

## **Crecimiento, supervivencia y composición bioquímica de juveniles de mejillón gallego, *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia), sometidos a diferentes regímenes de renovación del agua de cultivo**

J.P. FIDALGO\*, I. LOPEZ-MUÑOZ\*, A. CID\*, J. ABALDE\*\* & C. HERRERO\*

\**Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de La Coruña. Campus A Zapateira s/n. 15071 La Coruña*

\*\**Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago. 15071 Santiago de Compostela*

### **Resumen**

FIDALGO, J.P., LOPEZ-MUÑOZ, I., CID, A., ABALDE, J. & HERRERO, C. (1991). Crecimiento, supervivencia y composición bioquímica de juveniles de mejillón gallego, *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia), sometidos a diferentes regímenes de renovación del agua de cultivo. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 2: 91-98

La frecuencia del cambio de agua de mar de los recipientes de cultivo incide en el crecimiento y supervivencia de juveniles del mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). Se realizan 2 experiencias de 60 días en tanques de polietileno de 5 litros de capacidad; a uno de los tanques se le cambia el agua diariamente, mientras que al otro sólo se le cambia cuando el pH es mayor de 8.5 ó menor de 7.4. Los mejillones de ambos tanques se alimentan con una mezcla de microalgas marinas (*Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricorutum* y *Dunaliella tertiolecta*). El mayor crecimiento se obtiene en el cultivo al que se le ha cambiado el agua diariamente, y que presenta una tasa de crecimiento un 18% mayor que la del cultivo sin renovación diaria de agua. Sin embargo, a los 20 días, la supervivencia es del 100% en ambos casos y la tasa de crecimiento es un 9.94% mayor en los mejillones a los que no se recambiaba el agua diariamente. Al cabo de 40 días la supervivencia es de un 100% en el grupo con renovación diaria, y de un 95% en el otro, siendo en este caso la tasa de crecimiento un 14.72% mayor en los cultivos con renovación de agua. Por tanto, la incidencia del cambio de agua no se aprecia en experiencias a corto plazo (20 días), pero sí cuando la duración es mayor.

Palabras clave: Mejillón, cultivo en laboratorio, renovación de agua.

### **Abstract**

FIDALGO, J.P., LOPEZ-MUÑOZ, I., CID, A., ABALDE, J. & HERRERO, C. (1991). Growth, survival and biochemical composition of Galician juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis*, Mollusca, Bivalvia), cultured with different seawater removed regimes. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 2: 91-98

The seawater removal frequency affects the growth and survival of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. Two experiments were carried out in polyethylene tanks during 60 days; in one of the tanks seawater was daily removed, whereas in the other seawater was removed when pH was below 7.4 or above 8.3. Mussels of both tanks were fed with a mixed microalgal diet (*Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricorutum* and *Dunaliella tertiolecta*). After 20 days, survival was 100% in both experiments and mussels in the tank without seawater removal showed a growth rate a 9.94% higher than that of mussels in the tank with daily seawater removal. After 40 days, survival was 100% in the group with daily seawater removal and 95% in the other group, and the growth rate was a 14.72% higher in the group with daily seawater removal. After 60 days, there were not changes in the survival and the growth rate was a 18% higher in the group with daily seawater removal. Therefore, the frequency of seawater removal does not affect in short-term experiments (20 days) but it does in longer experiments.

Key words: Mussel, indoor culture, seawater removal

## INTRODUCCION

La necesidad de producción de semilla de moluscos bivalvos ha motivado la intensificación de los estudios experimentales sobre crecimiento, fisiología, nutrición, etc., de este estadio de los moluscos. La fragilidad y, por tanto, la mayor mortalidad de los estadios juveniles, hacen que tanto la alimentación como el control de la calidad del agua de cultivo deban ser cuidados, especialmente en las instalaciones de cultivo intensivo.

