

Manual de cultivo e asentamento do ourizo de mar

Paracentrotus Lividus



Manuais
Serie manuais didácticos

Autoras

Estefanía Paredes Rosendo
Alba Lago Dopico

Estefanía Paredes Rosendo



Estefanía Paredes é doutora en Ciencias do Mar. Forma parte do grupo de Ecoloxía Costeira (ECOCOST) no Centro de Investigación Mariña (CIM) da Universidade de Vigo e a súa investigación centrase no estudo e aplicación da criobioloxía aos organismos mariños, así coma do estudo da reprodución e fisioloxía dos mesmos. O seu traballo ten aplicacións para a biobancarización, conservación da biodiversidade, xestión sostible das pesquerías e acuicultura. Na actualidade a Dra. Paredes é Investigadora Ramón y Cajal na Universidade de Vigo, ademais de membro da xunta directiva da *Society for Cryobiology*, Presidenta da Sociedade Española de Criobiología e Profesora Asociada a cátedra en criobioloxía da UNESCO.

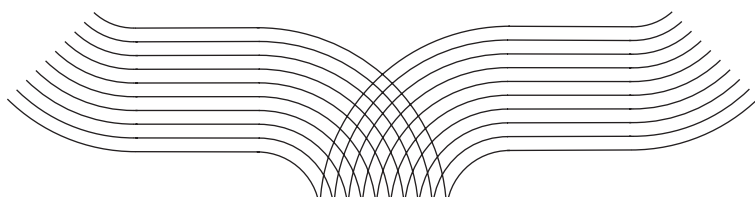
Alba Lago Dopico



Alba Lago é investigadora predoutoral na Universidade de Vigo. Iniciou a súa formación como Técnico Superior en Citoloxía e Anatomía Patolóxica para seguidamente graduarse en Bioloxía pola Universidade de Vigo. Durante os seus estudos de grao, obtivo unha bolsa Santander Intraemprende, o que a levou a incursión da investigación no sector privado relacionado co medio mariño. Posteriormente, realizou un Máster en Bioloxía Mariña na Universidade de Vigo. Durante ese período participou en diversos proxectos de investigación na ECIMAT, como MUSSELGO e OCIMER+, e traballou como xestora de proxectos en Campus do Mar, no proxecto BLUEBIOLAB. Actualmente, está desenvolvendo a súa tese sobre a criopreservación de larvas mariñas complexas.

Servizo de Publicacións

Universidade de Vigo



Manuais

Serie de manuais didácticos

n.º 089

Edición

Universidade de Vigo
Servizo de Publicacións
Rúa de Leonardo da Vinci, s/n
36310 Vigo

Deseño da portada

Tania Sueiro Graña
Área de Imaxe
Vicerreitoría de Comunicacións e Relacións Institucionais

Maquetación

Tórculo Comunicación Gráfica, S. A.

Fotografía da portada

Adobe stock

Impresión

Tórculo Comunicación Gráfica, S. A.

ISBN (Libro impreso)

978-84-1188-018-3

Depósito legal

VG 317-2024

© Servizo de Publicacións da Universidade de Vigo, 2024

© Estefanía Paredes Rosendo e Alba Lago Dopico

Sen o permiso escrito do Servizo de Publicacións da Universidade de Vigo, queda prohibida a reprodución ou a transmisión total e parcial deste libro a través de ningún procedemento electrónico ou mecánico, incluídos a fotocopia, a gravación magnética ou calquera almacenamento de información e sistema de recuperación.

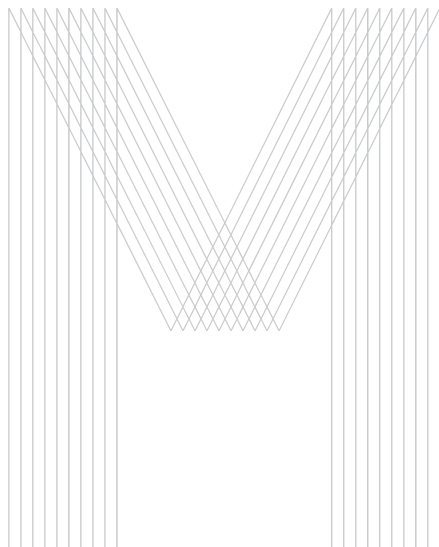
Ao ser esta editorial membro da **une**, garántense a difusión e a comercialización das súas publicacións no ámbito nacional e internacional.

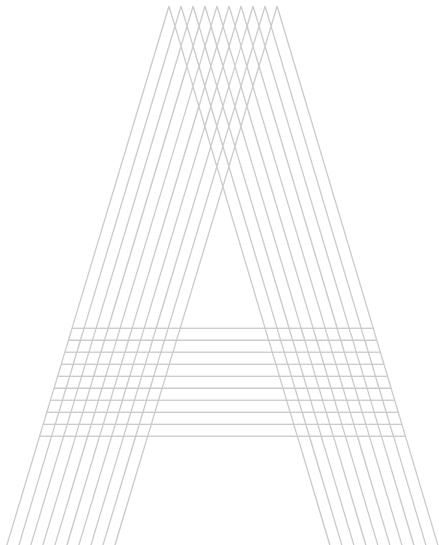
Servizo de Publicacións

Universidade de Vigo



HR EXCELLENCE IN RESEARCH





Este volume publícase
co financiamento da



**XUNTA
DE GALICIA**

Manual de cultivo e asentamento do ourizo de mar

Paracentrotus Lividus

Autoras

Estefanía Paredes Rosendo
Alba Lago Dopico

Índice

00

Limiar

Jesús Souza Troncoso, Catedrático de Zooloxía
Universidade de Vigo

11

01

Introducción e bioloxía do ourizo de mar

Noelia Tourón Besada, Alba Lago e Estefanía Paredes

15

1. Introducción	15
2. Bioloxía	17
2.1. Taxonomía e clasificación	17
2.2. Distribución e hábitat	18
2.3. Anatomía e Fisioloxía	19
3. Reprodución	24
4. Comportamento	26
5. Bibliografía	27

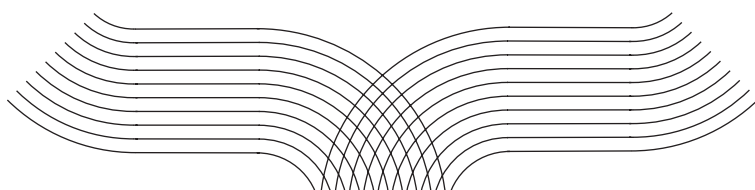
02

Reproducción e calidade dos gametos

Estefanía Paredes, Sara Campos e Noelia Tourón

31

1. Introducción	31
2. Indución do desove ou recolección dos gametos	32
2.1. Inxección de 1 ml de KCl 0,5M	32
2.2. Disección transversal do ourizo	32
3. Sexado	34
4. Calidade dos gametos	35
5. Fertilización	36
6. Desenvolvemento embrionario e larvario	38
7. Resumo de mellores prácticas recomendadas	39
8. Bibliografía	40



03

Cultivo larvario *Noelia Tourón e Damián Costas*

41

1. Obxecto	41
2. Fundamento teórico	41
3. Sala de Microalgas	42
4. Medios materiais	42
5. Acondicionamento	44
5.1. Medios materiais para o acondicionamento	44
5.2. Requirimentos da sala de acondicionamento do stock de reprodutores	45
5.3. Etapas do acondicionamento	45
1. Captura e transporte	45
2. Recepción e aclimatación	45
5.4. Fase de acondicionamento	47
5.5. Parámetros xerais do acondicionamento de reprodutores	47
6. Esquema xeral do acondicionamento	48
7. Cultivo larvario	50
7.1. Medios materiais	50
7.2. Sala de desenvolvemento larvario	51
7.3. Sistema de cultivo	51
7.4. Desenvolvemento larvario de <i>Paracentrotus lividus</i>	52
7.5. Parámetros xerais do cultivo	54
7.6. Análise microbiolóxica	56
7.7. Esquema xeral do cultivo larvario	56
8. Bibliografía	59
9. Anexos	60

04

Asentamento larvario *Alba Lago e Damián Costas*

63

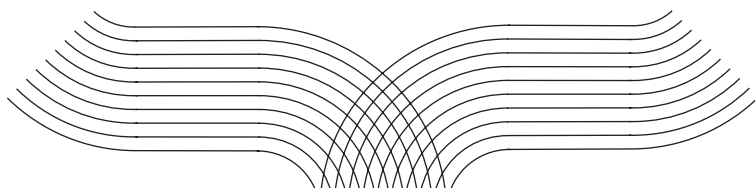
1. Obxecto	63
2. Medios materiais	63
3. Fundamento teórico	64
4. Método	66
4.1. Obtención e maduración de biopelículas	66
5. Procedemento de obtención de biopelículas naturais	67
5.1. Obtención de larvas competentes	68
5.2. Asentamento larvario	69
6. Parámetros xerais do cultivo	71
7. Esquema xeral do proceso	72
8. Bibliografía	75

05

Crecedemento dos xuvenís nos primeiros meses *Estefanía Paredes e Damián Costas*

77

1. Obxecto	77
2. Medios materiais	77
3. Fundamento teórico	78
4. Sistema de cultivo	78
5. Método	80
5.1. Taxa de crecedemento no laboratorio nos primeiros meses	80
5.2. Dispersión do tamaño nas poboacións cultivadas en alta densidade	81
5.3. Condicións de densidade en cultivo	84
6. Bibliografía	85



Limiar

Jesús Souza Troncoso
Catedrático de Zooloxía
Universidade de Vigo

11

Foi unha enorme satisfacción recibir a invitación para escribir o prefacio desta obra. Para min foi unha grande e bonita sorpresa, un presente que me fan. Moitas grazas ás editoras Estefanía Paredes e Alba Lago, colegas e amigas por esta oportunidade que considero un honor.

Os ourizos de mar pertencen ao filo Echinodermata, termo que provén do grego e que significa pel recuberta de espiñas (ekhino= púa, espiña e dermatata= pel). Ademais dos ourizos de mar, os equinodermos están representados polos lirios, as comátulas, as estrelas e os cogombros de mar. Trátase dun grupo de animais exclusivamente mariños polo que é moi probable que para moitos dos que están lendo, ó ser preguntados por un animal que represente o medio mariño, inmediatamente pensen nunha estrela de mar.

Os equinodermos están divididos en cinco clases principais, Crinoidea, Asteroidea, Ophiuroidea, Echinoidea e Holothuroidea. Unha sexta clase describiuse en 1986, os Concentricloidea, os cales carecen dun sistema vascular acuífero (SVA) ou polo menos está moi modificado na zona periférica do seu corpo; o SVA é un complexo conxunto de canles que terminan nuns pés tubulares responsables da locomoción, sendo este sistema unha característica exclusiva dos equinodermos. Actualmente a aceptación desta clase atópase en discusión xa que algúns autores os inclúen dentro dos Asteroidea, ou sexa, estrelas de mar modificadas.

Os ourizos de mar pertencen á clase Echinoidea. A clasificación deste grupo, é motivo de discusión científica, pero dende un punto de vista didáctico, podemos recoñecer tres grupos principais: os ourizos regulares, os irregulares e as galletas de mar. Tanto os ourizos regulares como as galletas de mar, presentan unha simetría corporal algo distinta dos regulares, posuíndo estes últimos simetría radial pentámera e unha estrutura bucal típica e exclusiva do grupo, responsable pola consecución do alimento, chamada lanterna de Aristóteles.

A especie tratada nesta obra, *Paracentrotus lividus*, é unha das especies de ourizos regulares que viven na zona litoral das costas de Galicia. É unha especie moi común, que pódese observar con facilidade en charcas de marea dos intermareais rochosos. Pero é na zona submareal, ata unha profundidade de 4-6 metros, onde poden ser máis abundantes compartindo hábitat coas algas das cales se alimentan.

Do mesmo xeito que os ourizos consumen as algas que rodean o seu hábitat, nós o *Homo sapiens*, servímonos desta especie como alimento. Grazas ás prospeccións de xacementos arqueolóxicos, sábese que os humanos facemos uso dos ourizos de mar dende o paleolítico. O seu consumo tamén está ben documentado na antiga Grecia, século IV a. C., en escritos de autores clásicos como Hipócrates, Aristóteles, entre outros. Os romanos tamén sabían apreciar esta exquisitez, escritos de Horacio (século I a. C.) Plinio (século I d. C.), entre outros, o demostran.

