PIN2	Pedrucho	Feb 22	45	May 23	1.25
P06	PIN2	Pedrucho	Feb 22	43	May 23	1.25
1	PIN2	Pedrucho	May 22	46.5	May 22	0
2	PIN2	Pedrucho	May 22	45	Jul 22	0.17
3	PIN2	Pedrucho	May 22	43	Vivo (May 23)	> 1
4	PIN2	Pedrucho	May 22	52.5	May 22	0
P3B1	PIN3B	Pedrucho	Sep 21	47 (Sep22)	Vivo (May 23)	> 1.7
P3B2	PIN3B	Pedrucho	Sep 21	45.3 (Sep 22)	Vivo (May 23)	> 1.7
P3B3	PIN3B	Pedrucho	Sep 21		Vivo (May 23)	> 1.7
P3B4	PIN3B	Pedrucho	Sep 21		Vivo (May 23)	> 1.7
P3B0	PIN3B	Pedrucho	Sep 21		May 22	0.67
P3C0	PIN3C	Isla del Barón	Junio 22		Sep 22	0.17
NP4.1	NP4	Isla Perdiguera	May 21	43.5 (Sep 22)	Oct 22	1.42
NP4.2	NP4	Punta Galán	Jul 21	46.5 (Sep 22)	Oct 22	0.25
NP4.3	NP4	Punta Galán	Jul 21	47 (Sep 22)	Vivo (May 23)	> 1.85
NP4.4	NP4	Punta Galán	Jul 21		Vivo (May 23)	> 1.85
NP4.5	NP4	Pedrucho	Nov 21	60 (Sep 22)	Vivo (May 23)	> 1.85

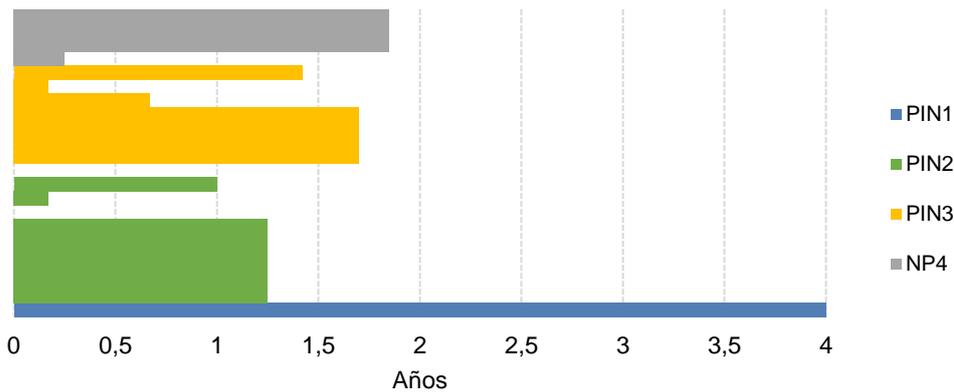


Figura 2.6 Tiempo de supervivencia de ejemplares de *P. nobilis* en el Acuario por sistema.

La estima de la tasa de supervivencia se calcula a partir del mes de permanencia potencial en cada momento: N<sub>1-2</sub>: 21; N<sub>3-15</sub>: 20; N<sub>16-33</sub>: 18; N<sub>34</sub>: 14; N<sub>35-48</sub>: 11. La supervivencia los primeros 15 meses es superior al 80%, produciéndose una caída importante en los meses sucesivos. Sin embargo, desde el mes 19 al 33 los ejemplares que sobreviven se mantienen estables hasta el mes 35 donde vuelve a ocurrir una caída en la tasa de supervivencia (Fig. 2.7).

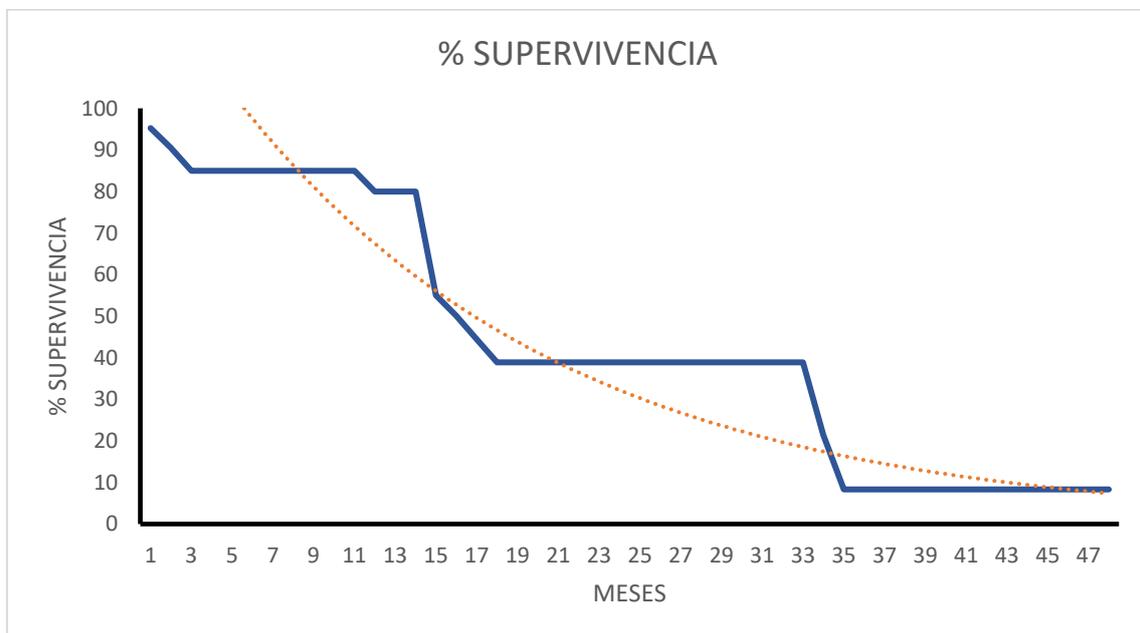


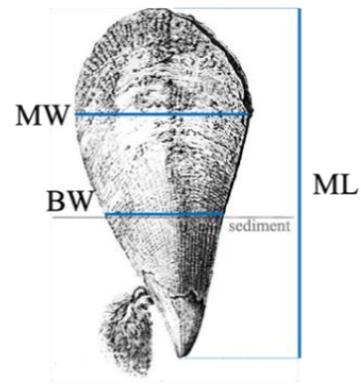
Figura 2.7 Tasa de supervivencia de los ejemplares *ex situ* en el acuario de la Universidad de Murcia por meses.

La Tabla 2.4 también muestra la talla de algunos de los individuos, en el momento de su llegada al Acuario, o algunos meses después. Por otro lado, la Tabla 2.5 recoge la talla y edad actual de

algunos de los individuos que sobreviven en el Acuario en mayo de 2023. En promedio, éstos tienen una longitud máxima de  $45,6 \pm 2,8$  cm, una anchura máxima de  $15,8 \pm 1,7$  cm y  $11,7 \pm 0,9$  años.

**Tabla 2.5** Talla y edad de los individuos de *P. nobilis* presentes en el Acuario en mayo de 2023. Edad estimada a partir de las mediciones siguiendo la ecuación de Rabaoui (2007). ML (longitud máxima), MW (anchura máxima), BW (anchura basal).

Tanque	ML (cm)	MW (cm)	BW (cm)	t (años)
PIN1	42	14	-	10.5
PIN2	49.7	17	-	13
PIN2	46.8	14	-	12
PIN2	45	17.5	-	11.5
PIN3	41.5	14,5	7.5	10.4
PIN3	47	16	7.5	12.1
PIN3	45	15	7,5	11.4
PIN3	48	18.5	10	12.4



$$ML(t) = 104.3 \times (1 - e^{-0.0526(t - 0.714)})$$

Donde ML = longitud total y t= tiempo

El potencial redox del sedimento de las cestas cerradas es considerablemente inferior al de las cestas de malla (Tabla 2.6).

El resultado de los datos obtenidos en la prueba testada en la cesta de malla en la que acababa de morir un ejemplar de nacra, se alcanzó un valor Eh (51 mV) muy similar al de la cesta cerrada, debido a la generación de condiciones anóxicas por descomposición del individuo.

Tabla 2.6. Potencial redox (Eh) medido en los dos tipos de cesta para plantar nacras.

Sedimento	Ejemplar	Cesta	Eh (mV)
Pueblo Cálido	Muerto	Malla	51
Pueblo Cálido	Vivo	Cerrada	58-60
Pueblo Cálido	Vivo	Malla	272
Isla del Barón	Vivo	Malla	311

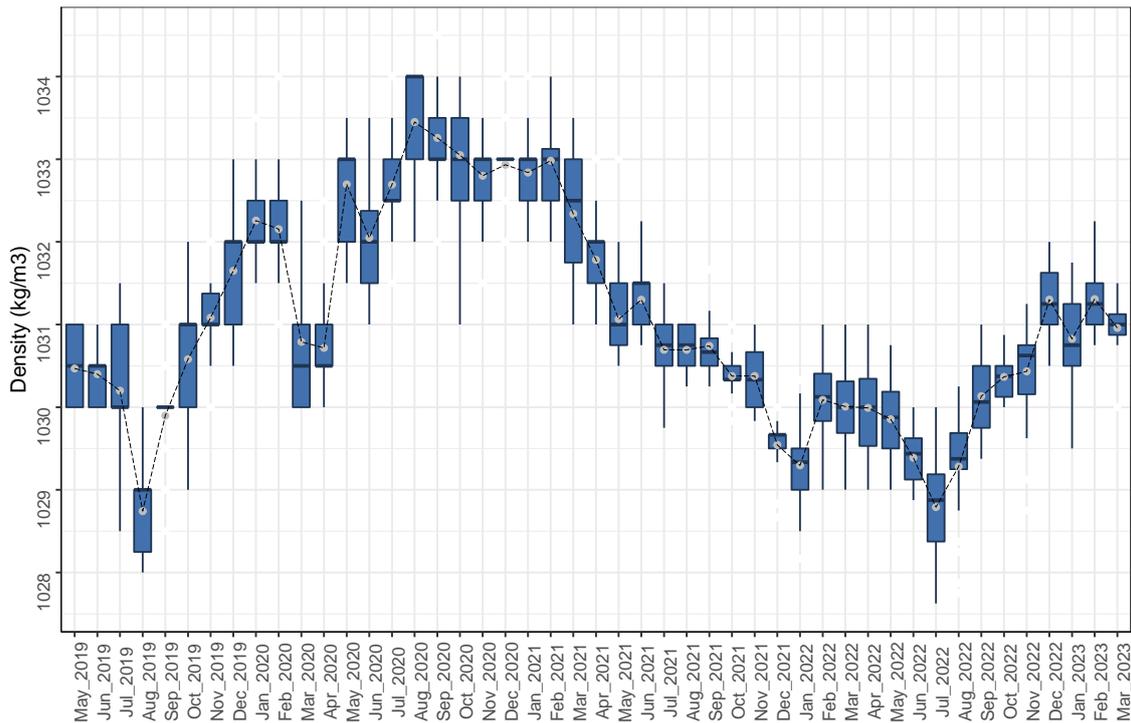
#### 2.4.2 Parámetros ambientales

A continuación, se muestran los principales parámetros ambientales de los tanques desde mayo de 2019 hasta mayo de 2023. Para ello se utiliza la media diaria de los cuatro tanques para cada parámetro, obteniendo un resultado diario. A partir de éste se representan los valores mensuales durante el periodo de estudio (Figuras 2.8-2.11).

Las condiciones medias de mantenimiento consisten en una densidad del agua de  $1031,04 \pm 1,38 \text{ kg/m}^3$ , una temperatura de  $19,17 \pm 2,06^\circ\text{C}$ ,  $3,10 \pm 0,27 \text{ meq/l}$  de alcalinidad y un pH de  $8,12 \pm 0,07$  (Tabla 2.6). De todos los parámetros, el que presenta una mayor desviación es la temperatura; en la Figura 2.9 se puede observar que existe una variación de la temperatura del agua en función de las estaciones. Para cada año, los valores tienden a ser más bajos durante los meses de invierno y más altos en verano.

Tabla 2.6. Media y valores máximos y mínimos de cada parámetro en los cuatro sistemas, entre mayo de 2019 y marzo de 2023. La conversión de densidad a salinidad en función de la temperatura.

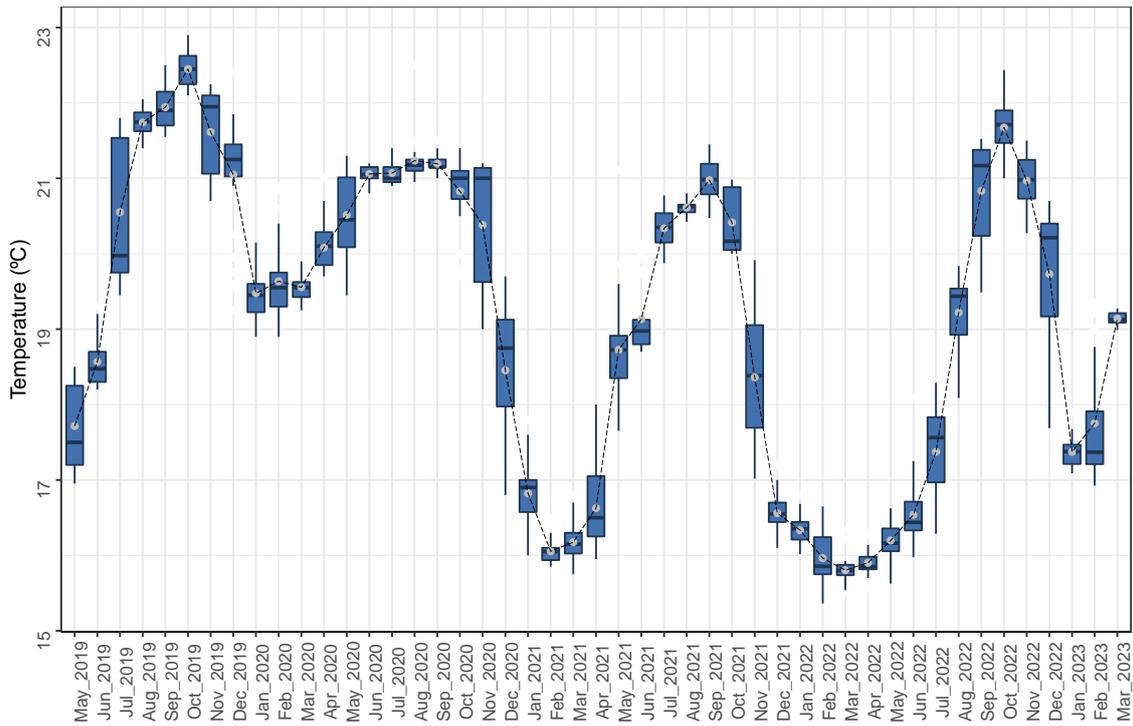
	Densidad ( $\text{kg/m}^3$ )	Salinidad (ups)	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Alcalinidad ( $\text{meq/l}$ )	pH
<b>Med.</b>	$1031.04 \pm 1.38$	42-43	$19.17 \pm 2.06$	$3.10 \pm 0.27$	$8.12 \pm 0.07$
<b>Max.</b>	1034.00	>44	22.90	4.00	8.33
<b>Min.</b>	1028.00	38-39	15.36	2.20	7.84



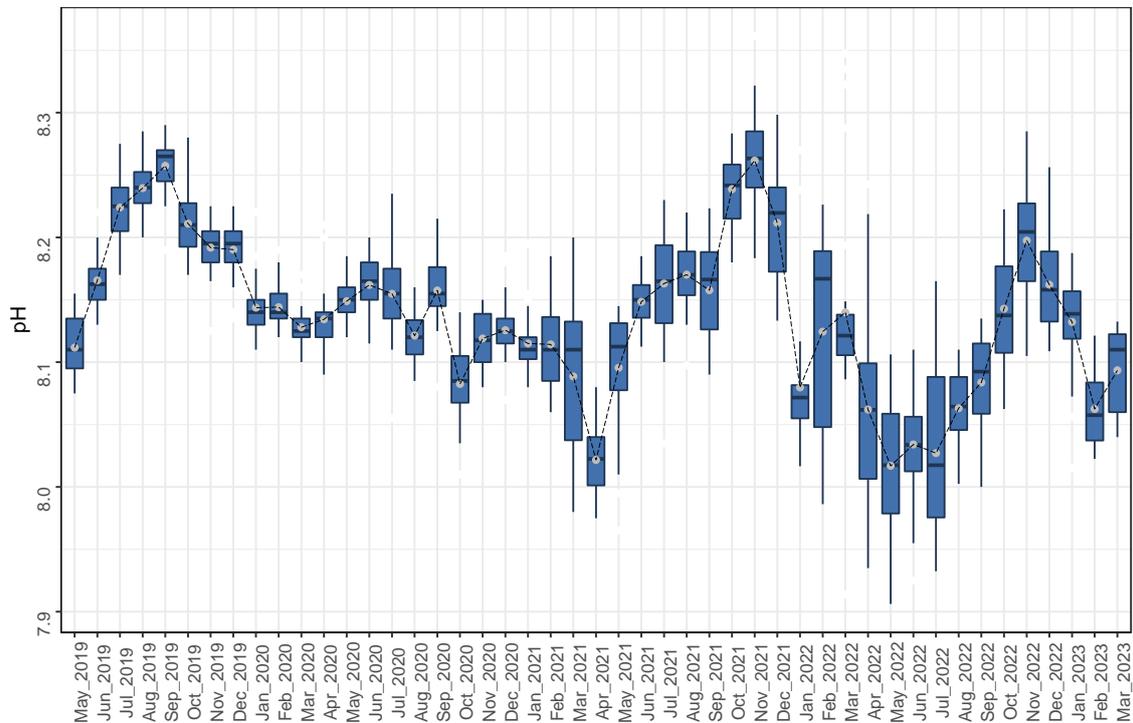
**Figura 2.8** Evolución temporal de la densidad del agua desde mayo de 2019 hasta marzo de 2023. Se representan la media (punto gris), la mediana (línea negra horizontal gruesa), el primer y tercer cuartil (recuadros azules) y la desviación (líneas negras verticales) de la densidad en los cuatro tanques durante cada mes.

El pH y la alcalinidad del agua presentan poca desviación a lo largo de los cuatro años (Tabla 2.6). En cuanto a la salinidad, los valores se aproximan a la salinidad del Mar Menor, situándose la media durante los cuatro años entre 42 y 43 ups. Cabe destacar que la salinidad del tanque no desciende por debajo de 39 ups en ningún momento concreto.

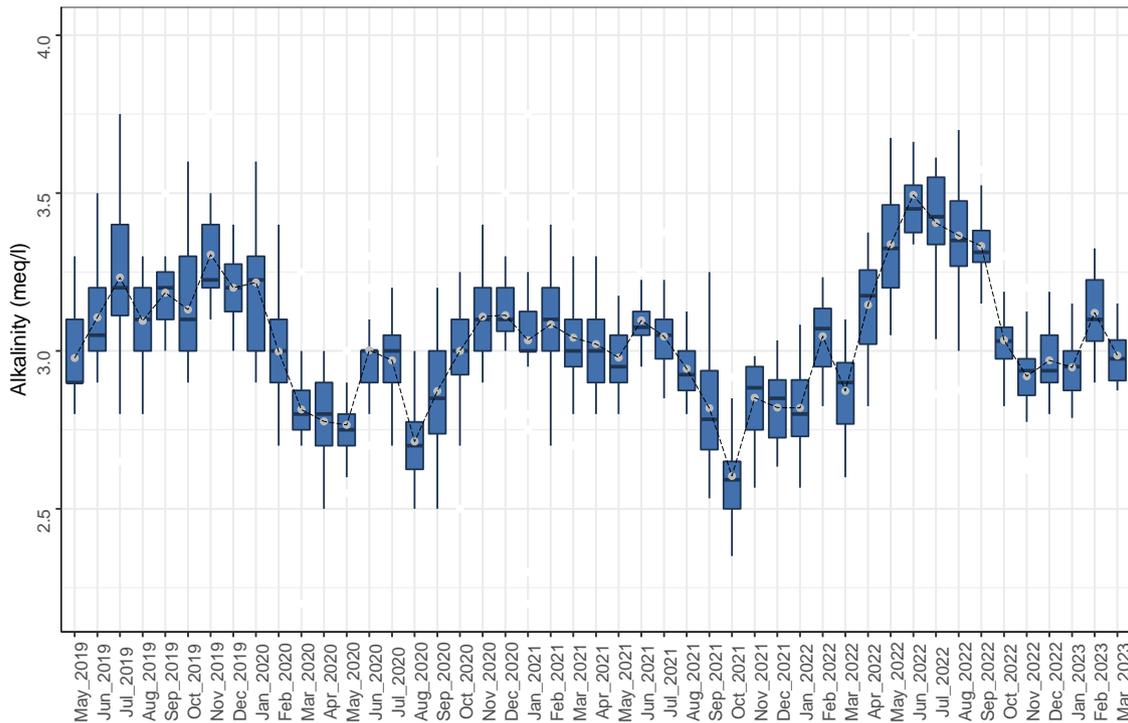
Debido a que en el Mar Menor las condiciones de salinidad y temperatura pueden llegar a ser extremas para la nacra, especialmente la temperatura, se ha tomado como referente de T<sup>a</sup> los valores máximos y mínimos de referencia como umbrales de estrés (14 y 28°C) y como referente de salinidad los valores detectados en el Mar Menor inferiores al máximo (45 ups) pero superiores al óptimo en infección por *Haplosporidium pinnae* (39,6 ups).



**Figura 2.9** Evolución temporal de la temperatura del agua de mayo de 2019 a marzo de 2023. Se representan la media (punto gris), la mediana (línea negra horizontal gruesa), el primer y tercer cuartil (recuadros azules) y la desviación (líneas negras verticales) de la temperatura en los cuatro tanques durante cada mes.



**Figura 2.10** Evolución temporal del pH del agua desde mayo de 2019 hasta marzo de 2023. Se representan la media (punto gris), la mediana (línea negra horizontal gruesa), el primer y tercer cuartil (recuadros azules) y la desviación (líneas negras verticales) del pH en los cuatro tanques durante cada mes.



**Figura 2.11** Evolución temporal de la alcalinidad del agua desde mayo de 2019 hasta marzo de 2023. Se representan la media (punto gris), la mediana (línea negra horizontal gruesa), el primer y tercer cuartil (recuadros azules) y la desviación (líneas negras verticales) de la alcalinidad en los cuatro tanques durante cada mes.

Por otro lado, la Tabla 2.7 muestra los valores de los nutrientes y oligoelementos que se mantienen en los tanques. En el caso de los nutrientes, si se superan los valores máximos indicados, se hace necesario realizar cambios de agua en el sistema.

**Tabla 2.7.** Valores óptimos (op) y máximos (max) de nutrientes, elementos y oligoelementos en los tanques.

<b>Elemento/compuesto</b>	<b>Concentración (mg/l)</b>
<b>Nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (max)</b>	20
<b>Fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (max)</b>	1.5
<b>Calcio (Ca<sup>2+</sup>) (op)</b>	450
<b>Magnesio (Mg<sup>2+</sup>) (op)</b>	1370
<b>Iodo (I<sub>2</sub>) (op)</b>	0.07

### 2.4.3 Control de epibiontes

Las tareas de control que se llevaron a cabo sobre los epibiontes en las valvas de las nacras, resultan eficaces siempre que realicen como protocolo temporal. El uso de *Spurilla neapolitana* para el control biológico de *Aiptasia diaphana*, resultó muy efectivo llegando a controlar todas las anemonas sobre las valvas.

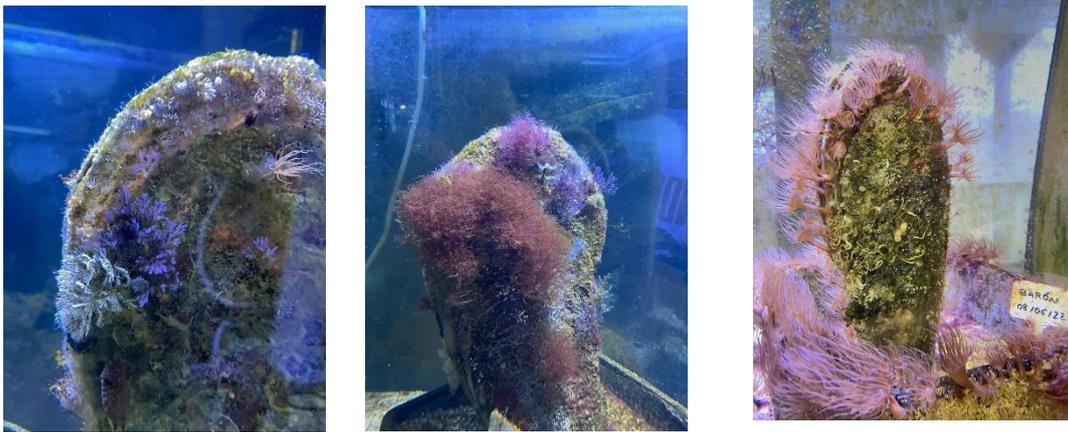
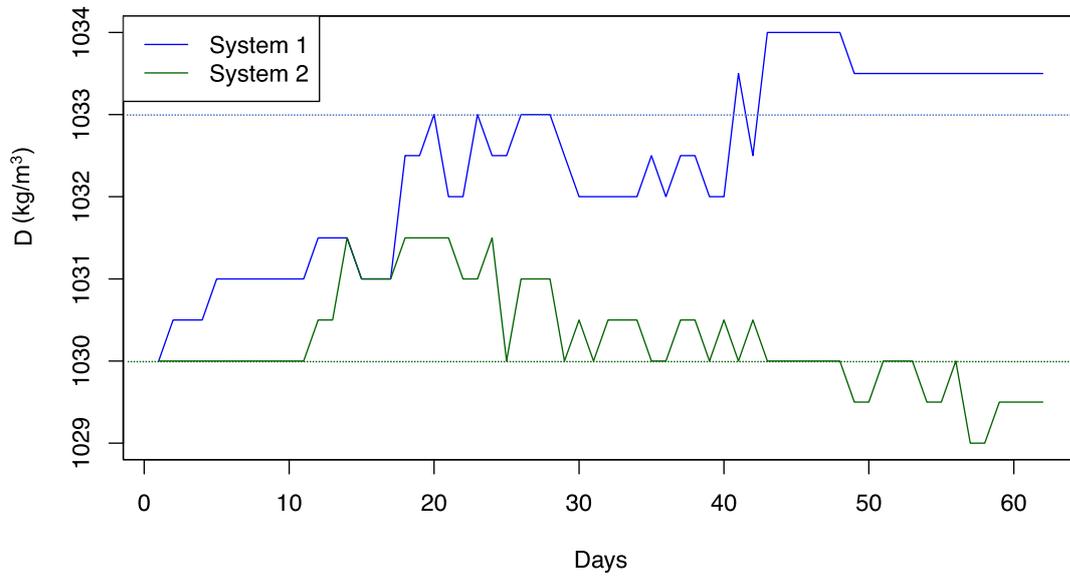


Figura 2.12 Epibiontes de distintas especies sobre ejemplares de nacra en laboratorio.

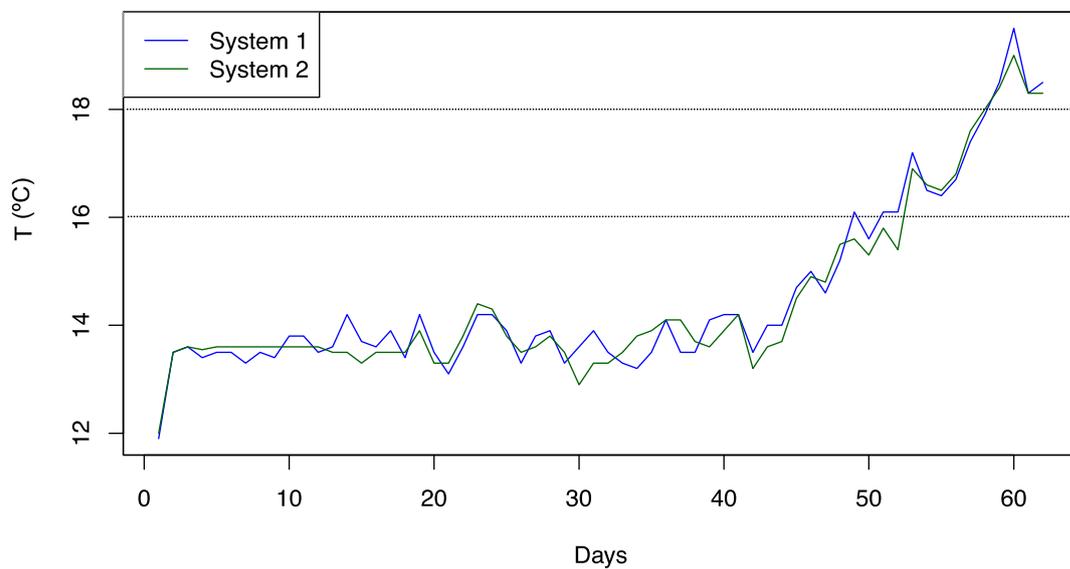
### 2.4.4 Tratamiento de salinidad y temperatura en ejemplares positivos en *H. pinnae*

Una vez que los individuos se aclimataron a los nuevos tanques del sistema, se comenzó a corregir la salinidad en el Sistema 1 (Fig. 2.13). Cuando se alcanzó el valor elegido, la temperatura de ambos sistemas comenzó a subir hasta entrar en el rango de temperatura en el que *H. pinnae* se muestra más agresivo y provoca la muerte del hospedador (Fig. 2.14). Este rango comienza a partir de los 16°C, aunque el mayor grado de afectación por parte del parásito se observa a partir de los 18°C, con una mortalidad esperada del 100%.

El experimento finalizó a los 60 días y se alcanzó una temperatura de 21°C sin observar signos de deterioro por enfermedad en ninguno de los dos sistemas, tratamiento y control y con una supervivencia del 100% de los individuos. El 8 de junio de 2020 se realizaron nuevas PCR en tres de los ejemplares afectados previamente, con resultados negativos para *H. pinnae*, dos de ellos en el sistema 1 y el otro en el sistema 2.



**Figura 2.13** Densidad del agua en los tanques para cada uno de los sistemas durante el experimento. Línea azul discontinua: densidad objetivo para el sistema 1 (1033, alrededor de 45 ups). Línea verde discontinua: densidad objetivo para el sistema 2 (1030, 39 - 40 ups).



**Figura 2.14** Temperatura del agua en los tanques para cada uno de los sistemas durante el experimento. Línea negra discontinua: temperaturas a partir de las cuales *H. pinnae* es más agresivo (16 y 18°C).

## 2.5 DISCUSIÓN

### 2.5.1 Mortalidad de ejemplares de *Pinna nobilis*

Desde un principio, los proyectos y campañas de mantenimiento *ex situ* de *Pinna nobilis*, han estado asociados a una elevada mortalidad de los ejemplares. El mantenimiento de esta especie no está resultando una tarea fácil, a diferencia de otras especies de bivalvos. Los principales problemas han estado relacionados con el tipo de alimento seleccionado para los ejemplares y con infecciones por *H. pinnae* y/u otros patógenos como *Vibrio mediterranei* (Prado et al., 2020a).

El mantenimiento de ejemplares de nacra en el Acuario de la Universidad de Murcia se ha enfrentado a varios problemas. En algunas ocasiones, al rescatar individuos en riesgo por episodios de eutrofización en la laguna y condiciones de hipoxia en el agua, (Capítulo 1 del presente trabajo) los ejemplares rescatados se encontraban en muy mal estado de salud. Tales ejemplares no son un buen punto de partida para trabajar en el desarrollo de protocolos de mantenimiento, sin embargo, es necesario avanzar en el conocimiento con las limitaciones encontradas, aplicando siempre los criterios de conservación de especies en peligro crítico de extinción... y el principio de precaución. Dos de estos ejemplares murieron a las pocas semanas de su traslado, mientras que otros permanecieron vivos durante más de un año, pero con signos evidentes de deterioro de su salud.

Por otro lado, se ha comprobado por PCR que una de las principales causas de mortalidad de ejemplares *ex situ* en el Acuario es la infección por *Vibrio spp.*, que puede permanecer latente en los tanques, en el sustrato o sobre las mismas conchas. En corales, se sabe que bacterias del género *Vibrio* permanecen latentes en los tanques y aprovechan los momentos en los que los organismos no se encuentran en las mejores condiciones de salud o en los que se pueden detectar subidas de Tª por encima de 26°C, infectándolos (Smith et al., 2015). Algo similar puede estar ocurriendo con *P. nobilis*.

La mayoría de las nacras recogidas en 2020 fueron sometidas a biopsias del manto para determinar si estaban infectadas por *Haplosporidium pinnae*. Ninguna de ellas dio positivo para *H. pinnae* por PCR, pero el 70% de los ejemplares biopsiados murieron antes que otros ejemplares recogidos en 2019, en todos los casos se sospechó de la presencia de *Vibrio sp.*, en los casos concretos estudiados se detectó *Vibrio mediterranei* por PCR.

En tres de los tanques estudiados (PIN1, PIN3 y NP4) durante septiembre de 2022 se recogió una muestra de hemolinfa de seis ejemplares, para realizar un estudio de respuesta inmune que será publicado en breve. Pocos meses después, cuatro de esos individuos (todos ellos aparentemente en buenas condiciones de salud antes de la extracción) murieron. Actualmente sobreviven dos ejemplares de los sometidos a extracción de hemolinfa, (Carella et al., 2023). Es posible que las bacterias del género *Vibrio* que estaban presentes en la superficie de la concha o del sedimento, aprovecharan la ocasión para infectar a los individuos.

En el total de nacras sometidas a estrés debido a procedimientos que implican la realización de pequeñas heridas, punciones o cortes, se ha observado una mortalidad superior al 60 %. La pérdida de estos ejemplares está relacionada con infecciones bacterianas por *Vibrio mediterranei*, debidas posiblemente al debilitamiento del sistema inmune observado en mayor medida en los ejemplares mantenidos *ex situ*, aunque también en ejemplares estudiados en el medio natural (Carella, F., Prado, P. com pers).