La influencia que sobre el estado fisiológico de los individuos tienen factores tales como el pH, concentración de catabolitos excretados, concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, flora bacteriana, etc., bien directamente o a través de otros factores que influyen sobre él, pudiendo conducir a situaciones de estrés, ha provocado distintas estrategias experimentales para mantener la calidad del agua: sistemas de recirculación de agua de mar, con varios cambios por semana (WALNE, 1974; WALNE & SPENCER, 1974; LAING & MILLICAN, 1986; LAING, 1987, etc); tanques de 50 l con cambios de agua cada 2 días (RODHOUSE *et al.*, 1983); renovación del agua diaria en contenedores de pequeña capacidad (ENRIGHT *et al.*, 1986; STRÖMGÉN & CARY, 1984); sistemas de flujo continuo, etc. Por tanto, el mantenimiento o cultivo de moluscos en laboratorio requiere un aporte considerable de agua de mar o bien costosos sistemas de recirculación y/o bombeo. Ello nos ha llevado a plantearnos cómo puede influir la frecuencia de renovación del agua de los recipientes de cultivo en el crecimiento, supervivencia e incluso en el metabolismo (estudiado en función de la composición bioquímica final) de la semilla de *Mytilus galloprovincialis* (Lmk).

## MATERIAL Y METODOS

Se utiliza semilla de mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lmk), procedente de la Ría de Arosa, N.O. de España, con un tamaño inicial entre 12-18 mm. Se mantienen en tanques de polietileno de 5 l de capacidad, en una cámara de cultivo con una temperatura ambiental controlada de 18±1 °C. Los tanques se llenan con agua de mar filtrada y esterilizada mediante luz ultravioleta, con una salinidad de 36‰ y un pH

7.9, y se airean para mantener una tensión de O<sub>2</sub> adecuada y evitar la sedimentación de las microalgas que se dan como alimento a la semilla de mejillón. Los mejillones se alimentan con una mezcla de las microalgas marinas *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta* y *Phaeodactylum tricorutum*, ajustando en función del peso seco (LAING & MILLICAN, 1986) a una proporción 1:1:1. Las microalgas se mantienen en fase de crecimiento exponencial en botellones de 6 l en una cámara a temperatura constante de 18±1 °C e intensidad luminosa de saturación (FABREGAS *et al.*, 1985, 1986). En base a las relaciones en peso seco de estas tres especies, 1:1.25:3 respectivamente, y las densidades celulares diarias de cada cultivo, se calculan los volúmenes de cultivo microalgal aportados diariamente como alimento, para una ración de cada especie equivalente a 18.72 mg de materia seca/día/semilla; a lo largo del período experimental se incrementa a 28.08 mg de materia seca de cada microalga por semilla y día, para adecuar la ración alimentaria al incremento de talla de los individuos. La ración de alimento aportada a las semillas se determinó de modo que a dicha densidad la producción de pseudoheces fuese mínima y a las 24 h todo el alimento suministrado hubiese desaparecido del tanque de cultivo.

## Cultivo experimental de las semillas

Se realizan tres experiencias, con una densidad de 20 individuos por litro de agua de mar, y con una duración de 60 días. La densidad de semilla se eligió en función de los valores recomendados por WALNE (1974) y WALNE & SPENCER (1974) para semilla de *Ostrea edulis*. En la experiencia 1, los mejillones no se alimentan y el agua de cultivo se cambia cuando los valores de pH se encuentran fuera del rango 7.4-8.1. En las experiencias 2 y 3 se utiliza la dieta microalgal descrita anteriormente; en la experiencia 2 el agua de los tanques de cultivo se cambia diariamente, mientras que en la experiencia 3 sólo cuando el pH es menor o igual a 7.4 o mayor o igual a 8.1. Diariamente, antes de añadir los volúmenes correspondientes de los cultivos microalgales, el agua de cultivo se limpia de detritus y se enrasa el volumen de agua.