Xeograficamente máis cerca de nós, os estudos de estratos dos concheiros achados nos castros galegos situados preto das costas, datados do final da Idade do Bronce e principios da romanización, achegan abundante información de que os ourizos eran un alimento habitual na cultura castrexa; Vázquez-Varela, Urgorri & Troncoso (1992) nun traballo titulado "O marisqueo na cultura castrexa de Galicia" dan testemuña disto. E máis recentemente, no período renacentista, o ourizo tamén era un prato admirado na mesa do emperador Carlos V (I de España).

Na actualidade o valor desta especie varía segundo o país ou rexión de consumo, pero en xeral non é un produto barato, e isto non é novo. Na Roma Imperial un sextario (3,282 litros de volume) de ourizos de mar custaba 50 denarios, nesa época non existían os refrixeradores, e a conservación tiña o seu prezo, polo tanto, o ourizo de mar conservado en salgadura chegaba a custar 100 denarios, xa que o sal tiña un elevado valor e tamén utilizábase como forma de pagamento. Para que teñamos unha idea o salario anual dun traballador atoparíase naquel entón nos 300 denarios, e aínda que o denario durase varios séculos como moeda, facede as contas.

Como non podería ser doutra maneira, o consumo deste manxar chegou ata os nosos días. O seu aspecto e textura e o seu sabor a mar concentra toda a esencia do ambiente mariño, consumíndose tanto en cru como en varios pratos elaborados, sendo un recurso que debe ser coidado.

Nos tempos que corren, a humanidade ten que afrontar novos retos á hora de preservar a súa riqueza biolóxica e xestionar os recursos pesqueiros e marisqueiros. Indubidablemente son moitos os esforzos que se fan para coidar e preservar a biodiversidade e en especial algunhas especies emblemáticas e importantes para o ser humano, como pode se-lo *Paracentrotus*, pero na miña opinión todos eses esforzos son insuficientes. Ademais, os ourizos, aínda que teñan mobilidade, son de desprazamento lento, polo tanto, faise moi fácil a súa recolección. Deste xeito, calquera iniciativa que se tome á hora de xestionar e preservar este recurso é benvida.

Galicia é mundialmente coñecida pola calidade do seu marisco, e esa riqueza debe ser coidada con moito mimo. Os xestores dos recursos mariños necesitan ter a maior cantidade de información posible sobre as especies obxecto de consumo. Unha obra como esta, trata de aportar o seu grao de area á conservación dun recurso biolóxico mariño que é fonte de riqueza cultural e económica. Libros como este que temos entre mans, no que podemos atopar información condensada de especies en particular, son moi necesarios.

A calidade desta obra está garantida pola excelencia na traxectoria dos autores. Son profundos coñecedores na materia, grandes especialistas en acuicultura e cultivo de varias especies de interese comercial, participaron e seguen participando en varios proxectos e contratos de investigación no ámbito estatal, autonómico e coa empresa privada. Parte destes proxectos foron dedicados exclusivamente ao coñecemento dos equinodermos, e algún en particular, só ao ourizo de mar *Paracentrotus lividus*. Achegaron resultados de gran interese, desenvolvendo técnicas innovadoras para garantir o recurso, entre eles podemos citar a criopreservación de gametos seleccionados, fecundación, desenvolvemento no laboratorio, hachering, novas dietas, crecemento e finalmente repoboación no medio natural.

Para rematar e deixar que desfrutedes do contido do libro, gustárame deixar constancia de que, neste contexto de cambio climático que estamos vivindo, onde as altas temperaturas acadan picos de forma continuada, as sociedades humanas están entrando nun escenario difícil de predicir. Polo tanto, esta guía, sen dúbida ningunha, será unha ferramenta de gran axuda á hora de preservar un recurso tan emblemático como é o noso ourizo de mar, *Paracentrotus lividus*.

Capítulo 01

Introducción e bioloxía do ourizo de mar

15

Noelia Tourón, Alba Lago e Estefanía Paredes

1. Introducción

Os ourizos de mar son coñecidos e apreciados en todo o mundo polas características organolépticas das súas gónadas, sendo Xapón, Italia, Francia, Turquía e Korea os seus principais consumidores (Rey-Méndez et al., 2015; Stefansson et al., 2017). Xapón, ademais de ser un dos principais consumidores cunha demanda anual de 50.000 T, neste país as gónadas con frecuencia superan os 50 USD/kg, e con picos frecuentes de máis de 100 USD/kg. Xapón sitúase como o maior importador mundial de ourizo de mar; alcanzando un valor total de importación de 209.21M de dólares (USD) en 2022. Ademais, este país é o segundo exportador a nivel mundial (Figura 1). (valores de mercado consultados de UN Comtrade).



Figura 1. Os oito maiores exportadores de ourizos de mar (*Strongylocentrotus* spp., *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), *Loxechinus albus* (Molina, 1782), *Echinus esculentus* Linnaeus, 1758) vivos, refrixerados ou conxelados. Datos do valor asociado ás exportacións mundiais 2020 obtidos a través de (UN Comtrade, s. f.).

En Europa, o ourizo de mar con maior importancia comercial é a especie de crecemento lento *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Esta especie presenta unha distribución moi ampla, dende a costa atlántica NE, Escocia e Irlanda, ata o norte de Marrocos e Cabo Verde, atopándose tamén nas illas Canarias, Azores e Madeira, así coma nas costas do mar Mediterráneo e o Adriático (Allain, 1972; C. Boudouresque & Verlaque, 2007).

Galicia é o maior produtor desta especie en Europa, cunha produción actual de 655.824,8 kg no ano 2022. O prezo medio de venda en Galicia, tamén aumentou considerablemente nos últimos anos pasando dos 1,51 €/kg en 2001, 11,41 €/kg no ano 2022, o que supuxo uns ingresos de máis de 7,3 millóns de euros nese ano (*Pesca de Galicia - Plataforma tecnolóxica da pesca*, s. f.). Os ourizos de mar recollidos en Galicia, expórtanse a outras rexións de España coma, Asturias, Cádiz ou Cataluña e países coma Francia, Alemaña, Portugal e Bélxica (Brusca, 2005; González-Irusta, 2009).

Aínda que non existe información moi concisa ao respecto, de forma xeral sábese que son necesarios ao redor de 2 anos para que *P. lividus* alcance os 2 cm de diámetro. Aínda que nun primeiro momento o seu crecemento é moi rápido, esta curva faise cada vez máis plana e o crecemento vólvese máis lento co paso dos meses. Polo tanto, podemos pensar que para que os individuos presenten a talla mínima comercial de 55 mm, especificada no Plan de extracción do ourizo de mar en Galicia, estes necesitan entre 4 anos e unha década. Ademais, os rexistros afirman que estes organismos non exceden os 13 ou 15 anos de vida (Lawrence, 2013).

Orixinalmente a recolección das distintas especies de ourizos de mar para o consumo, realizábase de maneira local e artesanal. Nas últimas décadas e como resultado da globalización do seu consumo, produciuse o aumento exponencial da súa demanda, o que obrigou a expansión de novas pesqueiras, así coma modernización de métodos de explotación. Este aumento da presión sobre as poboacións naturais, moitas de elas sobreexplotadas (Guidetti et al., 2004), levou a redución das capturas a nivel mundial dende as 117.000 toneladas anuais en 1998, a 62.828 toneladas no ano 2018 (FAO 2018). Isto fixo que moitos países, víranse obrigados á xeración e implantación de novas políticas de xestión específicas, co fin de garantir a saúde das poboacións actuais e futuras (Guidetti et al., 2004).

Actualmente a explotación da especie en Galicia atópase regulada por un dos plans de xestión da Consellería do Mar da Xunta de Galicia, en particular o Plan de extracción do ourizo de mar en Galicia que aparece especificado no DOG 246 do 29/12/2017. Estes plans de xestión integran aspectos biolóxicos, sociais e económicos para unha boa xestión do recurso. Entre outras cousas é onde se fixa a talla mínima comercial en 55 mm de diámetro ou os períodos de veda/períodos autorizados.

Sería de gran interese unha innovación da xestión da pesca deste recurso mariño no medio natural con plans de investigación adaptados ás especies e áreas de extrac-

ción, así coma a implantación de plans de repoboación en bancos sobre explotados, mediante reprodución e crianza en laboratorio de individuos xuvenís (Barnes & Crook, 2001; Girard et al., 2006; Lawrence, 2013; Lozano et al., 1995). Por outra banda, a acuicultura do ourizo de mar, e á súa produción en condicións controladas para o consumo da poboación, permitiría reducir a presión extractiva, así coma a introdución pouco a pouco de novos produtos de consumo no mercado, os cales son fonte de proteína de alta calidade nutricional, atópanse libres de graxas saturadas e azúcre, e presentan un alto contido en ácidos graxos poliinsaturados.

Sen embargo, lonxe de ser un produto cun interese exclusivamente gastronómico, os ourizos presentan una elevada importancia científica, ecolóxica e ecosistémica (Pinsino & Matranga, 2015; Saco-Álvarez et al., 2010). Dende o punto de vista ecolóxico, os ourizos de mar, xogan un papel fundamental no ecosistema mariño, xa que actúan como enxeñeiros dos ecosistemas, sendo os principais responsables da estrutura das comunidades bentónicas mariñas, consumindo unha enorme cantidade de macroalgas, que doutra maneira proliferarían de forma desproporcionada producindo un desequilibrio ecolóxico no ecosistema (Pinnegar et al., 2003). A nivel científico son utilizados como organismos modelo en diferentes disciplinas, dende os estudos de contaminación mariña, embrioloxía ou estudos de desenvolvemento celular (Gilbert, 2000; Pinsino & Matranga, 2015; Saco-Álvarez et al., 2010).

En resumidas contas, o ourizo de mar e máis concretamente a especie *P. lividus* é un recurso de alto valor engadido, tanto económica, ecosistémica e ecolóxicamente. Ten un interese comercial alto e un grao de mellora na súa explotación, que aínda é incipiente. Apostar por iniciativas de explotación sostible deste produto pasa por abrir a porta á acuicultura, ao mesmo tempo que se aposta por a protección e coidado de aquelas poboacións naturais xa existentes. Neste libro preténdense recoller todos os coñecementos científicos adquiridos por nós nestes últimos anos, co fin de iniciar os primeiros pasos para que a acuicultura desta especie sexa sostible no tempo e no espazo.

A continuación, móstrase de forma breve a información mínima e necesaria que se debería coñecer da especie de ourizo de mar *P. lividus* con fin de facilitar a súa correcta explotación, creando un marco de coñecemento onde se recollen detalles da súa bioloxía, así coma as súas características ecolóxicas, fisiolóxicas e anatómicas.

2. Bioloxía

2.1. Taxonomía e clasificación

Os equinodermos son un grupo de organismos exclusivamente mariños, que caracterízanse por posuír simetría pentaradial secundaria a cal divide o seu corpo en cinco sectores dispostos arredor dun eixe central (Brusca, 2005).

18

A palabra de orixe grega equinodermo significa “pel espiñenta” (equinos=espiñas e derma= pel). Este filo está formado por unhas 7.000 especies, incluíndo cogombros de mar, estrelas de mar, estrelas quebradizas e ourizos de mar. Á súa vez os equinodermos atópanse distribuídos en seis clases principais, Crinoidea, Asteroidea, Ophiuroidea, Concentricloidea (en discusión), Holothuroidea e Echinoidea, atopándose os ourizos de mar dentro de esta última.

Ourizos de mar poden clasificarse de forma artificial en ourizos irregulares, dólares de mar e ourizos regulares, dentro dos cales se atopa a especie de interese deste libro, *P. lividus* (táboa 1) (Lawrence, 2013).

Ao longo da historia a especie *P. lividus* mudou de nome, conforme á súa clasificación taxonómica avanzaba, referíndose a ela con nomes tales como *Strongylocentrotus lividus* (A. Agassiz, 1872), *Echinus lividus* (Lamarck, 1816), *Echinus saxatilis* (Tiedemann, 1816), *Echinus vulgaris* (Blainville, 1816). , 1825), *Echinus purpureus* (Risso, 1826), *Toxopneustes lividus* (Heller, 1868), *Toxopneustes concavus* (L. Agassiz & Desor, 1846), *Toxopneustes complanatus* (L. Agassiz & Desor, 1846), ou *Toxocidaritis livida* (Lamarck, 1816). Actualmente, o nome correcto é *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) que se corresponde coa clasificación establecida por Lamarck en 1816 (WoRMS - World Register of Marine Species, s. f.).