Por otra parte, también se han detectado problemas con los cambios bruscos de temperatura del agua. En PIN2, en septiembre de 2022 seis reproductores de nacra fueron sometidos a un aumento brusco de la temperatura del agua (pasaron de 15°C a 25°C en dos días). Este calentamiento del agua se realizó con el objetivo de inducir el evento reproductor en el grupo de ejemplares (inducción por choque térmico). En ningún momento se alcanzó el límite de tolerancia de la especie respecto a Tª (31°C), quedando el máximo alcanzado bastante lejos. Algunos meses después, 4 de los individuos murieron (P01, P03, P05 y P06, Tabla 3) posiblemente debido al estrés generado por la brusca subida de temperatura, relacionado con un deterioro del sistema inmune que facilitó la infección por *Vibrio sp.*

### 2.5.2 Control de epibiontes

Algunos de los epibiontes más comunes sobre las nacras en el Acuario corresponden a diversas especies de algas, poliquetos, esponjas del género *Dysidea* y el cnidario *Aiptasia diaphana*. Este último es una anémona muy abundante en el Mar Menor que al crecer cerca de la apertura de las valvas llega a irritar el manto de los ejemplares por acción de sus cnidocitos, por lo que su control es importante para el óptimo desarrollo de las nacras en los acuarios. Para ello, se ha comprobado la alta efectividad como elemento de control biológico del nudibranquio *Spurilla neapolitana*, un depredador natural de *Aiptasia diaphana*, entre otros cnidarios (Ros, 1978). En el caso de que no haya disponibilidad en el medio natural de ejemplares de *S. neapolitana*, el rápido crecimiento de la anémona hace necesario eliminar los epibiontes mediante raspado de

la concha cada cierto tiempo. Esto se debe de hacer con mucho cuidado para no romper las valvas del individuo. El procedimiento ideal es el descrito para el nudibranquio. El raspado de concha es efectivo solo a corto plazo debido a las pequeñas costillas características de la especie observadas en el área superior de la concha y en la zona de crecimiento que retienen pequeños trozos de tejido de las anémonas tras el raspado, uno de los mecanismos preferidos en los cnidarios de reproducción asexual. Al cabo de poco tiempo se puede observar muchas más pequeñas Aiptasias, que crecerán rápidamente.

### 2.5.3 Evolución de los parámetros ambientales

Los parámetros ambientales programados y observados en los tanques se pueden considerar óptimos para el mantenimiento de ejemplares de *Pinna nobilis* soportando cierta tolerancia. Lo ideal para llegar a esta conclusión hubiese sido someter a los ejemplares a diferentes grados de variación en cada parámetro, observando su respuesta para afirmar sin lugar a dudas los rangos óptimos de mantenimiento de la especie. Dado el estado de la población de nacra en el Mar Menor, se considera una prioridad no someter a estrés a ninguno de los ejemplares *ex situ*. De este modo se han considerado óptimos los parámetros en los que la especie desarrolla su ciclo de vida en el medio natural, y se han reproducido *ex situ*. En todo momento las variaciones observadas en parámetros como por ejemplo salinidad o temperatura han tenido relación con variaciones que se han podido observar en el medio natural.

La temperatura es probablemente el principal factor que afecta al metabolismo de los invertebrados (Newell y Branch, 1980). Este factor afecta directamente a la capacidad de filtración del animal e indirectamente a procesos vitales como el crecimiento, la respiración, el aclaramiento o la reproducción (Griffiths y Griffiths, 1987; Anestis et al., 2007; Specht y Fuchs, 2018). Existen pruebas de que la temperatura puede interactuar con factores físicos o con patógenos, pudiendo generar estrés y/o enfermedades en *P. nobilis*. Las altas temperaturas pueden facilitar la mortalidad relacionada con patógenos, como *Vibrio mediterranei* (Vattakaven et al., 2006). Prado et al. (2020c) encontraron mortalidades significativas relacionadas con la subida de la temperatura y demostraron que la reducción de la temperatura podría mitigar los efectos de los patógenos. Recientemente, Lattos et al. (2023) analizaron mortalidades masivas en islas griegas; todos los parámetros bioquímicos y el análisis filogenético sugieren un cambio de orden de actuación en el que la infección por patógenos aumenta la sensibilidad de *P. nobilis* a la temperatura del agua, provocando posteriormente mortalidades masivas. *P. nobilis* es una

especie euriterma con temperaturas mínimas y máximas tolerables de 16°C y 25°C, respectivamente, y su temperatura óptima de crecimiento es de 20°C (Trigos et al., 2015).

En el Mar Menor las variaciones de temperatura son extremas, pudiendo alcanzar valores extremadamente bajos en invierno y muy altos en verano (10 y 32°C respectivamente) (Conesa y Jiménez-Cárceles, 2007), incluso 8 y 32°C (Capítulo 1 del presente trabajo). Estas variaciones pueden suponer un factor de estrés para los individuos de *P. nobilis*, en condiciones alteradas, como experiencias de mantenimiento “*ex situ*”, o incluso malas condiciones ambientales *in situ* relativas a otros parámetros, aunque en buenas condiciones ambientales su tolerancia y adaptación a estos cambios es adecuada.

Los sistemas de control de temperatura hicieron posible mantener la estabilidad térmica necesaria en los tanques y programar los cambios para reproducir los ciclos estacionales, incluso se pueden llegar a planificar modificaciones específicas que favorezcan los procesos de inducción a la reproducción, necesarios en ocasiones para conseguir el desove, aunque en las experiencias descritas en este trabajo se seleccionó un ciclo reproductor naturalizado.

La concentración de sales disueltas en el agua de mar influye en el equilibrio osmótico, las tasas metabólicas, el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de los organismos marinos (Matozzo y Marin, 2011). *Pinna nobilis* se encuentra comúnmente tanto en ambientes costeros como estuarinos (Zavodnik et al.1991; Richardson et al.1999), con un amplio rango de salinidades. En el Mediterráneo, las poblaciones de mar abierto de *Pinna nobilis* experimentan típicamente pequeñas fluctuaciones de salinidad de alrededor de 36,8-38,4 ups (Hernandis, 2018). Sin embargo, las poblaciones de esta especie en lagunas costeras y bahías estuarinas pueden experimentar condiciones de salinidad diferentes. En estudios recientes, se han observado abundantes poblaciones de *Pinna nobilis* sobreviviendo en zonas con niveles de salinidad que alcanzan hasta 45 ups (Capítulo 1 del presente trabajo) o con valores inferiores a 30 ups (Prado et al., 2021). De los resultados obtenidos se deduce que *P. nobilis* tiene un cierto nivel de resiliencia frente a las variaciones de salinidad y puede ajustarse eficazmente a las fluctuaciones de salinidad en los ecosistemas lagunares. Sin embargo, estos cambios en la salinidad pueden tener un impacto significativo en el tamaño, distribución, composición por edades y susceptibilidad al estrés de sus poblaciones. Por otro lado, la importancia de la salinidad para esta especie no debe vincularse únicamente a su rango óptimo de tolerancia. Es importante señalar que existe una estrecha relación entre el grado de afección y la mortalidad derivada de infecciones por el protozoo *H. pinnae* y los niveles de salinidad del medio (Prado et al., 2021). Las investigaciones realizadas en el Mediterráneo occidental sugieren que el patógeno

causante de los eventos de mortalidad masiva de *P. nobilis* se propaga a través de las corrientes superficiales, alcanzando el óptimo de infección a niveles de salinidad que oscilan entre 36,5-39,7 ups, que son característicos de mar abierto (Cabanelas-Reboredo et al., 2019). Las poblaciones de *P. nobilis* en áreas confinadas, como lagunas o estuarios, han sido capaces de sobrevivir a los eventos de mortalidad masiva desde 2016 debido a sus salinidades significativamente más altas o bajas en comparación con mar abierto (Catanese et al., 2018; Kersting et al., 2019; García-March et al., 2020; Katsanevakis et al., 2021; Prado et al., 2021). No obstante, los cambios en los niveles de salinidad en estas zonas podrían seguir dando lugar a la entrada del parásito, como se evidencia en la laguna del Mar Menor (Capítulo 1 del presente trabajo).

En los hábitats de mar abierto, las condiciones de pCO<sub>2</sub> y pH se consideran relativamente estables (Hofmann et al., 2011). En el agua de mar (32-37 ups), la alcalinidad está fuertemente correlacionada con la salinidad, oscilando entre 2200 y 2400 µeq/l para la mayoría de las regiones oceánicas, con una relación casi lineal (Millero et al., 1998). El valor del pH es cercano a 8,2 pero puede oscilar entre 7,5 y 8,5 dependiendo de las condiciones locales. Los cambios repentinos y significativos en los niveles de pH y alcalinidad pueden crear un entorno estresante para los organismos que viven en la zona afectada (Gazeau et al., 2013). Estos cambios pueden causar daños importantes a estos organismos, pudiendo provocar su muerte o hacer que emigren fuera de la zona en busca de condiciones más favorables. Estudios experimentales han confirmado que una disminución del pH del agua de mar tiene efectos negativos sobre diversos invertebrados marinos, entre ellos los bivalvos y los erizos de mar, que tienen una capacidad limitada para regular el pH en sus áreas de calcificación. Esto los convierte en algunos de los organismos más vulnerables a la acidificación de los océanos, como confirman dos estudios de metaanálisis (Hendriks et al., 2010; Kroeker et al., 2013), junto con los corales hermatípicos en arrecifes de coral (Kornder et al, 2018; Mac Neil et al, 2004). En el caso de la calcificación de las conchas, los bivalvos utilizan minerales de carbonato cálcico, como la calcita y el aragonito. Si el nivel de pH del agua disminuye, se podría alterar la capacidad de estos animales para formar sus conchas y esqueletos, lo que podría afectar tanto a las especies acuáticas salvajes como a las cultivadas en sistemas abiertos (Matozzo y Marin, 2011). Aunque estudios posteriores sugieren que estos efectos pueden ser más complejos y no implican una respuesta tan clara (Thomsen et al., 2015). En estudios recientes en los que se recogieron datos de pH, se ha descrito que el rango de pH al que está expuesta *P. nobilis* en su hábitat natural oscila entre 7,7 y 8,3 (Marrocco et al., 2018; Cappello et al., 2019). Sin embargo, al igual que otros factores abióticos, las poblaciones

de *P. nobilis* en zonas cerradas como lagunas costeras y estuarios están expuestas de forma natural a un rango más amplio de variaciones de pH, 7,3-8,5 (Prado et al., 2021).

Por otra parte, fueron controlados los iones calcio, magnesio y yodo. La concentración adecuada de calcio es esencial para el mantenimiento de bivalvos como las nacras, ya que guarda una estrecha relación con la formación de carbonato cálcico y el crecimiento de las valvas formadas por calcita y aragonito (García-March, 2005). El magnesio es otro elemento que interactúa con el calcio, carbonatos y bicarbonatos en la formación de conchas en bivalvos (Planchon et al., 2007 y 2013).

El comportamiento de los bivalvos y sus ciclos vitales se ven claramente afectados por las fluctuaciones de luz y oscuridad a las que están sometidos (Jones, 1983). Los sistemas de iluminación de los tanques de *P. nobilis* tienen como objetivo reproducir el fotoperiodo existente en el medio natural y, de esta forma, favorecer la correcta evolución de los ciclos circadianos de la especie. Respecto a los ritmos circadianos de *P. nobilis*, se ha detectado un patrón cíclico en la apertura de las valvas en función de la incidencia de la luz solar y/o lunar, tanto en individuos en el medio natural (García-March, 2005; García-March et al., 2016), como en condiciones de laboratorio (Hernandis et al., 2018).

#### 2.5.4 Posición de los ejemplares

Se sitúan los ejemplares en cestas en posición vertical debido a que la captación de alimento por filtración en los tanques con movimiento de agua es mucho más homogénea. La primera opción fue situarlos sobre el sustrato, pero con el tiempo no se consideró la óptima, debido a que acababan anclándose con el biso al sustrato, dificultando las labores de mantenimiento en perjuicio de los ejemplares.

Es importante tener en cuenta la relación entre la potencia del sustrato y su granulometría para determinar su capacidad de generar zonas anóxicas en un sistema cerrado (Spotte, 1992). La mejor opción es anclar los individuos en cestas llenas de sustrato, pero no en cestas cerradas (ya que se volverían a generar condiciones anóxicas), sino en cestas de malla (Fig. 2.5), que permiten una mayor circulación del agua a través de las partículas de sedimento.

### 2.5.5 Tratamiento de salinidad y temperatura en ejemplares positivos en *Haplosporidium pinnae*

En relación al experimento de salinidad, se esperaba un claro deterioro del individuo control ya que se mantuvo una baja salinidad (óptima para *H. pinnae*), además de esperar una muerte rápida en temperaturas elevadas. Por otro lado, en el sistema 1 se pretendía comprobar si los cambios de salinidad pueden ser un tratamiento eficaz para los individuos infectados. En este sentido, se ha observado que, a pesar de una temperatura elevada, la alta salinidad del tanque podría impedir el desarrollo del patógeno. En el sistema control, la salinidad es menor, pero es cierto que sigue siendo alta, estando en el límite superior del rango óptimo de *H. pinnae*, por lo que es posible que se observe un deterioro del individuo con salinidades más bajas. Es posible que los análisis de PCR realizados a los individuos antes de los tratamientos dieran algún falso positivo, aunque es difícil que esto ocurra para los cuatro individuos. Suponemos que al menos uno de ellos estaba infectado, por lo que las PCR negativas posteriores confirman la posibilidad de utilizar tratamientos de salinidad con ejemplares positivos para *H. pinnae*, aunque deben realizarse más pruebas y estudios. Además, hay que tener en cuenta la procedencia de los individuos antes de realizar un tratamiento para aumentar la salinidad del agua. Los individuos de este estudio, procedentes del Mar Menor, estaban adaptados a altas salinidades, pero otros individuos, como los del delta del Ebro, podrían no llegar a soportar estas condiciones de salinidad.



**Figura 2.15:** Dos de los ejemplares en la experiencia de tratamiento de salinidad y temperatura. Al tratarse de ejemplares jóvenes su tasa de crecimiento es mucho más alta que la de ejemplares adultos. Obsérvese el crecimiento entre 01/08/2020 y 03/11/2020.

## 2.6 CONCLUSIONES

- A pesar de los numerosos retos encontrados durante el proceso de puesta a punto de los protocolos para el mantenimiento *ex situ* de ejemplares, algunos han sido mantenidos durante cuatro años.
- Se han identificado algunas de las condiciones ambientales apropiadas para el mantenimiento de ejemplares de nacra *ex situ* y los sistemas técnicos adecuados para conseguirlas.
- El uso de Skimmers en los sistemas de recirculación es determinante en el mantenimiento de la calidad del agua teniendo en cuenta la alta tasa de alimentación requerida por los ejemplares de nacra.
- La esterilización germicida juega un papel muy importante en el mantenimiento de la calidad de agua de los tanques y se contempla la posibilidad de incrementar la potencia germicida hasta alcanzar un nivel 5 de esterilización, como una medida adecuada para reducir la incidencia de infecciones por bacterias del género *Vibrio*.
- Todavía quedan muchos vacíos de conocimiento para conseguir un mantenimiento 100% exitoso y favorable para la especie, incluyendo la mejora de las dietas para el correcto desarrollo de los individuos.
- La alimentación con zooplancton incrementa la viabilidad en el tiempo de los ejemplares mantenidos.
- El crecimiento de los ejemplares *ex situ* parece ser en la mayoría de los casos muy similar al observado *in situ*, más lento en adultos y mucho más abundante en ejemplares de menos de 3 años.
- El control biológico de epibiontes como las anemonas que pueden afectar al borde del manto de las nacras por su efecto urticante, por medio de *Spurilla neapolitana* es muy efectivo.
- El control de las infecciones de *Haplosporidium pinnae* en ejemplares de *Pinna nobilis* del Mar Menor, mediante cambios de salinidad parece ser efectivo, aunque requiere de nuevos trabajos para confirmarlo.



**CAPÍTULO 3: AVANCES EN PROTOCOLOS DE REPRODUCCIÓN DE**  
***Pinna nobilis* L., 1758**

### 3.1 RESUMEN

Uno de los objetivos clave en proyectos *ex situ* de recuperación de especies en peligro, dirigido a evitar el declive de la especie y su extinción, se basa en establecer protocolos de reproducción que permitan obtener stocks de ejemplares viables, con capacidad para ser integrados en trabajos de repoblación *in situ*, si el caso lo requiere.

Teniendo en cuenta la situación de *Pinna nobilis* en su hábitat natural, catalogada en peligro crítico, conseguir la reproducción *ex situ* de la especie sería de vital importancia. Al igual que el resto de miembros de la familia Pinnidae, no se trata de una especie sencilla de mantener o reproducir y en este momento se está invirtiendo mucho tiempo y esfuerzo, por parte de diferentes grupos de investigación en el entorno del Mediterráneo, con el objeto de desarrollar los protocolos de reproducción que permitan asegurar el futuro de la especie.

En el presente capítulo se muestran los avances llevados a cabo en la reproducción de *Pinna nobilis* a partir de diferentes eventos reproductores que han tenido lugar en las instalaciones del Acuario de la Universidad de Murcia. Se han realizado estudios sobre densidad larvaria óptima en cultivos, dietas apropiadas, etología larvaria y por supuesto una caracterización de las diferentes etapas de desarrollo embrionario y larvario con cronogramas de desarrollo comparados. Aunque todavía no se ha alcanzado el asentamiento de juveniles y semilla de *Pinna nobilis*, si se observan claros avances entre sucesivos eventos estudiados.

**PALABRAS CLAVE:** *Pinna nobilis* – reproducción *ex situ* – desarrollo larvario- cultivos – Alimentación – Sistemas de cultivo larvario.

### 3.1 ABSTRACT

One of the key objectives in *ex situ* projects for the recovery of endangered species, aimed at preventing the decline of the species and its extinction, is based on establishing reproduction protocols that allow viable stocks of specimens to be obtained, with the capacity to be integrated into *in situ* repopulation projects if the case so requires.

Considering the situation of *Pinna nobilis* in its natural habitat, catalogued as critically endangered, achieving *ex situ* reproduction of the species would be of vital importance. Like the other members of the Pinnidae family, this is not an easy species to maintain or reproduce, and a great deal of time and effort is currently being invested by different research groups in the Mediterranean area, with the aim of developing reproduction protocols to ensure the future of the species.

This chapter shows the progress made in the reproduction of *Pinna nobilis* from different breeding events that have taken place in the facilities of the Aquarium of the University of Murcia. Studies have been carried out on optimal larval density in culture, appropriate diets, larval ethology and, of course, a characterisation of the different stages of embryonic and larval development with comparative developmental chronograms. Although the settlement of juveniles and seeds of *Pinna nobilis* has not yet been achieved, clear progress can be observed between successive events studied.

**KEY WORDS:** *Pinna nobilis* - *ex situ* reproduction - larval development - culture - feeding - larval culture systems.

### 3.2 INTRODUCCIÓN

El creciente deterioro de los ecosistemas terrestres y acuáticos, debido principalmente a factores de origen antrópico, ha llevado en las últimas décadas a numerosas especies y poblaciones a una situación de regresión que en ocasiones llega a alcanzar niveles críticos para la supervivencia (Oberhuber, 2004). Como respuesta a esta situación de crisis se observa un incremento en el esfuerzo para activar y poner en marcha proyectos de conservación dedicados al mantenimiento de la biodiversidad. Estos proyectos contemplan actuaciones *in situ* llevadas a cabo en el medio natural y actuaciones *ex situ* desarrolladas habitualmente en instalaciones lejos de los hábitats originales de las especies afectadas (Maxted, 2013; Braverman, 2014).

Las acciones *ex situ*, tienen entre sus principales objetivos la obtención de protocolos de mantenimiento y reproducción en cautividad que aseguren la viabilidad en el tiempo de las poblaciones naturales, desarrollando proyectos de recuperación basados fundamentalmente en repoblaciones, siempre que sean consideradas estrictamente necesarias (Gil Hernández et al., 2017).

La reproducción *ex situ* puede llegar a ser una solución potencial en programas de recuperación de especies en situación crítica (Ronquillo and McKinley, 2006; Thomas et al., 2010; Theodorou et al., 2015; Espinosa et al., 2006; Guallart et al., 2020; Ferranti et al., 2021 y 2022; Foyle et al.; 1997; Lebata-Ramos et al., 2010). En el grupo de los moluscos, cada vez es más frecuente el establecimiento de protocolos de reproducción *ex situ* con objetivos de conservación de poblaciones de especies en peligro. Aunque existen protocolos estandarizados en otras especies de bivalvos, hay un gran desconocimiento en relación con el mantenimiento y la reproducción de *P. nobilis*, (Trigos, 2018) especie en peligro crítico cuya supervivencia podría depender de la capacidad de criar ejemplares *ex situ*.

El desarrollo de protocolos de reproducción en especies de bivalvos con fines comerciales ha servido de gran ayuda a la hora de trasladar los conocimientos adquiridos al campo de la conservación de especies (Arnold, 2008).

Cuando se habla del ciclo de reproducción, se asume que comprende desde la maduración de los ejemplares reproductores hasta el asentamiento de los juveniles (Helm et al., 2006) y este es el objetivo principal en cualquier programa de cría en cautividad.

En el proceso de maduración de moluscos bivalvos intervienen factores endógenos y exógenos. Los factores endógenos incluyen ciertos condicionantes genéticos, a la vez que la acción de diferentes hormonas, dependientes a su vez de factores exógenos (Joaquim et al., 2008).

También hay diferentes factores exógenos que influyen en el proceso de gametogénesis como la talla de los individuos; la temperatura; la abundancia, la calidad y disponibilidad de alimento recibido; el fotoperiodo y los ciclos lunares (Giese y Pearse, 1974; Mackie, 1984; Helm et al., 2006).

La temperatura se muestra como uno de los principales factores desencadenantes del proceso de acondicionamiento o maduración (Orton, 1920; Loosanoff y Davis, 1952; Gunter 1957; Kinne, 1963). En *Atrina maura*, una especie de la familia Pinnidae Leach, 1819 la temperatura aparece como un factor determinante en la activación del ciclo reproductivo (Rodríguez -Jaramillo et al., 2001). Así mismo, el hecho de que la temperatura se encuentre en un rango óptimo durante el proceso de maduración influye tanto en la calidad de los ovocitos generados, como en su viabilidad tras la fecundación (Rodríguez -Jaramillo et al., 2001).

Del mismo modo, la calidad y cantidad de la alimentación recibida por el reproductor será decisiva a la hora de generar gónadas de buena calidad (Sastry, 1968). En condiciones determinadas, una alimentación deficiente en bivalvos, como en el caso de la nacra, puede generar el debilitamiento de los reproductores tras el proceso de maduración, debido a la movilización de las reservas de glucógeno almacenadas en el músculo como alternativa a las reservas habituales (Ángel-Pérez et al., 2007; Deudero et al., 2017).

La metodología de maduración en cultivos de bivalvos se basa en la exposición de los reproductores a ciclos cambiantes de temperatura durante periodos de tiempo determinados (Robles-Mungaray et al., 1996). El efecto inductor de la temperatura sobre la gametogénesis presenta dependencia específica y geográfica de modo que, según las especies, se puede activar el evento reproductivo en laboratorio con incrementos o descensos en las mismas, e incluso también generando shocks térmicos aplicando temperaturas de tolerancia máximas (Loosanoff y Davis, 1952; Sastry, 1968; Ángel-Pérez, 2007).

Frente a estas técnicas que pueden llegar a generar estrés en los ejemplares reproductores, se plantea una estrategia de trabajo que se inicia con la observación del ciclo de maduración de la especie en el medio natural, para después replicarlo en las instalaciones de cultivo como un proceso naturalizado, con el objeto de conseguir la reproducción. Este método podría reducir el estrés sobre los reproductores y evitar incluso mortandad de los individuos sometidos a técnicas agresivas. Esta metodología naturalizada y no agresiva es interesante fundamentalmente para especies sensibles o bajo figuras de protección como *P. nobilis*.

Tras la liberación de gametos y su fecundación comienza la etapa más delicada en el proceso reproductor de los bivalvos, el desarrollo larvario. Una circunstancia común a esta etapa en las

distintas especies de bivalvos conocidas es la elevada mortalidad de las larvas ocasionada por diferentes factores. Los procesos de fecundación irregulares y los eventos de acidificación en el medio acuático pueden provocar deformaciones de embriones y larvas que culminen con una elevada mortalidad de estas (Gazeau et al., 2010). La escasez de alimento (Rico-Villa et al., 2006) y periodos de temperaturas elevadas también son factores que inciden en la mortalidad de las larvas (Philippart et al., 2003).

En cultivos de bivalvos los principales problemas observados tienen relación con el diseño y aporte de dietas adecuadas, según los requerimientos nutricionales de la especie objetivo (Helm y Laing, 1987; Knauer y Southgate, 1999; Hendriks et al., 2003; Marshall et al., 2010; Cheng et al., 2020); la presencia de patógenos, frecuentemente bacterias y principalmente del género *Vibrio*, (Paillard et al., 2004; Beaz hidalgo et al., 2010; Travers et al., 2015; Dubert et al., 2017); aunque también se pueden producir fallos en los procedimientos de fecundación como la polispermia que pueden llegar a generar deformaciones en las fases larvarias reduciendo la viabilidad de las puestas (Styan, 1998; Helm, 2006; Dong et al., 2012).

La mortalidad larvaria presenta una incidencia especialmente importante en momentos clave como es el paso de pediveliger a juvenil, que implica ciertos cambios estructurales complejos (Helm, 2006; Trigos et al., 2018). En especies de la familia Pinnidae se detecta también un incremento en la mortalidad larvaria en el proceso de umbonación (Robles-Mungaray et al., 2004), en el que la prodisoconcha I pierde la charnela recta característica de D- Veliger y Veliger y aparece el umbo.

En el caso de *Pinna nobilis*, tras el evento de mortalidad masiva de 2016 (Darriba, 2017; Vazquez-Luis et al., 2017) y la situación actual de las únicas poblaciones relictas de la especie en el Mediterráneo, la obtención de juveniles reproducidos en cautividad para integrar en proyectos de recuperación parece ser una de las únicas opciones de viabilidad de la especie en un futuro cercano (Trigos et al., 2018)

Con el fin de asegurar la supervivencia de *P. nobilis*, uno de los objetivos prioritarios del presente trabajo ha sido avanzar en el establecimiento de protocolos de reproducción de la especie. La puesta a punto de dichos protocolos abrirá la puerta para obtener ejemplares juveniles viables, los cuales podrían ser la base para posibles proyectos de recuperación y repoblación en el medio natural (Trigos et al., 2018; Hernandez et al., 2023).

El estudio del presente capítulo se centra en la caracterización de los diferentes eventos reproductores de *Pinna nobilis* llevados a cabo en las instalaciones del Acuario de la Universidad

de Murcia desde el episodio de mortandad masiva en el Mediterráneo y la crisis de eutrofización del Mar Menor.

Los objetivos principales de este estudio fueron i) ampliar el conocimiento sobre el ciclo reproductor de la especie, concretamente en la población del Mar Menor y ii) avanzar en el desarrollo de un protocolo de reproducción *ex situ* válido para *Pinna nobilis*

Se describen los avances obtenidos en relación a dos experiencias *ex situ* separadas en el tiempo, concretamente en los años 2020 y en 2023, pero complementarias en conocimientos obtenidos. También se ha localizado el evento reproductor de *P. nobilis in situ* en la laguna del Mar Menor, confirmando la capacidad reproductora de la población relicta.

Partiendo de un gran vacío de conocimiento en la comunidad científica sobre las condiciones ambientales y los factores determinantes para la viabilidad de las larvas, en la primera experiencia *ex situ*, se llevaron a cabo distintos experimentos dirigidos a evaluar la tasa de supervivencia larvaria *ex situ*, en relación con la densidad de larvas en el cultivo y el tipo de alimento disponible. De forma simultánea, se avanzó en la caracterización y estudio de las fases de desarrollo embrionario y larvario con una descripción del cronograma y las características morfológicas externas de cada fase.

En la segunda experiencia *ex situ* se aplicaron los conocimientos adquiridos en experiencias anteriores y se tuvo como objetivo el análisis del comportamiento reproductor en un grupo de ejemplares inducidos en el laboratorio, siguiendo el patrón de condiciones naturales que afectan a la especie en el Mar Menor. También se comparó la viabilidad larvaria entre reproductores madurados en el medio natural y reproductores madurados en laboratorio y se continuaron los estudios sobre el cronograma y la caracterización de los diferentes estadios embrionarios y larvarios de *Pinna nobilis*.

### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1 Área de estudio

Las experiencias orientadas a avanzar en el conocimiento de los procesos reproductivos de *P. nobilis* y los protocolos de cría en cautividad se llevaron a cabo entre los años 2020 y 2023. La observación de los eventos de liberación de gametos *in situ* se centró en los ejemplares supervivientes de la laguna del Mar Menor, después del colapso poblacional ocurrido en 2016 (Capítulo 1 y Figura 3.1).

Los ejemplares mantenidos *ex situ* para el desarrollo de las diferentes experiencias procedían igualmente del Mar Menor (Figura 3.1). Un total de 21 individuos de *P. nobilis* han sido seleccionados al azar y trasladados al acuario de la Universidad de Murcia. El traslado desde el medio hasta las instalaciones se realizaba aplicando el protocolo de traslocación de *Pinna nobilis* (Giménez Casalduero y Cortés- Melendreras, 2018). Se obtuvo información de cada uno de los individuos recolectados (posición original, estado, talla máxima)

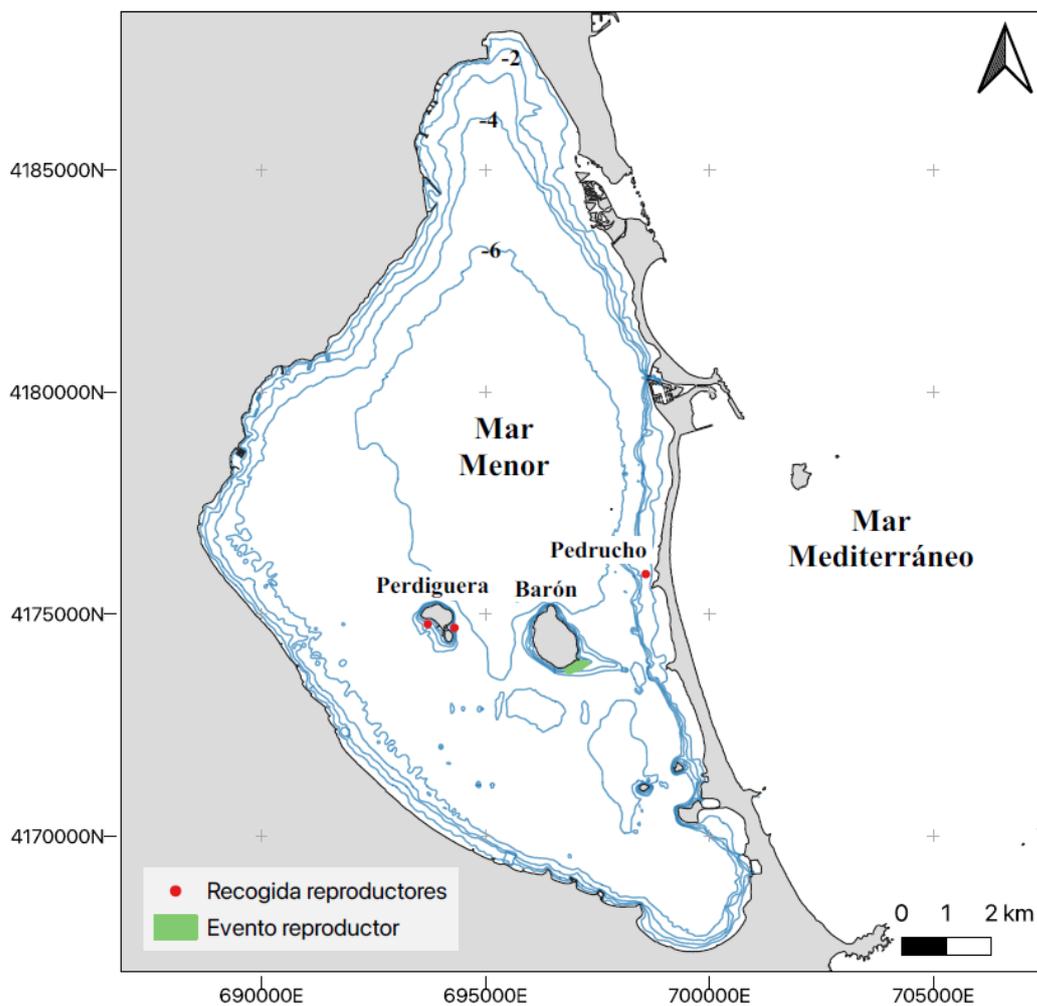


Figura 3.1: Área de estudio.

### 3.3.2 Evento reproductor en el medio natural en la laguna del Mar Menor

La localización del evento reproductor en el medio natural fue posible mediante la realización de muestreos dirigidos a este efecto, seleccionando los días clave en función de las temperaturas observadas como óptimas para la liberación de gametos. Una vez localizado por primera vez y con la temperatura observada como referencia, se volvió a localizar en dos ocasiones más en años posteriores.

La recogida de gametos in situ para su estudio en laboratorio se llevó a cabo mediante jeringuillas de 100 ml, posteriormente transportadas al laboratorio en neveras acondicionadas para el traslado en condiciones óptimas.

### 3.3.3 Diseño de sistemas para mantenimiento de reproductores

El presente trabajo se basa en dos experiencias llevadas a cabo en 2020 y 2023 sobre reproducción de *Pina nobilis* en laboratorio. La experiencia 1 consistió en la emulación *ex situ* del ciclo reproductor de la nacra, incluyendo maduraciones totales y parciales en gónada masculina y femenina respectivamente, y un evento de desove. Tras la liberación de gametos y su fecundación, las larvas fueron sometidas a varias pruebas con el objeto de determinar la densidad larvaria óptima de cultivo y testar diferentes dietas potenciales que ofrecieran una idea de la capacidad de adaptación de las larvas a diversos tipos de alimento vivos o en gel. También se realizó un seguimiento del desarrollo larvario y su adaptación a los sistemas de mantenimiento. En la Experiencia 2 se comparó un ciclo completo con maduración de ejemplares en el laboratorio y un ciclo parcial con maduración femenina en el medio natural y masculina en laboratorio. En los sucesivos eventos reproductores conseguidos se testaron varios sistemas y su aptitud para el mantenimiento de las larvas. Se realizó un seguimiento del desarrollo larvario hasta el estadio de umbonada, fase que no lograron superar.

La descripción de los sistemas de mantenimiento de ejemplares destinados a reproducción, incluidos los sistemas de cuarentena, coinciden con los descritos en el Capítulo 2 (Apartado 2. Metodología) del presente trabajo. Para la Experiencia 1 llevada a cabo en 2020, los reproductores de nacra fueron ubicados en el sistema Pinna 2, en los tanques Pinna 2A y Pinna 2B. En el caso de la Experiencia 2 realizada en 2023 los reproductores se mantuvieron en sistema

Pinna 3, en los tanques Pinna 3B y Pinna 3C.

Experiencia 2 realizada en 2023 los reproductores se mantuvieron en sistema Pinna 3, en los tanques Pinna 3B y Pinna 3C.