Como índice de la calidad del agua se elige el pH, el cual oscila en función de la concentración de amonio excretado, concentración de CO<sub>2</sub>, flora bacteriana, etc. El pH del agua de mar utilizada es 7.9, y en función de ello se elige el rango de fluctuación 7.4-8.1.

### Estimaciones sobre las semillas

Diariamente se observa el estado de los mejillones a efectos de contabilizar la supervivencia de los mismos y a intervalos periódicos se mide la longitud mediante un calibrador. Estos datos se utilizan para calcular la tasa de mortalidad (RICKER, 1973) y la tasa de crecimiento (BAYNE, 1976; ENRIGHT *et al.*, 1986a; LAING, 1987) mediante las expresiones:

$$\text{Tasa de mortalidad } (Z_t) = \text{Ln } (N_0/N_t)$$

donde  $Z_t$  es la tasa de mortalidad en el tiempo  $t$ ,  $N_0$  el número inicial de individuos, y  $N_t$  el número de individuos en el tiempo  $t$ .

$$\text{Tasa de crecimiento} \\ (\text{TC}_t) = [\text{Ln } (L_t) - \text{Ln } (L_0)] / t$$

siendo:  $\text{TC}_t$  la tasa de crecimiento en el tiempo  $t$ ,  $L_t$  la longitud ( $\mu\text{m}$ ) en el tiempo  $t$ ,  $L_0$  la longitud inicial ( $\mu\text{m}$ ), y  $t$  el tiempo en días.

Al final de las experiencias se recogen las semillas, se extraen las viandas y se liofilizan. Sobre la materia seca se determina el peso seco medio de la vianda, y los porcentajes de proteína, lípidos, carbohidratos y cenizas. Las proteínas se determinan por el método Kjeldahl (A.O.A.C. 1965) a partir del contenido en N total; los carbohidratos por la técnica del fenol-sulfúrico

(DUBOIS *et al.*, 1956) y para la determinación de lípidos se sigue un ensayo de carbonización cuantitativa (MARSH & WEINSTEIN, 1966). Las cenizas se obtienen por calcinación en un horno Muffla a 550 °C hasta la destrucción total de la materia orgánica (A.O.A.C. 1965).

En base a la cantidad de alimento añadida a los tanques de cultivo se calcula el peso seco final obtenido por individuo en el período experimental por cada 10<sup>6</sup> células microalgales, lo cual se describe como el peso específico por unidad de ración (WALNE & SPENCER, 1974).

### RESULTADOS Y DISCUSION

El mantenimiento del pH dentro del rango elegido, 7.4-8.1, representa aproximadamente una frecuencia de renovación del agua de los tanques de una vez cada 7 días en las experiencias 1 y 3.

En todas las experiencias la tasa de crecimiento disminuye a lo largo del período experimental (Tabla I; Fig. 1 y 2). La tasa de crecimiento a los 60 días ( $\text{TC}_{60}$ ) para los mejillones no alimentados, alimentados y con cambio de agua diario, y alimentados y sin renovación de agua diaria, es de un 9.6%, 53.48% y 36.63% respectivamente, con respecto a la tasa correspondiente a los 7 días ( $\text{TC}_7$ ).

La tasa de crecimiento en función del tiempo se ajusta a una función exponencial de ecuación  $y = a e^{-bx}$ , donde  $y$  es la tasa de crecimiento y  $x$  el tiempo en días. En la Tabla II se muestran los coeficientes de esta curva para cada una de las experiencias, y en la Fig. 2 se representa el logaritmo neperiano de la tasa de crecimiento frente al tiempo.