Táboa 1. Clasificación taxonómica de *P. lividus*.

PHYLUM	Echinodermata
SUBPHYLA	Echinozoa
CLASE	Echinoidea
SUBCLASE	Euechinoidea
SUPERORDEN	Echinacea
ORDEN	Echinoida
FAMILIA	Echinidae
XÉNERO	Paracentrotus
ESPECIE	<i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)

2.2. Distribución e hábitat

A especie *P. lividus* presenta unha ampla distribución ao longo do Atlántico Norte, dende as costas de Escocia e Irlanda ata Marrocos, pasando pola costa do mar Mediterráneo e o mar Adriático ata as Illas Canarias e Azores (Allain, 1972; C. F. Boudouresque & Verlaque, 2013); aínda que a súa abundancia máxima atópase nas costas

galegas e en aquelas rexións onde a temperatura da auga en verán sitúanse entre os 18 a 25°C e en inverno entre os 10 a 15°C, como pode ser o golfo de Biscaia, a costa de Portugal ou a occidental do Mediterráneo (Lawrence, 2013; Rodríguez-Bernaldo De Quirós et al., 2001).

Xeralmente adoita presentar unha batimetría que vai dende as charcas mesolitorais ou charcas de marea, ata os 30 m de profundidade na zona sublitoral, aínda que en Galicia poden atoparse ata 150 m (Besteiro & Urgorri, 1988). A especie *P. lividus* adoita habitar fondos rochosos, fondos de cantos rodados e incluso prados de *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile, 1813 ou de *Zostera marina* Linneo, 1753. Por outra banda, *P. lividus* tende a colonizar preferentemente superficies horizontais ou de pendentes suaves. Debido á súa alta plasticidade fenotípica, a cal lle permite posuír unha gran capacidade de adaptación ao medio (Bulleri et al., 1999; Fernandez & Boudouresque, 1997), son capaces de colonizar zonas moi expostas hidrodinamicamente e/ou de intermareal, refuxiándose nas depresións das rochas circundantes, e incluso poden aumentar a profundidade destas depresións cavando na rocha (Lawrence, 2013). A escavación realízase mediante o aparello mastigador e as espiñas, estas últimas cos seus movementos rotativos desgastan e esmagan as paredes dando lugar á formación de tobeiras. As súas escavacións poden ocupar grandes extensións de substrato rochoso, creando verdadeiros campos de ourizos de mar (Fig.2) (Martinell, 1981).

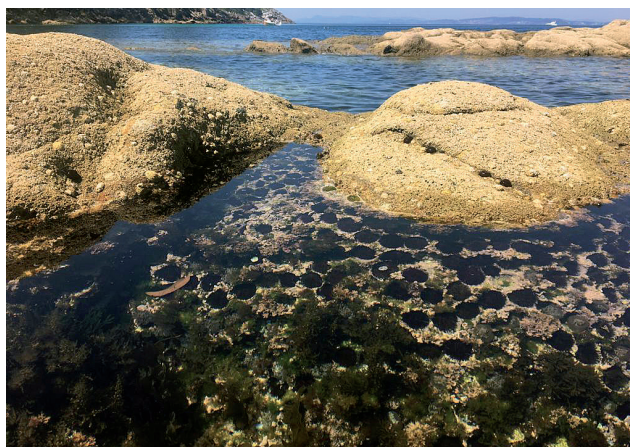


Figura 2. Zona intermareal rochoso onde poden apreciarse as tobeiras de *P. lividus* formando campos de ourizos.

2.3. Anatomía e Fisioloxía

P. lividus, é unha especie de ourizo regular, a cal caracterízase entre outras cousas, por presentar simetría pentaradial, un corpo de forma esférica e aplanada nos polos

e por ter o corpo cuberto por espiñas. Ao igual que o resto de seu corpo, estas espiñas atópase recubertas por unha fina capa de epiderme.

20 Derivado da súa simetría pentaradial, externamente poden distinguirse cinco rexións corporais con unha orixe común, o disco central, situado na cara aboral (onde se atopan o madreoporito, o ano, e o gonoporo) (Fig.3A) e que transcorren ata a boca, que se sitúa na propia lanterna de Aristóteles, na cara oral. Estas rexións están formadas por fileiras de pés ambulacrais. Os pés ambulacrais son extensións carnosas do sistema vascular acuífero, do que falaremos máis adiante, e que sae ao exterior a través dos poros que presenta a testa. Estas fileiras de pés ambulacrais aguápanse formando o que se coñece como espazos ambulacrais, entre os cales se sitúan os espazos interambulacrais (Fig.3B-3C).

A testa está composta por unha serie de elementos esqueléticos chamados oscículos, principalmente de CaCO_3 , os cales atópanse estreitamente unidos dando lugar a esta estrutura ríxida. Por outra banda, os pés ambulacrais, presentan na súa parte máis externa, unhas estruturas denominadas podios, involucrados no intercambio gasoso, a recepción sensorial, alimentación, locomoción e a fixación dos ourizos de mar (Brusca, 2005).

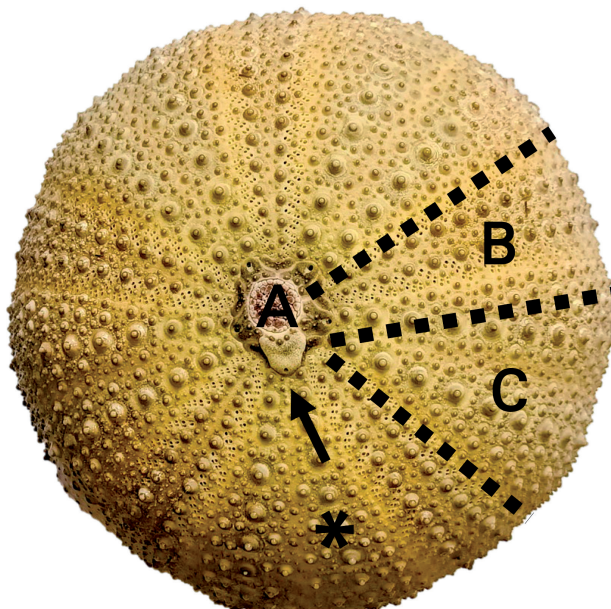


Figura 3. Detalle da rexión aboral do ourizo de mar. Disco central (A), espazo ambulacral (B), espazo interambulacral (C) e placa madreopórica onde se sitúa o madreoporito (*).

• Sistema circulatorio ou vascular acuífero

Nos ourizos de mar o sistema vascular acuífero interno que posúen, actúa tanto coma sistema circulatorio, como sistema de soporte para a locomoción. Este sistema vascular acuífero está formado por un sistema de condutos polos que circula o fluído celómico, que conecta co exterior a través dos poros da placa central do polo aboral (Fig.3-4). A través deste sistema de condutos, transpórtanse tanto alimentos como substancias de refugallo coa axuda dos celomocitos (células que compoñen o fluído celómico). O fluído celómico en composición é semellante á auga do mar, excepto pola presenza de celomocitos, proteínas e unha maior concentración de ións potasio. O sistema vascular acuífero posibilita o movemento de pés ambulacrais, espiñas, etc, resultado de cambios na presión do fluído celómico nas canles internas (Brogger et al., 2012; Brusca, 2005).

21

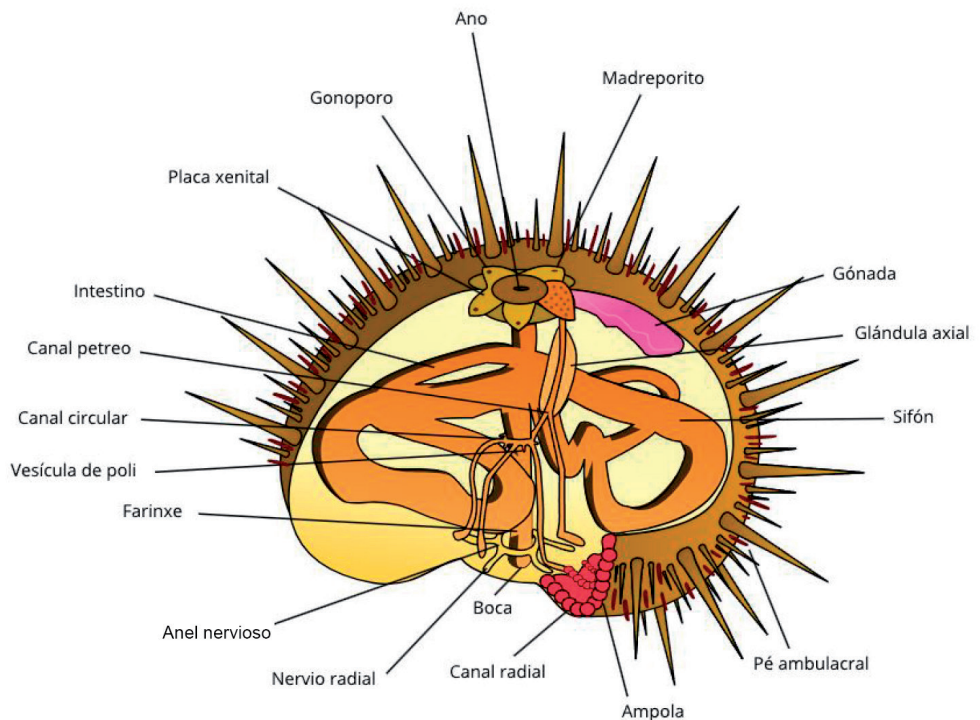


Figura 4. Anatomía interna do ourizo de mar.

• Aparato respiratorio

- 22 O intercambio gasoso realízase fundamentalmente a través dos 5 pares de branquias, que se sitúan arredor do peristoma (Fig.5B), e a través dos pés ambulacrais. As branquias son sacos ramificados da parede corporal; están cubertos de epitelio ciliado tanto interna como externamente, o que facilita a mobilidade do fluído interno cara eles. O fluído celómico é bombeado nas áreas respiratorias polos músculos da lanterna de Aristóteles (Brusca, 2005).

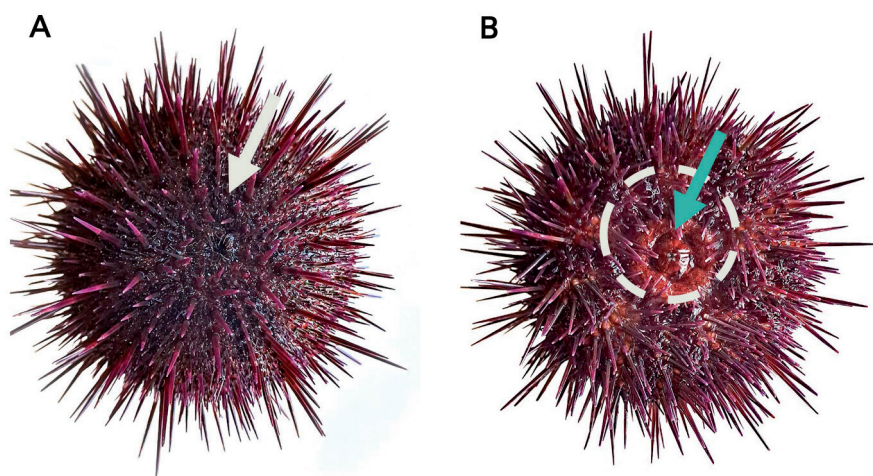


Figura 5. Anatomía externa do ourizo de mar, (A) Cara aboral, onde pode verse o ano (frecha branca), e (B) Cara oral, pode verse o peristoma (círculo branco) e a boca (frecha verde).

• Sistema nervioso

O sistema nervioso dos ourizos está descentralizado, polo que non existe un ganglio central no que se procese a información, se non que a recepción da información lévese a cabo en 3 redes neuronais integradas entre si, o sistema entoneural (aboral), o sistema ectoneural (oral), e o hiponeural (oral profundo) que lles permite percibir e a interacción co medio en todas as direccións. O sistema ectoneuronal, predominante nos equinoideos, está formado por un anel nervioso que rodea a cavidade bucal e do que parten 5 nervios radiais (Fig.3), aínda que a maior parte dos estímulos nerviosos son recibidos polas numerosas células sensoriais que se distribúen por todo o epitelio corporal, especialmente as espiñas, os pés ambulacrais e os pedicelarios (Brusca, 2005).