Tabla 3.1: Tanque de reproductores Pinna 2 A y B. Experiencia 1 - 2020

TANQUES	EJEMPLARES						
P2A	Ejemplares	P2A1	P2A2	P2A3	P2A4		
	Talla (cm.)	32.7	45.3	34.4	37.0		
	Origen	Barón	Barón	Barón	Barón		
P2B	Ejemplares	P2B1	P2B2	P2B3	P2B4	P2B5	P2B6
	Talla (cm.)	40.2	36.5	34.4	35.2	33.0	34.5
	Origen	Perdiguera	Perdiguera	Perdiguera	Perdiguera	Perdiguera	Perdiguera

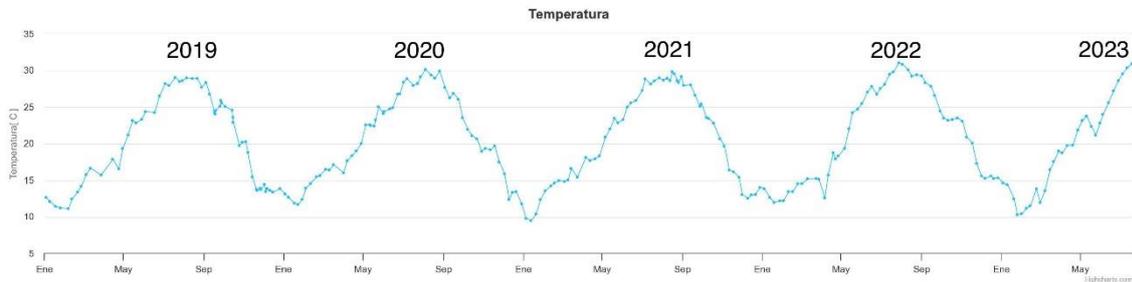
### 3.3.4 Experiencia 1. 2020: Densidad larvaria, optimización de dietas y caracterización de fases de desarrollo larvario

#### 3.3.4.1 Maduración de ejemplares

Los ejemplares destinados a la experiencia 1, que se llevó a cabo durante el ciclo reproductor de 2020 se trasladaron al Acuario durante los meses de enero y febrero. En una fase previa a su entrada en los tanques de maduración se llevó a cabo un periodo de cuarentena de 30 días, en el que fueron sometidos a biopsias de manto para determinar su estado de salud en relación con la infección por el protozoo *Haplosporidium pinnae* o bacterias de los géneros *Vibrio* y *Mycobacterium*. Tras el periodo de cuarentena fueron trasladados a los tanques de maduración y reproducción. Los tanques corresponden al sistema Pinna 2 (P2) (los elementos técnicos que componen sistema Pinna 2 están descritos en el Capítulo 2 de este trabajo).

El agua utilizada en los tanques de reproductores es agua de mar sintética, filtrada a 1 $\mu$  y esterilizada con lámparas germicidas U.V. a nivel de esterilización 5. Además, cada tanque lleva incluido en el sistema de filtrado una filtración mecánica de 50 $\mu$  y una lámpara germicida en continuo a un nivel de esterilización 3 (Niveles de esterilización germicida, Capítulo 2).

En el tanque Pinna 2A se introdujeron 4 ejemplares de Nacra A1 - A4. En el tanque Pinna 2B se introdujeron 6 ejemplares de nacra B1 – B6 (Figura 3.1). La talla de los ejemplares se puede observar en la tabla 1.



**Figura 3.2:** Tabla de temperaturas medias observadas en el Mar Menor entre 2019 y 2023. Fuente: <https://canalmarmenor.carm.es>

La maduración en especies de bivalvos es regulada por diferentes factores endógenos y exógenos, de los cuales tienen especial relevancia la temperatura y el fotoperiodo. Según el cronograma de maduración gonadal descrito por Deudero et al., 2017, en esta primera experiencia se contó con ejemplares en los que la maduración de gónadas femeninas se inició en el medio natural y llegó a término en el laboratorio. Aunque la experiencia de Deudero et al., 2017, se llevó a cabo con ejemplares de la Isla de Cabrera y podría haber variaciones con los madurados en el Mar Menor, se observó que algunos ejemplares Mar Menor presentaban gónadas femeninas maduras al llegar a la instalación de cuarentena. Por otra parte, todos los ejemplares que maduraron como machos lo hicieron en el laboratorio.



**Figura 3.3:** Ejemplares de nacra en Tanque PINNA 2B del sistema Pinna 2 – 2020.

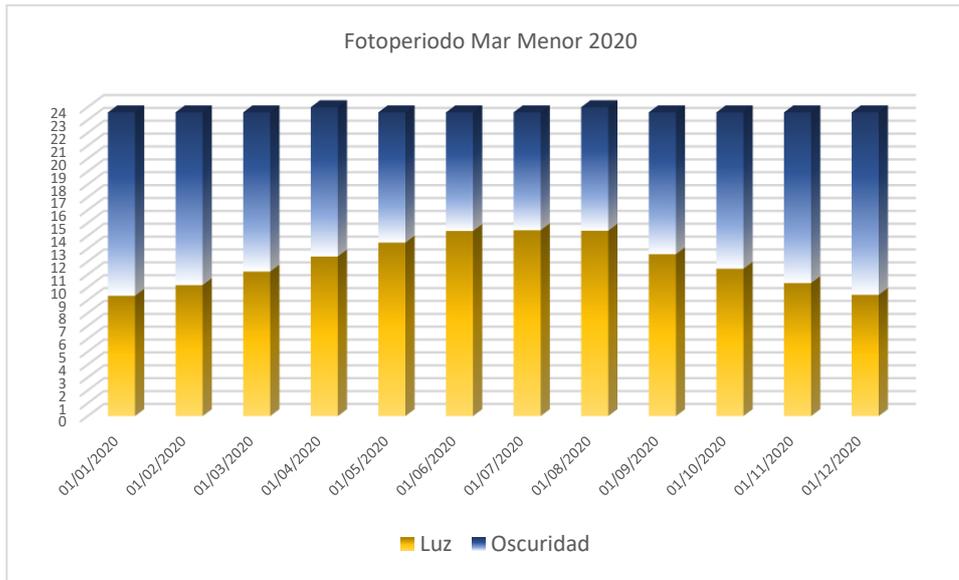


Figura 3.4: Fotoperíodo anual 2020. Fuente: <https://canalmarmenor.carm.es>

En los tanques mantenimiento de reproductores se reprodujeron las condiciones observadas en el medio natural para temperatura y fotoperíodo (Figuras 3.2 y 3.4).

La alimentación de los reproductores durante todo el ciclo reproductor se basó en una mezcla de fitoplancton vivo y gel de las especies *Tisochrysis lutea*, *Tetraselmis chuii* y *Phaeodactylum tricornutum*, a razón de 40.000 – 70.000 cel ml<sup>-1</sup>, enriquecido con una papilla base elaborada con zooplancton consistente en diversas especies de copépodos y misidáceos.

### 3.3.4.2 Inducción, liberación de gametos y fertilización

Con el objeto de conseguir la liberación de gametos en ejemplares reproductores del grupo de los moluscos bivalvos, existen diversos métodos de inducción al desove aplicables con resultados óptimos, aunque por regla general suelen ser agresivos para los reproductores. (Helm et al., 2006; Robles-Mungaray et al., 1996)

Debido a la fragilidad de la población del Mar Menor y del mismo modo que con el proceso de maduración, se optó por realizar una “inducción natural”, siguiendo los ritmos de la población en la laguna.

Una vez llevado a cabo el proceso de maduración, se continuó con la emulación de las variaciones de temperatura detectadas en el medio natural, en los tanques de reproductores,

esperando a que tuviese lugar la liberación de gametos sin producir estrés térmico en los individuos.

La identificación del evento de liberación de gametos se llevó a cabo realizando un seguimiento visual de los reproductores. Una vez identificado el episodio reproductor se procedió a la recogida de gametos.

Habitualmente la recogida de esperma y ovocitos de bivalvos se lleva a cabo separando los reproductores en depósitos independientes, de los que se extraen los gametos una vez finalizada su liberación (Helm et al., 2006).

En el caso de *Pinna nobilis* se consideró oportuno realizar la recogida de gametos en el mismo tanque de mantenimiento de reproductores, para evitar el estrés que supone la manipulación durante los traslados. Hay que tener en cuenta que los ejemplares destinados a la reproducción están ubicados en cestas adecuadas para mantener su posición erguida, con sustrato de arena donde por regla general anclan el biso y debido al tamaño de los ejemplares y el peso del conjunto se hace complicada su manipulación sin estrés (Capítulo 2. Apartado 2.9.2 Disposición de los ejemplares en los tanques).

La recogida de gametos en este caso se realizó mediante un tubo transparente de 10 mm de diámetro interno unido a una manguera transparente de 10,5 mm de diámetro interno, a través de la cual se sifonaron los gametos expulsados directamente desde la región exhalante hasta un recipiente de recogida.

Tras la recogida, se filtró el esperma por un tamiz de luz de malla de 15  $\mu$  y los ovocitos por uno de 85  $\mu$ , procediendo a la retención mediante un tamiz de luz de malla de 30  $\mu$ , con objeto de eliminar posibles elementos contaminantes.

La filtración a través de tamices durante todas las etapas de desarrollo larvario son importantes para mantener limpio y sano el cultivo (Helm et al., 2006). Durante el desarrollo larvario es habitual que unas larvas crezcan más rápido que otras, por lo que en el caso de los bivalvos el paso a través de diferentes tamices suele ser la mejor forma de separarlas por tamaños (Helm et al., 2006).

Una vez recogidos y filtrados los ovocitos y los espermatozoides se procedió a realizar un muestreo para detectar cualquier deficiencia (Helm et al., 2006). Para realizar el muestreo se homogenizó la mezcla en el depósito de recogida, se recogieron cuatro muestras de 1 ml y cada una se distribuyó en gotas en una placa de metacrilato utilizada para el recuento en la lupa.

Para el estudio y la descripción de las diferentes fases embrionarias y larvianas se utilizó un microscopio Leica modelo DM750, una lupa binocular Leica modelo S6D, ambos equipos complementados con una cámara Leica modelo MC170HD y una lupa binocular Leica modelo EZ4HD con cámara incorporada. La obtención de imágenes y videos y el tratamiento de estas se llevó a cabo mediante el programa LAS (Leica Application Suite) EZ V. 3.4.0.

Una vez comprobado el estado de los gametos se llevó a cabo el proceso de fecundación.

En el proceso de fecundación se pusieron en contacto ovocitos con espermatozoides, consiguiendo la fecundación de los primeros. La relación esperma – ovocitos debe ser de 10:1 para superar el 90% de fecundación (Joaquim et al., 2008; Góngora-Gómez et al., 2017), en ocasiones puede ser una relación más alta, hasta 15:1 e incluso 20-30:1 pero no es recomendable superarla para evitar la polispermia (Robles-Mungaray et al., 1996; Helm et al., 2006; Dong et al., 2012).

Tras la fertilización, los ovocitos se trasladaron directamente a los distintos tanques de destino para los experimentos diseñados, a las densidades preseleccionadas para el contraste. Una vez en los tanques de mantenimiento larvario (descritos en el apartado 3.5) se procedió a realizar un seguimiento de los embriones y primeros estadios larvianos aproximadamente cada 30 minutos durante las primeras 24 h. hasta alcanzar el estadio D-Veliger.

#### **3.3.4.3 Desarrollo larvario**

Una vez pasadas las primeras 24 h. desde la liberación de gametos se muestrearon las larvas para determinar el porcentaje de ellas que había alcanzado el estado D-Veliger.

A las 24 h una vez alcanzado el estadio larvario D- Veliger, con objeto de identificar las condiciones óptimas en relación a la densidad de larvas y fuente de alimentación óptima de las larvas, se realizó, un experimento ortogonal donde se testó la tasa de supervivencia en 3 concentraciones larvianas y en presencia de 4 tipos diferentes de fitoplancton en agua durante un periodo de 7 días.

Por otra parte, se observó la evolución de las diferentes fases larvianas y su supervivencia en el tiempo en distintos sistemas de mantenimiento, al igual que en las experiencia anterior.

### 3.3.4.4 Experiencia de densidad larvaria y optimización de dietas

Se prepararon un total de 36 unidades de muestreo (UMs). Cada UM consistía en una placa Petri con 40 ml de agua de mar artificial a la que se añadía un tipo de fitoplancton y una concentración de larvas de nacra en función del diseño experimental. Las placas Petri se cubrieron con tapas, se distribuyeron aleatoriamente en una mesa de laboratorio con temperatura controlada (21°C) e iluminación externa siguiendo fotoperiodo natural y se incubaron durante siete días.



Figura 3.5: Placas Petri con los cultivos de densidad y alimentación larvaria.

Las placas se redistribuyeron aleatoriamente dos veces para minimizar los efectos de las variaciones a pequeña escala de las condiciones de luz y temperatura ambiente.

Cada día se realizó un cambio de agua en cada una de las placas del 50% con agua nueva filtrada a  $1\mu$  y esterilizada con germicidas U.V. (Figura 3.6).



Figura 3.6: Muestreo y cambio de agua en cultivos de placas Petri.

Se realizaron 12 tratamientos experimentales agrupados en un primer factor que coincidía con el tipo diferente de alimento basado en fitoplancton y corresponde a 4 niveles: 1) LT: *Tisochrysis lutea* (T-ISO) viva; 2) GT: *Tisochrysis lutea* gel.; 3) MG: Mezcla de 4 especies fitoplanctónicas en gel (*Tisochrysis lutea*), *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochlorosis gaditana*, *Tetraselmis chuii*; 4) LT+MG: mezcla de 4 especies fitoplanctónicas en gel (*Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochlorosis gaditana*) e *Tisochrysis lutea* viva (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2:** diseño experimental con las condiciones de estado del fitoplancton utilizado, las especies utilizadas y concentración de fitoplancton en cada uno de los niveles y la concentración larvaria.

COD	Condición	Especies	CONCENTRACIÓN Fito células/ $\mu$ l	Larvas/ml	N			
LT	Viva	<i>Tisochrysis lutea</i> (T-ISO)	100	D2: 2	3			
				D5: 5	3			
				D10: 10	3			
GT	Gel	<i>Tisochrysis lutea</i> (T-ISO)	100	D2: 2	3			
				D5: 5	3			
				D10: 10	3			
MG	Gel	<i>Tisochrysis lutea</i>	100	D2: 2	3			
	Gel	<i>P. tricornutum</i>	25	D5: 5	3			
	Gel	<i>N. gaditana</i>	33.3	D10: 10	3			
	Gel	<i>Tetraselmis chuii</i>	33.3					
LT+ MG	Viva	<i>Tisochrysis lutea</i>	100					
				Gel	<i>Tisochrysis lutea</i>	100	D2: 2	3
					<i>P. tricornutum</i>	25	D5: 5	3
					<i>N. gaditana</i>	33.3	D10: 10	3
	<i>Tetraselmis chuii</i>	33.3						

Cada tratamiento de tipo de fitoplancton se dividió a su vez en tres grupos de 3 UMs en los que se dispusieron 3 concentraciones larvarias diferentes: 1) **D2**: La densidad de concentración de larvas fue de 2 larvas/ml Cada UM comenzó con un total de 80 larvas; 2) **D5**: La densidad de concentración de larvas fue de 5 larvas/ml Cada placa Petri comenzó el experimento con 200 larvas por UM; 3) **D10**: La densidad de concentración de larvas fue de 10 larvas/ml Cada UM comenzó con un total de 400 larvas por UM.

Se realizó un recuento de la supervivencia larvaria en todas las UMs en tres tiempos durante el periodo experimental: 1) **T1**: día 3, 2) **T2**: día 5 y 3) **T3**: día 7. El recuento se llevó a cabo mediante una lupa binocular a 40 aumentos. La estima de densidad larvaria se realizaba mediante lupa binocular a recuentos al azar de 9 o 10 campos visuales de 15,7 mm<sup>2</sup>, a partir de los cuales se estimaba la densidad total de la UM.

Las 36 UMs fueron dispuestas al azar en una zona experimental en unas condiciones de Temperatura atmosférica de 21°C y un fotoperiodo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad.

### Tratamiento de los datos

Con el objetivo de testar la supervivencia de las larvas de *Pinna nobilis*, se realizó un análisis de varianza de tres factores ortogonales y fijos (ANOVA) densidad de larvas (D), tipo de fitoplancton (Ph) y tiempo experimental (T).

Densidad de larvas con tres niveles (D2, D5 y D10), tipo de fitoplancton con cuatro niveles (LT, GT, MG y LT+MG) y tiempo experimental con tres niveles (T1, T2 y T3).

Se utilizaron tres UMs por tratamiento como réplicas. El modelo de este análisis fue

$$X = \text{MEDIA} + \text{Ph} + \text{C} + \text{T} + \text{PhxD} + \text{PhxT} + \text{CxT} + \text{PhxCxT} + \text{RES}$$

Se comprobó la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Cochran antes de aplicar el ANOVA y no fue necesario transformar los datos. Se realizaron comparaciones *post hoc* mediante la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) en caso de que fueran significativas en el ANOVA para determinar qué factor y tratamiento estaban implicados en las diferencias.

#### 3.3.4.5 Caracterización del desarrollo embrionario y larvario

El resto de las larvas que no formaban parte del experimento fueron trasladadas a diferentes sistemas con el fin de observar si alguno de ellos marcaba una diferencia cualitativa en cuanto a condiciones de mantenimiento y supervivencia.

Se testaron 4 sistemas:

- a. Kreissel de 12 l. Se trata de un tanque circular de los utilizados en el laboratorio para mantener larvas pelágicas de peces e invertebrados durante los primeros días de vida con una corriente circular en este caso generada por aireación que imita las corrientes en el medio natural.
- b. 5 bandejas de 4 l. Bandejas de plástico de 40 cm x 24 cm x 5 cm, llenadas hasta 4 l.
- c. Cilindro de 12 l. equipado con un motor de 6 rpm que hacía rotar una hélice cerca del fondo generando una corriente ascendente de agua.
- d. 4 tanques troncocónicos de 30 l. con aireación ligera.

El kreissel, las bandejas y el cilindro fueron sembradas a 15 larvas ml<sup>-1</sup> y se alimentaron con una mezcla de *Tisochrysis lutea* (T-ISO) viva a una densidad de 100 células µl<sup>-1</sup> y *Tetraselmis chuii* gel a 33,3 células µl<sup>-1</sup>.

Los troncocónicos fueron sembrados a 7, 20, 25 y 70 larvas ml<sup>-1</sup> y alimentados con la misma mezcla que la elegida para la experiencia de las placas Petri, Tabla X, durante el tiempo que duró el experimento.

En los diferentes sistemas se cambió el 50% del agua cada 2 días por agua nueva a la misma temperatura y salinidad filtrada a 1µ y esterilizada mediante U.V a nivel 5.

Se realizaron dos muestreos de las larvas diarios a las 10:00 h y a las 18:00 h en los que se comprobó su estado y se procedió a realizar fotografías y videos de comportamiento larvario.

### 3.3.5 Experiencia 2. 2023: Maduración *ex situ* e *in situ* y caracterización de fases de desarrollo larvario

#### 3.3.5.1 Maduración de ejemplares

Los ejemplares destinados a la experiencia 2 llevada a cabo en el ciclo reproductor de 2023, fueron trasladados en dos fases al Acuario de la Universidad de Murcia, y fueron introducidos en los tanques PINNA 3B y PINNA 3C.

Los ejemplares del tanque Pinna 3B se recogieron en la localidad del Pedrucho (La Manga), entre los días 29 y 30 de septiembre de 2021 (Figura 1).

Los ejemplares ubicados en el tanque Pinna 3C fueron trasladados desde la Isla del Barón, durante los meses de marzo y abril de 2023 (Figura 1).

**Tabla 3.3:** Tanques de reproductores Pinna 3 B y C. Experiencia 2 – 2023

\*\* Ejemplar P3B5 sometido a dos extracciones de hemolinfa. \* Ejemplar P3C4 sometido a una extracción de hemolinfa.

TANQUES	EJEMPLARES						
	Ejemplares	P3B1	P3B2	P3B3	P3B4	P3B5 **	
P3B	Talla (cm.)	40,7	39,5	45,5	44,7	45,3	
	Origen	Pedrucho	Pedrucho	Pedrucho	Pedrucho	Pedrucho	
	Ejemplares	P3C1	P3C2	P3C3	P3C4 *	P3C5	P3C6
P3C	Talla (cm.)	50.5	46	50	44	50.5	55
	Origen	Barón	Barón	Barón	Barón	Barón	Barón

En todos los casos los ejemplares seleccionados para su traslocación como reproductores no formaban parte de la población registrada, etiquetada y georreferenciada mediante GPS destinadas al seguimiento a largo plazo de la población, sino que eran ejemplares de nueva observación. La posición de los ejemplares fue trasladada al equipo de seguimiento de la población de nacra en el Mar Menor\*, para que quedaran reflejados en el inventario. En este caso no fueron sometidos a un periodo de cuarentena previa con biopsias de manto por el riesgo que supone para su supervivencia, según los indicios descritos en el capítulo 2, y cómo afectan los procedimientos invasivos al estado de salud de los ejemplares. Todos los ejemplares seleccionados fueron trasladados directamente al sistema Pinna 3 (P3), cuya descripción técnica aparece en el capítulo 2 de este trabajo (Figura 3.7).

- Equipo constituido por TRAGSATEC, la Universidad de Murcia y la Universidad de Alicante.

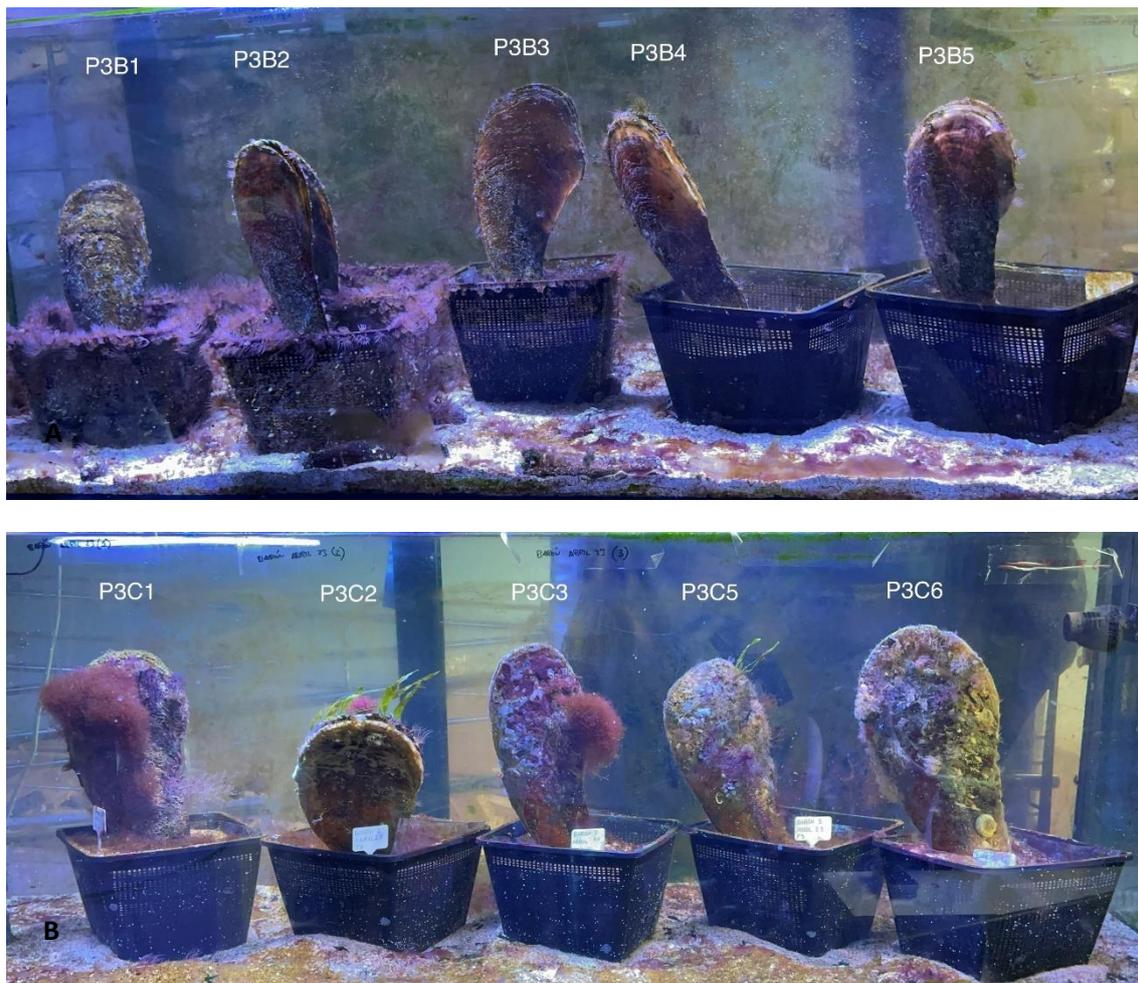


Figura 3.7: Grupo de reproductores tanque A: PINNA 3B y B: PINNA 3C.

En este ciclo reproductor se trabajó con reproductores madurados *ex situ* en las instalaciones del Acuario de la Universidad de Murcia (reproductores recogidos en 2021) y con reproductores madurados *in situ* en el medio natural (recogidos en 2023), con el fin de comparar las puestas y la viabilidad larvaria.

El ejemplar P3C4 se aisló en un tanque independiente diseñado para llevar a cabo una experiencia de alimentación con una nueva dieta alternativa. También fue sometido a extracción de hemolinfa para un trabajo de respuesta inmune (Carella et al., en prensa).

Para conseguir un correcto proceso de maduración de los reproductores, se replicaron las condiciones ambientales observadas en el Mar Menor, priorizando la temperatura como uno de los factores exógenos de mayor influencia como desencadenante del proceso de maduración (Rodríguez -Jaramillo et al., 2001), así como el fotoperiodo.

En las dos experiencias de reproducción de nacra realizadas en este trabajo se reguló el ciclo de temperatura con respecto al observado en el medio natural, moderando los extremos entre 14 y 28°C, con el fin de no someter a estrés a los ejemplares (Hernandis et al, 2018), respetando que las condiciones fueran las apropiadas para la correcta evolución del proceso de maduración.

Los datos de referencia sobre la evolución de la temperatura semanal en el Mar Menor se obtuvieron de los datos públicos disponibles en la web: <https://canalmarmenor.carm.es/monitorizacion/monitorizacion-de-parametros/> y también <https://marmenor.upct.es/charts/>.

También se reguló el fotoperiodo como factor externo desencadenante, para imitar la evolución en el medio natural.

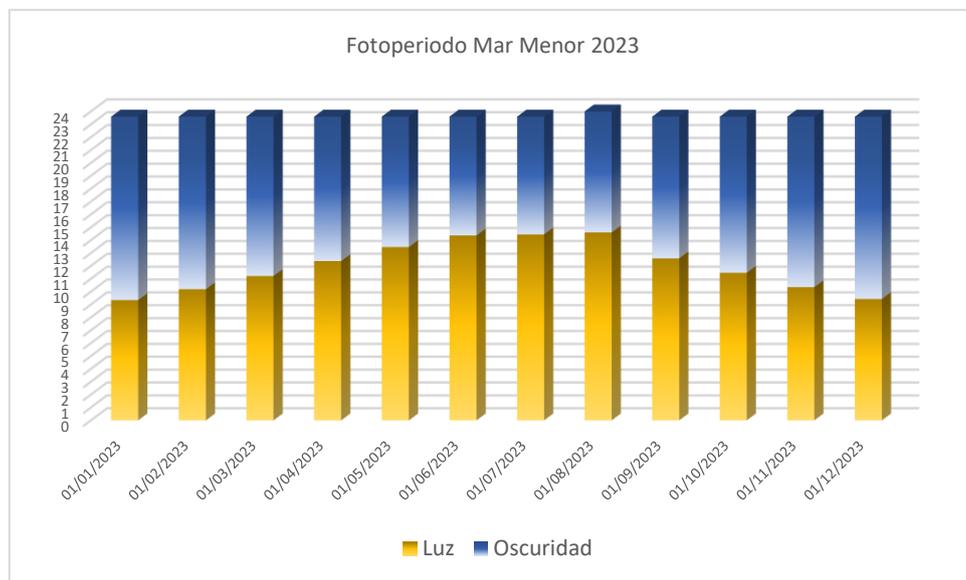


Figura 3.8: Fotoperiodo anual 2023. Fuente: <https://canalmarmenor.carm.es>

La alimentación de los reproductores de nacras durante el proceso de maduración (8 meses ciclo completo, 3 meses ciclo parcial) y mantenimiento pre-desove, estuvo compuesta por tres especies de microalgas cultivadas en el laboratorio, dos de las cuales eran fijas en la dieta: *Thisochrysis lutea* (T-Iso, Bendif et al., 2013) y *Tretraselmis chuii*; mientras que la otra especie perteneciente al grupo de las diatomeas se alternó entre *Chaetoceros gracilis* y *Phaeodactylum tricornutum*.

Las concentraciones de cada especie variaron en función de su tamaño: *Thisochrysis lutea* ( $6 \cdot 10^3$  cel  $\mu\text{l}^{-1}$ ), *Tretraselmis chuii* ( $2 \cdot 10^3$  cel  $\mu\text{l}^{-1}$ ) y *Chaetoceros gracilis* o *Phaeodactylum tricornutum* ( $7 \cdot 10^3$  cel  $\mu\text{l}^{-1}$ ) en los cultivos. La mezcla se realizaba siguiendo una relación 3/3.

La dosis diaria en cada tanque de 940 l. se calculó según García March, 2020, sobre el modelo de aproximación a *Pinna nobilis* de la dieta propuesta por Hernandis et al., 2022 para *Pinna rudis*. Según el estudio se debe alimentar con dosis entre 1,5 y 2,5  $\mu\text{m}^3 \text{ ml}^{-1}$  (equivalente a 40.000 – 70.000 cel  $\text{ml}^{-1}$ ). El máximo se eligió en relación con el umbral de producción de pseudoheces, (Bayne, 1993).

La dosis diaria se repartió en tres tomas con un periodo de alimentación durante el que se detuvo la entrada de agua procedente del sistema de filtrado por dos horas.

La dosis diaria de fitoplancton se complementó con dos especies de zooplancton intentando proporcionara los reproductores un perfil nutricional óptimo rico en ácidos grasos poliinsaturados (Knauer y Southgate, 1999; Rivero-Rodríguez et al., 2007; Cheng et al., 2020). Las especies seleccionadas para alimentar a los reproductores fueron un rotífero, *Brachionus rotundiformis*, seleccionado por su pequeña talla y un copépodo *Acartia tonsa*, suministrado en forma de nauplio. *B. rotundiformis* fue alimentado a su vez con el alga *Nannochloropsis gaditana*, cuyo perfil nutricional se adecua a los requerimientos tenidos en cuenta. El zooplancton fue incluido en las dosis habituales de fitoplancton a razón de 0,5 unidades  $\text{ml}^{-1}$ .

Para determinar el estado de maduración gonadal se eligió la observación dorsal de la gónada a través de las valvas abiertas. Debido a que esta forma de determinar el grado de acondicionamiento es muy inexacta, aunque inocua, se tuvo que realizar un seguimiento muy exhaustivo para identificar el momento del evento reproductor.

### 3.3.5.2 Inducción, liberación de gametos y fertilización

Se llevó a cabo una nueva experiencia de seguimiento del evento reproductor con inducción naturalizada, en la que la emisión de gametos no es puntual provocada por un shock térmico, sino que se extiende en el tiempo en un proceso de interacciones entre individuos.

Con el fin de localizar los eventos de desove se dispusieron filtros de recogida de huevos con mallas de 30 $\mu$ , integrados en los sistemas de filtración de los tanques de reproductores. Del mismo modo y teniendo en cuenta que la liberación de gametos se produce durante el día (obs pers), se llevó a cabo un seguimiento visual desde el amanecer hasta el anochecer, dirigido a la localización de los diferentes episodios.

La recogida y muestreo de gametos siguió el mismo procedimiento que el llevado a cabo en la experiencia 1.

El tratamiento del esperma y los ovocitos también fue similar al realizado en la experiencia 1. En los días en los que solo hubo expulsión de esperma, se recogieron muestras de 250 ml y se conservaron a 4°C, temperatura a la que se pueden mantener viables hasta tres días (Trigos et al., 2018)). De esta forma, en el caso de que en el siguiente episodio de liberación de gametos solo se obtuviesen ovocitos, se tendría capacidad de fecundación utilizando el esperma conservado.

### 3.3.5.3 Caracterización del desarrollo embrionario y larvario

Después de fecundados, los ovocitos se trasladaron a tanques de cultivo donde pasaron las primeras 24 horas, tiempo que dura el desarrollo de los embriones y el primer estadio larvario. La densidad larvaria en este primer tanque se sitúa entre 7 y 10 larvas ml<sup>-1</sup> (Robles-Mungaray et al., 1996)

Los tanques de cultivo destinados a mantener los embriones y primeros estadios larvarios fueron de tres tipos:

- a. Bandejas de 50 l. (75x52x15 cm) sin movimiento de agua.
- b. Troncocónicos de 250 l con aireación suave.
- c. Troncocónicos de 500 l con aireación suave.

Durante ese tiempo se muestrearon cada hora con el objeto de describir los tiempos en los que se producen cambios durante el desarrollo embrionario y la entrada en las primeras fases de desarrollo larvario.

Una vez alcanzado el estadio D-Veliger, se procedió a separar grupos de larvas en diferentes sistemas de mantenimiento.

Los sistemas seleccionados fueron:

- a. Bandejas de 50 l. (75x52x15 cm) sin movimiento de agua.
- b. Bandejas de 50 l. con movimiento de agua.
- c. Troncocónicos de 250 l con aireación suave.
- d. Troncocónicos de 500 l con sistema motorizado de movimiento de agua ascendente (adaptado del cilindro de 12 l motorizado, utilizado en la experiencia 1).

La densidad larvaria en esta fase de desarrollo se sitúa entre 3 y 5 larvas ml<sup>-1</sup> siguiendo la estima adecuada de densidad larvaria obtenida en la experiencia 1 -2020.

Desde que las larvas alcanzaron el estadio D-Veliger se alimentaron con *Tisochrysis lutea* durante los tres primeros días a una concentración de 20 cel  $\mu\text{l}^{-1}$ . A partir del tercer día la alimentación se complementó con *Chaetoceros calcitrans*, en relación 1:1, manteniendo la misma concentración. Conforme fue aumentando la talla de las larvas se incrementó la concentración de alimento, llegando en fase umbonada a 30 cel  $\mu\text{l}^{-1}$ .

Las bandejas de 50 l fueron limpiadas y desinfectadas cada dos días y al mismo tiempo las larvas fueron sifonadas y tamizadas a 120 – 85 y 63  $\mu$ .