TABLA I. Valores de la tasa de crecimiento (TC) a los 7, 20, 40 y 60 días de semilla de mejillón gallego cultivada con distintos regímenes de renovación del agua.  $\text{TC} = [\text{Ln } (L_t) - \text{Ln } (L_0)] / t$

Experiencia	Días			
	7	20	40	60
No alimentados	2.81	2.56	0.90	0.27
Cambio diario	6.32	5.43	4.52	3.38
Cambio no diario	7.78	5.97	3.64	2.85

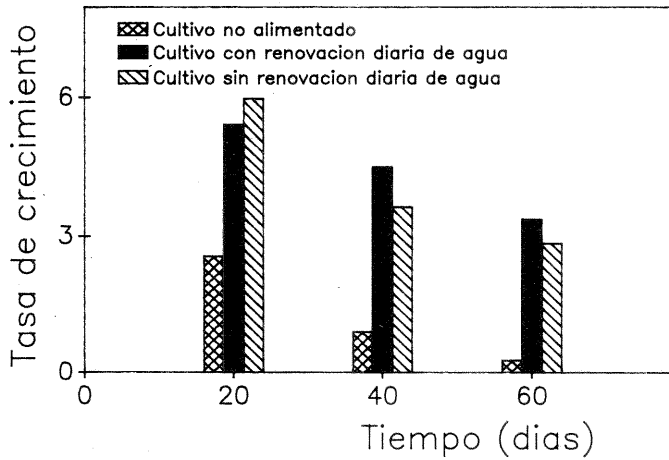


Fig. 1. Tasa de crecimiento (Tc) de la semilla del mejillón gallego a lo largo del tiempo de cultivo y con los distintos regímenes de renovación de agua.

TABLA II. Valores de los coeficientes a, b y r de las funciones  $y = ae^{-bx}$  (y = tasa de crecimiento; x = tiempo (días)) para semilla de mejillón gallego cultivada con distintos regímenes de renovación del agua

Experiencia	Coeficientes		
	a	b	r
No alimentados	4.124	-0.038	-0.94
Cambio diario	6.9269	-0.0114	-0.99
Cambio no diario	7.8906	-0.018	-0.95

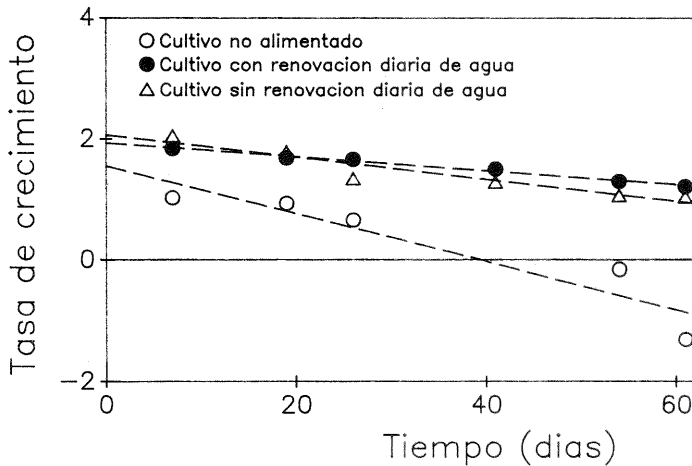


Fig.2. Tasa de crecimiento, representada en escala logarítmica frente al tiempo, para la semilla de mejillón gallego cultivada con distintos regímenes de renovación de agua.

Al comparar las tasas de crecimiento obtenidas en las distintas experiencias para el mismo día (Tabla I; Fig. 1 y 2), se observa que durante los 20 primeros días de cultivo los mejillones alimentados a los que no se les cambia el agua diariamente crecen más deprisa que aquellos a los que se les cambia el agua a diario. Sin embargo, a partir del día 20 son los mejillones con cambio de agua diario los que alcanzan la máxima tasa de crecimiento. En estas dos experiencias el crecimiento es notablemente superior al de los mejillones no alimentados: 2-2.5 veces mayor a los 20 días, 4.5-5 veces a los 40 días y 10-12 a los 60 días.