• Sistema dixectivo

Na cara oral atópase a cavidade bucal propiamente dita, no interior dunha estrutura que recibe o nome de lanterna de Aristóteles. Esta lanterna non é máis que un aparello de mastigación moi desenvolvido, onde os alimentos son resgados e triturados. Está formada por unha complexa estrutura esquelética e muscular, que consta dunha armazón pentagonal, constituída á súa vez por cinco grandes placas calcarias chamadas pirámides, con forma de punta de frecha, e onde se introducen cinco dentes de carbonato cálcico tamén de forma piramidal (Fig.6).

Dende a cavidade bucal, no interior da lanterna, ascéndese ata a farinxe, a cal desemboca no esófago. Este esófago únese ao estómago tubular que comunica cun intestino de paredes delgadas no que se realiza a absorción de nutrientes. Este intestino ascende ata conectar co recto e o ano, situados na rexión aboral do ourizo, a través do cal as feces son expulsadas ao exterior (Fig.7) (Brusca, 2005).



Figura 6. Lanterna de Aristóteles do ourizo de mar *P. lividus*.

• Sistema excretor

Ademais de a través do ano (Fig.7), moitos dos residuos elimínanse por difusión xeral a través de varias áreas da superficie corporal, principalmente polos pés ambulacrais, as branquias e a glándula axial, sendo os celomocitos presentes no fluído celómico as células encargadas de transportar os residuos (Brusca, 2005; Rupert & Barnes, 1996).

• Sistema reprodutor

Paracentrotus lividus é unha especie dioica e non presenta dimorfismo sexual externo, é dicir, non existen diferenzas morfolóxicas externas que permitan distinguir

o sexo do individuo. Ao igual que o resto dos ourizos regulares, a especie *P. lividus* presenta cinco gónadas, situadas no interior da testa, na cara interna de cada un dos espazos interambulacrais. Á súa vez cada unha das gónadas comunica con un dos gonoporos situados nas 5 placas xenitais da cara aboral (Fig.7). Chegado o momento da reprodución, a través dos gonoporos liberaranse os gametos ao medio mariño onde se producirá a fecundación externa (Brusca, 2005).

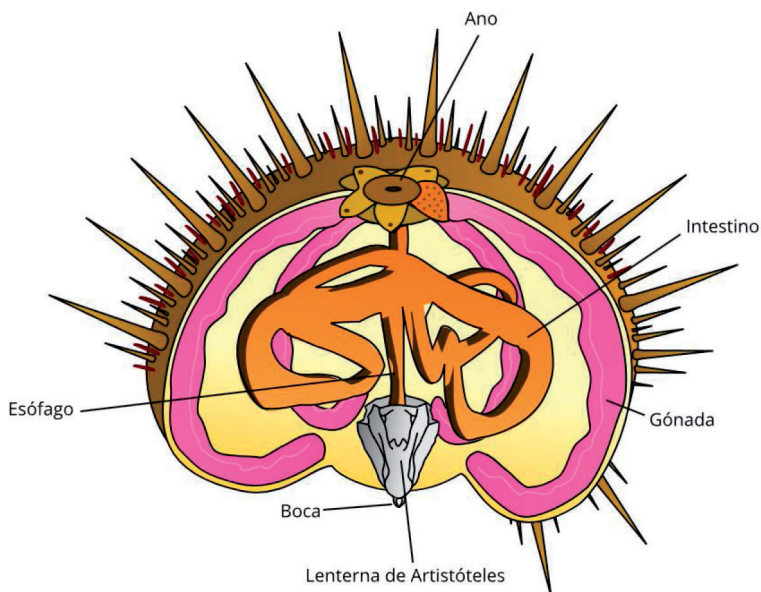


Figura 7. Anatomía interna do ourizo de mar onde poden verse a disposición das gónadas internamente.

3. Reprodución

A fecundación é externa, prodúcese cando os oocitos e os espermatozoides son liberados na auga do mar a través dos gonoporos situados na rexión aboral. Na especie *P. lividus*, ao igual que no resto dos invertebrados mariños, a reprodución atópase regulada xeralmente por factores ambientais externos como o fotoperíodo, a temperatura, a dispoñibilidade de alimento, o ciclo lunar, etc, pois a liberación sincrónica dos gametos é fundamental para o mantemento das poboacións do medio natural (Hernández Pérez, 2009; James & Siikavuopio, 2012).

O desenvolvemento gonadal é un proceso hormonalmente controlado nun ciclo anual. Son varios os autores que describiron as distintas etapas que conforman o desenvol-

vemento da gónada de *P. lividus*: (Barbaglio et al., 2007; Byrne, 1990; Sánchez-España et al., 2004; Spirlet et al., 1998), entre outros. Segundo o traballo de Byrne (1990), hai seis estados diferentes da gónada durante o seu desenvolvemento: estadio I (cubrimento), estadio II (crecemento), estadio III (premadureza), estadio IV (madurez), estadio V (posta) e estado VI (pos-posta). O ciclo reprodutivo de *P. lividus* na costa de Galicia presenta en xeral unha única posta anual que comeza a finais da primavera (marzo e abril) e se prolonga ata o verán (xullo e agosto). Durante a etapa posterior ao desove, as gónadas están na etapa VI ou pos-posta, despois do verán comeza un período de crecemento somático, que se prolonga ata os primeiros meses do outono. Nesta fase comeza un período de almacenamento nos fagocitos nutritivos, as gónadas baleiras despois da posta comezan a recuperarse almacenando substancias de reserva e fagocitos nutritivos, pasando do estado VI ao estado I, no que aparecen os primeiros oocitos primarios no interior da gónada. O índice gonadal (IG) comeza a aumentar de novo. A partir deste momento, a viteloxénese comeza nos oocitos (gametoxénese), na que as substancias de reserva acumuladas en forma de glicóxeno xogan un papel fundamental na madurez dos oocitos (Walker et al., 2013).

Como regra xeral, durante o mes de febreiro, as células reprodutoras do tecido gonadal maduran, os oocitos aumentan de tamaño e comezan a unirse, pasando ao estadio III ou premadureza (Fig.8A). Nesta etapa aparecen os primeiros óvulos maduros mentres desaparece o tecido de reserva; a maduración dos oocitos continúa ata converterse en óvulos listos para ser expulsados ao medio externo. A partir deste momento a gónada está no estadio IV ou madurez (Fig.8B); os óvulos maduros enchen todo o espazo gonadal xa que neste instante o tecido nutritivo e os fagocitos practicamente desapareceron. A evolución da madurez da gónada continúa progresivamente ata alcanzar o seu pico entre maio e xuño aproximadamente, presentando a etapa V durante a cal se produce o desove. Tras a expulsión dos gametos, as gónadas pasan a un estado VI ou posposta, durante o cal o ovario está case baleiro (Fig.8C). Unha vez rematada esta fase, reaparece o tecido de reserva. Os ovos que non foron liberados son reabsorbidos polos fagocitos e a gónada volve ao estadio I, pechando así o ciclo anual (Byrne, 1990).

No caso das gónadas dos machos o proceso de maduración gonadal desenvólvese de forma similar ao das femias e seguindo as mesmas fases. Neste libro non se inclúen fotografías histolóxicas do desenvolvemento gonadal dos machos, xa que son as femias as responsables das limitacións a nivel reprodutivo que existen no seu cultivo. Sen embargo, traballos como o de Machado et al., 2022 e Raposo et al., 2023, recollen ditas fotografías que permiten profundar mais neste asunto.

En Galicia o período de veda para a extracción deste recurso esténdese dende Abril ata Outubro, nun intento de coincidir cos meses nos que a gónada se atopa nos estadios de posposta e recuperación gonadal. Nalgúns casos, a posta natural pode chegar a coincidir con período de veda, xa que o desenvolvemento gonadal non é

un proceso de todo sincrónico en todas as poboacións de ourizo, se non que varía segundo a zona, o hidrodinamismo, as condicións climatolóxicas e a dispoñibilidade de alimento.

26

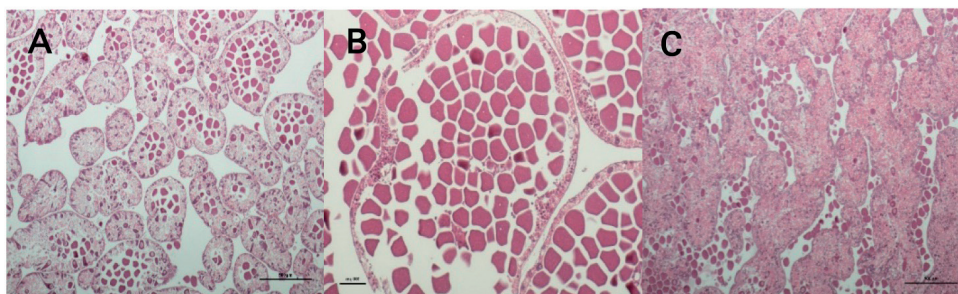


Figura 8. Diferentes estadios de desenvolvemento gonadal de *P. lividus*. (A) femia en premadurez (estadio III), (B) Femia madura, (estadio IV), (C) Femia desovada (estadio VI).

4. Comportamento

Esta especie de ourizo presenta unha actividade fundamentalmente nocturna para evitar na medida do posible os depredadores diúrnos, (Dance, 1987; Kempf, 1962) excepto unha poboación de Irlanda que se comporta de forma contraria, presentando actividade diúrna probablemente debido á abundancia de depredadores nocturnos na zona (Ebling et al., 1966). Sen embargo, sábese que *P. lividus* pode realizar pequenas migracións diúrnas entre as fendas das rochas; (Barnes & Crook, 2001).

Os movementos circadianos desta especie non adoitan superar os 20 cm de desprazamento (Hereu et al., 2004), e ademais estes movementos atópanse limitados polo tamaño dos ourizos, a presenza de depredadores ou a luz. Sábese que no caso dos ourizos de máis de 50 mm de diámetro non adoitan migrar, debido a que o seu tamaño lles impide esconderse en moitas das fendas das rochas (Barnes & Crook, 2001). A presenza de depredadores pode influír na actividade trófica de *P. lividus*, reducíndoa a unha superficie de aproximadamente un metro cadrado ao redor do seu refuxio e evidenciando a existencia de patróns de movemento específicos nesta especie (Sala & Zabala, 1996).

Por outra banda, esta especie presenta fototropismo negativo, polo que ademais de habitar principalmente cavidades e fendas de rochas pouco iluminadas, soe cubrirse frecuentemente con fragmentos de cunchas opacas, pedras pequenas ou algas, que manteñen pegados ao seu corpo mediante os pés ambulacrais (Crook et al., 1999; Verling et al., 2002), protexéndose así da luz solar, da calor e da depredación, e incluso poden chegar a usar os fragmentos destas algas, como mecanismo de nutrición secundario (Catoira, 1999). Este fenómeno coñécese como "covering" (Verling et al., 2004).