Los troncocónicos fueron limpiados y desinfectados cada tres días. Del mismo modo que en las bandejas las larvas fueron sifonadas y tamizadas a 120 – 85 y 63  $\mu$ .

Todo el material utilizado para la recogida de gametos, así como durante los trabajos y tratamientos realizados sobre embriones y larvas, se desinfectó mediante inmersión completa en ácido acético al 7% (Robles-Mungaray, 1996), seguido de inmersiones sucesivas en agua fría a 18°C y agua caliente a 60 °C, con secado completo posterior.

El agua marina utilizada para las larvas se realizó con sales sintéticas y se pasó a través de un filtro mecánico de 1 $\mu$ , además de por lámparas germicidas U.V. con un nivel de esterilización 5.

Los muestreos de larvas (n=3) se llevaron a cabo 3 veces al día en cada sistema, a las 9:00 h. a las 15 h. y a las 20 h. Se recogieron 3 muestras de 5 ml de cada sistema y fueron observadas al microscopio para conteo, observación y realización de fotografía y video.

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Evento reproductor en el medio natural en la laguna del Mar Menor



**Figura 3.9:** Expulsión de ovocitos en ejemplares de la Isla del Barón. 22 de mayo de 2019. Mújoles alimentándose de ovocitos. Foto Javier Giménez.

En el transcurso del seguimiento de poblaciones de *Pinna nobilis* en el Mar Menor, llevado a cabo por el equipo de TRAGSATEC, la Universidad de Alicante y la Universidad de Murcia, se localizaron distintos eventos reproductores en diferentes años, ubicados concretamente en la Isla del Barón, una de las zonas de mayor densidad de nacras de la laguna.

La primera observación tuvo lugar el 22 de mayo de 2019 y se localizó fácilmente por la aparición de grupos de mújoles (*Liza aurata*) atraídos por la abundante cantidad de ovocitos liberados (Figura 3.9). Los mújoles se situaron en el margen superior de las valvas de las nacras en la región exhalante, en el punto de liberación de los gametos, alimentándose de ellos. El mismo día fueron detectados otros ejemplares cercanos expulsando gametos masculinos. En este caso los peces no se mostraron atracción por el esperma como posible fuente de alimento, posiblemente debido a su rápida dispersión en el medio acuático.

La temperatura del agua en el momento de la liberación de gametos era 24 °C.

Se observó que la temperatura para la inducción del evento reproductor fue de 24 °C (Figura 3.2). Este umbral se tomó como referencia para el seguimiento de siguientes episodios reproductivos *in situ*. Un año después, el 29 de mayo de 2020, cuando se alcanzó esa temperatura (Fig. 3.2) se volvió a muestrear el estado de los ejemplares de *Pinna nobilis* en la Isla del Barón, detectando de nuevo la liberación de gametos femeninos en diferentes ejemplares de la zona.

A fecha de 19 de mayo de 2022, de nuevo se localizó el evento reproductor en el mismo lugar al alcanzar la misma temperatura que en años anteriores (Figura 3.2). En esta ocasión se observó la liberación de gametos masculinos y femeninos por parte de diferentes ejemplares.

En todas las ocasiones en las que se detectó la liberación de gametos femeninos en el medio natural se trasladaron muestras de estos gametos al laboratorio y se observó un porcentaje de fecundación cercano al 90%.

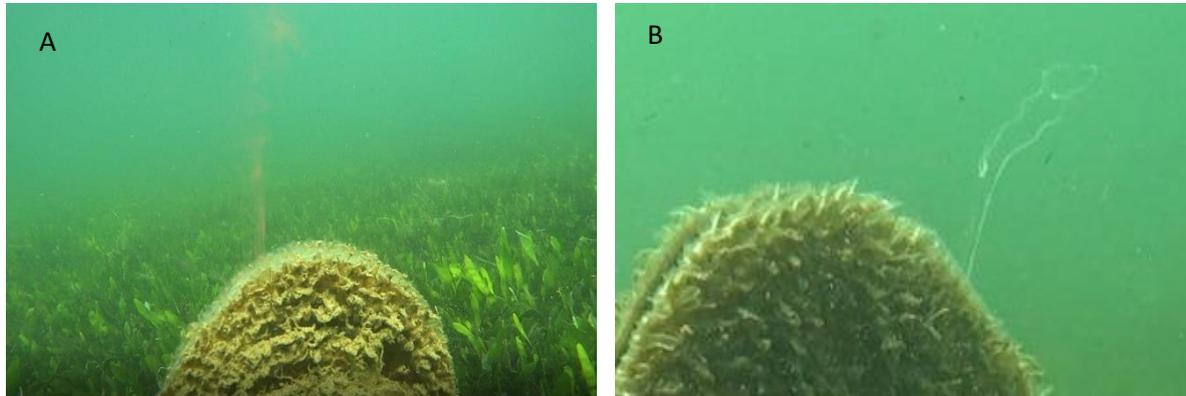
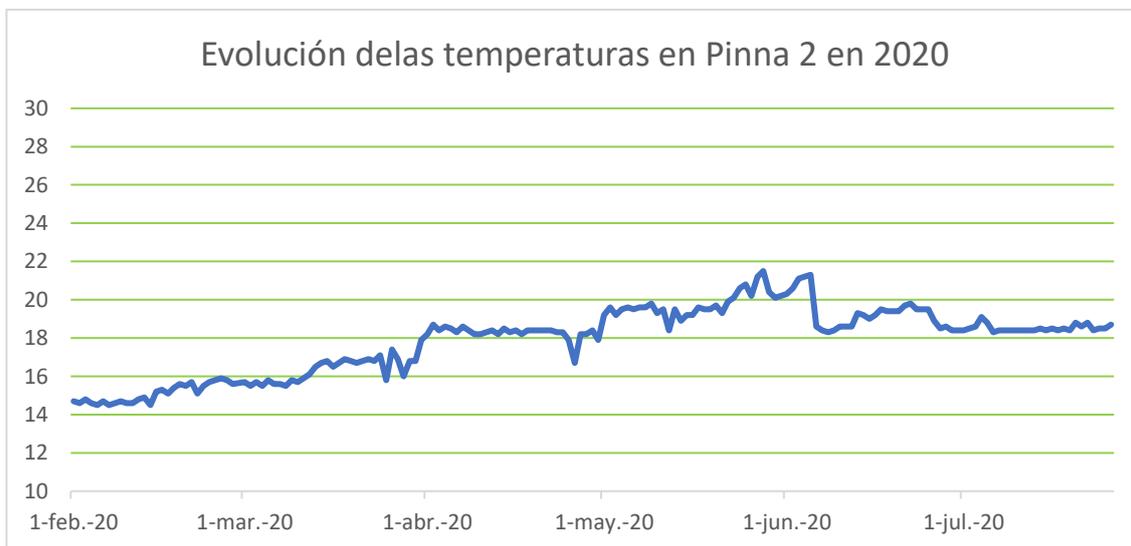
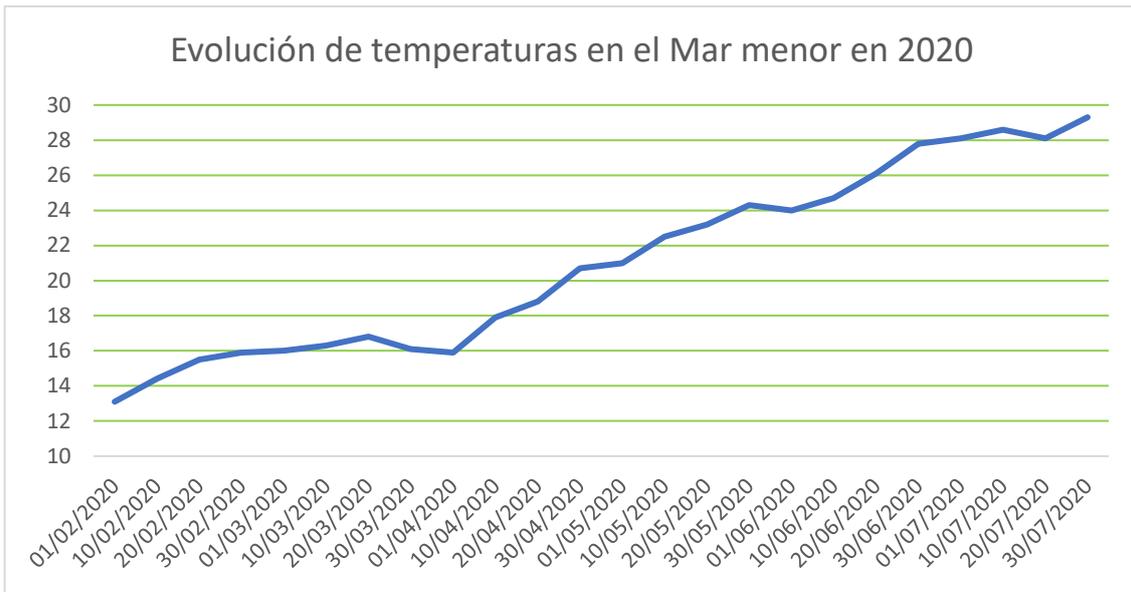


Figura 3.10: Ejemplar liberando ovocitos(A) y ejemplar liberando esperma (B) 22/05/2019 Foto: Javier Giménez.

### 3.4.2 Experiencia 1. 2020: Densidad larvaria, optimización de dietas y caracterización de fases de desarrollo larvario

#### 3.4.2.1 Sistemas de mantenimiento de reproductores. Tablas de parámetros

A continuación, se muestran los datos observados de temperatura, pH y salinidad. La temperatura estuvo sujeta a mayor variación que el resto de parámetros, con el fin de reproducir las condiciones del ciclo de temperatura natural en el Mar Menor. La temperatura en la laguna, durante el periodo experimental se mantuvo dentro de los rangos habituales con relación a otros años, sin alcanzar temperaturas extremas en su valor mínimo, llegando a 13,1°C el 1 de febrero de 2020 y, sin embargo, los valores máximos alcanzaron el máximo de 29,3°C el 30 de julio de 2020. El patrón de cambio fue el esperado a lo largo del año (Figura 3.11-A). El rango de temperatura del sistema Pinna 2, se mantuvo entre los 14 °C y los 20°C y siguió el patrón de cambio similar al medio natural, aunque suavizado para no inducir estrés térmico a los ejemplares, ya que se detectaron indicios de estrés en algunos ejemplares biopsiados (Figura 3.11-B).



**Figura 3.11:** Comparativa de temperaturas, la línea azul representa el valor medio diario. A: Evolución de la temperatura del agua en el Mar Menor durante 2020 ( <https://canalmarmenor.carm.es/monitorizacion/monitorizacion-de-parametros/> y también <https://marmenor.upct.es/charts/>) y; B: Evolución de la temperatura del agua en el tanque Pinna 2 durante 2020.

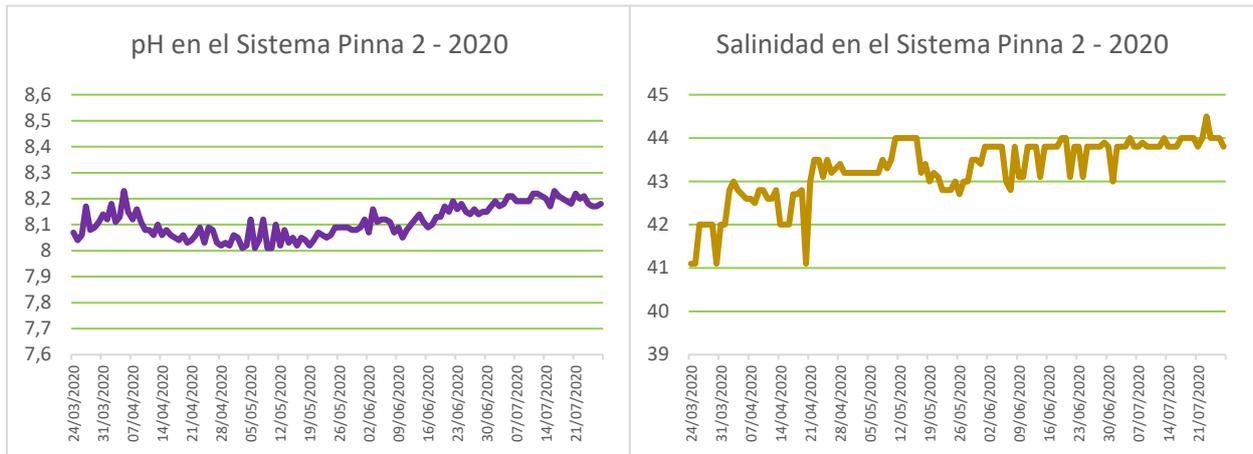


Figura : Variación de pH y salinidad durante el periodo de estudio en 2020. Fuente de los datos: Fuente: [https://canalmarmenor.carm.es/monitorizacion/monitorizacion-de-parametros/...](https://canalmarmenor.carm.es/monitorizacion/monitorizacion-de-parametros/) (Figura: elaboración propia)

### 3.4.2.2 Maduración de ejemplares

En el intento de detectar señales externas que indiquen un avanzado estado de maduración en *Pinna nobilis*, se observó un cambio con respecto a las características habituales de disposición y coloración detectadas en el borde del manto que afectó a un 60 % de los reproductores implicados en el evento reproductor de 2020 (Fig. 3.12).

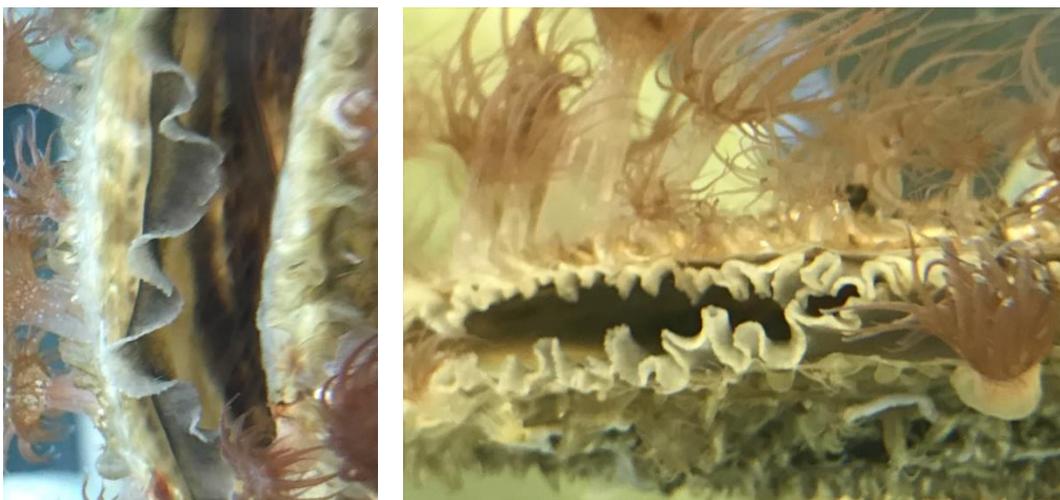


Figura 3.12: Borde del manto blanco y festoneado en ejemplar maduro.

Este cambio también se ha observado en ejemplares salvajes en el Mar Menor durante los meses de mayo y junio, aunque su observación conlleva mayor dificultad debido a que el manto no suele estar tan extendido como en los ejemplares mantenidos en laboratorio.

### 3.4.2.3 Inducción, liberación de gametos y fertilización

El día 10 de junio a las 9:35 h. se detectó la emisión de esperma por parte de los ejemplares P2B1 y P2B6. 15 minutos más tarde, el ejemplar P2B4 ubicado en el mismo sistema, comenzó a liberar ovocitos. Tras su recogida se realizó un primer muestreo en el que se estimó un desove de  $6350 \cdot 10^3$  huevos esféricos con un tamaño medio de  $60 \mu$  de diámetro. Otros reproductores se suman al evento reproductor liberando esperma. En este caso se trata de los ejemplares P2B5, P2A2 y P2A4. De este grupo de 10 reproductores solo uno de ellos liberó huevos mientras que 5 liberaron esperma.

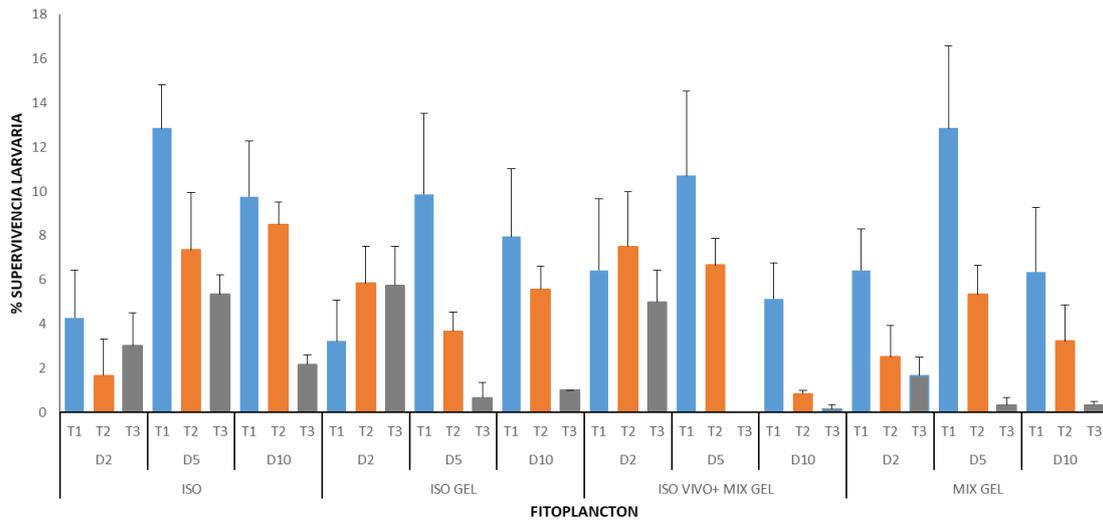
Una vez recogidos, se detectó un elevado número de huevos fecundados, aun así, se realizó el protocolo de fertilización y en muestreo siguiente se detectó una tasa de fecundación del 98%.

Tabla 3.4: Secuencia de liberación de gametos en la experiencia 1 – 2020.

FECHA	P2A2	P2A4	P2B1	P2B4	P2B5	P2B6
10/06/20	Esperma	Esperma	Esperma	Ovocitos	Esperma	Esperma
11/06/20			Esperma			Esperma
12/06/20	Esperma				Esperma	

### 3.4.2.4 Resultados de la experiencia de densidad larvaria y optimización de dietas

Los resultados del ANOVA sobre la tasa de supervivencia larvaria muestran que existen diferencias significativas entre las interacciones, concretamente entre la densidad larvaria y el tiempo (D x T); y entre la densidad larvaria y el tratamiento de fitoplancton (D x Ph). Las diferencias altamente significativas en el factor Tiempo muestran que la tasa de supervivencia global disminuye entre los tres tiempos de experimentación, sin embargo, hay que tener en cuenta las diferencias de la interacción que pueden estar determinando este resultado (Tabla 3.5; Fig. 3.13).

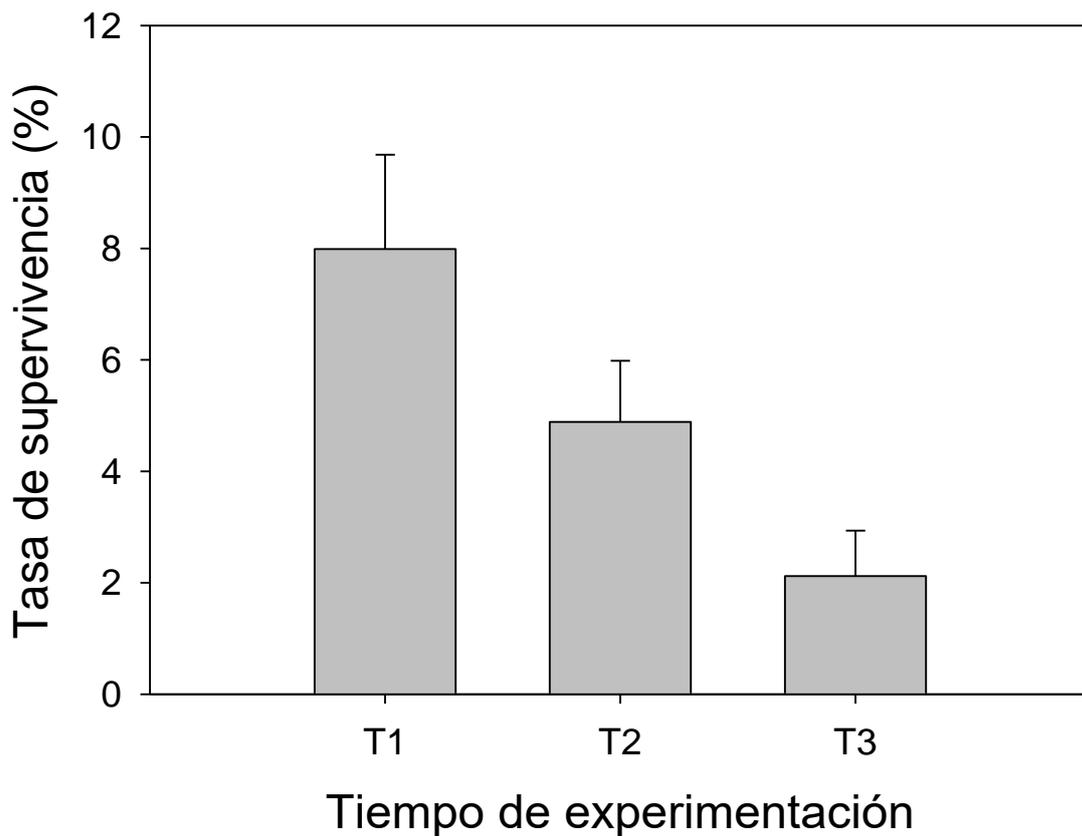


**Figura 3.13:** Valor medio y ES de la tasa de supervivencia para cada tratamiento de fitoplancton (ISO, ISO GEL, ISO VIVO+ MIX GEL y MIX GEL), con tres concentraciones larvianas (D2: 2 larvas/ml); D5: 5 larvas/ml y D10: 10 larvas/ml) en los tres tiempos experimentales (T1: 3 días; T2: 5 días y T3: 7 días).

**Tabla 3.5.** Resultados del ANOVA de tres factores sobre la tasa de supervivencia de las larvas de *Pinna nobilis* con Ph: Tipo de fitoplancton (LT, GT, MG y LT+MG), D: Densidad de larvas (D2, D5 y D10), y T: Tiempo experimental (T1, T2 y T3) como factores. La prueba de Cochran no es significativa (C: 0,1089). \*: p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p< 0,001.

Source	Df	MS	F ratio	P value	
Ph	3	15.79	1,42	0.244	n.s
D	2	46.27	4.17	0.019	*
T	2	310.39	27.95	0.000	***
Ph x D	6	32.47	2.92	0.013	*
Ph x T	6	5.44	0.49	0.814	n.s
D x T	4	59.63	5.37	0.001	**
Ph x D x T	12	7.43	0.67	0.775	n.s
Residual	72	11.10			

La tasa de supervivencia larvaria media en general de todos los tratamientos fue baja, y se observa una disminución en la supervivencia importante con el tiempo. Tras 7 días (T3) de experimentación fue de  $2.12 \pm 0.89 \%$ , mientras que la tasa de supervivencia a los 5 días (T2) era prácticamente el doble ( $4.89 \pm 0.43 \%$ ) y esta había disminuido desde el día 2 cuya supervivencia media fue de  $7.99 \pm 1.90 \%$  (Fig. 3.14).



**Figura 3.14:** Media y error estándar de la tasa de supervivencia de las larvas para los tres tiempos experimentales (T1:3 días; T2: 5 días y T3: 7días).

Al analizar la supervivencia larvaria en función de la concentración de larvas en la unidad experimental, se observan diferencias significativas con una mayor supervivencia en los tratamientos densidad de 5 larvas /ml (D5) con respecto a los otros dos, mientras que no se observan diferencias entre las de mayor y menor concentración (Fig. 3.15).

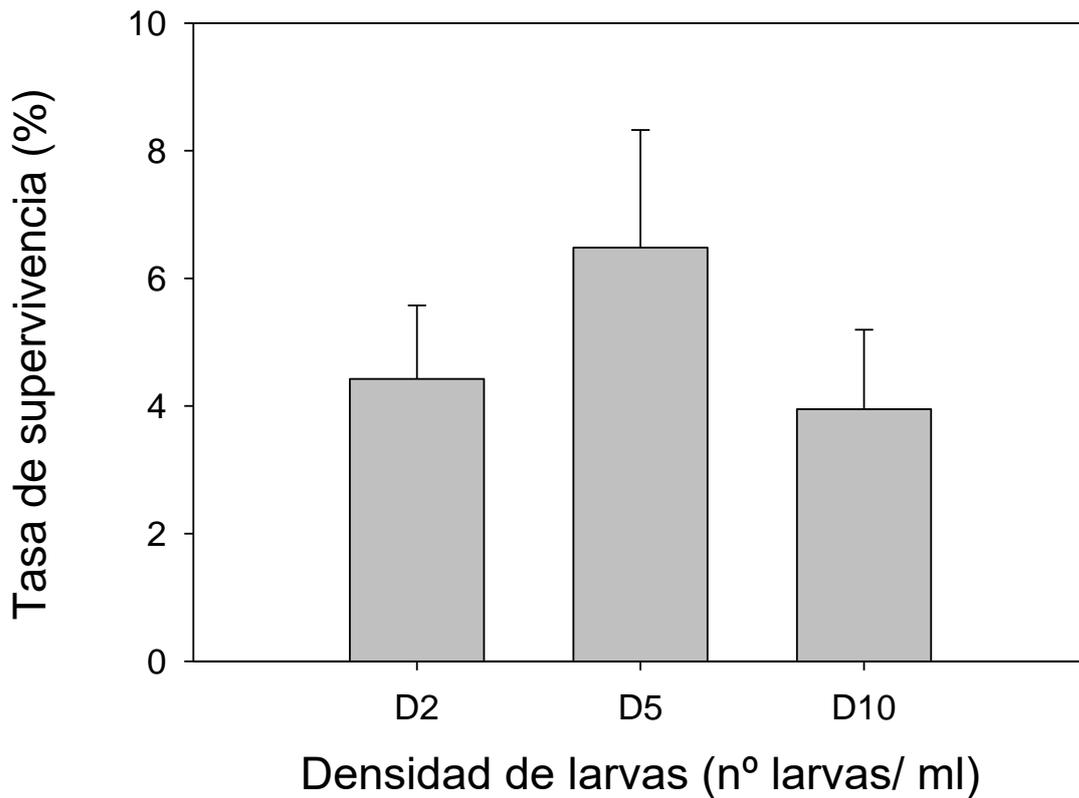
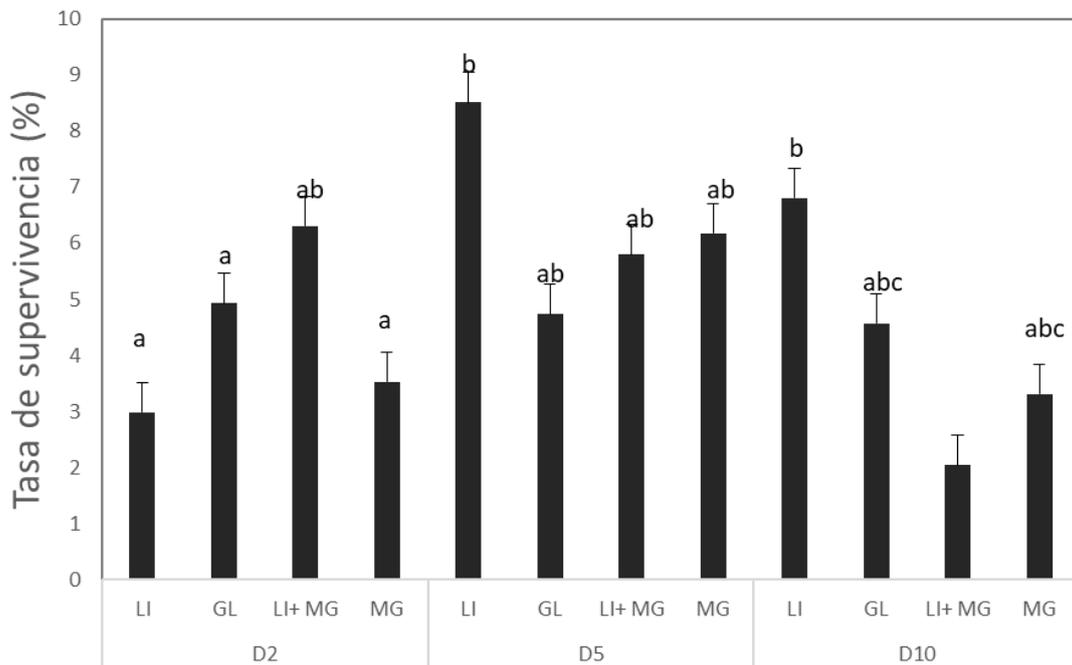


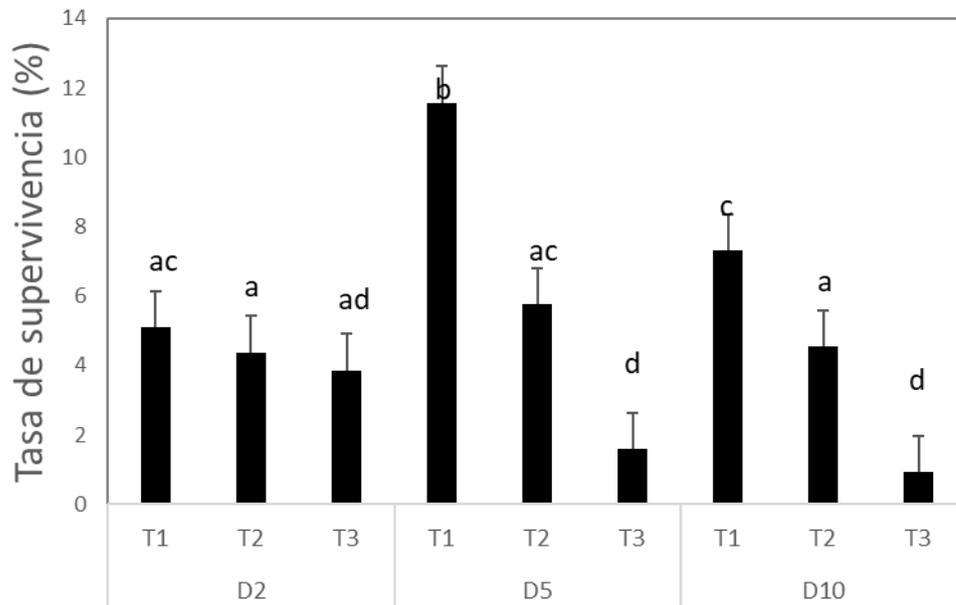
Figura 3.15: Media y error estándar de la tasa de supervivencia de las larvas de *Pinna nobilis* en tres concentraciones de larvas. D2: 2 larvas/ml, D5: 5 larvas/ml y D10: 10 larvas /ml.

Según los resultados de SNK, en relación a la interacción entre los tratamientos de fitoplancton y la densidad larvaria (D x Ph), se ha detectado que en D2 no hay diferencias significativas entre el tratamiento fitoplanctónico, y aunque tampoco se han observado diferencias en los tratamientos fitoplanctónicos de la D5, los valores de *Tisochrysis lutea* vivo (LI) son superiores al resto y un posible aumento en la replicación podría remarcar las diferencias significativas. En la concentración de D10 si se observa una supervivencia significativamente menor en el tratamiento de *T. lutea* vivo (LI) con Mix gel (LI+MG) que en el resto de tratamientos. La tasa de supervivencia ha sido mayor en el tratamiento con *T. lutea* viva que en el resto de los tratamientos (Figura e y f).



**Figura 3.16:** Valor medio y ES de la tasa de supervivencia para cada tratamiento de fitoplancton (ISO, ISO GEL, ISO VIVO+ MIX GEL y MIX GEL), con tres concentraciones larvárias (D2: 2 larvas/ml); D5: 5 larvas/ml y D10: 10 larvas/ml).

En relación a la interacción entre densidad larvária y tiempo de experimentación (D x T). No se observan diferencias en las tasas de supervivencia a lo largo del periodo experimental en los tratamientos con densidad larvária de D2. Sin embargo, en los tratamientos con densidad larvária D5 se observa que el día experimental 3 (T1) se obtienen los mayores valores de supervivencia y son significativamente mayores que los obtenidos para esta densidad el día 5 (T2) y estos a su vez presentan una mayor tasa de supervivencia que la obtenida el día 7 (T3). Un patrón similar encontramos en los tratamientos con una mayor densidad (D10), donde se observa una mayor supervivencia el día 3 que el día 5, y esta superior que el día 7. El tratamiento de D10 en el día 7 de experimentación (T3) representa la menor tasa de supervivencia de todo el experimento (Fig. 3.17).



**Figura 3.17:** Valor medio y ES de la tasa de supervivencia para cada tratamiento de concentraciones larvarias (D2: 2 larvas/ml); D5: 5 larvas/ml y D10: 10 larvas/ml) en los tres tiempos experimentales (T1: 3 días; T2: 5 días y T3: 7 días).

### 3.4.2.5 Caracterización del desarrollo embrionario y larvario

Una vez fecundados los ovocitos se pudo observar el primer corpúsculo polar a los 54 minutos (Fig. 3.21). Posteriormente tuvo lugar el proceso de segmentación en el que se apreciaron las tres divisiones mitóticas que dieron lugar a la mórula una vez transcurridos 2 h desde la fecundación del huevo (Fig.3.22).

Tres horas después de la puesta ya se localizan embriones en estado de gástrula ciliada (Fig. 3.22). A las 7 h y 13 min postdesove se observó el primer estadio larvario, la fase de trocófora temprana (Fig. 3.23), caracterizada por la presencia de una corona ciliada. En esta fase se pudo apreciar con posterioridad la aparición del flagelo apical (Fig. 3.23) alcanzado su estadio más avanzado 23 h y 5 min postdesove. Las larvas trocóforas presentaron una gran movilidad, realizando desplazamientos rápidos generados por un característico movimiento helicoidal (Fig. 3.23).