La supervivencia a los 40 días de cultivo es muy similar en todas las experiencias, oscilando entre 95-100% (Tabla III; Fig. 3). Las diferencias aparecen a partir de este momento y se manifiestan entre los mejillones no alimentados y aquellos alimentados, independientemente de la frecuencia del cambio de agua. La supervivencia final es del 95-100% en los alimentados y del 70% en los no alimentados. A partir de los datos de supervivencia se puede calcular la tasa de mortalidad (Z), como se describió anteriormente. Al final de la experiencia, Z toma valores de 0.36 para los mejillones no alimentados, 0.00 para los alimentados a los que se les renueva el

TABLA III. Valores de porcentaje de supervivencia y tasa de mortalidad (Z) obtenidos con semilla de mejillón gallego cultivada con distintos regímenes de renovación del agua. Supervivencia =  $(N_t/N_0) \times 100$ ;  $Z = \ln(N_0/N_t)$

Experiencia	Supervivencia		Z	
	40	60	40	60
No alimentados	100	70	0.00	0.36
Cambio diario	100	100	0.00	0.00
Cambio no diario	95	95	0.05	0.05

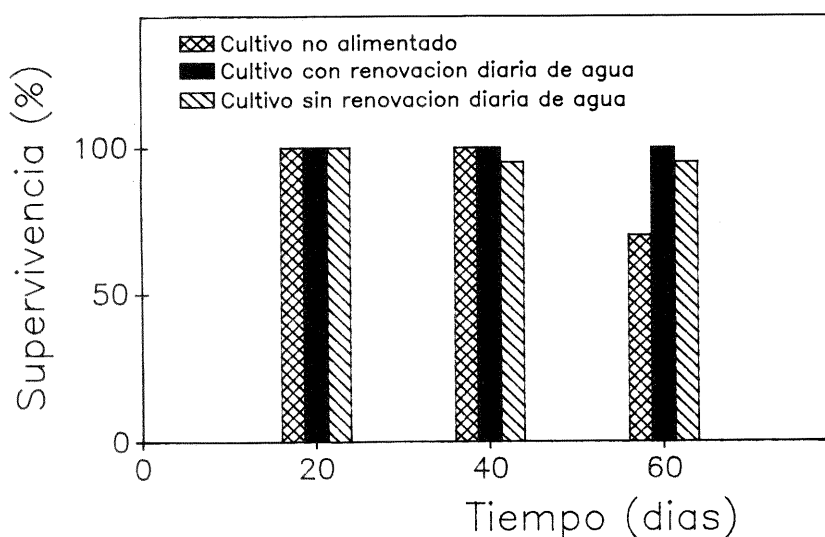


Fig. 3. Supervivencia a los 20, 40 y 60 días de cultivo de la semilla de mejillón gallego cultivada con distintos regímenes de renovación de agua.

agua diariamente, y de 0.05 para los alimentados y con cambio de agua no diario (Tabla III).

Como consecuencia de la frecuencia del cambio de agua, se ve alterada la composición bioquímica de los mejillones, fundamentalmente en la fracción lipídica (Tabla IV; Fig. 4), la cual representa un 5.24% de la materia seca en los mejillones con cambio diario del agua de los tanques, mientras que en los mejillones con cambio no diario representa un 13.93%. Los porcentajes de proteínas y carbohidratos son muy similares, con valores ligeramente superiores en los mejillones sometidos a cambios diarios del agua. Las cenizas fueron un 3% mayores en aquellos en los que el agua no se cambió diariamente.

El peso seco medio final de la vianda es 11.6 mg (aprox. 38%) mayor en el grupo de cambio diario frente a los mejillones de la experiencia 3 (Tabla V).

El incremento de peso específico indica que por cada  $10^6$  células microalgales añadidas al tanque de cultivo (aproximadamente 0.18 mg de materia microalgal seca) se obtienen aproximadamente 23.5  $\mu\text{g}$  de materia seca por individuo en los mejillones con una frecuencia diaria de renovación del agua de los tanques, y unos 13.64  $\mu\text{g}$  por semilla en la experiencia con una frecuencia no diaria de renovación del agua.