5. Bibliografía

- Allain, J. Y. (1972). La pêche aux oursins dans le monde. *Pêche Merit*, 1133, 625-630.
- Barbaglio, A., Sugni, M., Di Benedetto, C., Bonasoro, F., Schnell, S., Lavado, R., Porte, C., & Carnevali, D. M. C. (2007). Gametogenesis correlated with steroid levels during the gonadal cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(2), 466-474.
- Barnes, D. K., & Crook, A. C. (2001). Implications of temporal and spatial variability in *Paracentrotus lividus* populations to the associated commercial coastal fishery. *Coastal Shellfish—A Sustainable Resource: Proceedings of the Third International Conference on Shellfish Restoration*, held in Cork, Ireland, 28 September–2 October 1999, 95-102.
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2013). Chapter 21—*Paracentrotus lividus*. En J. M. Lawrence (Ed.), *Sea Urchins: Biology and Ecology* (Vol. 38, pp. 297-327). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00021-6>
- Boudouresque, C., & Verlaque, M. (2007). Chapter 13 Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 37, 243-285. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(07\)80077-9](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(07)80077-9)
- Brogger, M. I., Martinez, M. I., Romanelli Michel, M. V., Sanchez Antelo, C., & Tablado, A. (2012). Estudios sobre equinodermos argentinos: Estrellas, erizos y pepinos de mar. En *El Museo Argentino de Ciencias Naturales 200 años. Museo Argentino de Ciencias Naturales*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/152883>
- Brusca, R. C. (2005). *Invertebrados* (2a ed). McGraw-Hill.
- Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., & Cinelli, F. (1999). Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(1), 81-95.
- Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 104, 275-289.
- Catoira, J. L. (1999). Outros recursos e outras economías: Ourizos. *Cultivando o mar: a acuicultura do milenio*, 47-60.
- Crook, A. C., Verling, E., & Barnes, D. K. (1999). Comparative study of the covering reaction of the purple sea urchin, *Paracentrotus lividus*, under laboratory and field conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(6), 1117-1121.
- Dance, C. (1987). Patterns of activity of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Bay of Port-Cros (Var, France, Mediterranean). *Marine Ecology*, 8(2), 131-142.
- Ebling, F. J., Hawkins, A. D., Kitching, J. A., Muntz, L., & Pratt, V. M. (1966). The ecology of Lough Ine XVI. Predation and diurnal migration in the *Paracentrotus* community. *The Journal of Animal Ecology*, 559-566.
- Fernandez, C., & Boudouresque, C.-F. (1997). Phenotypic plasticity of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in a lagoonal environment. *Marine Ecology Progress Series*, 152, 145-154.
- Gilbert, S. F. (2000). *The Early Development of Sea Urchins*. Developmental Biology. 6th Edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9987/>
- Girard, D., Hernández, J. C., Toledo, K., Clemente, S., & Brito, A. (2006). Aproximación a la biología reproductiva del equinoideo *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) en el litoral de Tenerife. *Proceedings of the XIV SIEBM*.

González-Irusta, J. M. (2009). Contribución al conocimiento del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en el Mar Cantábrico: Ciclo gonadal y dinámica de poblaciones. Doctoral thesis). Universidad de Cantabria, España.

Guidetti, P., Terlizzi, A., & Boero, F. (2004). Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). *Fisheries Research*, 66(2), 287-297. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(03\)00206-6](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(03)00206-6)

Hereu, B., Zabala, M., Linares, C., & Sala, E. (2004). Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Marine Biology*, 144, 1011-1018.

Hernández Pérez, J. C. (2009). Estrategia reproductiva de la población canaria de erizo *Diadema aff. antillarum* Philippi, 1845: Maduración gonadal, asentamiento larvario y reclutamiento. Universidad de La Laguna, Servicio de Publicaciones. <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/10213>

James, P., & Siikavuopio, S. I. (2012). The effect of continuous and intermittent feeding regimes on survival and somatic and gonadal growths of the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 364, 173-179.

Kempf, M. (1962). Recherches d'écologie comparée sur *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et *Arbacia lixula* (L.). *Rec Trav St Mar Endoume*, 25(39), 47-115.

Lawrence, J. M. (2013). Sea Urchins, Volume 38—3rd Edition (Vol. 38). Academic Press. <https://www.elsevier.com/books/sea-urchins/lawrence/978-0-12-396491-5>

Lozano, J., Galera, J., López, S., Turon, X., & Palacin, C. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 122, 179-191.

Machado, A. M., Fernández-Boo, S., Nande, M., Pinto, R., Costas, B., & Castro, L. F. C. (2022). The male and female gonad transcriptome of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*: Identification of sex-related and lipid biosynthesis genes. *Aquaculture Reports*, 22, 100936. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100936>

Martinell, J. (1981). Actividad erosiva de *Paracentrotus lividus* (Lmk.) (Echinodermata: Echinoidea) en el litoral gerundense. *Oecologia aquatica*, 5(5), 219-225.

Pesca de Galicia—Plataforma tecnológica da pesca. (s. f.). Recuperado 24 de octubre de 2023, de <https://www.pescadegalicia.gal/>

Pinnegar, J. K., Polunin, N. V., & Badalamenti, F. (2003). Long-term changes in the trophic level of western Mediterranean fishery and aquaculture landings. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(2), 222-235.

Pinsino, A., & Matranga, V. (2015). Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.013>

Raposo, A., Ferreira, S. M. F., Ramos, R., Anjos, C., Gonçalves, S. C., Santos, P. M., Baptista, T., Costa, J. L., & Pombo, A. (2023). Reproductive Cycle of the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) on the Central West Coast of Portugal: New Perspective on the Gametogenic Cycle. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/jmse11122366>

Rey-Méndez, M., Touron Besada, N., Rodríguez-Castro, B., Rama-Villar, A., Fernández-Silva, I., González-Henríquez, N., Martínez, D., Ojea, J., & Catoira, J. (2015). Crecimiento y mejora del índice gonadal en el cultivo del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Echinoida: Echinidae) en Galicia (España). *Revista de biología tropical*, 63, 261-272.

Rodríguez-Bernaldo De Quirós, A., López-Hernández, J., González-Castro, M., De la Cruz-García, C., & Simal-Lozano, J. (2001). Comparison of volatile components in fresh and canned sea urchin (*Pa-*

racentrotus lividus, Lamarck) gonads by GC–MS using dynamic headspace sampling and microwave desorption. *European Food Research and Technology*, 212, 643-647.

Rupert, E. E., & Barnes, R. D. (1996). *Zoologia dos Invertebrados*, 6a edição. Editora Roca, São Paulo, 1026p.

Saco-Álvarez, L., Durán, I., Ignacio Lorenzo, J., & Beiras, R. (2010). Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(4), 491-499. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.018>

Sala, E., & Zabala, M. (1996). Fish predation and the structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Marine ecology progress series*, 140, 71-81.

Sánchez-España, A. I., Martínez-Pita, I., & García, F. J. (2004). Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) from southern Spain. *Hydrobiologia*, 519, 61-72.

Spirlet, C., Grosjean, P., & Jangoux, M. (1998). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: Analysis by means of the maturity index. *Invertebrate reproduction & development*, 34(1), 69-81.

Stefansson, G., Kristinsson, H., Ziemer, N., Hannon, C., & James, P. (2017). Markets for Sea Urchins: A Review of Global Supply and Markets. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12657.99683>

UN Comtrade. (s. f.). Recuperado 24 de octubre de 2023, de <https://comtradeplus.un.org/>

Verling, E., Crook, A., & Barnes, D. (2002). Covering behaviour in *Paracentrotus lividus*: Is light important? *Marine Biology*, 140, 391-396.

Verling, E., Crook, A. C., & Barnes, D. K. (2004). The dynamics of covering behaviour in dominant echinoid populations from American and European west coasts. *Marine Ecology*, 25(3), 191-206.

Walker, C. W., Lesser, M. P., & Unuma, T. (2013). Sea Urchin Gametogenesis – Structural, Functional and Molecular/Genomic Biology. En *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 38, pp. 25-43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00003-4>

WoRMS - World Register of Marine Species. (s. f.). Recuperado 11 de noviembre de 2022, de <https://www.marinespecies.org/>

Capítulo 02

Reproducción e calidade dos gametos

31

Estefanía Paredes, Sara Campos e Noelia Tourón

1. Introducción

Comprender a reprodución animal na acuicultura é fundamental para a investigación, así coma para a viabilidade económica na acuicultura. O éxito reprodutivo dos animais acuáticos xoga un papel vital nos ecosistemas, e a calidade dos gametos é un factor determinante para a sostenibilidade das poboacións.

Cando chega a época de cría, no medio natural os ourizos de mar participan en eventos de desova sincronizados, moitas veces desencadeados por sinais ambientais como a temperatura, os ciclos lunares ou os sinais químicos (Himmelman, 1975; Zhadan et al., 2017). Durante un evento de desove, os ourizos de mar liberan grandes cantidades de ovos e esperma simultaneamente ao mar.

Estes factores naturais son difíciles de reproducir no laboratorio, polo que a obtención de gametos de ourizo no laboratorio realízase mediante técnicas como: inxección de KCl, electroestimulación ou disección.

Neste capítulo vamos a expoñer os pros e contras destas metodoloxías, daremos una vista práctica ao proceso de sexado (Paredes & Costas, 2020), falaremos da calidade dos gametos obtidos e do proceso de fertilización coma porta de inicio dos coñecementos necesarios para un cultivo larvario con ourizo de mar *Paracentrotus lividus*.

2. Indución do desove ou recolección dos gametos

A indución ao desove pódese facer de varias formas (Paredes & Costas, 2020) pero aquí falaremos en detalle de dúas técnicas principalmente:

2.1. Inxección de 1 ml de KCl 0,5M a través da membrana que rodea a boca (membrana peristomial). Despois os ourizos deben colocarse nun vaso coa parte aboral (onde se atopan o madreporito e mais os gonoporos) en contacto con auga de mar (Fig.9). De producirse o desove os ourizos soltarán os ovos (verase claramente a exesión de cor laranxa vermello) e de ser macho un fío de esperma (Resgalla et al., 2020).

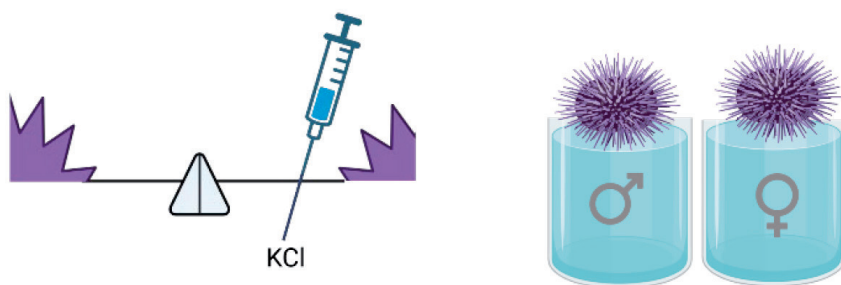


Figura 9. Obtención de gametos por estimulación das gónadas por inxección de KCl.
Imaxe creada por BioRender.

2.2. Disección transversal do ourizo, con tesoiras ou cun coitelo procederase á disección completa do ourizo que quedará dividido nunha parte oral e outra aboral iguais (seccionando á metade as cinco gónadas). O líquido gonadal contendo ovos ou esperma pode entón ser pipeteado directamente das gónadas, permitindo obter concentracións e cantidades de gametos moito maiores que coa inxección (Fig.10,11; Táboa.2). Os ourizos de mar son organismos moi fértiles, para evitar unha fertilización non desexada os instrumentos de disección deberán lavarse entre diseccións. A disección tamén se pode facer lonxitudinal (eixo oral aboral) de forma que non se seccionan as gónadas, podendo retirarse intactas da testa para obter os gametos en placa.

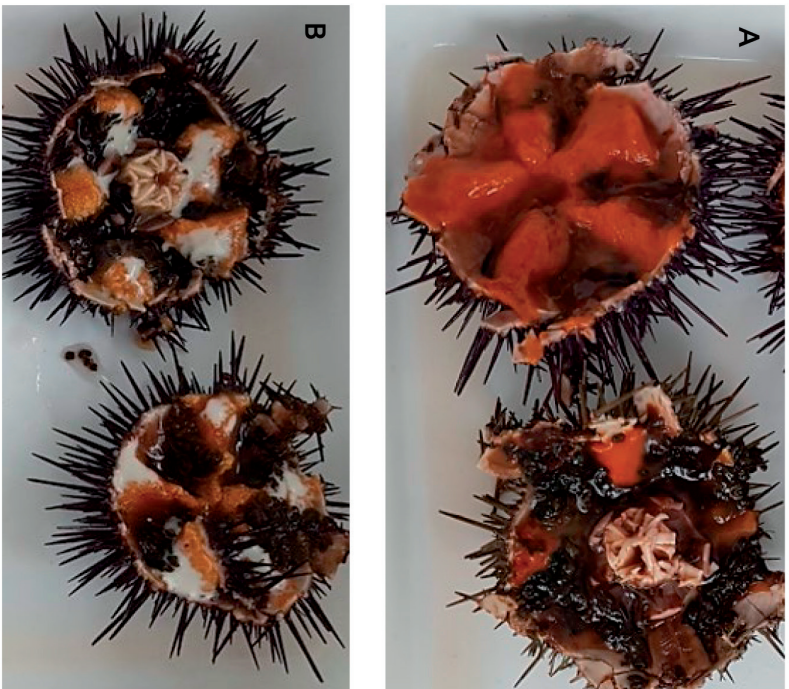


Figura 10. Obtención de gametos por método de disección transversal: ourizos tras a disección: (A) femia, (B) macho.