La fase D-Veliger (Fig. 3.23 y 3.24), caracterizada por la aparición de la prodisoconcha I, se alcanzó a las 28 h y 5 min y su talla media es de 83  $\mu$ . Esta primera protovalva se caracteriza por presentar el lado de la charnela recto (Figs. 3.23 y 3.24), de ahí el nombre "D- Veliger. En esta fase las larvas mostraron una gran capacidad nadadora, pudiendo realizar movimientos circulares o rectos. Se observó la característica presencia del velo (Fig. 3.24), una estructura ciliada que le proporciona movilidad y genera corrientes para captar alimento. Ya en esta fase pudo apreciar su capacidad para descender hasta el fondo y quedarse en posición vertical generando corrientes desde el velo. Durante esta fase comenzó la alimentación larvaria siguiendo los protocolos establecidos. Se pudo localizar el alimento, en este caso células de *Tisochrysis lutea* distinguibles por transparencia en la glándula gástrica (Fig. 3.35). A los cinco días la característica charnela recta de la fase D-Veliger fue cambiando de forma hacia una charnela más redondeada, característica de la larva umbonada temprana. En esta fase la tasa de mortalidad fue muy elevada muriendo todas las larvas alcanzando una talla de 110  $\mu$  (Tabla 3.6).

En la tabla 3.6 se puede observar la secuencia de tiempos en el desarrollo embrionario y larvario hasta el estado alcanzado.

**Tabla 3.6:** Secuencia de desarrollo larvario para tiempos y tallas. Desove 10/06/2020. La coloración corresponde a las fechas de cada proceso.

TIMMING LARVAS	10/06/2020	Tiempo entre fases h/m	Tiempo acumulado	TALLA
Huevo	9:51	0:00	0:00	60 $\mu \pm$
Fecundación	10:30	0:39	0:39	
Corpúsculo polar	10:45	0:15	0:54	
1ª división	12:06	0:21	02:15	
2ª división	12:27	0:21	02:36	
3ª división	12:49	0:22	02:58	
Mórula	13:29	0:40	03:38	
Blástula				
Gástrula	13:54	0:25	04:03	
Trocófora temprana	17:04	3:10	07:13	
Trocófora tardía	9:56	17:02	24:05	
D-Veliger	13:56	4:00	28:05	83 $\mu \pm$
Veliger				90 $\mu \pm$
Umbonadatemprana	11:25		145:34	100 $\mu \pm$
Umbonada	19:10		201:19	110 $\mu \pm$

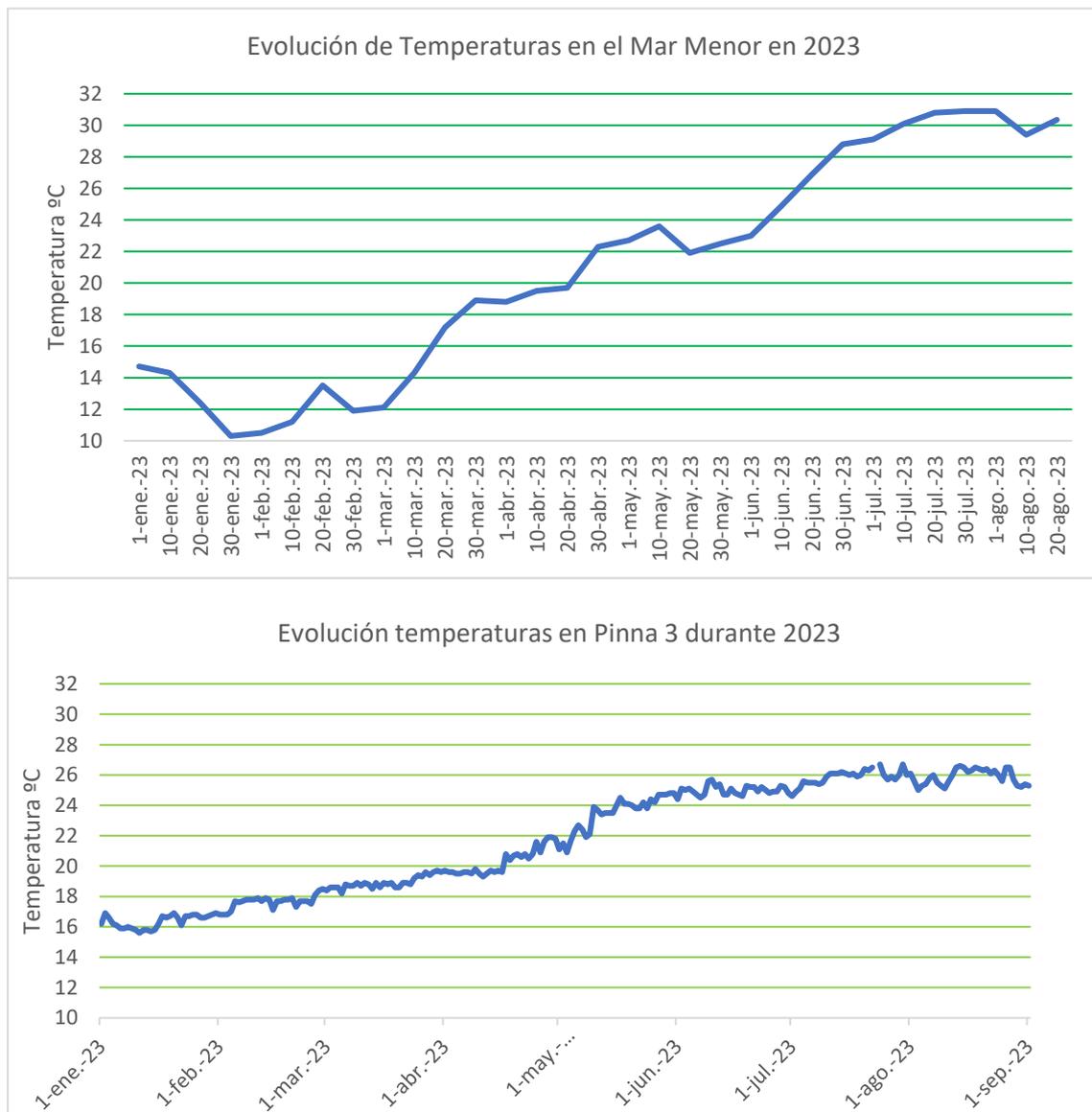
  

10/06/2020
11/06/2020
16/06/2020
18/06/2020

### 3.4.3 Experiencia 2. 2023: Maduración ex situ e in situ y caracterización de fases de desarrollo larvario

#### 3.4.3.1 Sistemas de mantenimiento de reproductores. Tablas de parámetros

Durante todo el experimento el sistema Pinna 3 (figura 3.7) estuvo sometido a control de parámetros con el fin de mantener unas condiciones similares a las observadas en el medio natural (Mar Menor) con su evolución en el tiempo. La temperatura varió en la laguna del Mar Menor desde los 10,3°C en el 30 de enero de 2023 los 30,9 el 30 de agosto del mismo año.

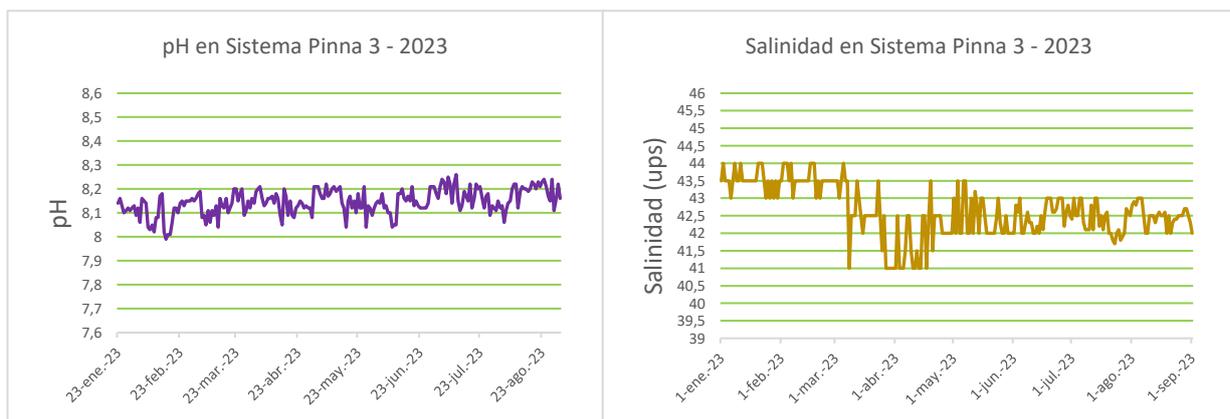


**Figura 3.18:** Comparativa de temperaturas en el Mar Menor (A) y en el tanque Pinna 3 (B) durante 2023 (°C). Fuente de información temperaturas del Mar Menor: <https://canalmarmenor.carm.es/monitorizacion/monitorizacion-de-parametros/> y también <https://marmenor.upct.es/charts/>.

Siguiendo un patrón de cambios similar a otros años, aunque alcanzando temperaturas extremas (Fig. 3.18-A). Siguiendo el mismo patrón y con las previsiones basadas en comportamientos de años precedentes se diseñó un plan de control de temperatura, suavizando las temperaturas extremas. Los valores mínimos en los meses de enero y febrero, el mínimo (15,6°C) el 11 de enero de 2023 y subiendo de forma gradual en el transcurso de los meses sucesivos hasta alcanzar los 26°C con una cota máxima de 27,7 °C los días 24 y 30 de julio (Fig. 3.18-B).

Los valores de pH mantuvieron un patrón más estable rondando 8,1, con pequeñas variaciones entre 7,99 y 8,26. La salinidad se encontraba acorde a la salinidad media del Mar Menor, comenzó un primer periodo entre 43-44 ups para posteriormente sufrir un ajuste a salinidades entre 42-43 ups a partir del mes de mayo (Fig. 3.19). Las pequeñas fluctuaciones observadas en ambos parámetros son resultados de los ajustes diarios típicos de los procedimientos de mantenimiento del sistema.

Las condiciones en los sistemas diseñados para el mantenimiento de larvas no variaron y se mantuvieron similares a las descritas para el sistema de reproductores (Capítulo 2, Apartado 3.2 Parámetros ambientales).



**Figura 3.19:** Registro de variación de pH y salinidad en Pinna 3 durante la experiencia 2- 2023. Fuente: <https://canalmarmenor.carm.es/monitorizacion/monitorizacion-de-parametros/...> (Figura: elaboración propia).

### 3.4.3.2 Maduración de ejemplares

En proximidad del evento reproductor de 2023, se apreció con claridad un cambio de coloración del borde del manto y su apariencia festoneada en el 87% de los reproductores implicados.



**Figura 3.20:** Ejemplar de *P. nobilis* epifitado por *Caulerpa prolifera*. A la derecha un detalle del manto festoneado con borde blanco, posible indicador de ejemplar maduro.

En la figura 3.20 se puede apreciar un macro del borde del manto festoneado y blanco. En este ejemplar no hay anemonas del género *Aipsasia* que puedan generar confusión sobre el origen de la forma festoneada del manto por irritación tras contacto con cnidocitos.

Solamente en dos ejemplares P3B5 y P3C1 se pudo intuir la presencia de gónadas femeninas por visualización del paquete visceral desde la región dorsal de las valvas.

### 3.4.3.3 Inducción, liberación de gametos y fertilización

Al tratarse de un proceso de inducción natural solo hubo que esperar a que los reproductores liberasen los gametos.

De todo el grupo de reproductores en Pinna 3C un 50% liberaron únicamente gametos masculinos y mientras que el 50% restante liberaron gametos masculinos y femeninos, produciéndose alternancia en la liberación de gametos con un mínimo de 2 días entre gametos de sexo opuesto (Tabla 3.7). En Pinna 3B solo liberaron gametos el 40% de los reproductores, 20% masculinos y 20% femeninos y masculinos en alternancia.

La temperatura del sistema en el comienzo de la emisión de gametos era de 25,2 °C y la salinidad era de 41 ups. Esta temperatura y salinidad se mantuvieron durante todo el evento reproductor con ligeros cambios.

El caso del reproductor P3C2 es destacable debido a que estuvo liberando esperma durante dos días continuos, durante todo el día, mientras que en el resto de los reproductores la liberación de esperma se reducía a un máximo de 4 horas por la mañana. Este ejemplar podría considerarse el “inductor” del proceso, P3C2 comenzó a liberar esperma el día 14 de junio a las 10:17 h y pasó todo el día emitiendo pulsos con altas concentraciones de gametos. Una vez en oscuridad a las 21:30 h se mantuvo en reposo y dejó de emitir gametos. El día 15, continuó con el proceso de liberación desde las 9:16 h, terminando la simulación de amanecer programada en la pantalla del tanque, y estuvo liberando esperma a pulsos similares a los del día anterior, hasta las 21:00 h que dejó de hacerlo al activarse la simulación de la puesta de sol programada en el sistema de reproductores y la sala de cría.

A diferencia del reproductor “inductor”, los reproductores P3C4 y P3C6 expulsaron esperma por la mañana durante tres días seguidos. P3C5 también liberó esperma únicamente por la mañana, pero lo hizo durante 6 días con un día de descanso después del tercer día.

La liberación de gametos femeninos comenzó el día 16 de junio y continuó los días 21, 22 de junio y 6 de julio. En la tabla 3.7 se representa la secuencia de liberación de gametos en el tiempo por parte de los reproductores.

**Tabla 3.7:** Secuencia temporal de liberación de gametos de los ejemplares mantenidos en el sistema Pinna 3. Se destacan las fechas de emisión y el tipo de gametos emitidos (esperma /ovocitos).

Secuencia de liberación de gametos en la experiencia 2 – 2023								
FECHA	P3C2	P3C1	P3C5	P3C6	P3B5	P3C3	P3B4	P3C4
14/06/23	Esperma+							
15/06/23	Esperma+							
16/06/23		Ovocitos						
19/06/23			Esperma					
20/06/23			Esperma	Esperma				
21/06/23			Esperma	Esperma	Ovocitos	Ovocitos		
22/06/23	Ovocitos	Esperma						
28/06/23					Esperma		Esperma	Esperma
29/06/23			Esperma	Esperma				Esperma
06/07/23	Esperma	Ovocitos en pseudoheces	Esperma		Esperma		Esperma	Esperma
07/07/23	Esperma		Esperma			Esperma		

#### 3.4.3.4 Caracterización del desarrollo embrionario y larvario

Durante el ciclo reproductor naturalizado que se llevó a cabo en los meses de junio y julio de 2023, fueron estudiados cinco eventos reproductores, que tuvieron lugar los días 16, 21 y 22 de junio y 7 de julio. Uno de los desoves, el del día 16, resultó en una escasa supervivencia larvaria debido a un fallo en las características del agua de mar sintética utilizada. De los cuatro desoves restantes durante los días 21, 22 y 7, tres fueron muy similares entre sí. El día 21 hubo dos puestas, una de las cuales presentó algunas diferencias.

A continuación, se procederá a la descripción de tres de los cinco eventos representativos, dos de los cuatro estudiados como similares y el que presentó diferencias.

Los cuatro eventos similares correspondieron a los reproductores ubicados en el tanque Pinna 3C, que fueron seleccionados como reproductores que habían realizado su proceso de maduración en el medio natural y fueron recogidos en abril de 2023.

El evento que se distinguió del resto corresponde a los reproductores dispuestos en el tanque Pinna 3B, seleccionados como reproductores madurados “*ex situ*”, que fueron trasladados al laboratorio en septiembre de 2021.

##### 3.4.3.4.1 Evento 16/06/23. Tanque Pinna 3C

El día 16 de junio a las 9:35 h comenzó a liberar ovocitos el ejemplar P3C1, finalizando a las 9:55 h, tras 20 minutos de puesta homogénea y continua. En este tiempo se liberaron 10.842.600 ovocitos esféricos, con un tamaño medio de 60  $\mu$ .

Los ovocitos se recogieron siguiendo la misma técnica utilizada para el esperma, aunque en el caso de los ovocitos, dada la homogeneidad en caudal y diámetro de flujo, fue posible recogerlos muy cerca de la región exhalante de emisión.

Al seguir la técnica de desove naturalizado y no separar reproductores en los momentos previos a la emisión de gametos, se observó cómo un 91% de huevos estaban ya fecundados en el momento de la emisión. A pesar de esto se aseguró la fecundación, mezclando con esperma en una relación entre 8 y 15 espermatozoides por ovocito, con el fin de evitar polispermia.

Tras la fertilización, pasados unos minutos, se detectó una tasa de fecundación del 94,9%.

Las etapas de desarrollo embrionario se sucedieron con rapidez alcanzando la primera fase larvaria, trocófora (Fig.3.23), en 5 h 25 min. La segunda fase larvaria, D-veliger (Fig. 3.23 y 3.24) se localizó a las 25h 53 min post desove. En la tabla 3.8 se encuentra la secuencia de tiempos y

tallas en todo el experimento. Ya en fase D-Veliger se comenzaron a apreciar filamentos mucosos (Rojas et al., 2020) en bandejas y troncocónicos, que salían del fondo alcanzando la superficie con facilidad. Estos filamentos mucosos se eliminaban en los procesos de limpieza de tanques, pero volvían a salir en poco tiempo.

El día 20 se encontraron las larvas muertas, aglutinadas en una matriz mucosa que cubría un 70% del fondo de los sistemas de mantenimiento de larvas.

Desde el día 18 se había observado contaminación en los cultivos, se identificaron ciertas especies de protozoos ciliados de los géneros *Litonotus*, *Euplotes* y *Vorticella*, que se mostraron complicados de eliminar del todo mediante los procesos de separación por tamaños en tamices sucesivos.

Tabla 3.8: Secuencia de desarrollo larvario para tiempos y tallas. Desove 16/06/2023.

TIMMING LARVAS	16/06/2023	Tiempo acumulado h:m	TALLA
Huevo	9:55	0:00	60 μ
Fecundación	10:00	0:05	
Corpúsculo polar	10:18	0:23	
1ª división	10:54	00: 59	
2ª división	11:07	1:12	
3ª división	11:55	2:00	
Mórula	12:32	2:37	
Blástula			
Gástrula	12:54	2:59	
Trocofora temprana	15:20	5:25	
Trocófora tardía	8:53	23:02	
D-Veliger	11:44	25:53	
Veliger	13:19	75:28	
Umbonada temprana	RIP		
Umbonada	RIP		

16/06/2023
17/06/2023
19/06/2023

Tabla 3.9: Tabla de supervivencia y mortalidad. Desove 16/06/2023.

FECHA	P3C1	Nº huevos	Fertilización	Larvas	Supervivencia	Mortalidad
16/06/23	Ovocitos	10.842.600	94,9%	10.300.400		
17/06/23				7.416.300	72,1%	27,9% (2.884.100)
18/06/23				4.968.900	67%	33% (2.447.400)
19/06/23				3.890.000	78%	22% (1.078.900)
20/06/23				0	0%	100% (3.890.000)

#### 3.4.3.4.2 Evento 21/06/23-A. Tanque Pinna 3B

El día 21 de junio se detectó una puesta en PINNA 3B por parte del ejemplar P3B5, con origen en el Pedrucho en 2021. Este ejemplar fue sometido a extracción de hemolinfa en junio de 2022 destinada a un estudio de respuesta inmune (Carella et. Al., en prensa). Este reproductor adquiere especial importancia ya que es el primer caso confirmado de puesta procedente de un individuo madurado en el laboratorio.

El desove comenzó a las 12:45 h y terminó a las 12:50. En 5 minutos de puesta liberó hasta 51.000 ovocitos, esféricos y con una talla de 50  $\mu$ . Tras el proceso de fertilización la tasa de fecundación fue del 98% y fueron trasladados a una bandeja de 9 l a una densidad de 5,6 larvas  $\text{ml}^{-1}$ . A las 24 h fueron tamizados y se trasladaron a una bandeja de 40 l a una densidad de 1,26 larvas  $\text{ml}^{-1}$ .

Tabla 3.10: Secuencia de desarrollo larvario para tiempos y tallas. Desove 21/06/2023-A.

TIMMING LARVAS	21/06/2023-A	Tiempo acumulado h:m	TALLA
Huevo	12:50	0:00	50 μ
Fecundación	12:55	0:05	51 μ
Corpúsculo polar	12:16	0:26	
1ª división	13:30	1:40	
2ª división	13:42	1:52	
3ª división	13:56	2:06	
Mórula	14:35		
Blástula			
Gástrula			
Trocofora temprana	15:20	2:30	65,5 μ
Trocófora tardía			70 μ
D-Veliger	14:06	25:16	80 μ
Veliger	11:15	70:25	100 μ
Umbonadat temprana	14:05	97:15	104 μ
Umbonada	14:27	169:37	120 μ

21/06/2023-A
22/06/2023-A
24/06/2023-A
25/06/2023-A
29/06/2023-A

Tabla 3.11: Tabla de supervivencia y mortalidad. Desove 21/06/2023-A.

FECHA	P3B5	Nº huevos	Fertilización	Larvas	Supervivencia	Mortalidad
21/06/23	Ovocitos	51.000	98%	49.980		
23/06/23				48.300	96%	4%
25/06/23				39.900	82,6%	17,4%
27/06/23				18.300	45,8%	54,2%
29/06/23				7.500	40,9%	59,1%
01/07/23				2.000	26,6%	73,4%
03/07/23				0	0%	100%

### 3.4.3.4.3 Evento 21/06/23-B. Tanque Pinna 3C

El mismo día, 21 de junio, en el tanque PINNA 3C, se observó liberación de ovocitos por parte del reproductor P3C3, con origen en la Isla del Barón, abril de 2023. Este ejemplar está en el grupo de los madurados *in situ*. Se pudo observar que liberó esperma previamente, en poca cantidad el día 16 de junio. A las 12:35 h se detectó el inicio del desove, y terminó a las 13:15 h. Tras 40 minutos de puesta se recogieron 24.387.670 ovocitos esféricos y con una talla de 60  $\mu$ . Como en todos los eventos hasta la fecha se observó fecundación en los ovocitos expulsados, a pesar de ello se procedió a fertilizar bajo el mismo protocolo que en el resto de los eventos. La tasa de fecundación alcanzada es del 98%. 2  $10^6$  larvas se conservaron para experiencias posteriores.

Tabla 3.12: Secuencia de desarrollo larvario para tiempos y tallas. Desove 21/06/2023-B.

TIMMING LARVAS	21/06/2023-B	Tiempo acumulado h:m	TALLA
Huevo	13:15	0:00	60 $\mu$
Fecundación	13:20	0:05	
Corpúsculo polar	13:25	0:10	
1ª división	13:29	0:14	
2ª división	13:42	0:27	
3ª división	14:32	01:17	
Mórula	15:04	01:49	
Blástula			
Gástrula	15:30	02:15	
Trocofóra temprana	17:58	04:43	70 $\mu$
Trocofóra tardía	12:23		73 $\mu$
D-Veliger	14:37		80 $\mu$
Veliger			90 $\mu$
Umbonadatemprana			90 $\mu$
Umbonada			

21/06/2023
22/06/2023
24/06/2023
25/06/2023
28/06/2023

En esta ocasión, el día 1 post-desove fueron trasladados a dos bandejas con volumen de 40 l. a una densidad de 10 larvas ml<sup>-1</sup> y a un troncocónico de 500 l. a una densidad de 23,4 l ml<sup>-1</sup>. A partir del día 2 una vez tamizados y filtrados, se desdoblaron a cuatro bandejas de 40 l a una densidad de 5 larvas ml<sup>-1</sup> y dos troncocónicos de 500 l. a una densidad de 21,5 larvas ml<sup>-1</sup>.

El día 1 de julio quedan muy pocas larvas en estado umbonada temprana (Fig. 3.25) con una talla de 90 micras y se observa pérdida del velo. El día 3 de julio no se encuentran supervivientes.

Tabla 3.13: Tabla de supervivencia y mortalidad. Desove 21/06/2023-B.

FECHA	P3C3	Nº huevos	Fertilización	Larvas	Supervivencia	Mortalidad
21/06/23	Ovocitos	24.387.670	98%	23.899.916		
23/06/23				22.550.000	94,35 %	5,65 %
25/06/23				15.690.000	69,5 %	30,5 %
27/06/23				9.270.000	59,08 %	40,92 %
29/06/23				4.380.000	47,25 %	52,75 %
01/07/23				1.540.000	35,16 %	64,84 %
03/07/23				0	0%	100%

3.4.4 SECUENCIA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO EN *Pinna nobilis*

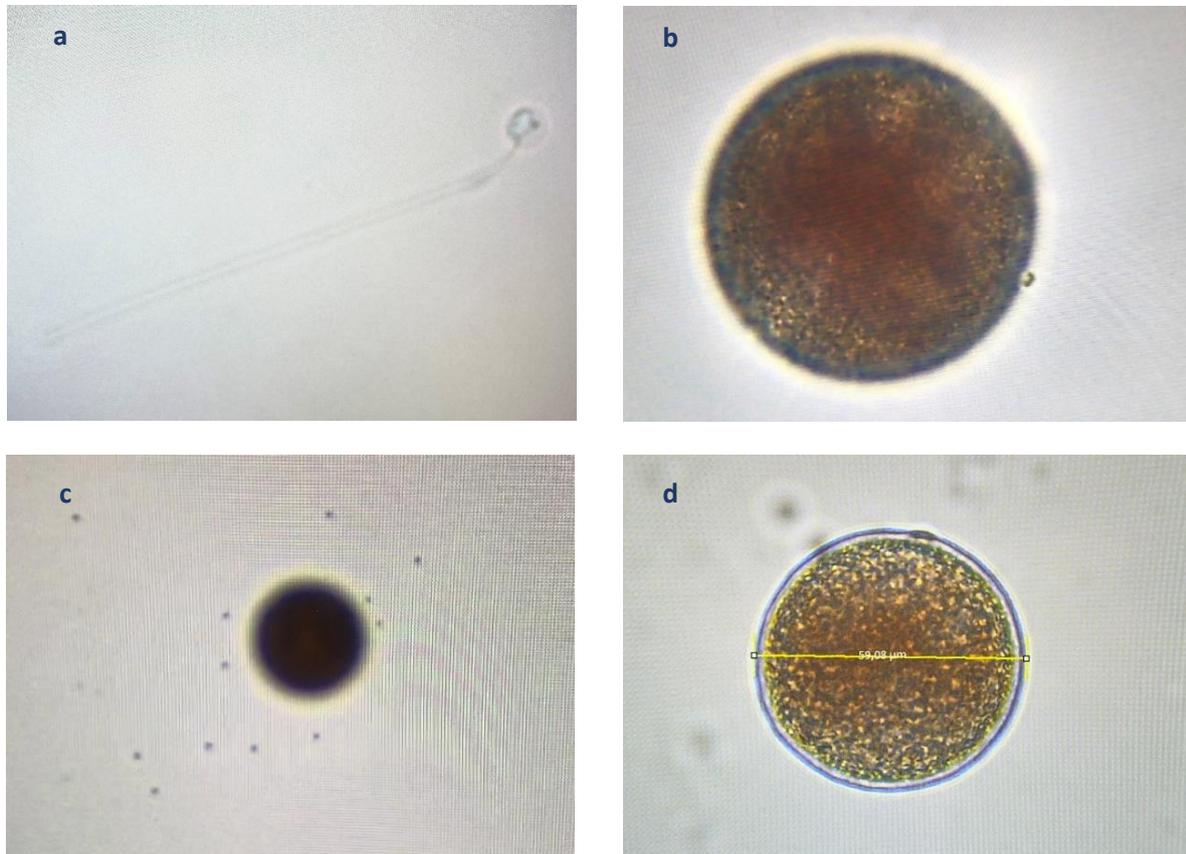
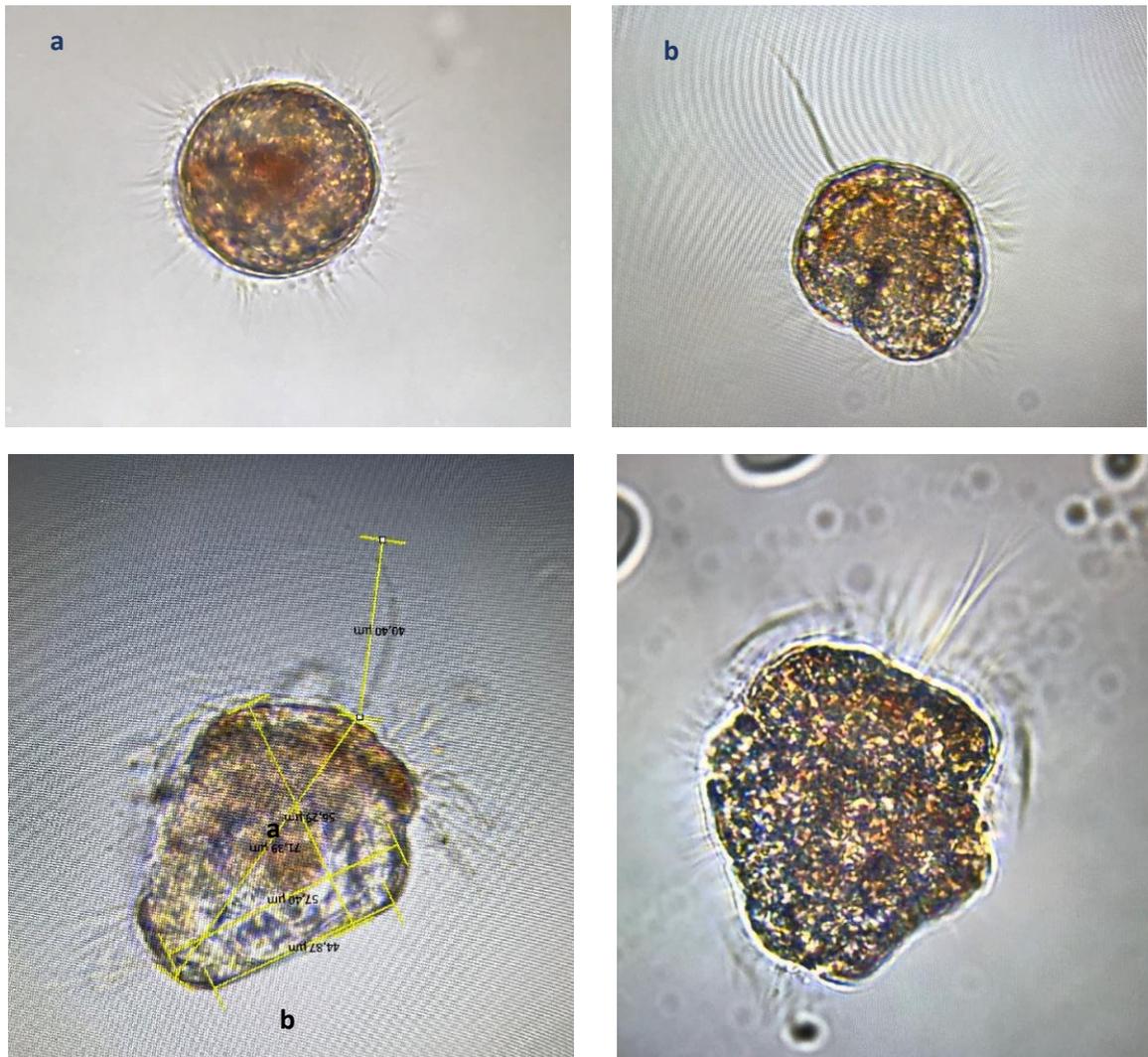


Figura 3.21: Secuencia de gametos y fecundación en *Pinna nobilis*.

- a. Espermatozoide.
- b. Momento de la fecundación del Ovocito por parte de un espermatozoide.
- c. Relación Ovocitos: esperma - 1 : 12
- d. Ovocito fecundado. Aparición del primer corpúsculo polar.

c

d



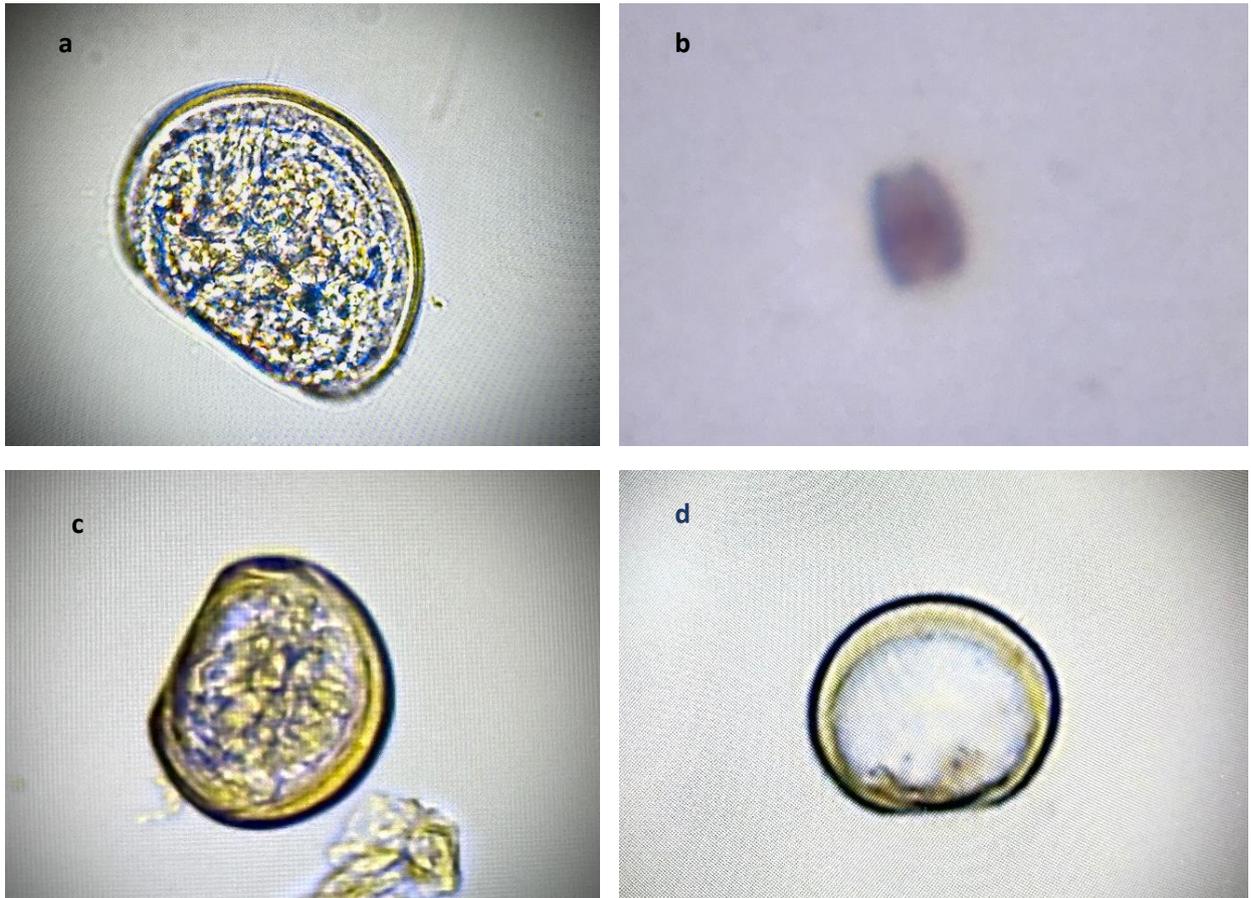
**Figura 3.23:** Secuencia de fases de desarrollo larvario en *Pinna nobilis*.