Se calcula también la eficiencia de asimilación (proporción de alimento ingerido que es transformado en materia seca), obteniéndose

TABLA IV. Valores de porcentaje de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas con respecto a la materia seca total para semilla de mejillón gallego cultivada con distintos regímenes de renovación del agua

Experiencia	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas
Cambio diario	73.97	20.79	5.24	15.69
Cambio no diario	69.53	16.54	13.93	16.19

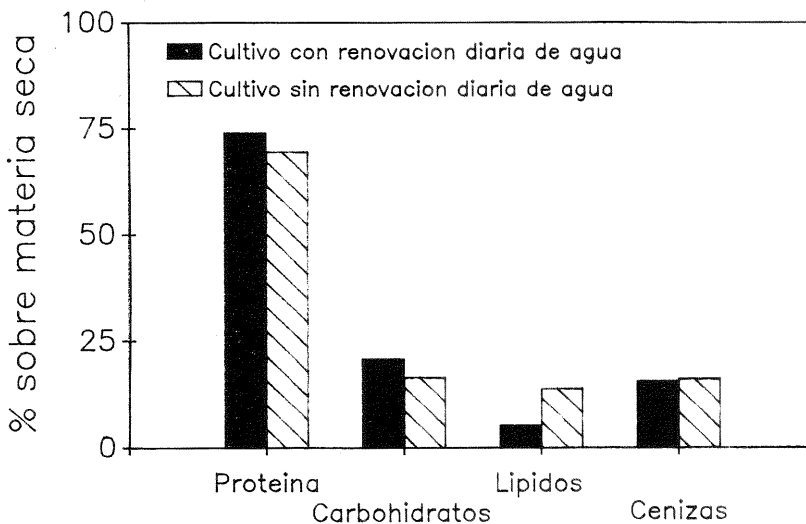


Fig. 4. Concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas expresada en porcentaje sobre la materia seca de semillas de mejillón gallego cultivada con distintos regímenes de renovación de agua.

TABLA V. Valores del peso seco final de la vianda (mg), incremento de peso específico ( $\mu\text{g}$ )/millón de células microalgales) y eficiencia de asimilación (%) para semilla de mejillón gallego cultivada con distintos regímenes de renovación del agua

Experiencia	Peso seco final vianda	Peso específico	Eficiencia de asimilación
Cambio diario	42.3	23.5	13.05
Cambio no diario	30.7	13.6	7.59

unos valores de 13.05% y 7.59% para los mejillones con frecuencia diaria de cambio del agua y con frecuencia no diaria, respectivamente.

La frecuencia del cambio del agua de los tanques de cultivo parece afectar al crecimiento de la semilla de mejillón, destacando el hecho de que en los primeros 20 días de la experiencia el crecimiento es superior en aquellos mejillones en los que el agua no se cambia diariamente. La frecuencia del cambio del agua no parece afectar, sin embargo, a la supervivencia, prácticamente total en las dos experiencias con alimentación. Por otra parte, la semilla parece ser notablemente resistente a las condiciones de inanición, con una alta tasa de supervivencia, 70% a los 60 días, y con capacidad para mantener un crecimiento, aunque mínimo.

Como consecuencia de la frecuencia de la renovación del agua de los tanques se observa un efecto sobre la composición bioquímica de la semilla cultivada, almacenando una mayor cantidad de reservas lipídicas aquellos mejillones sometidos a cambios poco frecuentes de agua. Sin embargo, las demás fracciones celulares son escasamente afectadas.

Estas condiciones de cultivo afectan también al incremento neto de peso seco, al incremento de peso específico y al porcentaje de asimilación de la biomasa microalgal. El cálculo de la ración alimenticia ingerida se hace estrictamente en base a la cantidad de biomasa microalgal añadida al tanque de cultivo por día y semilla. Una proporción de ésta no es ingerida por la semilla, ya que si bien la mayoría de los días que duró la experiencia la biomasa microalgal suministrada durante cada 24 h desaparecía del agua de cultivo, parte de las células microalgales se deposita-

ban sobre el fondo del tanque. Por ello, tanto el incremento en peso específico como la eficiencia de asimilación están infraestimadas. Si bien estos dos parámetros están infraestimados, sirven para reflejar un distinto comportamiento en función de la frecuencia del cambio de agua.