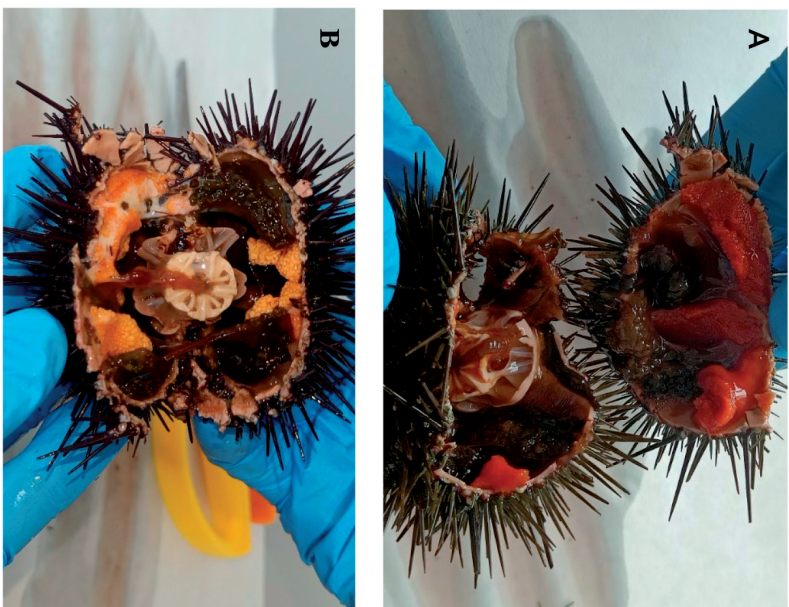


Figura 11. Obtención de gametos por método de disección longitudinal, ourizos tras a disección: (A) femia, (B) macho.

3. Sexado

34 Para discernir os ourizos por sexo os animais deben estar maduros no momento do sexado. Colocamos un ourizo orientada a superficie oral cara arriba, localizamos unha das placas interambulacrais (Fig.12A) e mediante unha xiringa cunha agulla de 40 mm pinchamos a membrana peristomial e diriximos a agulla cara á gónada que está situada no interior da placa interambulacral seleccionada (Fig.12B), procedendo á succión suavemente. Se o líquido aspirado é branco a extracción é esperma e polo tanto o ourizo de mar é macho e pola contra se o líquido aspirado é amarelo/vermello son oocitos e os ourizos son femias. Se os ourizos non están en época de desove, estas diferenciacións non serán posibles; por outro lado cando os ourizos están maduros, esta é unha metodoloxía 100% efectiva para diferenciar os sexos. En caso de dúbida, as células aspiradas pódense observar ao microscopio. Non hai mortalidade asociada ao procedemento (Paredes & Costas, 2020).

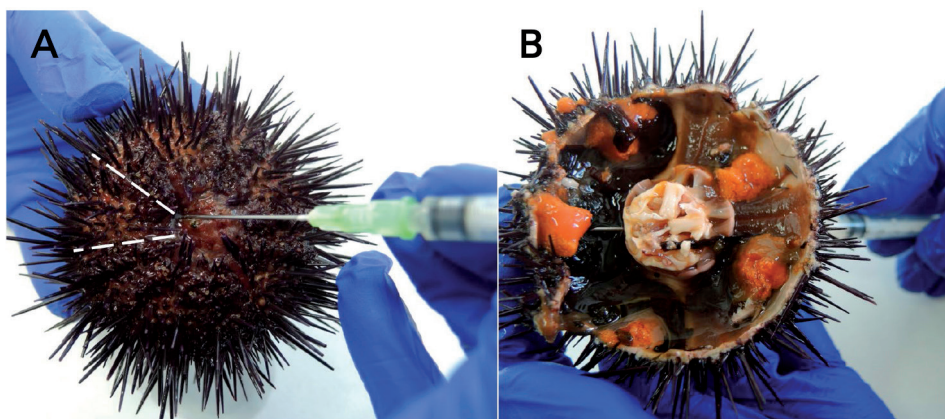


Figura 12. Guía visual da metodoloxía de sexado. (A) Ángulo e localización da inxección. (B) Visión interna da agulla tomando mostra da gónada.

Se durante o manexo, os ourizos entrasen en posta de forma espontánea os gametos poden utilizarse, preferiblemente previo control de calidade. Se a posta sucede espontaneamente nun tanque sen un sexado previo, os ovos fertilizados poderían recollerse pero careceríamos de control sobre os cruces realizados ou a calidade previa da posta.

Táboa 2. Comparativa entre metodoloxías de obtención de gametos de ourizo de mar. (Paredes & Costas, 2020²; Resgalla et al., 2020¹).

Metodoloxía	Calidade dos gametos	Concentración	Supervivencia	Número de animais
Inxección KCl	Óptima	Baixa-Media	Baixa ¹	Alto
Disección	Óptima	Moi alta	No	Alto
Sexado	Óptima	-	No	-
Sexado + Disección	Óptima	Moi alta	No	Minimo ²

35

4. Calidade dos gametos

A calidade dos gametos femininos e masculinos pódese observar baixo un microscopio. Os oocitos de gran calidade, nesta especie deben ter un tamaño de aproximado de 90 micras, presentar unha forma esférica e cor alaranxada. A calidade dos espermatozoides mídese segundo a súa mobilidade (moi móbil, pouco móbil, inmóbil) baixo o microscopio ou, no caso de contar cun analizador automático (CASA, do inglés Computer Assisted Semen Analysis) poderíanse obter datos sobre a velocidade das células espermáticas, así coma a súa traxectoria. Por outra banda, a calidade dos gametos tamén reflíctese na porcentaxe de fertilización, unha boa calidade debería garantir unha fertilización de máis do 90%.

Unha vez que os gametos se encontran en auga de mar, os oocitos poden aguantar arredor de 8h, sempre e cando a temperatura non sexa superior a 18°C e nunha concentración baixa que permita que unha vez precipitados no fondo non carezan de osíxeno. No caso do esperma, unha vez en contacto coa auga de mar prodúcese a súa activación, a partir dese momento irá perdendo mobilidade co paso das horas. Se conservamos os gametos dentro das gónadas poderíamos mantelos nunha neveira a 4°C. No caso do esperma sen activar podería aguantar un ou dous días a esta temperatura e, se falamos de oocitos, durante 24 horas.

Se fose necesario conservar por máis tempo os gametos poderíamos recorrer ao proceso de criopreservación. Dito proceso soamente se pode aplicar ao esperma (Fabbrocini & D'Adamo, 2017) xa que polo momento non é posible criopreservar os oocitos desta especie (Campos et al., 2021; Paredes et al., 2022).

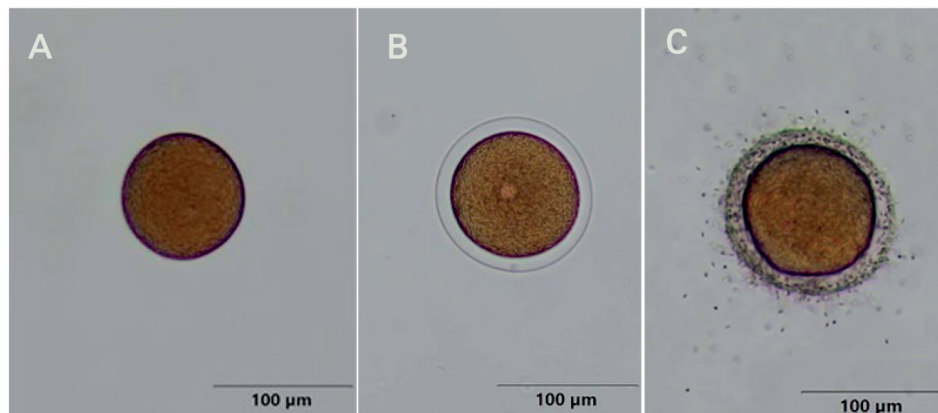


Figura 13. *P. lividus* oocito (A), oocito coa membrana de fertilización (B) Oocito con demasiado esperma, membrana de fertilización contendo o exceso de esperma (C).

5. Fertilización

Co fin de asegurar a máxima diversidade xenética, recomendase o uso de 3 machos e 3 femias a hora de realizar a fertilización. Os ourizos de mar teñen fertilización externa, é dicir, os gametos femininos e masculinos libéranse ao mar onde ten lugar a fecundación. É por iso, que cando realizamos a fecundación débese evitar o uso de demasiado esperma na solución que contén os oocitos. A concentración recomendada é de 10-20 espermatozoides por oocito, co fin de evitar a entrada de varios espermatozoides no mesmo óvulo, fenómeno coñecido como poliespermia (Fig.13C).

A estimación de número de oocitos, realízase nunha probeta de 1000-2000 ml. Esta probeta contén a solución de oocitos e auga de mar filtrada a 1 micra e esterilizada mediante UV. Coa axuda dunha baqueta homoxenézase o seu contido e tómanse varias alícuotas de 0,05-1 ml para realizar os cónteos nunha cámara Sedgewick Rafter. No caso do recuento dos espermatozoides, é necesario realizar unha disolución 1/20 do esperma procedente directamente da gónada, con fin de facilitar o seu recuento, repetindo nese momento o mesmo procedemento que no caso do recuento de oocitos.

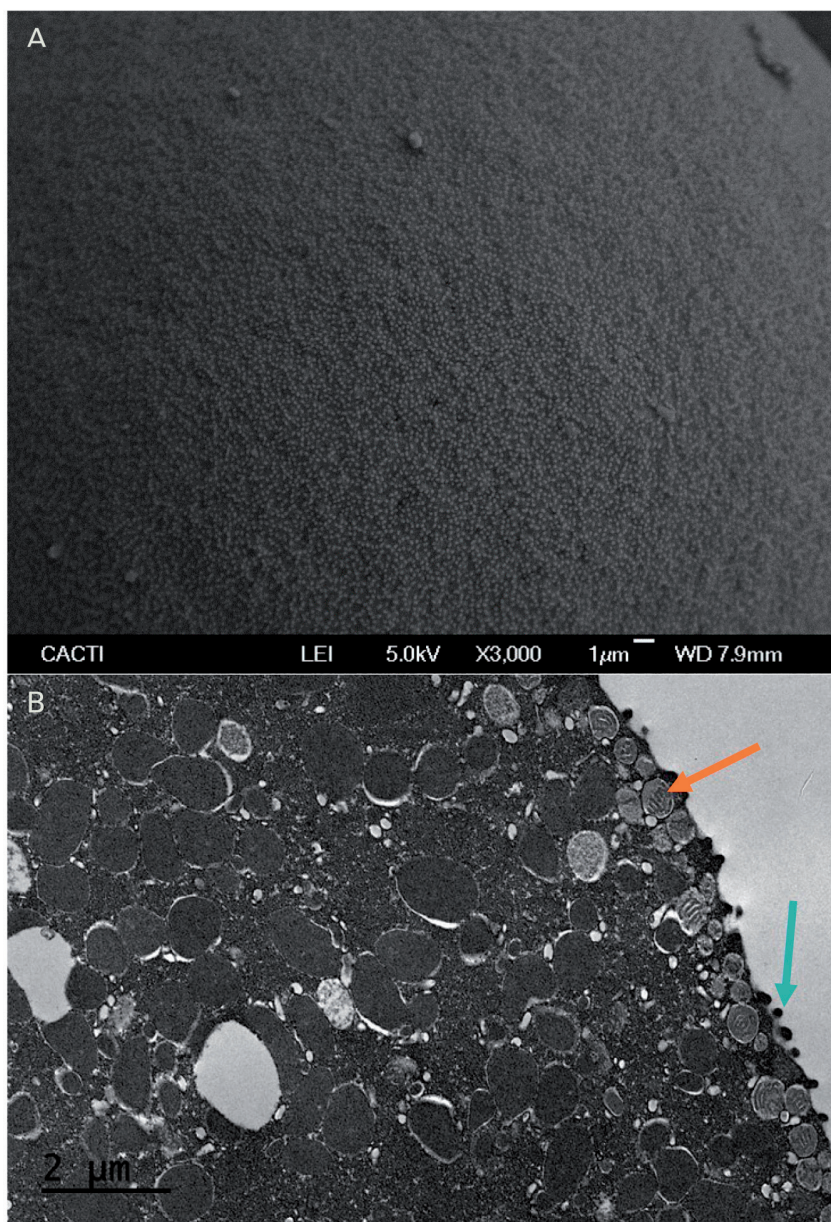


Figura 14. (A) Fotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) dun oocito sen fertilizar onde se poden apreciar os microvilli. (B) Fotografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) dun oocito sen fertilizar con microvilli (frecha verde) e gránulos de calcio (frecha laranxa).