- a. Trocófora temprana. Corona de cilios.
- b. Trocófora tardía. Corona de cilios y flagelo apical.
- c. D. Veliger. Distintas medidas: C1 charnela, C2 longitud Prodisoconcha I, C3 anchura Prodisoconcha I hasta el velum, C4. Longitud total hasta el velum, C5 flagelo apical.
- d. Visión dorsal de una larva D- veliger. Prodisoconcha I.



**Figura 3.24:** Larva veliger de *Pinna nobilis*.

- a. Vista dorsal veliger tardía. Longitud y anchura. Velum.
- b. Vista lateral de veliger temprana o D-veliger.



**Figura 3.25:** Estadios larvarios de *Pinna nobilis*.

- a. Veliger cerrada.
- b. Veliger asentada filtrando.
- c. Veliger tardía. Comienzo umbonación.
- d. Umbonada temprana. Prodisoconcha I. Umbo.

### 3.5 DISCUSIÓN

Este capítulo describe los avances llevados a cabo en la caracterización del ciclo reproductivo de *Pinna nobilis*, a través de diferentes eventos reproductores *ex situ*, en las instalaciones del Acuario de la Universidad de Murcia entre 2020 y 2023. Además, los conocimientos obtenidos se complementan con las observaciones realizadas sobre reproductores y liberación de gametos en el medio natural.

La delicada situación de la nacra en el Mediterráneo, cercana a la extinción, así como la comprometida situación de sus poblaciones relictas, localizadas en zonas sometidas a importantes presiones de origen antrópico, hacen que el desarrollo de protocolos de mantenimiento y reproducción *ex situ* de la especie sea especialmente significativo para la conservación de la especie (Trigos, 2017; Hernandis, 2023).

#### 3.5.1 Evento reproductor *in situ* en la laguna del Mar Menor

La localización del evento reproductor *in situ*, requirió un importante esfuerzo de muestreo, que aun sin ser intensivo dio sus frutos en los años elegidos. Esto está relacionado con lo dilatado y recurrente en el tiempo que puede llegar a ser el evento anual de liberación de gametos. Cuando se procedió al estudio de las puestas recogidas en el medio natural, se observó como un porcentaje importante de los ovocitos estaban ya fecundados. La distancia con otros ejemplares que en ese momento liberaban gametos masculinos, hace pensar que la fecundación de los ovocitos o de una parte importante de ellos tuvo lugar, con anterioridad a su expulsión, en la cavidad paleal, favorecida por el proceso de filtración, como se sugiere en Trigos et al., 2018. Este mecanismo de fecundación podría reforzar la teoría de la distribución en parches de la especie como el modo de garantizar un ciclo reproductivo exitoso (Angel-Dapa, 2015). También sugiere que ejemplares aislados difícilmente pueden contribuir al acervo genético de la especie.

A la hora de diseñar estrategias de recuperación para *Pinna nobilis* en el caso en que se consigan cerrar los protocolos de reproducción de la especie y se obtenga semilla viable, es interesante incluir como posibles áreas de repoblación, las zonas ocupadas por individuos aislados, ya que son zonas con condiciones apropiadas para los adultos y estos adultos reproductores incrementarían la variabilidad genética del grupo *ex situ* una vez en el medio natural.

### 3.5.2 Diseño de sistemas

Los sistemas de recirculación diseñados para albergar a los ejemplares reproductores de nacra han sido los adecuados, proporcionando la calidad de agua requerida para el desarrollo de las diferentes pruebas. Posiblemente se modifiquen en futuras experiencias en lo concerniente al nivel de esterilización requerido. En las experiencias realizadas se ha filtrado el agua a través de lámparas germicidas a nivel 3 de esterilización, que ha probado ser suficiente para mantener un nivel de bacterias circulantes prácticamente indetectable, pero debido a la localización de *Vibrio mediterranei* sobre algunos reproductores agotados por el proceso de maduración y liberación de gametos, se incrementará el nivel de esterilización para mantenerlo cercano a 5 y estudiar si la contaminación bacteriana continua afectando a los ejemplares más débiles.

En lo que respecta a la idoneidad de los sistemas estudiados para el mantenimiento de larvas se observó que siempre que se respetasen las condiciones adecuadas de densidad larvaria óptima, alimentación y calidad del agua, relacionada fundamentalmente con limpieza y estabilidad de parámetros, las larvas evolucionaban hasta fase umbonada, en la cual se incrementó la mortalidad. Se observaron larvas viables en placas Petri durante más de 8 días, al igual que en los diferentes tamaños y estructuras de bandejas y en los tanques más evolucionados para el mantenimiento de larvas, como son los troncocónicos motorizados de 500 l, pero estos últimos sin duda ofrecen más seguridad en lo que respecta a la estabilidad paramétrica, asegurando la viabilidad larvaria a largo plazo con menor esfuerzo. El movimiento lento conseguido en los diferentes sistemas motorizados probados se contempla como una de las modificaciones más apropiadas para el mantenimiento de calidad en el medio.

### 3.5.3 Acondicionamiento de reproductores. Maduración gonadal

En las experiencias *ex situ* llevadas a cabo en este trabajo se abordaron ciclos de reproducción completos y parciales, que abarcaron tanto el acondicionamiento o maduración gonadal y la liberación de gametos, como únicamente la liberación de gametos. Dependiendo de las circunstancias puede ser interesante elaborar un protocolo de reproducción completo que abarque desde el proceso de maduración hasta el desarrollo larvario, o parcial, centrando la experiencia en la liberación de gametos y desarrollo de larvas. El protocolo parcial puede llegar a ser más exitoso debido a que los ejemplares madurados en el medio natural suelen tener unas condiciones exógenas y endógenas habitualmente más favorables que las proporcionadas en laboratorio (Ángel-Pérez et al, 2007). Por otra parte, también es más económico debido a que no se realiza el esfuerzo correspondiente al desarrollo de cultivos auxiliares a gran escala para

acondicionar a los reproductores (Robles-Mungaray et al., 1996). Sin embargo, todavía hay que interpretar determinados resultados que surgen de la consecución del proceso reproductor completo en el laboratorio.

Como propone el trabajo sobre *Atrina maura* de Ángel Dapa et al., 2015; la viabilidad *in situ* de las larvas depende de una conjunción de factores óptimos durante todo el ciclo reproductor, que no tienen por qué observarse en todos los eventos reproductores y por lo tanto hay ocasiones en las que la viabilidad larvaria es nula. En especies de la misma familia, como es el caso, pueden existir cierto paralelismo que explicaría como en localidades como el Mar Menor el reclutamiento en *Pinna nobilis* parece ser por clases de edad. El asentamiento de juveniles ha tenido lugar en los momentos en los que se cumplen esas condiciones idóneas que han favorecido una etapa de maduración gonadal correcta y un periodo de desarrollo larvario óptimo. Un punto clave para el trabajo de reproducción *ex situ* podría ser la identificación de esos factores que hacen que en años determinados haya reclutamiento viable, mientras que otros años no lo haya.

Según el trabajo de Deudero et al., 2017 la maduración de los ejemplares de *Pinna nobilis* en el Mediterráneo (Parque Nacional de Cabrera) sigue unos periodos de tiempo diferentes entre hembras y machos. Las gónadas femeninas comienzan a diferenciarse en un pequeño número de ejemplares entre noviembre y diciembre, llegando entre febrero y marzo a un estado de maduración avanzado en la mayoría de ellas, mientras que los machos comienzan a madurar en ese momento. Las gónadas masculinas maduran más rápidamente y el periodo reproductor tiene lugar entre mayo y julio.

En la primera experiencia de cría de nacra contemplada en este estudio, llevada a cabo en la temporada reproductora de 2020, se recogieron los ejemplares reproductores en el mes de febrero, algunos de los cuales ya presentaban signos de maduración de gónada femenina. Se trabajó en la elaboración de un protocolo de reproducción semi-completo que incluyó la maduración de gónadas masculinas *ex situ*, mientras que las gónadas femeninas solamente llevaron a término su proceso de maduración en el laboratorio. Este tipo de acondicionamiento en el caso de gónadas masculinas suele resultar menos exigente que en las femeninas.

Por otra parte, las condiciones en el Mar Menor en febrero de 2020 no eran las ideales cuando se recogieron los ejemplares de nacra destinados a mantenimiento en laboratorio (Giménez-Casalduero y Martínez- Fernández, 2020), y no se consiguió identificar a qué nivel pudo afectar esa alteración en las condiciones ambientales *in situ*, al proceso de maduración gonadal. (Capítulo 1 del presente trabajo).

Tras evaluar diferentes metodologías de maduración basadas principalmente en la aceleración del proceso sometiendo a las nacras a cambios de temperatura en tiempos determinados (Helm et al., 2006) se descartaron aquellas que pudieran alterar de algún modo el ciclo vital natural de la nacra para no inducir estrés durante el procedimiento. De este modo, se pensó en la conveniencia de llevar a cabo un proceso de maduración naturalizado de los ejemplares que siguiera las pautas de tiempo, temperatura y alimento observadas en su ambiente habitual.

En la segunda experiencia de reproducción de nacra elegida para este trabajo, realizada en la temporada de reproducción de 2023, se contaba con ejemplares recogidos en 2021 que maduraron en el laboratorio y ejemplares recogidos en 2023 durante el mes de abril que maduraron en el medio natural. En el momento de la recolección, las hembras presentaban indicios de estar ya maduras, mientras que los machos estaban terminando su proceso de maduración. Al igual que en la experiencia anterior, se aplicó un método de maduración naturalizado.

En cultivos de bivalvos es importante conocer el estado de maduración de los ejemplares reproductores antes de proceder a inducir la liberación de gametos (Helm et al., 2006). Para identificar el estado de madurez de los reproductores existen distintos procedimientos. En cultivos comerciales de bivalvos, uno de los métodos más comunes para observar el estado de madurez se basa en el estudio de las gónadas de un grupo de ejemplares representativo entre los reproductores (Ángel-Pérez et al, 2007; Helm et al., 2006). Este procedimiento implica la muerte de ejemplares, por lo que no es extrapolable a experiencias con *Pinna nobilis*. Este estudio habría sido enormemente interesante y habría aportado datos muy relevantes sobre el proceso de maduración *ex situ*, comparables con los datos existentes del proceso de maduración *in situ* de *Pinna nobilis* (Deudero et al., 2017), pero éticamente sería muy cuestionable dado el estado actual de la población en el Mediterráneo y también en el Mar Menor. El método seleccionado para trabajar con nacras debe ser totalmente inocuo, por ello se seleccionó la evaluación de su estado de acondicionamiento por aproximación visual, consistente en la observación del paquete visceral desde la región superior, aprovechando la apertura de valvas, para localizar la gónada. Este método es complejo de llevar a cabo y puede no dar buenos resultados en un número importante de reproductores. En la segunda experiencia de un total de once reproductores solamente en dos de ellos se pudo apreciar el desarrollo gonadal por aproximación visual dorsal.

En el caso de que no se llegue a determinar si el ejemplar está maduro, es conveniente avanzar en los procesos de inducción a la puesta haciendo un seguimiento exhaustivo diario para detectar el evento reproductor.

En las dos experiencias realizadas en años diferentes, el proceso de maduración de ejemplares se ha llevado a cabo favorablemente, reproduciendo en los tanques de cría los factores exógenos determinantes (temperatura, alimentación y fotoperiodo) observados en el medio natural. Las posibles desviaciones con respecto a los valores del medio y pequeñas variaciones relacionadas, principalmente con la temperatura, fueron premeditadas como consecuencia de primar la seguridad de los ejemplares frente a cambios excesivamente bruscos, que pudieran favorecer el desarrollo de determinados agentes patógenos o generar estrés innecesario en los individuos. (Prado et al., 2022). Por ello se programaron límites de temperaturas máximas y mínimas no superables durante las experiencias que correspondían con 14 y 28°C.

Uno de los grandes retos actualmente es avanzar en el conocimiento y optimización de las dietas correctas para ejemplares adultos y larvas, siendo este uno de los cuellos de botella para el mantenimiento *ex situ* a largo plazo de ejemplares de *Pinna nobilis*. En la actualidad se están realizando una serie de experiencias en esta línea en el Acuario de la Universidad de Murcia. La correcta alimentación es sin lugar a duda un factor determinante.

Siguiendo la técnica de maduración naturalizada solo se obtienen resultados una vez al año, coincidiendo con el evento reproductor en el medio natural, pero se previene el estrés y el agotamiento de los ejemplares obteniendo de este modo una mayor calidad gonadal y por lo tanto un incremento en las posibilidades de alcanzar fases larvianas avanzadas e incluso el asentamiento de juveniles. Los cambios y desviaciones de las condiciones óptimas en el proceso de maduración reducen la viabilidad de las larvas y las posibilidades de llegar a producir semilla (Leal Soto, 2010; Ángel Dapa, 2015).

La dieta proporcionada a reproductores y larvas varió en calidad entre una experiencia y otra, confirmando en la primera experiencia la preferencia general, tanto de adultos como de larvas, por alimento vivo frente a dietas en gel, tal y como sugieren los estudios de Prado et al., 2020b.

En ambas experiencias se les proporcionó una dieta basada en fitoplancton y zooplancton, como se ha venido haciendo desde 2018 con los ejemplares de *Pinna nobilis* mantenidos en el laboratorio del Acuario de la Universidad de Murcia y como sugieren los estudios de Prado et al., 2020. Las dietas seleccionadas para los reproductores de *Pinna nobilis* ricas en ácidos grasos poliinsaturados, DHA (ácido docosahexaenoico 22:6W3), EPA (eicosapentaenoico 20:5w3 y Araquidónico ARA, podrían resultar esenciales en la formación de gónadas de calidad (Hendricks

et al, 2003; Da Costa et al; 2016; Hernandis et al., 2023) y del mismo modo son especialmente importantes para la supervivencia de las larvas, especialmente durante el reclutamiento (Helm y Laing, 1987; Napolitano et al., 1990). Ese perfil de ácidos grasos puede ser proporcionado por ciertas especies de fitoplancton, así como por determinadas especies de zooplancton.

En ejemplares reproductores de *Pinna nobilis* el complemento de zooplancton en la dieta, basado en especies ricas en ácidos grasos poliinsaturados, podría llegar a ser clave para un mantenimiento a largo plazo de ejemplares de nacra *ex situ*, para lo cual es importante continuar con los trabajos de protocolos de mantenimiento de la especie (obs pers).

#### 3.5.4 Inducción, liberación de gametos y fertilización

El procedimiento de inducción a la puesta en cultivos de bivalvos suele contemplar metodologías agresivas para los reproductores como los choques térmicos, la inyección de serotonina o el rasgado gonadal (Helm et al., 2004; Robles-Mungaray, 1996). Cualquiera de las tres se descarta en *Pinna nobilis*, ya que las dos primeras resultan en un porcentaje de mortalidad elevado para los adultos y la tercera implica directamente el sacrificio de los ejemplares seleccionados.

Es por ello que para las dos experiencias implicadas en el presente trabajo se ha elegido un proceso de liberación de gametos naturalizado basado en inductores naturales como el fotoperiodo y principalmente la temperatura. Evidentemente el esfuerzo de muestreo para localizar la emisión de gametos es importante en los momentos en los que se prevé que va a tener lugar el desove, pero el resultado puede marcar grandes diferencias con los procedimientos de inducción llevados a cabo con métodos más agresivos, debido a la relación entre optimización de factores inductores naturales y viabilidad de las larvas a largo plazo (Leal Soto, 2010; Ángel Dapa, 2015).

En este sistema naturalizado, el inicio de la liberación de gametos, que en las experiencias estudiadas en el presente trabajo siempre comienza por la emisión de gametos masculinos (reproductor inductor), actúa induciendo al resto de reproductores maduros a la liberación de gametos, comportamiento que se observa igualmente en el medio natural.

Por otra parte, el descubrimiento de nuevos péptidos reguladores de procesos reproductores, como la maduración o el desove, en especies de la familia Pinnidae como *Atrina pectinata*, ofrece alternativas en la inducción de los ciclos reproductores en cultivos *ex situ*. (Funayama et al., 2022; Hashimoto K., com pers).

En las observaciones realizadas tanto *in situ* como *ex situ*, se apreció que la liberación de gametos masculinos suele ser por pulsos, con momentos en los que la densidad de espermatozoides por  $\text{ml}^{-1}$  es muy elevada seguidos de periodos en los que la densidad es muy baja, incluso nula. Por el contrario, en el caso de gametos femeninos, se observó un caudal de liberación constante en el tiempo, con una densidad de ovocitos similar durante todo el proceso de expulsión.

Esto contrasta con el modo de liberación de gametos en otras especies de bivalvos en los que suele ocurrir, al contrario, el esperma es expulsado a través de la abertura o sifón exhalante en un chorro fino y constante, mientras que la expulsión de los óvulos es más intermitente y se expulsan en “nubes” (Helm et al., 2006).

En ambas experiencias realizadas en este trabajo se apreció la importancia de llevar a cabo un protocolo de limpieza de gametos, embriones y larvas efectivo, con resultados determinantes en la calidad del cultivo y en la viabilidad larvaria (Robles Mungaray et al., 2004, Helm et al., 2006; Hashimoto K., com pers).

En los cultivos establecidos en las diferentes experiencias se observó la presencia de especies contaminantes. Durante la primera experiencia se observó la presencia de larvas de poliquetos del género *Hidroides* así como ciliados indeterminados. Durante la segunda experiencia se identificaron, en algunos casos de forma abundante, ciliados de los géneros *Euplotes*, *Litonotus* y *Vorticella*.

Durante la experiencia 2 la diferencia de tallas en los reproductores osciló entre 39,5 (ejemplar P3B2) y 55 cm. (ejemplar P3C6) y durante el evento reproductor solo P3C6 liberó esperma durante tres días seguidos. En futuros estudios se intentará estimar la cantidad de esperma que se libera en un evento naturalizado durante todos los días de emisión.

Tras las puestas tanto *in situ* en la propia laguna, como *ex situ*, en la totalidad de los eventos reproductores evaluados, en el análisis de las muestras se observó una elevada tasa de fecundación en los ovocitos expulsados y muestreados. Esta observación coincide con la propuesta por Trigos et al., 2018, y apoya la evidencia de la fertilización interna en la cavidad paleal, favorecida por la filtración de agua con presencia de espermatozoides de ejemplares próximos. La observación de este comportamiento abre las puertas para comprender la ecología de esta especie en el medio natural, como su distribución gregaria (Prado et al., 2022). Sería interesante estudiar el tipo de fecundación que tiene lugar, ya que todo parece apuntar a que no solamente son fecundados por los espermatozoides que penetran en la cavidad paleal y allí

tiene lugar la fecundación de los ovocitos expelidos, sino que sería interesante estudiar la viabilidad de la fecundación a través de la pared de la gónada.

En los trabajos de De Gauleac, 1995 o Deudero et al., 2017; se identificó a *Pinna nobilis* como una especie con hermafroditismo sucesivo con maduración asíncrona. En trabajos posteriores como los de Trigos et al., 2018, con individuos provenientes del Archipiélago de Embiez, se observó como algunos reproductores actuaban como hermafroditas simultáneos, liberando gametos masculinos y femeninos al mismo tiempo con procesos de autofertilización; Prado et al., 2020 y Hernandis et al., 2023 identificaron maduración simultánea de gónadas masculinas y femeninas y localizaron en su reciente trabajo individuos en fase hermafrodita con gónadas masculinas y femeninas maduras en el mismo momento y con liberación alterna y simultánea, en el medio natural y el laboratorio. La liberación de gametos simultánea no es efectiva para la especie por aparición de problemas en las fases larvarias relacionados con la autofecundación (Gosling, 2003).

En la experiencia 1 llevada a cabo en este trabajo se observó la liberación de gametos femeninos y masculinos en reproductores diferentes, actuando como hermafroditas sucesivos o secuenciales con maduración asíncrona. Sin embargo, en la experiencia 2 se observó maduración gonadal masculina y femenina simultánea y liberación de gametos masculinos y femeninos espaciada en el tiempo, en cuatro de los ocho ejemplares que se reprodujeron durante el ciclo de desove, es decir, actuaron como ejemplares hermafroditas con maduración simultánea y liberación de gametos alterna. La liberación de gametos en modo alterno, sí que es efectiva porque permite la fecundación cruzada asegurando la viabilidad larvaria, además de hacer más efectivo el evento reproductor en menor espacio de tiempo. En ningún caso coincidió en el mismo ejemplar la liberación de ambos tipos de gametos simultáneamente por lo que no hubo autofecundación. El 50% de los ejemplares con los que se ha llevado a cabo la experiencia 2 de este trabajo, se han comportado como hermafroditas simultáneos alternos.

Algunos autores relacionan la condición de hermafroditas simultáneos con la presencia de contaminantes químicos en el agua (Pekkarinen, 1991; Syasina et al., 1996). En el caso de los ejemplares con origen en el Delta del Ebro es posible que los contaminantes de origen agrícola como pesticidas o fitosanitarios sean responsables de estas modificaciones en el comportamiento reproductor de las nacras (Prado et al., 2020). En los estudios realizados por Campillo et al., 2013 en el Mar Menor, en zonas cercanas a la desembocadura de la rambla del Albuñón, se establece una relación entre la presencia de contaminantes procedentes de cultivos agrícolas y otras actividades y el estrés en ejemplares de la almeja *Ruditapes decussatus*

sembrados en la zona como indicadores biológicos. Habría que estudiar si los contaminantes detectados en esos puntos de muestreo alcanzan las zonas donde se encuentran las poblaciones de nacra en la concentración adecuada para establecer una relación con la generación de estrés y con una posible influencia en el cambio a una condición de hermafroditismo simultáneo.

También se presenta la posibilidad de que este cambio en el comportamiento reproductor en el Mar Menor esté relacionado con procesos de estrés generados por las condiciones de temperatura y salinidad elevadas o incluso se puede observar este cambio como una adaptación frente a condiciones adversas para rentabilizar más el evento reproductor.

En otras especies que funcionan como hermafroditas alternos como las almejas gigantes del género *Tridacna* (Knop, 1996) la liberación de gametos es prácticamente simultánea, aunque primero se liberan gametos masculinos y en un corto espacio de tiempo gametos femeninos que por acción de las corrientes se separan de sus gametos hermanos, sin llegar a la autofecundación.

### 3.5.5 Experiencia de densidad larvaria y optimización de dietas

En la experiencia 1 de este trabajo se evaluó el efecto de la densidad larvaria a tres niveles 2, 5 y 10 larvas ml<sup>-1</sup>, sobre la supervivencia en el tiempo. El resultado óptimo se obtuvo en cultivos a una concentración de 5 larvas ml<sup>-1</sup>, coincidiendo con las densidades óptimas para cultivo de otros miembros de la familia Pinnidae, como *Atrina maura* (Robles Mungaray et al., 2004).

Respecto a la selección de dietas se testaron diferentes combinaciones entre fitoplancton vivo y gel, obteniendo los resultados esperados en relación a la mayor supervivencia con fitoplancton vivo de la especie *Tisochrysis lutea*. La viabilidad del fitoplancton gel para adultos o larvas habría supuesto un gran ahorro de tiempo y esfuerzo en la gestión de los cultivos auxiliares, pero especialmente en la fase larvaria no resulta adecuado. El fitoplancton vivo es el tipo de alimento preferido por las larvas de *Pinna nobilis* y durante las dos experiencias se ha observado su proceso de captación, atraído por las corrientes generadas por el velo a partir de la fase velíger. También se ha podido observar la presencia de *T. lutea* en la glándula gástrica por transparencia, denotando su capacidad de alimentación.

### 3.5.6 Caracterización de desarrollo larvario

Los ovocitos liberados en la experiencia 1 presentaban una talla de 60  $\mu$  al igual que todos los ovocitos liberados en la experiencia 2, por reproductores madurados en el medio natural.

Los ovocitos liberados durante la experiencia 2 por el ejemplar P3B5, uno de los ejemplares madurados en el laboratorio, tuvieron una talla de 50  $\mu$ . Del mismo modo la puesta de este ejemplar fue de 51  $10^3$  ovocitos mientras que las otras todas fueron superiores a 10  $10^6$ , por lo que los malos resultados obtenidos en cuanto a abundancia de gónada madurada se relacionaron con la dieta inadecuada recibida durante el proceso de maduración, así como con el estrés generado por su participación en un experimento que implicó la extracción de hemolinfa del ejemplar que podría haber alterado su condición de salubridad.

Sin embargo, la puesta se mantuvo viable durante 10 días, al igual que el resto de puestas mucho más numerosas de otros reproductores, pero con un porcentaje de supervivencia mucho mayor (Tabla 3.11) en relación con el volumen de puesta, además de que casi el 50% de las larvas alcanzaron una talla de 120  $\mu$  en estadio de umbonada temprana, el estadio más avanzado conseguido hasta la fecha en las experiencias realizadas en el laboratorio.

Del mismo modo que en el trabajo de Trigos et al., (2018), en el presente estudio se observa la flotabilidad negativa de los ovocitos recién fecundados hasta la aparición de la fase de blástula ciliada, en la que todos los ovocitos fecundados comienzan a desplazarse por la masa de agua.

Se observa un desfase entre el cronograma de las fases de desarrollo embrionario y larvario obtenidas por Trigos et al., (2018) y las obtenidas en las dos experiencias estudiadas en este trabajo, con una clara reducción en el tiempo acumulado especialmente significativo en fase D-veliger. Mientras en la experiencia comparada, se alcanza el estado de veliger temprana o D-veliger a las 48 h. y umbonada temprana en 144:00 h. En las experiencias observadas en este trabajo, la fase D-veliger se alcanza en 28h. en la experiencia de 2020 y en una media de 25h. en la de 2023. El paso a umbonada temprana se alcanza en un tiempo acumulado de 145 h. en la experiencia de 2020 y en 97:15 h en la experiencia de 2023.

El acortamiento en los tiempos acumulados en las fases de desarrollo larvario podría indicar una mejora de las condiciones de viabilidad de las larvas, relacionadas por una parte con unos procesos de maduración de larvas más efectivos y por otra parte con un avance en los protocolos de mantenimiento de reproductores y reproducción *ex situ* de *Pinna nobilis*, ya que se ha detectado cierto estancamiento en fases larvarias, relacionado con la escasa viabilidad (Prado, com pers).

Continuando con la etología larvaria, el comportamiento detectado tras alcanzar la fase de trocófora coincide con el observado en la misma fase de desarrollo en otros bivalvos en el que las larvas realizan un movimiento helicoidal sobre su eje, moviéndose rápidamente por la masa de agua (Trigos et al., 2018). Al alcanzar el estadio de velíger temprana o D-veliger las larvas se mueven por la masa de agua gracias a la acción del velo ciliado, pero tienen la capacidad de descender hasta el sustrato y mantenerse inmóviles durante ciertos periodos de tiempo en situación erguida y generando corrientes por movimiento de los cilios del velo. Es necesario contrastar la variación de velocidad observada en el movimiento ciliar entre un tipo de corriente, la corriente de alimentación (más lenta) y otro, la corriente de movimiento (más rápida).

En contraste con los resultados obtenidos por Trigos et al., 2018, se identifican como probables las afirmaciones de Peharda y Vilibic (2008) sobre migraciones verticales relacionadas con fototropismo negativo, en las que las larvas de *Pinna nobilis* desciende al fondo durante el día y suben a la superficie durante la noche, como ocurre con otras especies (Gosling, 2003). Este comportamiento se ha observado, especialmente en los tanques troncocónicos de 500 l motorizados con movimiento suave ascendente, en los que los muestreos realizados entre las 10h y las 18h solo fueron efectivos tras recoger las larvas que estaban asentadas en las paredes y fondo de los tanques, encontrando muy poca densidad larvaria en la masa de agua libre, mientras que los muestreos a partir de las 18 h. se detectó una concentración similar a la estimada para el tanque en agua libre, lo que podría implicar un comportamiento similar al de migraciones verticales, aunque sería necesario realizar un mayor número de pruebas para poder asegurarlo.

En las dos experiencias llevadas a cabo en este trabajo, se alcanzó la etapa de desarrollo larvario umbonada temprana antes de tener problemas de mortalidad masiva en las larvas. Es muy posible que los cambios que tienen lugar en la fase umbonada requieran un estado de salud óptimo en las larvas que no sea el alcanzado durante las experiencias realizadas. Esto puede deberse a varios factores: i) Por una parte, si la dieta proporcionada hubiera sido la adecuada, las larvas deberían haber alcanzado tallas entre 120 y 140  $\mu$  en la fase umbonada temprana. En el caso de las larvas de la experiencia del día 21/06/2023-A, si se alcanzó esa talla, pero debido al bajo número de huevos generados no fueron viables durante más tiempo; ii) Por otra parte, aun con buenas condiciones de calidad de agua se detectó la pérdida del velo en algunos ejemplares, lo que puede ser un síntoma de infección por bacterias del género *Vibrio*. Las bacterias del género *Vibrio* son comunes en cultivos larvarios de bivalvos, ocasionando una elevada mortalidad larvaria (Gómez León et al., 2008; Elston et al., 2008; Prado et al., 2005; Dubert et al., 2015).

La mortalidad derivada del crecimiento bacteriano observada en cultivos, debido a una limpieza deficiente, afecta directamente a la viabilidad de las larvas. Probablemente en el medio natural circunstancias adversas que generen un exceso de bacterioplancton, también afecte a las fases larvarias de *Pinna nobilis* reduciendo su viabilidad influyendo en el reclutamiento de ese ciclo reproductor. Durante las diferentes crisis de eutrofización en la laguna del Mar Menor se describieron episodios de un elevado crecimiento de bacterioplancton, que en el caso de otros invertebrados como los poliquetos del género *Hidroides* es un inductor que promueve el crecimiento de sus larvas (Sandonini et al., 2021b).

En la experiencia 1 la especie más abundante como contaminante en los cultivos de nacra eran los poliquetos del género *Hidroides*, sin embargo, en la experiencia 2 no se detecta esta especie, aunque si se observa contaminación por protozoos ciliados. Posiblemente esto tenga que ver con el estado de la laguna en 2020, con altas concentraciones de bacterioplancton y las condiciones observadas en 2023, con muy baja concentración de bacterioplancton (F. Torrella, com pers).

En los cultivos larvarios descritos en el presente trabajo, se observó una alta sensibilidad de las larvas frente a ligeros cambios en las condiciones del agua. En la puesta de la experiencia 2 del día 16/06/2023 se observó como durante el tamizado de larvas y su paso a sistemas limpios con agua nueva sintética mezclada y reposada durante tres días, las larvas acusaron la mayor reactividad del agua debido al corte periodo de reposo y liberaron una gran cantidad de mucosa que generó una reacción de aglutinamiento larvario que provocó una elevada mortalidad (Rojas et al., 2020). Toda la puesta de esa fecha se perdió por este motivo. Una vez corregido el problema de reactividad del agua utilizando agua sintética con al menos dos semanas de reposo, únicamente se detectó liberación de mucosa y problemas de aglutinación en tanques de desarrollo larvario concretos y coincidiendo con manejo inadecuado en el tamizado de larvas o en el cambio de sistemas. Es por ello que este comportamiento parece indicar que la secreción de filamentos mucosos es un estímulo de protección que en cultivos puede llegar a causar mortalidades masivas de larvas.

En el cultivo larvario resultó complicado obtener una limpieza completa de las larvas y se observó contaminación en los cultivos por distintas especies de ciliados como *Litonotus sp.*, *Vorticella sp.* y *Euplotes sp.* Aunque en principio la presencia de estos ciliados no afecta a las larvas negativamente, cuando la población aumenta se pueden ver afectadas por competencia alimentaria e incluso por incremento en la densidad individuos general del cultivo, ya que los

ciliados llegan a alcanzar las mismas tallas que las larvas. Es conveniente tamizar las larvas ajustando el tamaño de malla para lograr una limpieza lo más efectiva posible.

Debido a la complejidad que reviste la consecución de protocolos válidos de desarrollo larvario en *Pinna nobilis*, se hace necesario seguir avanzando en la consecución de protocolos de mantenimiento óptimos, así como profundizar en el desarrollo protocolos de reproducción que aseguren la máxima calidad gonadal y la determinación de las condiciones óptimas ambientales, que permitan llegar a asentar larvas de la especie, con calidad suficiente como para llegar a ser utilizadas en proyectos de recuperación.

### 3.6 CONCLUSIONES

- Se ha confirmado la existencia de eventos reproductores en el Mar Menor estudiados en distintos años, concretamente 2019, 2020 y 2022.
- Se han constatado cambios morfológicos en el manto de los ejemplares en los días previos a la emisión de los gametos, lo que podría servir como un indicador no invasivo para el seguimiento de la proximidad del desove tanto *in situ* como *ex situ*.
- La replicación de las condiciones ambientales naturales en el laboratorio ha permitido la maduración gonadal *ex situ* y la replicación del patrón de comportamiento de emisión de gametos.
- Un porcentaje importante de gametos emitidos en el medio natural y los ovocitos procedentes de la maduración naturalizada se encontraban ya fecundados en el desove.
- El procedimiento de “inducción naturalizada” *ex situ* es muy efectivo, ya que consigue la emisión de gametos masculinos y femeninos siguiendo unas secuencias similares a las que ocurren en el medio natural, sin generar estrés en los reproductores.
- la emisión de gametos tanto *in situ* como *ex situ* ocurrió entre 24 y 25°C, lo que podría considerarse como umbral de temperatura “detonante” del evento reproductivo para la población del Mar Menor.
- En los estudios realizados *ex situ*, los eventos naturalizados de emisión de gametos siempre comienzan con la descarga de esperma de ejemplares con gónadas masculinas exclusivamente o con ambos tipos de gónadas maduras.
- Es probable que la emisión de un primer individuo “inductor” active la emisión de esperma de los machos circundantes y ovocitos en los reproductores con gónadas femeninas maduras.
- Este fenómeno de inducción al desove puede ser inmediato o demorarse hasta dos días, según los trabajos realizados.
- La condición de hermafroditas simultáneos alternos observada en el 50% de los ejemplares que se reprodujeron en la experiencia 2 puede ser interpretada como una estrategia ventajosa que rentabiliza el evento reproductor en épocas de estrés.
- La filtración y presencia de esperma en el interior de los individuos próximos al individuo emisor favorece la fecundación interna de un elevado porcentaje de ovocitos.
- En los distintos eventos reproductores estudiados, la especie *Tisochrysis lutea* viva parece ser un alimento óptimo entre los tratados para aumentar la supervivencia larvaria en sus primeras fases, confirmándose su presencia en la glándula gástrica.