La composición bioquímica y las características metabólicas parecen reflejar un mayor gasto energético debido a la respiración en los mejillones sin renovación diaria del agua con respecto a los mejillones sometidos a renovaciones del agua diarias (BAYNE, 1976).

WALNE & SPENCER (1974), en experiencias de 21 días con semilla de ostra, *Ostrea edulis*, con una frecuencia de cambio del agua de los tanques de 2, 4 ó 7 veces por semana, encuentran que el crecimiento es más rápido en aquellos tanques que recibían el cambio de agua más frecuentemente, interpretando que en los niveles de alimentación altos podría haberse producido un efecto adverso que se compensaba por los cambios más frecuentes de agua. Nosotros hemos observado el mismo efecto, pero en nuestras experiencias se manifiesta a un plazo más largo, a partir del vigésimo día.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A.O.A.C. (1965). *Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemist*. USA.
- BAYNE, B.L. (1976). The biology of the mussel larvae. In: Bayne, B.L. (Ed.), *Marine Mussels. Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press. London. pp.: 81-120.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annal. Chem.*, **28**: 350-356.

- ENRIGHT, C.T., NEWKIRK, G.F., CRAIGIE, J.S. & CASTELL, J.D. (1986a). Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **96**: 1-13.
- ENRIGHT, C.T., NEWKIRK, G.F., CRAIGIE, J.S. & CASTELL, J.D. (1986b). Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **96**: 15-26.
- FABREGAS, J., HERRERO, C., ABALDE, J., LIAÑO, R. & CABEZAS, B. (1986). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, **53**: 187-199.
- FABREGAS, J., HERRERO, C., CABEZAS, B. & ABALDE, J. (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch.) with high nutrient concentration. *Aquaculture*, **49**: 231-244.
- HERRERO, C. (1985). *Las microalgas marinas como una nueva fuente de proteína, vitaminas y minerales*. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.
- HERRERO, C., ABALDE, J., CABEZAS, B., FÁBREGAS, J. & REGUEIRO, B. (1985). Isolation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* var. *bicornutum* from Galician waters. Amino acid pattern and biological value. *Bol. Acad. Gal. Cienc.*, **4**: 35-39.
- LAING, I. (1987). The use of artificial diets in rearing bivalve spat. *Aquaculture*, **65**: 243-249.
- LAING, I. & MILLICAN, P.F. (1986). Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*, **54**: 245-262.
- MARSH, J.B. & WEINSTEIN, D.B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipids Res.*, **7**: 574-576.
- RICKER, W.E. (1973). Linear regression in fisheries research. *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**: 409-434.
- RÓDHOUSE, P.G., RODEN, C. & SOMERVILLE-JACKLIN, M.E. (1983). Nutritional value of microalgal mass cultures to the oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, **32**: 11-18.
- SANJUAN, A., QUESADA, H., ZAPATA, C. & ALVAREZ, G. (1986). Identificación del mejillón del NO de la Península Ibérica como *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Acta Cient. Comp.*, **22** (3-4): 35-79.
- STRÖMGÉN, T. & CARY, C. (1984). Growth in length of *Mytilus edulis* L. fed on different algal diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **76**: 23-34.
- WALNE, P.R. (1974). *Culture of Bivalve Molluscs. 50 Years' Experience at Conwy*. Fishing News Books. Farnham. 173 pp.
- WALNE, P.R. & SPENCER, B.E. (1974). Experiments on the growth and food conversion efficiency of the spat of *Ostrea edulis* L. in a recirculation system. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, **35** (3): 303-318.