38

A superficie dos oocitos está recuberta por microvilli (Fig.14, frecha verde), que son prolongacións encargadas do recoñecemento óvulo-esperma (Spiegel & Spiegel, 1977; Tilney & Jaffe, 1980). Cando ambos gametos se recoñecen e entran en contacto, fórmase a membrana de fertilización en cousa de segundos (Fig.13B, 13C) arredor do óvulo impedindo que se produza a poliespermia. Os responsábeis da formación da membrana de fertilización son uns gránulos ou vesículas de calcio baixo a membrana celular (Fig.14, frecha laranxa).

6. Desenvolvemento embrionario e larvario

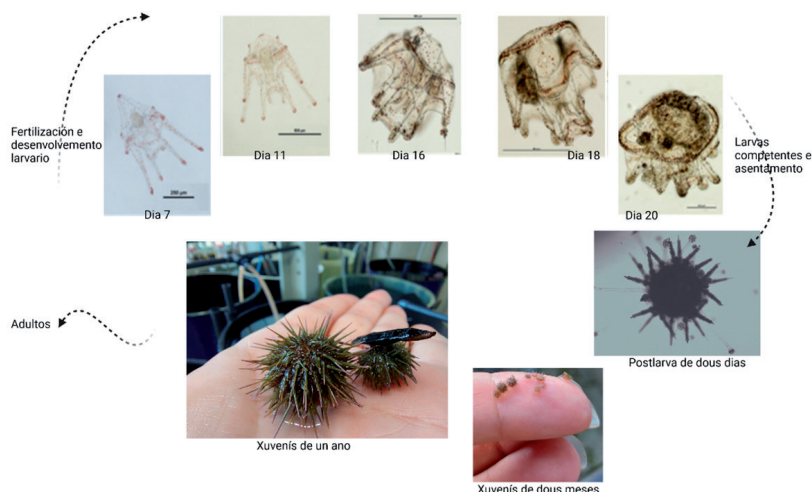


Figura 15. Esquema do desenvolvemento de *P. lividus* en cultivo controlado a 18°C.

Despois da fecundación, o cigoto sofre divisións celulares rápidas, estas divisións seguen un patrón radial, onde as células se dividen simetricamente arredor dun eixe central ata formar unha mórula (de 2 a 6 horas a 18°C no caso de *P. lividus*). Cando continúa a división ocorre a blastulación (de 6 a 8 horas) e a continuación a gastrulación (10-14 horas) que supón o completo reordenamento celular da gástrula para formar tres capas xerminais, o ectodermo, mesodermo e endodermo. Tamén se forma unha cavidade interna ou invaxinación chamada blastoporo que se converterá na apertura do futuro sistema dixestivo. A gástrula evoluciona dando lugar a larva característica dos equinodermos a larva pluteus. Unha larva pluteus de catro brazos alcánzase ao redor das 48 horas.

A larva pluteus ten múltiples brazos delgados e alongados que irradian dende o extremo anterior do seu corpo. Estes brazos aumentan en número co desenvolvemento

da larva (Fig.15) e están espazados uniformemente ao redor da larva. Os brazos están cubertos de cilios que baten ritmicamente, axudando ao movemento e á alimentación. Posúen un esqueleto interno característico a base de espículas calcificadas. Estas espículas proporcionan soporte e rixidez ao corpo da larva.

39

Tras aproximadamente uns 20 días de cultivo larvario alimentándose de fitoplancto, a larva atópase competente para o asentamento. As larvas de ourizo séntense atraídas por certos substratos para realizar o seu asentamento e, gracias á metamorfose, transfórmanse nunha post-larva que se vai a alimentar de micro e macroalgas.

7. Resumo de mellores prácticas recomendadas

- Debido a que ambos métodos de recolección de gametos provocan a morte do ourizo, recomendase utilizar a disección lonxitudinal en lugar da inxección de KCl. Con este tipo de disección non se seccionan as gónadas e pódense obter concentracións e cantidades de gametos moito maiores que coa inxección de KCl.
- É necesario que os ourizos atópanse maduros, xa que de non ser así non será posible a súa diferenciación por sexos.
- O sexado mediante aspiración con xiringa en ourizos maduros, apenas presenta mortalidade e 100% de efectividade.
- Unha vez sexados, se existen dúbidas en canto á diferenciación das células aspiradas deberán comprobarse mediante a observación baixo un microscopio.
- A calidade dos gametos compróbase observándoos baixo un microscopio. Os oocitos deberán ter forma esférica e cor alaranxado e o esperma una elevada mobilidade.
- Unha vez en auga de mar os gametos deberán utilizarse o antes posible para evitar a perda de calidade.
- En auga poderíanse manter os oocitos ate 8h a 18°C e na gónada os oocitos 24h a 4°C.
- En auga o esperma perderá mobilidade co paso das horas. É posible manter o esperma sen activar nas gónadas durante 48h.
- Soamente se pode aplicar a criopreservación ao esperma.
- A fertilización é externa. Non se debe engadir demasiado esperma á solución que contén os oocitos. A concentración recomendada é de 10-20 espermatozoides por oocito para evitar a poliespermia.
- Calidade dos gametos tamén se pode medir na porcentaxe de fertilización, unha boa calidade debería garantir unha fertilización de mais do 90%.

8. Bibliografía

- Campos, S., Troncoso, J., & Paredes, E. (2021). Major challenges in cryopreservation of sea urchin eggs. *Cryobiology*, 98, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.008>
- 40 Fabbrocini, A., & D'Adamo, R. (2017). Motility of sea urchin *Paracentrotus lividus* spermatozoa in the post-activation phase. *Aquaculture Research*, 48(11), 5526-5532. <https://doi.org/10.1111/are.13373>
- Himmelman, J. H. (1975). Phytoplankton as a stimulus for spawning in three marine invertebrates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 20(2), 199-214. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(75\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90024-6)
- Paredes, E., Campos, S., Lago, A., Bueno, T., Constensoux, J., & Costas, D. (2022). Handling, Reproducing and Cryopreserving Five European Sea Urchins (Echinodermata, Klein, 1778) for Biodiversity Conservation Purposes. *Animals*, 12(22), 3161. <https://doi.org/10.3390/ani12223161>
- Paredes, E., & Costas, D. (2020). Non-lethal sex identification of sea urchins: Method and advantages. *Lab Animal*, 49(1), 7-8. <https://doi.org/10.1038/s41684-019-0439-y>
- Resgalla, C., Friedrichsen, J. C., Souza, R. C., Vieira, D. C., Deucher, K., & Silva, M. A. C. da. (2020). Assessment of sea urchin spawning induction and oocyte conservation applied to ecotoxicological assays. *Ocean and Coastal Research*, 68, e20288. <https://doi.org/10.1590/S2675-28242020068288>
- Spiegel, E., & Spiegel, M. (1977). Microvilli in sea urchin eggs: Differences in their formation and type. *Experimental Cell Research*, 109(2), 462-465. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90030-1)
- Tilney, L. G., & Jaffe, L. A. (1980). Actin, microvilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. *Journal of Cell Biology*, 87(3), 771-782. <https://doi.org/10.1083/jcb.87.3.771>
- Zhadan, P. M., Vaschenko, M. A., Almyashova, T. N., Zhadan, P. M., Vaschenko, M. A., & Almyashova, T. N. (2017). Effects of Environmental Factors on Reproduction of the Sea Urchin *Strongylocentrotus Intermedius*. En *Sea Urchin—From Environment to Aquaculture and Biomedicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69511>

Imaxe creada por BioRender Licenza UQ25HQ8JD5 e TW25LUZKD0 (Figura 8).

Capítulo 03

Cultivo larvario

41

Noelia Tourón e Damián Costas

1. Obxecto

O presente capítulo describe a metodoloxía utilizada na ECIMAT-CIM-UVigo para levar a cabo o cultivo larvario do Ourizo de Mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).

2. Fundamento teórico

O cultivo larvario do ourizo de mar comprende o conxunto de técnicas metodoloxías e instalacións necesarias para o correcto desenvolvemento das larvas que permita unha produción en masa de larvas competentes para a fixación en condicións controladas. Estas técnicas baséanse no coñecemento da bioloxía e ecoloxía dos ourizos mariños (capítulo 2), así como na comprensión das súas necesidades nutricionais e ambientais durante a súa fase larvaria.

Os ourizos de mar teñen reprodución sexual e liberan os seus gametos na auga, onde se produce a fecundación e formación e desenvolvemento das larvas. Estas larvas son planctónicas e pasan por diferentes etapas antes de converterse en xuvenís. Durante este proceso, as larvas requiren unha temperatura óptima, salinidade, pH, osíxeno e condicións de alimentación para a súa supervivencia e crecemento. O cultivo de larvas céntrase en proporcionar estas condicións controladas, utilizando sistemas de acuicultura que permiten optimizar estes parámetros, asegurar a dispoñibilidade de alimento, a eliminación de factores de estrés, competidores, depredadores, etc. de xeito que se maximice a produción de larvas para a seguinte etapa de cultivo (Capítulo 4).

3. Sala de Microalgas

42 O éxito do cultivo larvario e asentamento do cultivo de *P. lividus* depende en gran medida da calidade das microalgas producidas, da disposición do número de especies necesarias e de ter a capacidade de produción adecuada. Ademais, a dispoñibilidade de cepas de diatomeas bentónicas con alto poder de adherencia pode permitir un mix de diatomeas axeitados como indutores da fixación como veremos no capítulo 4 ou ter independencia das condicións do medio natural.

4. Medios materiais

- Sala de cultivo climatizada e con control de fotoperíodo e intensidade de luz.
- Dosificadoras de microalgas.
- Mesado de traballo.
- Campá de fluxo laminar.
- Autoclave.
- Lavalouzas.
- Liña de Auga de mar a 18°C, filtrada a 1 μ absoluta e desinfectada mediante UVC.
- Liña de auga doce sen cloro e filtrada a 1 μ nominal.
- Liña de aire de 300-450 mbar de presión, con menos do 15% humidade e filtrado a 0,22 micras.
- Microscopio.
- Equipos de medición de parámetros de cultivo.
- Recipientes de cultivo de vidro como tubos de ensaio de 10 ml, matraces Erlenmeier e balóns de 6-10 l.
- Sistema de cultivo masivo como bolsas de PE transparente galga 800.
- Pediluvios e baños para material.

As dimensións desta sala poden variar en función da necesidade de produción de microalgas para atender as distintas fases de cultivo de *P. lividus*, adaptándose ao volume de produción e a tecnoloxía utilizada para o seu cultivo (bolsas, tanques, fotobioreactor, etc.). Xeralmente debe tratarse de tres salas, unha cun espazo para a colección de cepas de cada especie, un andel para escalado e outra de produción en sistemas estándar de xeración de biomasa, xa sexa en sistemas de produción en bolsas en "bath" ou en fotobioreactores tubulares.

As especies de microalgas son variadas segundo os autores, pero deben ter unhas características comúns como son a dixestibilidade, equilibrio nutricional e capacidade de crecemento a alta densidade reducindo costes de produción.

A composición da dieta usada para alimentar a fase larvaria do cultivo de *P. lividus* é de vital importancia para o correcto desenvolvemento e crecemento das larvas. A composición desta dieta varía entre autores: *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros muelleri* Lemmermann, 1898 ou *Chaetoceros neogracilis* VanLand, 1968, outras diatomeas como *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 1873 ou *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897, *Tisochrysis lutea* El M.Bendif & I.Probert, 2013 (T-ISO) *Rhodomonas* sp. e *Cryptomonas* sp; *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, 1905 ou *Dunaliella tertiolecta* Carnicero, 1959. 43

Nesta sala tamén haberá as diatomeas, que son xeralmente usadas para crear unha biopelícula indutora de fixación das larvas competentes na fase de fixación que se comenta con detalle no capítulo 4.

Neste caso usaremos unha dieta composta polas seguintes especies:

- *Chaetoceros neogracilis* (ECC007)
- *Tisochrysis lutea* (T-ISO) (ECC038)
- *Phaeodactylum tricornutum* (ECC028)
- *Rhodomonas lens* Pascher & Ruttner, 1913 (ECC030)

Na figura 16 móstranse as diferentes fases de cultivo de microalgas dende cepas monoespecíficas ata a obtención da masa produción nas instalacións do ECIMAT (Estación de Ciencias Mariñas de Toralla), pertencente ao CIM-UVigo.