- La densidad larvaria en el cultivo es determinante para aumentar la tasa de supervivencia larvaria, siendo la concentración de 5 larvas ml<sup>-1</sup> la más idónea.
- Se ha incrementado el conocimiento sobre los diferentes estadios larvarios de *P. nobilis* y su comportamiento hasta la fase umbonada, a partir de la cual no se ha conseguido supervivencia larvaria.
- La técnica de maduración y desove naturalizados limita los episodios reproductivos al ciclo anual de la especie, pero evita estrés en los individuos.
- La identificación de los factores naturales óptimos que garanticen la viabilidad larvaria permitirá asegurar la obtención de semilla en eventos de reproducción *ex situ*.
- Los porcentajes de supervivencia larvaria después de 7 días experimentales caen hasta el 2,12 %
- No se ha conseguido cerrar el ciclo de reproducción de *P. nobilis* en cautividad.



## **CONCLUSIONES**

## CAPÍTULO 1

En esta contribución se ha estudiado la distribución espacial de *P. nobilis* desde su entrada en la laguna y posteriores periodos de colonización y expansión hasta la actualidad, incluyendo los factores que determinan su regresión y/o supervivencia.

- El marco de modelización utilizado en este estudio, basado en un modelo RFRK de dos etapas, ha resultado determinante para caracterizar la distribución espacial de las especies como variable de apoyo para la planificación y gestión del uso del suelo.
- Los ejemplares de nacra de mayor tamaño y las concentraciones de mayor densidad se encontraban en las áreas de mayor profundidad en la laguna, antes del colapso ambiental. Podían considerarse como zonas “refugio” protegidas de la presión de las redes de “pantasana” y de la extracción de turistas y furtivos.
- La concentración de grava en sedimento era uno de los factores que determinaba la presencia de ejemplares en el periodo pre-colapso, debido a la necesidad de anclaje mediante el viso de los juveniles en la fase de asentamiento.
- Otro de los factores ambientales determinantes que explican la distribución de la especie en la laguna en los años previos al colapso ambiental de 2016 era la distancia al Estacio y las Encañizadas como vías de entrada de larvas a la laguna procedentes de la población Mediterránea.
- La mortandad masiva producida por el patógeno *Haplosporidium pinnae* en las poblaciones Mediterráneas no afectó en la misma medida a la población lagunar
- Tras el episodio de crisis de eutrofización se produjo una mortandad total de ejemplares por debajo de los 3 m de profundidad
- La talla media de los individuos supervivientes disminuyó de los 41,32 cm a los 33,57 cm.
- En la actualidad, la población estimada no supera los 1.500 ejemplares y el número de ejemplares etiquetados y geolocalizados no llega a 600, por lo que se estima que la mortandad de la especie en la población lagunar desde 2016 supera el 99,9%-
- Se han identificado las diferentes presiones antrópicas que afectan a la población lagunar. La inestabilidad del sistema debido a eventos de eutrofización, el vandalismo, la extracción ilegal de ejemplares sanos y el calado de redes ilegales en zonas de nacra por parte de algunos pescadores, amenazan la supervivencia de la especie en el Mar Menor.
- Tras el colapso ambiental la distribución de especie estuvo marcada por la profundidad, pero con un cambio determinante de patrón en relación al periodo pre-colapso

- La distancia a los canales de conexión paso de ser un factor determinante para la interpretación de la alta densidad de ejemplares a un factor de ausencia de individuos, debido a la mayor probabilidad de entrada del patógeno desde el Mediterráneo.
- Se ha contrastado la mortandad de núcleos poblacionales relacionada con la entrada de agua masiva desde el Mediterráneo en momentos de baja salinidad debido a la entrada del patógeno *H. pinnae*.
- El efecto de la caída de salinidad es determinante para la presencia de la especie. Las soluciones propuestas, como el dragado de los canales de conexión de las golas, podrían provocar una disminución de la salinidad al permitir la entrada de agua del Mediterráneo, lo que favorecería la propagación del patógeno y la desaparición de los ejemplares supervivientes.
- La supervivencia de la especie en el Mar Menor depende de unas condiciones ambientales adecuadas, sobre todo en los factores determinantes como son la salinidad, o concentración de oxígeno, al igual que el régimen de intercambio de aguas con el Mediterráneo. Por lo tanto, la aplicación de las medidas necesarias para garantizar la recuperación de la laguna y la restauración de la población de nacra se contempla como una prioridad.
- Estos resultados obtenidos en la identificación de factores ambientales son determinantes a la hora de identificar los “puntos calientes” de supervivencia de la especie y el umbral de tolerancia de los diferentes factores ambientales a partir de los cuales se produce la muerte de los ejemplares en las zonas que han sobrevivido a la pandemia de *Haplosporidium pinnae*.

## CAPÍTULO 2

- A pesar de los numerosos retos encontrados durante el proceso de puesta a punto de los protocolos para el mantenimiento *ex situ* de ejemplares, algunos han sido mantenidos durante cuatro años.
- Se han identificado algunas de las condiciones ambientales apropiadas para el mantenimiento de ejemplares de nacra *ex situ* y los sistemas técnicos adecuados para conseguirlas.
- El uso de Skimmers en los sistemas de recirculación es determinante en el mantenimiento de la calidad del agua teniendo en cuenta la alta tasa de alimentación requerida por los ejemplares de nacra.

- La esterilización germicida juega un papel muy importante en el mantenimiento de la calidad de agua de los tanques y se contempla la posibilidad de incrementar la potencia germicida hasta alcanzar un nivel 5 de esterilización, como una medida adecuada para reducir la incidencia de infecciones por bacterias del género *Vibrio*.
- Todavía quedan muchos vacíos de conocimiento para conseguir un mantenimiento 100% exitoso y favorable para la especie, incluyendo la mejora de las dietas para el correcto desarrollo de los individuos.
- La alimentación con zooplancton incrementa la viabilidad en el tiempo de los ejemplares mantenidos.
- El crecimiento de los ejemplares *ex situ* parece ser en la mayoría de los casos muy similar al observado *in situ*, más lento en adultos y mucho más abundante en ejemplares de menos de 3 años.
- El control biológico de epibiontes como las anemonas que pueden afectar al borde del manto de las nacras por su efecto urticante, por medio de *Spurilla neapolitana* es muy efectivo.
- El control de las infecciones de *Haplosporidium pinnae* en ejemplares de *Pinna nobilis* del Mar Menor, mediante cambios de salinidad parece ser efectivo, aunque requiere de nuevos trabajos para confirmarlo.

### CAPÍTULO 3

- Se ha confirmado la existencia de eventos reproductores en el Mar Menor estudiados en distintos años, concretamente 2019, 2020 y 2022.
- Se han constatado cambios morfológicos en el manto de los ejemplares en los días previos a la emisión de los gametos, lo que podría servir como un indicador no invasivo para el seguimiento de la proximidad del desove tanto *in situ* como *ex situ*.
- La replicación de las condiciones ambientales naturales en el laboratorio ha permitido la maduración gonadal *ex situ* y la replicación del patrón de comportamiento de emisión de gametos.
- Un porcentaje importante de gametos emitidos en el medio natural y los ovocitos procedentes de la maduración naturalizada se encontraban ya fecundados en el desove.
- El procedimiento de “inducción naturalizada” *ex situ* es muy efectivo, ya que consigue la emisión de gametos masculinos y femeninos siguiendo unas secuencias similares a las que ocurren en el medio natural, sin generar estrés en los reproductores.

- la emisión de gametos tanto *in situ* como *ex situ* ocurrió entre 24 y 25°C, lo que podría considerarse como umbral de temperatura “detonante” del evento reproductivo para la población del Mar Menor.
- En los estudios realizados *ex situ*, los eventos naturalizados de emisión de gametos siempre comienzan con la descarga de esperma de ejemplares con gónadas masculinas exclusivamente o con ambos tipos de gónadas maduras.
- Es probable que la emisión de un primer individuo “inductor” active la emisión de esperma de los machos circundantes y ovocitos en los reproductores con gónadas femeninas maduras.
- Este fenómeno de inducción al desove puede ser inmediato o demorarse hasta dos días, según los trabajos realizados.
- La condición de hermafroditas simultáneos alternos observada en el 50% de los ejemplares que se reprodujeron en la experiencia 2 puede ser interpretada como una estrategia ventajosa que rentabiliza el evento reproductor en épocas de estrés.
- La filtración y presencia de esperma en el interior de los individuos próximos al individuo emisor favorece la fecundación interna de un elevado porcentaje de ovocitos.
- En los distintos eventos reproductores estudiados, la especie *Tisochrysis lutea* viva parece ser un alimento óptimo entre los tratados para aumentar la supervivencia larvaria en sus primeras fases, confirmándose su presencia en la glándula gástrica.
- La densidad larvaria en el cultivo es determinante para aumentar la tasa de supervivencia larvaria, siendo la concentración de 5 larvas ml<sup>-1</sup> la más idónea.
- Se ha incrementado el conocimiento sobre los diferentes estadios larvarios de *P. nobilis* y su comportamiento hasta la fase umbonada, a partir de la cual no se ha conseguido supervivencia larvaria.
- La técnica de maduración y desove naturalizados limita los episodios reproductivos al ciclo anual de la especie, pero evita estrés en los individuos.
- La identificación de los factores naturales óptimos que garanticen la viabilidad larvaria permitirá asegurar la obtención de semilla en eventos de reproducción *ex situ*.
- Los porcentajes de supervivencia larvaria después de 7 días experimentales caen hasta el 2,12 %
- No se ha conseguido cerrar el ciclo de reproducción de *P. nobilis* en cautividad.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abeliovich, A. (2006). The nitrite-oxidizing bacteria. *The prokaryotes*, 5, 861-872.
- Acarli, S., Lök, A., Yigitkurt, S. & Palaz, M. (2011). Culture of fan mussel (*Pinna nobilis*, Linnaeus 1758) in relation to size on suspended culture system in Izmir Bay, Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17, 995-1002.
- AEMET, 2022. High resolution daily observational grid data [dataset]. URL [https://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/cambio\\_climat/datos\\_diarios?w=2&w2=0](https://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/cambio_climat/datos_diarios?w=2&w2=0).
- Aguilar-Escribano, J., Giménez-Casalduero, F., Más-Hernández, J., Ramos-Esplá, A., 2016. Evaluación del estado y composición de la Comunidad Fitoplanctónica de las aguas del Mar Menor, Murcia (mayo de 2016). Informe técnico. Universidad de Alicante, Alicante, Spain.
- Allyn, A.J., Alexander, M.A., Franklin, B.S., Massiot-Granier, F., Pershing, A.J., Scott, J.D., Mills, K.E., 2020. Comparing and synthesizing quantitative distribution models and qualitative vulnerability assessments to project marine species distributions under climate change. *PLoS One* 15, e0231595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231595>
- Anestis, A., Lazou, A., Pörtner, H. O., & Michaelidis, B. (2007). Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Vol. 293, No. 2.
- Aravio-Torre J, Arévalo A (1971) La salinidad del Mar Menor, sus variaciones. Algunas consideraciones sobre el intercambio de aguas con el Mar Mediterráneo. *Bol Inst Esp Oceanogr* 146:3–19.
- Arnold, W. S. (2008). Application of larval release for restocking and stock enhancement of coastal marine bivalve populations. *Reviews in Fisheries Science*, 16(1-3), 65-71.
- Azzati RC, Carrascosa MG, Babio CR (1987) Anélidos Poliquetos del Mar Menor (SE España): inventario faunístico y caracterización ecológica y bionómica. *Cah Biol Mar* 28:403–428.
- Babarro, J. M., Reiriz, M. J. F., & Labarta, U. (2008). Secretion of byssal threads and attachment strength of *Mytilus galloprovincialis*: the influence of size and food availability. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(4), 783-791.
- Bachelet, G., Guillou, J., & Labourg, P. J. (1992). Adult-larval and juvenile interactions in the suspension-feeding bivalve, *Cerastoderma edule* (L.): field observations and

experiments. *Marine eutrophication and population dynamics*. Olsen & Olsen, Fredensborg, 175-182.

Baraza F, Martínez M, Guirao J, Rodríguez A and others (2003) Programa de gestión integrada del litoral del Mar Menor y su zona de influencia (CAMP Mar Menor): estudio de viabilidad. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Murcia.

Barberá, C.C., Cañizares, F.S., Rull, A.L., 1996. Estudio de la población del molusco eulamelibranmquio *Pinna nobilis* L., 1758, en el litoral alicantino. Instituto Juan Gilalbert, Diputación de Alicante, Alicante, Spain.

Barceló, A., Lemus, M. & Izaguirre, E. (2008). Parámetros geoquímicos en sedimentos superficiales de la región marino-costera de Punta de Piedras, isla de Margarita, Estado Nueva Esparta. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 47(1): 33-40.

Basso, L., Hendriks, I., Steckbauer, A. & Duarte, C. (2015a). Resistance of juveniles of the Mediterranean pen shell, (*Pinna nobilis*) to hypoxia and interaction with warming. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 165: 199-203.

Basset A, Pinna M, Sabetta L, Barbone E, Galuppo N (2008) Hierarchical scaling of biodiversity in lagoon ecosystems. *Transit Waters Bull*3:75–86.

Basso L, Hendriks I, Steckbauer A, Duarte C (2015a) Resistance of juveniles of the Mediterranean pen shell, (*Pinna nobilis*) to hypoxia and interaction with warming. *Estuar Coast Shelf Sci* 165:199–203.

Basso L, Vázquez-Luis M, García-March JR, Deudero S and others (2015b) The pen shell, *Pinna nobilis*: a review of population status and recommended research priorities in the Mediterranean Sea. *Adv Mar Biol* 71:109–160.

Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2010). Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), 34-43.

Belando MD, Bernardeau-Esteller J, García-Muñoz R, Ramos-Segura A, Santos-Echeandía J, García-Moreno P, Ruiz JM (2017) Evaluación del estado de conservación de las praderas de *Cymodocea nodosa* en la laguna costera del Mar Menor. 2014–2016. Asociación de Naturalistas del Sureste (ANSE) e Instituto Español de Oceanografía (IEO), Murcia.

Belando MD, García R, Ramos A, Franco-Navarro IJ, García P, Ruiz JM (2014) Distribución y abundancia de las praderas de macrófitos bentónicos y las poblaciones de nacra (*Pinna nobilis*) en el Mar Menor. Asociación de Naturalistas del Sureste (ANSE) e Instituto Español de Oceanografía (IEO), Murcia.

Bendif, E. M., Probert, I., Schroeder, D. C., & de Vargas, C. (2013). On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of applied phycology*, 25, 1763-1776.

BOE. (2018). "Orden TEC/1078/2018, de 28 de septiembre, por la que se declara la situación crítica de *Cistus heterophyllus carthaginensis*, *Lanius minor*, *Margaritifera auricularia*, *Marmaronetta angustirostris*, *Mustela lutreola*, *Pinna nobilis* y *Tetrao urogallus cantabricus* en España, y se declaran de interés general las obras y proyectos encaminados a la recuperación de dichos taxones". <https://www.boe.es/eli/es/o/2018/09/28/tec1078>

Bothe, H., Ferguson, S., & Newton, W. E. (Eds.). (2006). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier.

Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (2012). *Pond aquaculture water quality management*. Springer Science & Business Media.

Braverman, I. (2014). Conservation without nature: the trouble within situ versus ex situ conservation. *Geoforum*, 51, 47-57.

Breiman, L., 2001. Random Forests. *Mach. Learn.* 45, 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>

Brush, S. B. (2000). The issues of in situ conservation of crop genetic resources. *Genes in the Field. On-Farm Conservation of Crop Diversity, IPGRI, IDRC, Lewis Publishers*, 3-26.

Buchanan, JB, (1984). Sediment analysis. *Methods for the study of marine benthos.*, 41-65. McIntyre AD (eds) *Methods for the study of marine benthos*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 41–65

Buckland ST, Anderson DR, Burnham KP, Laake JL, Borchers DL, Thomas L (2001) Introduction to distance sampling: estimating abundance of biological populations. Oxford University Press, London.

Butler, A., Vicente, N., de Gaulejac, B., 1993. Ecology of the pteroid bivalves *Pinna bicolor*

Gmelin an *Pinna nobilis* L. Mar. Life 3, 37–45.

Cabanellas-Reboredo, M., Deudero, S., Alós, J., Valencia, J.M., March, D., Hendriks, I.E., Álvarez, E., 2009. Recruitment of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) on artificial structures. Mar. Biodivers. Rec. 2, e126. <https://doi.org/10.1017/S1755267209001274>

Cabanellas-Reboredo, M., Vázquez-Luis, M., Mourre, B., Álvarez, E., Deudero, S., Amores, Á., Addis, P., Ballesteros, E., Barrajon, A., Coppa, S., García-March, J.R., Giacobbe, S., Giménez-Casalduero, F., Hadjioannou, L., Jiménez-Gutiérrez, S. V., Katsanevakis, S., Kersting, D., Mačić, V., Mavrič, B., Patti, F.P., Planes, S., Prado, P., Sánchez, J., Tena-Medialdea, J., de Vaugelas, J., Vicente, N., Belkhamssa, F.Z., Zupan, I., Hendriks, I.E., 2019. Tracking a mass mortality outbreak of pen shell *Pinna nobilis* populations: A collaborative effort of scientists and citizens. Sci. Rep. 9, 13355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49808-4>

CACMM, 2017. Informe integral sobre el estado ecológico del Mar Menor. Comité de Asesoramiento Científico del Mar Menor, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Murcia, Spain.

Caldecott, J. O., Jenkins, M. D., Johnson, T. H., & Groombridge, B. (1996). Priorities for conserving global species richness and endemism. *Biodiversity & Conservation*, 5, 699-727.

Campillo, J. A., Albentosa, M., Valdés, N. J., Moreno-González, R., & León, V. M. (2013). Impact assessment of agricultural inputs into a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain) on transplanted clams (*Ruditapes decussatus*) by biochemical and physiological responses. *Aquatic Toxicology*, 142, 365-379.

Carella, F., Aceto, S., Pollaro, F., Miccio, A., Iaria, C., Carrasco, N., Prado, P., De Vico, G., 2019. A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. *Sci. Rep.* 9, 2725. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37217-y>

Carella, F., Palić, D., Šarić, T., Župan, I., Gorgoglione, B., Prado, P., & Vico, G. D. (2023). Multipathogen infections and multifactorial pathogenesis involved in noble pen shell (*Pinna nobilis*) mass mortality events: Background and current pathologic approaches. *Veterinary Pathology*, 60(5), 560-577.

Cappello, T., Maisano, M., Giannetto, A., Natalotto, A., Parrino, V., Mauceri, A. & Spanò, N. (2019). Pen shell *Pinna nobilis* L. (Mollusca: Bivalvia) from different peculiar environments:

adaptive mechanisms of osmoregulation and neurotransmission. *European Zoological Journal*, 86(1), 333-342. 10.1080/24750263.2019.1673492.

Cashion, M. S., Bailly, N., & Pauly, D. (2019). Official catch data underrepresent shark and ray taxa caught in Mediterranean and Black Sea fisheries. *Marine Policy*, 105, 1-9.

Catanese, G., Grau, A., Valencia, J.M., García-March, J.R., Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Deudero, S., Darriba, S., Carballal, M.J., 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. *J. Invertebr. Pathol.* 157, 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.006>

CARM (2003) Base de datos de los LIC marinos de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Murcia.

Cheng, P., Zhou, C., Chu, R., Chang, T., Xu, J., Ruan, R., ... & Yan, X. (2020). Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. *Algal Research*, 51, 102076.

Čížmek, H., Čolić, B., Gračan, R., Grau, A., Catanese, G., 2020. An emergency situation for pen shells in the Mediterranean: The Adriatic Sea, one of the last *Pinna nobilis* shelters, is now affected by a mass mortality event. *J. Invertebr. Pathol.* 173, 107388. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107388>

Cognetti G, Maltagliati F (2000) Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Mar Pollut Bull* 40: 7–14.

Cohen J (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 20:37–46.

Colsohl, B., Boudry, P., Pérez-parallé, M.L., Bratoš Cetinić, A., Hugh-jones, T., Arzul, I., Mérour, N., Wegner, K.M., Peter, C., Merk, V. & Bernadette, P. (2021). Sustainable large-scale production of European flat oyster (*Ostrea edulis*) seed for ecological restoration and aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1423-1468. 10.1111/raq.12529.

Colt, J., & Huguenin, J. E. (Eds.). (2002). Design and operating guide for aquaculture seawater systems. Elsevier.

Conesa, H.M. & Jiménez-Cárceles, F.J. (2007). The Mar Menor lagoon (SE Spain): A singular natural ecosystem threatened by human activities. *Marine Pollution Bulletin* 54, 839–849. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.05.007>

Cortés-Melendreras, E., Gomariz-Castillo, F., Alonso-Sarría, F., Giménez Martín, F. J., Murcia, J., Canales-Cáceres, R., Ramos-Esplá, A., Barberá, C. & Giménez-Casalduero, F. (2022). The relict population of *Pinna nobilis* in the Mar Menor is facing an uncertain future. *Marine Pollution Bulletin*, 185, 114376. [10.1016/j.marpolbul.2022.114376](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114376).

Cortés-Melendreras, E., Giménez, J., Murcia, J., Gomariz-Castillo, F., Montano Simón, A., Giménez-Casalduero, F. 2021. Informe sobre el estado actual de la nacra en el Mar Menor. Periodo 2016-2021. Informe técnico para Dirección General del Medio Natural y Dirección General del Mar Menor. Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente. 6 pp.

Covich, A. P., Palmer, M. A., & Crowl, T. A. (1999). The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems: zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *BioScience*, 49(2), 119-127.

Darriba, S. (2017). First haplosporidan parasite reported infecting a member of the Superfamily Pinnoidea (*Pinna nobilis*) during a mortality event in Alicante (Spain, Western Mediterranean). *J.Inv.Pathol.* 148, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.05.006>

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. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 92, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.12.033>

de Gaulejac B (1993) Etude écophysiological du mollusque bivalve méditerranéen *Pinna nobilis* L. Reproduction, croissance, respiration. PhD thesis, Université Paul Cézanne, Marseille

de Gaulejac B, Vicente N (1990) Ecologie de *Pinna nobilis* (L.) mollusque bivalve sur les côtes de Corse. Essais de transplantation et expériences en milieu contrôlé. *Haliotis* 10:83–100.

Delbeek, J. C., & Sprung, J. (1994). *The reef aquarium: A comprehensive guide to the identification and care of tropical marine invertebrates*. Ricordea Pub.

Descombes, P., Wisz, M. S., Leprieur, F., Parravicini, V., Heine, C., Olsen, S. M., ... & Pellissier, L. (2015). Forecasted coral reef decline in marine biodiversity hotspots under climate change. *Global Change Biology*, 21(7), 2479-2487.

DGSCM, 2009. Plan de Ecocartografías del litoral español: Ecocartografía de Murcia [dataset].

URL:<https://www.miteco.gob.es/es/costas/temas/proteccion-costa/ecocartografias/ecocartografia-murcia.aspx>

Dong, Y., Yao, H., Lin, Z., & Zhu, D. (2012). The effects of sperm–egg ratios on polyspermy in the blood clam, *Tegillarca granosa*. *Aquaculture Research*, 43(1), 44-52.

Dubert, J., Barja, J. L., & Romalde, J. L. (2017). New insights into pathogenic Vibrios affecting bivalves in hatcheries: present and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 8, 762.

Dumbauld, B. R., Ruesink, J. L., & Rumrill, S. S. (2009). The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: a review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture*, 290 (3-4), 196-223.

Elith J, Graham CH (2009) Do they? How do they? WHY do they differ? On finding reasons for differing performances of species distribution models. *Ecography* 32: 66–77.

Elith, J., Franklin, J., 2017. Species Distribution Modeling, in: Reference Module in Life Sciences. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.02390-6>

Esteve-Selma MA, Martínez-Fernández J, Fitz C, Robledano F and others (2016) Conflictos ambientales derivados de la intensificación de los usos en la cuenca del Mar Menor: una aproximación interdisciplinar. In: León VM, Bellido JM (eds) Mar Menor: una laguna singular y sensible. Evaluación científica de su estado. Instituto Español de Oceanografía, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, p 79–113.

Evans JS, Murphy MA, Holden ZA, Cushman SA (2011) Modeling species distribution and change using random forest. In: Drew AC, Wiersma Y, Huettmann F (eds) Predictive species and habitat modeling in landscape ecology. Springer, New York, NY, p139–159.

Fdz-Polanco, F., Villaverde, S., & Garcia, P. A. (1994). Temperature effect on nitrifying bacteria activity in biofilters: activation and free ammonia inhibition. *Water Science and Technology*, 30 (11), 121.

Fielding AH, Bell JF (1997) A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environ Conserv* 24:38–49.

Fitzsimons, J. A., Branigan, S., Gillies, C. L., Brumbaugh, R. D., Cheng, J., DeAngelis, B. M., ... & Zu Ermgassen, P. S. (2020). Restoring shellfish reefs: Global guidelines for practitioners and scientists. *Conservation Science and Practice*, 2(6), e198.

- Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., ... & Snyder, P. K. (2005). Global consequences of land use. *science*, 309(5734), 570-574.
- Fosså, S. A., & Nilsen, A. J. (1996). *The modern coral reef aquarium* (Vol. 1). Bornheim: Birgit Schmettkamp Verlag.
- Funayama, S., Matsumoto, T., Kodera, Y., & Awaji, M. (2022). A novel peptide identified from visceral ganglia induces oocyte maturation, spermatozoa active motility, and spawning in the pen shell *Atrina pectinata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 598, 9-14.
- García-Carpintero, E.E., Cárdbaba-Arranz, M., Sánchez-Gómez, L.M. (2020). Revisión bibliográfica sobre eficacia y seguridad de la luz ultravioleta y ozono para la desinfección de superficies. Actualización. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS) - Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad. Madrid. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. 100 pp.
- García-March, J., Ferrer, J.F., 1995. Biometría de *Pinna nobilis* L., 1758: una revisión de la ecuación de De Gaulejac y Vicente (1990). Boletín del Inst. Español Oceanogr. 11, 175–181.
- García-March, J.R., Tena, J., Henandis, S., Vázquez-Luis, M., López, D., Téllez, C., Prado, P., Navas, J.I., Bernal, J., Catanese, G., Grau, A., López-Sanmartín, M., Nebot-Colomer, E., Ortega, A., Planes, S., Kersting, D., Jimenez, S., Hendriks, I., Moreno, D., Giménez-Casalduero, F., Pérez, M., Izquierdo, A., Sánchez, J., Vicente, N., Sanmarti, N., Guimerans, M., Crespo, J.L., Valencia, J.M., Torres, J., Barrajon, A., Álvarez, E., Peyran, C., Morage, T., Deudero, S., 2020. Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction? *Biol. Conserv.* 243, 108498. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108498>
- García-March, J.R. (2003) Contribution to the knowledge of the status of *Pinna nobilis* (L.) 1758 in Spanish coasts. *Mem Inst Oceanogr Paul Ricard* 9:29–41.
- García-March, J. R. (2005). Aportaciones al conocimiento de la Biología de *Pinna nobilis* Linneo, 1758 (Mollusca: Bivalvia) en el litoral mediterráneo ibérico. Universitat de Valencia, 332 pp.
- García-March JR, García-Carrascosa AM, Peña Cantero AL, Wang YG (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 JR, Hernandis S, Vázquez-Luis M, Prado P, Deudero S, Vicente N, Tena-Medialdea J (2020) Age and growth of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in the western Mediterranean Sea. *Mar Environ Res* 153: 104795.

García-March, J. R., Jiménez, S., Sanchis, M. A., Monleon, S., Lees, J., Surge, D., & Tena-Medialdea, J. (2016). In situ biomonitoring shows seasonal patterns and environmentally mediated gaping activity in the bivalve, *Pinna nobilis*. *Marine Biology*, 163(2), 1. 10.1007/s00227-016-2812-3.

García-March, J. R., Tena, J., Henandis, S., Vázquez-Luis, M., López, D., Téllez, C., Prado, P., Navas, J.I., Bernal, J., Catanese, G., Grau, A., López-Sanmartín, M., Nebot-Colomer, E., Ortega, A., Planes, S., Kersting, D., Jimenez, S., Hendriks, I.E., Moreno, D., GiménezCasalduero, F., Pérez, M., Izquierdo, A., Sánchez, J., Vicente, N., Sanmarti, N., Guimera, M., Crespo, J.L., Valencia, J.M., Torres, J., Barrajon, A., Álvarez, E., Peyran, C., Morage, T., Deudero, S. (2020). Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction? *Biological Conservation*, 243, 108498.

Gazeau, F., Gattuso, J. P., Dawber, C., Pronker, A. E., Peene, F., Peene, J., ... & Middelburg, J. J. (2010). Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences*, 7(7), 2051-2060.

Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J. P., O'Connor, W. A., Martin, S., ... & Ross, P. M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine biology*, 160, 2207-2245.

Giese, A. C., & Pearse, J. S. (1974). *Reproduction of marine invertebrates: I. Acoelomate and Pseudocoelomate Metazoans*.

Gil Hernández, P. M., Valladares, F., Fornes Sales, A., & Gurrutxaga San Vicente, M. (2017). Bases científico-técnicas para la Estrategia estatal de infraestructura verde y de la conectividad y restauración ecológicas.

Giménez-Casalduero F (2006) Gestión de la franja costera: un enfoque integrado. In: Contrastes naturales en la región bioclimática del mediterráneo. Ayuntamiento de Murcia and Museo de la Ciencia y del Agua, Murcia, p 261–272.

Gimenez-Casalduero F, Ramos-Esplá AA, Izquierdo Muñoz A, Gomariz-Castillo F, Martínez Hernández FJ, González-Carrión F (2016) Alloctonous marine invertebrates in the Mar Menor lagoon. In: León VM, Bellido JM (eds) Mar Menor: una laguna singular y sensible. Evaluación científica de su estado. Instituto Español de Oceanografía, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, p 157–178.

Giménez-Casalduero, F., Gomariz-Castillo, F., Alonso-Sarría, F., Cortés, E., Izquierdo-Muñoz, A., Ramos-Esplá, A., 2020. *Pinna nobilis* in the Mar Menor coastal lagoon: a story of colonization and uncertainty. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 652, 77–94. <https://doi.org/10.3354/meps13468>

Giménez-Casalduero, F., Martínez-Fernández, J., 2020. El colapso del Mar Menor: Historia de una joya ecológica maltratada. *Mètode Rev. difusió la Investig.* 106, 22–29.

Gilbert, T., Gardner, R., Kraaijeveld, A.R., & Riordan, P. (2017). Contributions of zoos and aquariums to reintroductions: historical reintroduction efforts in the context of changing conservation perspectives. *International Zoo Yearbook*, 51, 15-31.

Gomariz-Castillo, F., Alonso-Sarría, F., Cánovas-García, F., 2017. Improving Classification Accuracy of Multi-Temporal Landsat Images by Assessing the Use of Different Algorithms, Textural and Ancillary Information for a Mediterranean Semiarid Area from 2000 to 2015. *Remote Sens.* 9, 1058. <https://doi.org/10.3390/rs9101058>

Gomez, E.D. & Mingoa-Licuanan, S.S. (2006). Achievements and lessons learned in restocking giant clams in the Philippines. *Fisheries Research*, 80(1), 46-52.

González-Wangüemert M, Giménez-Casalduero F, Pérez- Ruzafa Á (2006) Genetic differentiation of *Elysia timida* (Risso, 1818) populations in the Southwest Mediterranean and Mar Menor coastal lagoon. *Biochem Syst Ecol* 34:514–527.

González-Wangüemert M, Cánovas F, Marcos C, Pérez-Ruzafa Á (2009) Phosphoglucose isomerase variability of *Cerastoderma glaucum* as a model for testing the influence of environmental conditions and dispersal patterns through quantitative ecology approaches. *Biochem Syst Ecol* 37:325–333.

Gosling, E. (2003). Bivalve culture. *Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture*.

Grau, A., Villalba, A., Navas, J. I., Hansjosten, B., Valencia, J. M., García-March, J. R., ... & Catanese, G. (2022). Wide-geographic and long-term analysis of the role of pathogens in the decline of *Pinna nobilis* to critically endangered species. *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.666640>

Griffiths, C.L., Griffiths, R.J., 1987. 1 - Bivalvia. pp. 1-88. In: *Bivalvia Through Reptilia*. Pandian T.J., Vernberg F.J. (eds). Academic Press, New York.

Guallart, J. & Templado, J. (2012). *Bases ecológicas preliminares para la conservación de las especies de interés comunitario en España: Invertebrados*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. 81 pp.

Guillaumot, C., Danis, B., Saucède, T., 2021. Species distribution modelling of the Southern Ocean benthos: a review on methods, cautions and solutions. *Antarct. Sci.* 33, 349–372. <https://doi.org/10.1017/S0954102021000183>

Gunter, G. (1957). Temperature. *Treatise on marine ecology and paleoecology*, 1, 159-184.

Gupta, H. V., Kling, H., Yilmaz, K.K., Martinez, G.F., 2009. Decomposition of the mean squared error and NSE performance criteria: Implications for improving hydrological modelling. *J. Hydrol.* 377, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.08.003>

Guyon I, Weston J, Barnhill S, Vapnik V (2002) Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Mach Learn* 46:389–422.

Hammer, H.S. (2020). Water quality for zebrafish culture. In: *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 321-335). Academic Press.

Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 1–9.

Harrison, P. J., & Berges, J. A. (2005). Marine culture media. *Algal culturing techniques*, 21-34.

Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J., 2009. *The Elements of Statistical Learning*, Second. ed, Springer Series in Statistics. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-84858-7>

Hastie T, Tibshirani R, Friedman J (2009) *The elements of statistical learning*, 9<sup>th</sup> edn. Springer New York, NY.

Hastie, T.J., Tibshirani, R.J., 1990. *Generalized Additive Models*. Routledge, New York, USA. <https://doi.org/10.1201/9780203753781>

Helm, M. M., Bourne, N., & Lovatelli, A. (2006). FAO. Cultivo de bivalvos en criadero. Manual práctico. *Documento técnico de pesca*, 471.

Helm, M. M., & Laing, I. (1987). Preliminary observations on the nutritional value of 'Tahiti Isochrysis' to bivalve larvae. *Aquaculture*, 62(3-4), 281-288.

Henley, W. F., Zimmerman, L. L., Neves, R. J., & Kidd, M. R. (2001). Design and evaluation of recirculating water systems for maintenance and propagation of freshwater mussels. *North American Journal of Aquaculture*, 63(2), 144-155.

Hellblom, F. (1999). Carbon acquisition in *Zostera marina*. Licentiate Thesis. Stockholm University.

Hendriks, I.E., C.M. Duarte, & M. Alvarez. (2010). Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 86: 157–164.

Hendriks, I. E., van Duren, L. A., & Herman, P. M. (2003). Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(2), 199-213.

Hengl T, Heuvelink GBM, Stein A (2004) A generic framework for spatial prediction of soil variables based on regression-kriging. *Geoderma* 120:75–93.

Hengl T, Nussbaum M, Wright MN, Heuvelink GBM, Gräler B (2018) Random Forest as a generic framework for predictive modeling of spatial and spatio-temporal variables. *PeerJ* 6:e5518.

Hengl, T., Heuvelink, G.B.M., Rossiter, D.G., 2007. About regression-kriging: From equations to case studies. *Comput. Geosci.* 33, 1301–1315. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2007.05.001>

Hernandis, S., Ibarrola, I., Tena-Medialdea, J., Vázquez-Luis, M., García-March, J. R., Prado, P., & Albentosa, M. (2022). Scope for growth and dietary needs of Mediterranean Pinnids maintained in captivity. *BMC zoology*, 7(1), 43.

Hernandis, S., García-March, J. R., Sanchís, M. A., Monleón, S., Vicente, N., & Tena, J. (2018). Temperature regulates the switch between light-synchronized and unsynchronized activity patterns in the subtidal bivalve *Pinna nobilis*. *Mediterranean Marine Science*, 19(2), 366-375.

Hernandis, S., Tena-Medialdea, J., Téllez, C., López, D., Prado, P. & García-March, J.R. (2021b). Suspended culture of *Pinna rudis* enhances survival and allows the development of a seasonal growth model for Mediterranean Pinnids. *Aquaculture*, 543, 736964.

Heywood, V. H. (2015). In situ conservation of plant species—an unattainable goal? *Israel Journal of Plant Sciences*, 63(4), 211-231.

Hiemstra PH, Pebesma EJ, Twenhöfel CJW, Heuvelink GBM (2009) Real-time automatic interpolation of ambient gamma dose rates from the Dutch radioactivity monitoring network. *Comput Geosci* 35:1711–1721.

Hofmann, G. E., Smith, J. E., Johnson, K. S., Send, U., Levin, L. A., Micheli, F., ... & Martz, T. R. (2011). High-frequency dynamics of ocean pH: a multi-ecosystem comparison. *PLoS one*, 6(12), e28983.

IUCN (2019) Mediterranean noble pen shell crisis (*Pinna nobilis*) — January 2020 update. <https://www.iucn.org/news/mediterranean/202001/mediterranean-noble-pen-shell-crisis-pinna-nobilis-january-2020-update> (accessed 15 Jan 2020).

James G, Witten D, Hastie T, Tibshirani R (2013) An introduction to statistical learning. Springer, New York, NY.

Jansson, S. L., & Persson, J. (1982). Mineralization and immobilization of soil nitrogen. *Nitrogen in agricultural soils*, 22, 229-252.

Jiménez-Martínez, J., García-Aróstegui, J.L., Hunink, J.E., Contreras, S., Baudron, P., Candela, L., 2016. The role of groundwater in highly human-modified hydrosystems: a review of impacts and mitigation options in the Campo de Cartagena-Mar Menor coastal plain (SE Spain). *Environ. Rev.* 24, 377–392. <https://doi.org/10.1139/er-2015-0089>.

Jones, D. S. (1983). Sclerochronology: reading the record of the molluscan shell: annual growth increments in the shells of bivalve molluscs record marine climatic changes and reveal surprising longevity. *American Scientist*, 71(4), 384-391.

Kalle, T. (1971). Salinity: General introduction. In: Kinne, O. (ed.), *Marine ecology: A comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters*. Wiley-Interscience, London.

Kamermans, P., Blanco, A., Joaquim, S., Matias, D., Magnesen, T., Nicolas, J. L., ... & Robert, R. (2016). Recirculation nursery systems for bivalves. *Aquaculture international*, 24, 827-842.

Karlson, A.M.L., Pilditch, C.A., Probert, P.K., Leduc, D. & Savage, C. (2020). Large Infaunal Bivalves Determine Community Uptake of Macroalgal Detritus and Food Web Pathways. *Ecosystems* 24, 384-402. <https://doi.org/10.1007/s10021-020-00524-5>

Katsanevakis, S., 2019. The cryptogenic parasite *Haplosporidium pinnae* invades the Aegean Sea

and causes the collapse of *Pinna nobilis* populations. *Aquat. Invasions* 14, 150–164.  
<https://doi.org/10.3391/ai.2019.14.2.01>

Katsanevakis, S., 2007. Density surface modelling with line transect sampling as a tool for abundance estimation of marine benthic species: the *Pinna nobilis* example in a marine lake. *Mar. Biol.* 152, 77–85. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0659-3>

Katsanevakis S (2005) Population ecology of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in a marine lake. *Endang Species Res* 1:51–59.

Katsanevakis, S., Carella, F., Çinar, M.E., Čížmek, H., Jiménez, C., Kersting, D.K., Moreno, D., Rabaoui, L., Vicente, N., 2022. The Fan Mussel *Pinna nobilis* on the Brink of Extinction in the Mediterranean, in: *Imperiled: The Encyclopedia of Conservation*. Elsevier, pp. 700–709.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821139-7.00070-2>.

Katsanevakis, S., Thessalou-Legaki, M., 2009. Spatial distribution, abundance and habitat use of the protected fan mussel *Pinna nobilis* in Souda Bay, Crete. *Aquat. Biol.* 8, 45–54.  
<https://doi.org/10.3354/ab00204>.

Kersting, D., Benabdi, M., Čížmek, H., Grau, A., Jimenez, C., Katsanevakis, S., Öztürk, B., Tuncer, S., Tunesi, L., Vázquez-Luis, M., Vicente, N., Otero Villanueva, M., 2019. *Pinna nobilis*. IUCN Red List Threat. Species 2019 e.T1600759. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T160075998A160081499.en>.

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). *Mar. Environ. Res.* 130, 282–292.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.08.007>

Kersting, D. K., Vázquez-Luis, M., Mourre, B., Belkhamssa, F. Z., Álvarez, E., Bakran-Petricioli, T. & Hendriks, I. E. (2020). Recruitment disruption and the role of unaffected populations for potential recovery after the *Pinna nobilis* mass mortality event. *Frontiers in Marine Science*, 882.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2020.594378>

Kinne, O. (1963). The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. I. Temperature. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, 1, 301-340.

Kjerfve B (ed) (1994) Coastal lagoon processes. Elsevier, New York, NY.

- Knauer, J., & Southgate, P. C. (1999). A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 7(3-4), 241-280.
- Knop, D. (1996). Giant clams: a comprehensive guide to the identification and care of Tridacnid clams. (*No Title*).
- Kornder, N. A., Riegl, B. M., & Figueiredo, J. (2018). Thresholds and drivers of coral calcification responses to climate change. *Global change biology*, 24(11), 5084-5095.
- Kožul, V., Glavić, N., Bolotin, J. & Antolović, N. (2013). Growth of the fan mussel *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) in experimental cages in the South Adriatic Sea. *Aquaculture Research*, 44, 31-40.
- Krawczyk B (2016) Learning from imbalanced data: open challenges and future directions. *Prog Artif Intell* 5: 221–232.
- Kroeker, K.J., R.L. Kordas, R. Crim, I.E. Hendriks, L. Ramajo, G.S. Singh, C.M. Duarte, and J.-P. Gattuso. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology* 19: 1884–1896.
- Kuhn M (2015) Caret: classification and regression training. <https://CRAN.R-project.org/package=caret> (accessed 26 Jan 2018).
- Kuhn M, Johnson K (2013) Applied predictive modeling. Springer, New York, NY.
- Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J., Neter, J., Li, W., others, 2005. Applied linear statistical models. McGraw-Hill Irwin Boston.
- Lattos, A., Bitchava, K., Giantsis, I.A., Theodorou, J.A., Batargias, C., Michaelidis, B., 2021. The Implication of Vibrio Bacteria in the Winter Mortalities of the Critically Endangered *Pinna nobilis*. *Microorganisms* 9, 922. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050922>.
- Lattos, A., Papadopoulos, D. K., Giantsis, I. A., Feidantsis, K., Georgoulis, I., Karagiannis, D., ... & Michailides, B. (2023). Investigation of the highly endangered *Pinna nobilis*' mass mortalities: Seasonal and temperature patterns of health status, antioxidant and heat stress responses. *Marine Environmental Research*, 105977.
- Lauria, V., Garofalo, G., Fiorentino, F., Massi, D., Milisenda, G., Piraino, S., Russo, T., Gristina, M., 2017. Species distribution models of two critically endangered deep-sea octocorals reveal

fishing impacts on vulnerable marine ecosystems in central Mediterranean Sea. *Sci. Rep.* 7, 8049.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08386-z>

Leal, M. C., Ferrier-Pagès, C., Petersen, D., & Osinga, R. (2016). Coral aquaculture: applying scientific knowledge to ex situ production. *Reviews in Aquaculture*, 8(2), 136-153.

Liaw A, Wiener M (2002) Classification and regression by random forest. *R News* 2:18–22

Lillo M (1979) Geomorfología litoral del Mar Menor y del Bajo Segura. PhD thesis, University of Valencia.

Lloret, J., Marín, A., Marín-Guirao, L., Velasco, J., 2005. Changes in macrophytes distribution in a hypersaline coastal lagoon associated with the development of intensively irrigated agriculture. *Ocean Coast. Manag.* 48, 828–842.

<https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2005.07.002>

Loosanoff, V. L., & Davis, H. C. (1952). Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. *The Biological Bulletin*, 103(1), 80-96.

López-Bermúdez F, Ramírez L, Martín Agar P (1981) Análisis integral del medio natural en la planificación territorial: el ejemplo del Mar Menor. *Murcia* (VII)18:11–20.

McMichael, A. J. (2002). Population, environment, disease, and survival: past patterns, uncertain futures. *The Lancet*, 359(9312), 1145-1148.

MacMillan, R.J., Cawthorn, R.J., Whyte, S.K., & Lyon, P.R. (1994). Design and maintenance of a closed artificial seawater system for long-term holding of bivalve shellfish. *Aquacultural Engineering*, 13(4), 241-250.

McNeil, B. I., Matear, R. J., and Barnes, D. J. (2004), Coral reef calcification and climate change: The effect of ocean warming, *Geophys. Res. Lett.*, 31, L22309, [doi:10.1029/2004GL021541](https://doi.org/10.1029/2004GL021541).

Mackie, G. L. (1984). Bivalves. *The mollusca*, 7, 351-418.

Marion, G. M., Millero, F.J., Camões, M. F., Spitzer, P., Feistel, R., & Chen, C. T. (2011). pH of seawater. *Marine Chemistry*, 126(1-4), 89-96.

Marrocco, V., Sicuro, A., Zangaro, F. & Pinna, M. (2018). First record of the protected species *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) in the Aquatina Lagoon (NATURA 2000 site IT9150003, South-East Italian coastline). *Nature Conservation*, 28, 51-59.

- Marshall, R., McKinley, S., & Pearce, C. M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2(1), 33-55.
- Martin, C.S., Giannoulaki, M., De Leo, F., Scardi, M., Salomidi, M., Knittweis, L., Pace, M.L., Garofalo, G., Gristina, M., Ballesteros, E., Bavestrello, G., Belluscio, A., Cebrian, E., Gerakaris, V., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Schembri, P.J., Terribile, K., Rizzo, L., Ben Souissi, J., Bonacorsi, M., Guarneri, G., Krzelj, M., Macic, V., Punzo, E., Valavanis, V., Frascchetti, S., 2014. Coralligenous and maërl habitats: predictive modelling to identify their spatial distributions across the Mediterranean Sea. *Sci. Rep.* 4, 5073. <https://doi.org/10.1038/srep05073>
- López-Sanmartín, M., Catanese, G., Grau, A., Valencia, J. M., García-March, J. R., & Navas, J. I. (2019). Real-Time PCR based test for the early diagnosis of *Haplosporidium pinnae* affecting fan mussel *Pinna nobilis*. *PLoS one*, 14(2), e0212028.
- Mas J (1994) Mar Menor lagoon: relationships, differences and similarities between the coastal lagoon and the adjacent Mediterranean Sea. PhD thesis, Universidad Autónoma de Madrid.
- Mas, J., Franco, I., Demestre, M., Guillén, J, Murcia, F.J., Ruiz, J.M., 2017. Benthic Communities on Shallow Sedimentary Bottoms in the Western Mediterranean, in: Guillén, Jorge, Acosta, J., Chiocci, F.L., Palanques, A. (Eds.), Atlas of Bedforms in the Western Mediterranean. Springer International Publishing, Cham, Suiza, pp. 199–206. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33940-5\\_31](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33940-5_31)
- Maxted, N. (2013). In situ, ex situ conservation. In *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition* (pp. 313-323). Elsevier.
- Matozzo, V. & Marin, M.G. (2011). Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship? *Invertebrate survival journal*, 8(1), 70-77.
- McGlathery KJ, Sundbäck K, Anderson IC (2007) Eutrophication in shallow coastal bays and lagoons: the role of plants in the coastal filter. *Mar Ecol Prog Ser* 348:1–18.
- Meyer, H., Reudenbach, C., Hengl, T., Katurji, M., Nauss, T., 2018. Improving performance of spatio-temporal machine learning models using forward feature selection and target-oriented validation. *Environ. Model. Softw.* 101, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2017.12.001>
- Meyer, H., Reudenbach, C., Wöllauer, S., Nauss, T., 2019. Importance of spatial predictor variable selection in machine learning applications – Moving from data reproduction to spatial prediction. *Ecol. Modell.* 411, 108815. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2019.108815>

Millero, F. J., Lee, K., & Roche, M. (1998). Distribution of alkalinity in the surface waters of the major oceans. *Marine Chemistry*, 60(1-2), 111-130.

Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. 2022. Estrategia de conservación de la nacra (*Pinna nobilis*) en España.

MITECO (2009) Estudio ecocartográfico del litoral de las provincias de Granada, Almería y Murcia.  
<https://www.miteco.gob.es/es/costas/temas/proteccion-costa/ecocartografias/ecocartografia-murcia.aspx>

MITECO, 2019. Un temporal de lluvia sin precedentes en los últimos 100 años en la Vega Baja del Segura.

MITECO, 2018. Orden TEC/1078/2018, de 28 de septiembre, por la que se declara la situación crítica de *Cistus heterophyllus carthaginensis*, *Lanius minor*, *Margaritifera auricularia*, *Marmaronetta angustirostris*, *Mustela lutreola*, *Pinna nobilis* y *Tetrao urogallus*, in: Boletín Oficial Del Estado. Gobierno de España, Madrid, Spain, pp. 100677–100679.

MITECO. (2022). Estrategia de conservación de la nacra (*Pinna nobilis*) en España. 101 pp.

MITMA, 2022. Predicción de oleaje, nivel del mar, boyas y mareografos: Datos históricos [dataset]. URL <https://www.puertos.es/es-es/oceanografia/Paginas/portus.aspx>.

Moreteau, J.C., Vicente, N., 1982. Evolution d'une population de *Pinna nobilis* L. (Mollusca, Bivalvia). *Malacologia* 22, 341–345.

Murillo, L., Talavera, P., 1983. Aportación a la malacología de una laguna litoral: el Mar Menor (Murcia). *Iberus* 3, 15–28.

Nakamura, K., Elbaile, E., Salinas, C., Mesquita-Joanes, F., Sousa, R., Guerrero-Campo, J., Ruiz-Zarzuela, I. & de Blas, I. (2019). Captive breeding of *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) and its conservation importance. *Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst*, (29), 1771-1784.

Napolitano, G. E., Ackman, R. G., & Ratnayake, W. M. (1990). Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21(2), 122-130.

Nebot-Colomer, E., Álvarez, E., Belando, M.D., Deudero, S., Catanese, G., Bernardeau-Esteller, J., García-Muñoz, R., Ramos-Segura, A., Ruiz, J.M., Vázquez-Luis, M., 2021. Living under threat: Will one of the last *Pinna nobilis* populations be able to survive? *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 32, 1–13. <https://doi.org/10.1002/aqc.3738>

Newell, R. C., & Branch, G. M. (1980). The influence of temperature on the maintenance of metabolic energy balance in marine invertebrates. In *Advances in marine biology* (Vol. 17, pp. 329-396). Academic Press.

Oberhuber, T. (2004). Camino de la sexta gran extinción. *El ecologista*, 41.

Orton, J. H. (1920). Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 12(2), 339-366.

Paillard, C., Le Roux, F., & Borrego, J. J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquatic living resources*, 17(4), 477-498.

Panarese, R., Tedesco, P., Chimienti, G., Latrofa, M.S., Quaglio, F., Passantino, G., Buonavoglia, C., Gustinelli, A., Tursi, A., Otranto, D., 2019. *Haplosporidium pinnae* associated with mass mortality in endangered *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) fan mussels. *J. Invertebr. Pathol.* 164, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.005>

Peharda, M., & Vilibić, I. (2008). Modelling the recruitment effect in a small marine protected area: the example of saltwater lakes on the Island of Mljet (Adriatic Sea). *ACTA ADRIATICA*, 49(1), 25-35.

Peteiro, L. G., Filgueira, R., Ayala, A. M., & Fernández-Reiriz, M. J. (2007). Formas de vida de los moluscos bivalvos.

Philippart, C.J.M., van Aken, H.M., Beukema, J.J., Bos, O.G., Cadée, G.C., Dekker, R., 2003. Climate-related changes in recruitment of the bivalve *Macoma balthica*. *Limnol. Oceanogr.* 48, 2171–2185. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.6.2171>

Planchon, F., Hermans, J., Borremans, C., Dubois, P., Poulain, C., Paulet, Y., & Andre, L. (2007, December). Mg isotopes in biocarbonates: new insight into vital effects associated to echinoderms and bivalves calcification. In *AGU Fall Meeting Abstracts* (Vol. 2007, pp. B44C-07).

Planchon, F., Poulain, C., Langlet, D., Paulet, Y. M., & André, L. (2013). Mg-isotopic fractionation in the manila clam (*Ruditapes philippinarum*): New insights into Mg incorporation pathway and calcification process of bivalves. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 121, 374-397.

Prado, P., Andree, K. B., Trigos, S., Carrasco, N., Caiola, N., García-March, J. R., Tena, J., Fernández-Tejedor, M. & Carella, F. (2020a). Breeding, planktonic and settlement factors shape recruitment patterns of one of the last remaining major populations of *Pinna nobilis* within Spanish waters. *Hydrobiologia*, 847(3), 771-786.

Prado, P., Cabanes, P., Catanese, G., Carella, F., Carrasco, N., Grau, A., Hernandis, S., García-March, J.R., Tena, J., Caiola, N., Andree, K.B., (2020b). Growth of juvenile *Pinna nobilis* in captivity conditions: Dietary and pathological constraints. *Aquaculture*, Volume 522, 735167.

Prado, P., Carrasco, N., Catanese, G., Grau, A., Cabanes, P., Carella, F., García-March, J. R., Tena, J., Roque, A., Bertomeu, E., Gras, N., Caiola, N., Furones, M.D. & Andree, K.B. (2020c). Presence of *Vibrio mediterranei* associated to major mortality in stabled individuals of *Pinna nobilis* L. *Aquaculture*, 519.

Prado, P., López, M.A., Cermeño, P., Bertomeu, F., García-March, J.R., Hernandis, S., Tena-Medialdea, J., Cortés, E., Giménez-Casaldueiro, F., 2022. Point pattern analysis as a tool for assessing disease spread and population features in remaining sanctuaries of the critically endangered bivalve *Pinna nobilis*. *J. Nat. Conserv.* 68, 126221. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2022.126221>

Prado, P., Grau, A., Catanese, G., Cabanes, P., Carella, F., Fernández-Tejedor, M., Andree, K.B., Añón, T., Hernandis, S., Tena, J., García-March, J.R., 2021. *Pinna nobilis* in suboptimal environments are more tolerant to disease but more vulnerable to severe weather phenomena. *Mar. Environ. Res.* 163, 105220. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105220>

R Core Team (2018) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Rabaoui, L., Belgacem, W., Ben Ismail, D., Mansour, L., Tlig-Zouari, S., 2015. Engineering effect of *Pinna nobilis* shells on benthic communities. *Oceanologia* 57, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2015.03.002>

Rabaoui L, Tlig-Zouari S, Katsanevakis S, Belgacem W, Ben Hassine OK (2011) Differences in absolute and relative growth between two shell forms of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) along the Tunisian coastline. *J Sea Res* 66:95–103.

Rabaoui, L., Tlig-Zouari, S., Katsanevakis, S., Ben Hassine, O.K., 2010. Modelling population density of *Pinna nobilis* (Bivalvia) on the eastern and southeastern coast of Tunisia. *J. Molluscan Stud.* 76, 340–347. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyq023>

Rabaoui, L., Tlig Zouari, S., Katsanevakis, S., y Ben Hassine, O. K. (2007). Comparison of absolute and relative growth patterns among five *Pinna nobilis* populations along the Tunisian coastline: an information theory approach. *Marine Biology*, 152(3), 537-548.

Rehman, U. (2016). *Next generation bioreactor models for wastewater treatment systems by means of detailed combined modelling of mixing and biokinetics* (Doctoral dissertation, Ghent University).

Reiss H, Birchenough S, Borja A, Buhl-Mortensen L and others (2015) Benthos distribution modelling and its relevance for marine ecosystem management. *ICES J Mar Sci* 72:297–315.

Renner, I.W., Elith, J., Baddeley, A., Fithian, W., Hastie, T., Phillips, S.J., Popovic, G., Warton, D.I., 2015. Point process models for presence-only analysis. *Methods Ecol. Evol.* 6, 366–379. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12352>

Richardson, C.A., Kennedy, H., Duarte, C.M., Kennedy, D.P., Proud, S. V., 1999. Age and growth of the fan mussel *Pinna nobilis* from south-east Spanish Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows. *Mar. Biol.* 133, 205–212. <https://doi.org/10.1007/s002270050459>

Rico-Villa, B., Le Coz, J. R., Mingant, C., & Robert, R. (2006). Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 256(1-4), 377-388.

Rivero-Rodríguez, S., Beaumont, A. R., & Lora-Vilchis, M. C. (2007). The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture*, 263(1-4), 199-210.

Roberts, D.R., Bahn, V., Ciuti, S., Boyce, M.S., Elith, J., Guillera-Arroita, G., Hauenstein, S., Lahoz-Monfort, J.J., Schröder, B., Thuiller, W., Warton, D.I., Wintle, B.A., Hartig, F., Dormann, C.F., 2017. Cross-validation strategies for data with temporal, spatial, hierarchical, or phylogenetic structure. *Ecography (Cop.)*. 40, 913–929. <https://doi.org/10.1111/ecog.02881>

Roberts, S.M., Halpin, P.N., Clark, J.S., 2022. Jointly modeling marine species to inform the effects of environmental change on an ecological community in the Northwest Atlantic. *Sci. Rep.* 12, 132. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04110-0>

Robinson, N.M., Nelson, W.A., Costello, M.J., Sutherland, J.E., Lundquist, C.J., 2017. A Systematic Review of Marine-Based Species Distribution Models (SDMs) with Recommendations for Best Practice. *Front. Mar. Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00421>

Robles-Mungaray, M., Serrano-Guzmán, S. J., & Hoyos-Chaires, F. (1996). Cultivo de larvas y semillas de callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) en el CREMES de Bahía Kino. *Son. México. Resúmenes del XI Simposium Internacional de Biología Marina. La Paz, BCS*, 25.

Rodríguez Babio C, Navarro Tárrega JC (1983) Aportaciones al estudio del zoobentos del Mar Menor (Murcia). 9. Mollusca. Libro de resúmenes. VI Congreso Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural, Real Sociedad Española de Historia Natural, Santiago de Compostel

Rodríguez, S., Balboa, S., Oliveira, G., Montes, J., 2017. First report of mass mortalities in natural population of *Pinna nobilis*. A microbial perspective, in: The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017). Valencia, Spain.

Rodríguez-Jaramillo, C., Maeda-Martínez, A. N., Valdez, M. E., Reynoso-Granados, T., Monsalvo-Spencer, P., Prado-Ancona, D., ... & Sicard, M. T. (2001). The effect of temperature on the reproductive maturity of the penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). *Journal of Shellfish Research*, 20(1), 39-47.

Rojas, R., Miranda, C. D., & Amaro, A. M. (2009). Pathogenicity of a highly exopolysaccharide producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Microbial ecology*, 57, 129-139.

Romero-Díaz, M.A., Pérez Morales, A., 2021. Before, during and after the Dana of September 2019 in the region of Murcia (Spain), as reported in the written press. Cuad. Investig. Geográfica 47, 163–182. <https://doi.org/10.18172/cig.4769>

Ronquillo, J.D., Mckinley, R.S., 2006. Developmental stages and potential mariculture for coastal rehabilitation of endangered Pacific angelwing clam, *Pholas orientalis*. *Aquaculture* 256 (1), 180–191.

Ros, J. (1978). La alimentación y el sustrato en los opistobranquios ibéricos. *Oecologia aquatica*, 3: 153-166.

Roughgarden J (1986) Predicting invasions and rates of spread. In: Mooney HA, Drake JA (eds) Ecology of biological invasions of North America and Hawaii. Springer-Verlag, New York, NY, p 179–190.

Ruitton, S., Lefévre, C., 2021. Toward a recovery of the pen shell *Pinna nobilis* in the French Mediterranean open sea? *Sci. Reports Port-Cros Natl. Park* 35, 429–434.

Ruiz-Álvarez, M., Gomariz-Castillo, F., Alonso-Sarría, F., 2021. Evapotranspiration response to climate change in semi-arid areas: Using random forest as multi-model ensemble method. *Water* 13. <https://doi.org/10.3390/w13020222>

Ruiz GM, Carlton JT, Grosholz ED, Hines AH (1997) Global invasions of marine and estuarine habitats by non- indigenous species: mechanisms, extent and consequences. *Am Zool* 37:621–632.

Ruiz, J.M., Albentosa, M., Aldeguer, B., Álvarez-Rogel, J., Antón, J., Belando, M.D., Bernardeau, J., Campillo, J.A., Domínguez, J.F., Ferrera, I., Fraile-Nuez, E., García, R., Gómez-Ballesteros, M., Gómez, F., González-Barberá, G., Gómez-Jakobsen, F., Le, L., 2020. Informe de evolución y estado actual del Mar Menor en relación al proceso de eutrofización sus causas. Instituto Español de Oceanografía, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España, Madrid, Spain.

Ruiz, J.M., León, V.M., Marín, L., Giménez-Casalduero, F., Álvarez-Rogel, J., Esteve, M.A., Gómez, R., Robledano, F., 2019. Informe de Síntesis sobre el Estado Actual del Mar Menor y sus causas en relación al contenido de nutrientes. *Boletín Contenc. Adm.* 2, 7.

Samer, M. (2015). Biological and chemical wastewater treatment processes. *Wastewater treatment engineering*, 150, 212.

Sandonnini, J., Del Pilar Ruso, Y., Cortés Melendreras, E., Barberá, C., Hendriks, I.E., Kersting, D.K., Giménez Casalduero, F., 2021a. The emergent fouling population after severe eutrophication in the Mar Menor coastal lagoon. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 44, 101720. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101720>

Sandonnini, J., Del Pilar Ruso, Y., Cortés Melendreras, E., Giménez Casalduero, F., 2021b. Massive Aggregations of Serpulidae Associated With Eutrophication of the Mar Menor, Southeast Iberian Peninsula. *Front. Mar. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.531726>

Santhanam, R. (2018). *Biology and ecology of edible marine bivalve molluscs*. CRC Press.

Šarić, T., Župan, I., Aceto, S., Villari, G., Palić, D., De Vico, G., Carella, F., 2020. Epidemiology of Noble Pen Shell (*Pinna nobilis* L. 1758) Mass Mortality Events in Adriatic Sea Is Characterised with Rapid Spreading and Acute Disease Progression. *Pathogens* 9, 776. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100776>

Sastry, A. N. (1968). The relationships among food, temperature, and gonad development of the bay scallops *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiological zoology*, 41(1), 44-53.

Schlieper C, Flügel H, Rudolf J (1960) Temperature and salinity relationships in marine bottom invertebrates. *Experientia* 16:470–472.

- Siletic, T., Peharda, M., 2003. Population study of the fan shell *Pinna nobilis* L. in Malo and Veliko Jezero of the Mljet National Park (Adriatic Sea). *Sci. Mar.* 67, 91–98. <https://doi.org/10.3989/scimar.2003.67n191>
- Smith, J.N., Kelly, N., Renner, I.W., 2021. Validation of presence-only models for conservation planning and the application to whales in a multiple-use marine park. *Ecol. Appl.* 31. <https://doi.org/10.1002/eap.2214>
- Schmidt, H., Seitz, S., Hassel, E. & Wolf, H. (2018). The density–salinity relation of standard seawater, *Ocean Sci.*, 14, 15–40, <https://doi.org/10.5194/os-14-15-2018>
- Smith, D., Leary, P., Craggs, J., Bythell, J. & Sweet, M. (2015). Microbial Communities Associated with Healthy and White Syndrome-Affected *Echinopora lamellosa* in Aquaria and Experimental Treatment with the Antibiotic Ampicillin. *PLoS ONE* 10(3): e0121780. doi: [10.1371/journal.pone.0121780](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121780)
- Specht, J. A., & Fuchs, H. L. (2018). Thermal and viscous effects of temperature on *Mercenaria mercenaria* suspension feeding. *Marine Ecology Progress Series*, 589, 129-140.
- Spotte, S. H. (1979). Seawater aquariums: the captive environment. (*No Title*).
- Spotte, S. (1992). *Captive seawater fishes: science and technology*. John Wiley & Sons.
- Strauss T, von Maltitz MJ (2017) Generalising Ward’s method for use with Manhattan distances. *PLOS ONE* 12: e0168288
- Styan, C. A. (1998). Polyspermy, egg size, and the fertilization kinetics of free-spawning marine invertebrates. *The American Naturalist*, 152(2), 290-297.
- Theodorou, J. A., James, R., Tzovenis, I., & Hellio, C. (2015). The recruitment of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) on the ropes of a Mediterranean mussel long line farm. *Journal of Shellfish Research*, 34(2), 409-414.
- Thiel, A. J. (1989). *Advanced Reef Keeping: Theory, equipment, instrumentation, installation* (Vol. 1). Aardvark Press.
- Thomsen, J., Haynert, K., Wegner, K. M., & Melzner, F. (2015). Impact of seawater carbonate chemistry on the calcification of marine bivalves. *Biogeosciences*, 12(14), 4209-4220.

- Travers, M. A., Miller, K. B., Roque, A., & Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of invertebrate pathology*, *131*, 11-31.
- 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*. *Mediterr. Mar. Sci.* *15*, 667. <https://doi.org/10.12681/mms.836>
- 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.
- Trigos, S., Vicente, N., Prado, P. & Espinós, F. J. (2018). Adult spawning and early larval development of the endangered bivalve *Pinna nobilis*. *Aquaculture*, *483*, 102-110.
- Tsatiris A, Papadopoulos V, Makri D, Topouzelis K, Manout- soglou E, Hasiotis T, Katsanevakis S (2018) Spatial distribution, abundance and habitat use of the endemic Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* in Gera Gulf, Lesvos (Greece): comparison of design-based and model-based approaches. *Mediterr Mar Sci* *19*:642–655.
- Turcios, A. E., & Papenbrock, J. (2014). Sustainable treatment of aquaculture effluents—what can we learn from the past for the future? *Sustainability*, *6*(2), 836-856.
- Tzirita, M. (2012). *A characterisation of bioaugmentation products for the treatment of waste fats, oils and grease (FOG)*. Doctoral dissertation, Dublin City University.
- UNESCO. (1981). The Practical Salinity Scale 1978 and the International Equation of State of Seawater 1980. *Technical Paper in Marine Science* 36.
- Unsworth, R. K., McKenzie, L. J., Collier, C. J., Cullen-Unsworth, L. C., Duarte, C. M., Eklöf, J. S., ... & Nordlund, L. M. (2019). Global challenges for seagrass conservation. *Ambio*, *48*, 801-815.
- UPCT, 2022. Servidor de Datos Científicos del Mar Menor [dataset]. URL <https://marmenor.upct.es/>
- Valavi, R., Elith, J., Lahoz-Monfort, J.J., Guillera-Arroita, G., 2019. blockCV: An r package for generating spatially or environmentally separated folds for k -fold cross-validation of species distribution models. *Methods Ecol. Evol.* *10*, 225–232. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13107>
- Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Barraión, A., García-March, J.R., Grau, A., Hendriks, I.E., Jiménez, S., Kersting, D., Moreno, D., Pérez, M., Ruiz, J.M., Sánchez, J., Villalba, A., Deudero, S., 2017.

- S.O.S. *Pinna nobilis*: A Mass Mortality Event in Western Mediterranean Sea. *Front. Mar. Sci.* 4, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00220>
- Vázquez-Luis, M., March, D., Alvarez, E., Alvarez-Berastegui, D., Deudero, S., 2014. Spatial distribution modelling of the endangered bivalve *Pinna nobilis* in a Marine Protected Area. *Mediterr. Mar. Sci.* 15, 626. <https://doi.org/10.12681/mms.796>
- Velasco J, Lloret J, Millan A, Marin A, Barahona J, Abellan P, Sanchez-Fernandez D (2006) Nutrient and particulate inputs into the Mar Menor lagoon (SE Spain) from an intensive agricultural watershed. *Water Air Soil Pollut* 176:37–56.
- Vattakaven, T., Bond, P., Bradley, G., & Munn, C.B. (2006). Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6508-6513.
- Viaroli P, Laserre P, Campostrini P (2007) Lagoons and coastal wetlands. *Hydrobiologia* 577:1–3
- Wentworth, C.K. (1922). A Scale of Grade and Class Terms for Clastic Sediments. *The Journal of Geology*, 30(5).
- Xiao, R., Wei, Y., An, D., Li, D., Ta, X., Wu, Y., & Ren, Q. (2019). A review on the research status and development trend of equipment in water treatment processes of recirculating aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 863-895.
- Yanong, R. P. (2003). Fish health management considerations in recirculating aquaculture systems—part 2: pathogens. *Circular*, 121, 1-8.
- Youden WJ (1950) Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3:32–35.
- Zar, J.H., 2009. Biostatistical analysis, 5th Editio. ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
- Zavodnik D (1967) Contribution to the ecology of *Pinna nobilis* L. (Moll., Bivalvia) in the northern Adriatic. *Thalass Jugosl* 3:93–103.
- Zavodnik D, Hrs-Brenko M, Legac M (1991) Synopsis on the fan shell *Pinna nobilis* L. in the eastern Adriatic Sea. In: Boudouresque CF, Avon M, Gravez AV (eds) *Les Espèces Marines à Protéger en Méditerranée*. GIS Posi- donie Publ., Marseille, France, p 169–178.
- Zegeye, H. (2017). In situ and ex situ conservation: complementary approaches for maintaining biodiversity. *International Journal of Research in Environmental Studies*, 4(1), 1-12.

Zenetos A, Gofas S, Russo G, Templado J (2004) CIESM atlas of exotic species in the Mediterranean, Vol 3. CIESM, Monaco.