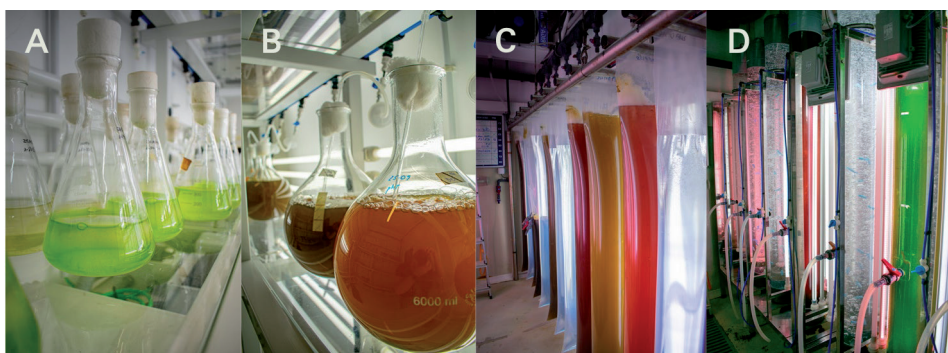


Figura 16. (A) Cepas monoespecíficas de microalgas. (B) Cultivo intermedio en botellóns de 6 l. (C) Cultivo en bolsas de plástico (PE), (D) Fotobioreactor tubular vertical.

Ademais para o control da produción precisamos dun laboratorio cun mínimo equipamento dun microscopio, unha lupa, unha sonda multiparamétrica de control de Temperatura, salinidade, oxíxeno e pH, etc (Fig.17).

44



Figura 16. (A) Cepas mono específicas de microalgas. (B) Cultivo intermedio en botellóns de 6 l. (C) Cultivo en bolsas de plástico (PE), (D) Fotobioreactor tubular vertical.

5. Acondicionamento

Trátase do proceso que permite ter individuos maduros fóra da época natural de posta.

Xeralmente en Galicia o ciclo reprodutivo segue un patrón anual onde o máximo desenvolvemento das gónadas prodúcese durante o inverno (Catoira, 1995) aínda que podemos atopar individuos maduros dende xaneiro a xullo quedando no verán con índices gonadais mais baixos para aumentar progresivamente a partir de setembro (Ouréns et al., 2011). Neste período os individuos pódense recoller directamente do medio natural e manter con alimentación e temperatura estable a 18°C para evitar postas espontáneas. Nestas condicións a madurez das gónadas pode prolongarse durante un período maior ca identificada no medio natural.

5.1. Medios materiais para o acondicionamento

- Sala de cultivo con control de fotoperíodo e intensidade de luz.
- Tanques ou caixas de cultivo de 50-200 l.
- Mesado de traballo.
- Liña de Auga de mar a 18°C.
- Liña de Auga de mar a 12°C.
- Liña de auga doce.
- Outros recipientes de cultivo (xerras, material de vidro...) de diferentes volumes.
- Pediluvios, baños para material.
- Outros: caldeiros, pipetas, xerras, trueiros, rasquetas, palillos, etc.

5.2. Requisitos da sala de acondicionamento do stock de reprodutores

As dimensións da sala van depender do número de reprodutores que precisemos. Esta sala debe dispor dun sistema de circulación da auga do mar que permitirá renovar completamente o volume de auga en tanques de acondicionamento, control do fotoperíodo, intensidade de luz e temperatura da auga, ademais de permitir a alimentación e limpeza.

O acondicionamento realízase só no caso de que precisemos individuos maduros fóra da época natural de posta como é o caso. Individuos maduros poden aclimatar-se paulatinamente a condicións de cativeiro subindo a temperatura ata 18°C o que permite mantelos coa gónada madura durante moitos meses.

5.3. Etapas do acondicionamento

• Fase previa

1. Captura e transporte

Os ourizos son capturados en áreas próximas ao criadeiro e transportados coa maior brevidade. O transporte realízase en seco pero en recipientes que permitan evitar a desecación e variacións bruscas de temperatura así como o sol directo sobre os ourizos. Xeralmente utilízanse capachos, caixas de porexpan ou neveiras portátiles e os ourizos deben ir preferentemente entre algas laminarias.

No caso de realizarse un transporte de proxenitores de máis de 24 horas, este deberá realizarse en temperatura controlada entre 4-10°C en caixas contedores adecuados, separación de machos e femias e con cada un dos ourizos envolto individualmente en papel similar ó seca-mans de laboratorio mollado en auga de mar do tanque de cultivo, evitando así o desecado durante o transporte, mantendo os ourizos individualizados fronte a posibles postas espontáneas e permitindo a obtención de postas na localidade de destino.

De cara a ter individuos maduros fóra da época natural de posta en Galicia e tendo en conta a duración do acondicionamento os individuos captúranse en xuño-xullo co obxectivo de termos finalizado o acondicionamento en outubro e así dispoñer de individuos maduros para o período outubro-xaneiro, ademais de manterse o stock todo o ano co que podemos dispoñer de individuos de xeito rápido en calquera momento para a obtención de postas.

2. Recepción e aclimatación

Os tanques de recepción deben ter unhas condicións ambientais iguais ás da auga de procedencia especialmente temperatura e salinidade, con abundante renovación de auga e sen alimento.

Dado que os individuos na época de captura están maduros é posible que teñamos postas directamente nos tanques tralo transporte o que nos permite realizar un sexado rápido da poboación separando en tanques diferentes ambos sexos (ver capítulo 2).

46

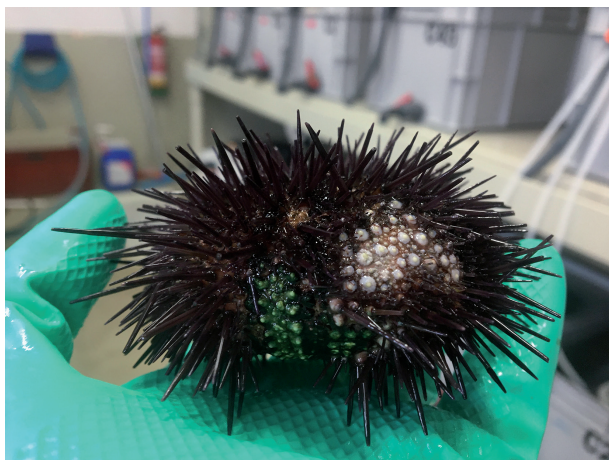


Figura 18.Exemplar de *P. lividus* con lesións típicas como resultado de problemas de aclimatación.

O principal problema da aclimatación radica nunha mala captura e transporte que provoca problemas de necrose na epiderme e calvicie do ourizo, chegando nos casos máis graves ata a morte do animal coa aparición de infeccións oportunistas (Fig.18) (Boudouresque & Verlaque, 2007).



Figura 19. Tanques acondicionado de ourizo na ECIMAT (Estación de Ciencias Mariñas de Toralla). (A) Tanques acondicionado, (B) Caixas de acondicionado e stock maduración.

Ao longo dos días o stock vaise aclimatando a 18°C de temperatura cun cambio progresivo.

5.4. Fase de acondicionamento

- Etapa de sincronización

Etapa de 20 días onde os ourizos mantéñense a 18°C sen alimentación e luz natural. Deste xeito os animais consumen toda a gónada e poden comezar a gametoxénese de xeito sincronizado (Fig.19A).

- Etapa de inicio da gametoxénese

A duración desta etapa é de 15 días e nela recuperamos una alimentación "*ad libitum*" con macroalgas, cun progresivo descenso da temperatura ata os 12°C e un descenso progresivo do fotoperíodo ata as 8 horas de luz. A intensidade de luz redúcese igualmente de xeito paulatino ata un máximo de 50 lux (Fig.19B).

- Etapa de inverno

Etapa de 20-25 días cos ourizos en condicións de inverno: 12°C, 8 horas de luz e 50 lux. A alimentación é intensa do mesmo xeito que a acumulación de reservas e crecemento da gónada (Fig.19B).

- Etapa de recuperación

Etapa de 15 días onde progresivamente subimos temperatura ata os 18°C, recuperamos o fotoperíodo ata as 16 h de luz e mantemos unha intensa alimentación (Fig.19B).

- Etapa de maduración

Nas condicións previas acadadas na fase anterior en 20-30 días podemos dispor de individuos maduros listos para usar.

O proceso dura aproximadamente uns 3 meses. Os individuos mantéñense maduros nestas condicións.

5.5. Parámetros xerais do acondicionamento de reprodutores de ourizo

- **Temperatura:** A temperatura redúcese dende 18 a 12^a mantendo un período de auga fría para recuperarse posteriormente nunha rampla que reflicte as condicións no medio natural.
- **Salinidade:** A salinidade mantense en **35 ppt**.
- **pH:** natural.
- **Amonio:** Cero cunha abundante renovación de auga do 100% á hora.
- **Fotoperíodo:** Redución progresiva ata 8 horas de luz, manténdose durante 3 semanas nestas condicións o que aumenta o período de alimentación. Posteriormente auméntase ata condicións de primavera-verán.

- **Iluminación:** A intensidade luminosa non é relevante neste cultivo pero debe manterse entre 50-100 lux.

Debe existir un plan de acondicionamento e un rexistro similar os indicados nos anexos ó fin deste capítulo.

48

6. Esquema xeral do acondicionamento

CONDICIÓNS XERAIS	
DESCRICIÓN	O acondicionamento de reprodutores fai referencia á metodoloxía de cultivo que permite individuos maduros fóra da época natural de posta o que permite ter fecundacións durante todo o ano. No caso da ECIMAT o acondicionamento realízase entre xullo e outubro permitindo ter individuos maduros, sexados todo o ano.
LUGAR-SALA	Adecuada segundo as condicións descritas necesarias para a fase do cultivo onde xeralmente debemos dispor de tanques planos ou de fondo cóncavo, control de temperatura, fotoperíodo.
Nº INDIVIDUOS	Segundo as necesidades.
ORIXE	Local, con aclimatación, transporte e sexado previo.
TIPO TANQUES	Material: PEAD, PP ou fibra de vidro . Volume: 0.05-0.15 m ³ . Forma: plana, cónica, cuña. Saída: central para baleirado e por reborde lateral superficial para renovación de auga continua. Cor: indiferente.
DENSIDADE	Ata 0,5 ourizos/l.
Nº/ TANQUE	Segundo volume: Para tanques de 50l: 25 individuos.
FLUXO DE AGUA	Fluxo: Aberto. Entrada: superficial. Filtrado: mínimo auga filtrada por area. Renovación: 100% renovación/h.
AIREACIÓN	Sen aireación.
DESTINO	Segundo necesidades.
FASES PREVIAS	Captura e transporte. Recepción e aclimatación. Sexado.

FASES	FASE 1 SINCRONIZACIÓN	(20-30 días, 18°C) INANICIÓN.
	FASE 2 INICIO GAMETOXÉNESE	(15 días) Descenso T 1°C/ 2 días ata 12°C; descenso fotoperíodo 1 h/4 días ata 8 h de luz.
	FASE 3 INVERNO	(20 días) INVERNO. Manter a 12°C e 8 h de luz, 50 lux.
	FASE 4 RECUPERACIÓN	(15 días) Ascenso T 1°C/ 2 días ata 18 °C; ascenso fotoperíodo 1 h/4 días ata 16h de luz.
	FASE 5 MADUREZ	(15-30 días) Manter a 18°C e 16 h de luz, 50 lux 85-100 días verificar madurez.

PARAMETROS (SISTEMA MEDICION, FRECUENCIA)	
OSÍXENO	Manter en saturación. En fluxo aberto nestas condicións non é un problema.
TEMPERATURA	Segundo etapa de acondicionamento entre 12-18°C
SALINIDADE	35 ppt.
FOTOPERIODO	Segundo etapa de acondicionamento entre 8 e 16 horas de luz.
pH	Natural, entre 7,9 e 8,2.
AMONIO	Valores recomendado de 0 ppm.
TIPO LUZ E INTENSIDADE	Segundo etapa de acondicionamento: luz natural ou LED.

ALIMENTO MICROALGAS	
ESPECIES	<i>Saccorhiza polyschides</i> (Lightfoot) Batters, 1902 (eventualmente mexillón conxelado). A macroalga lávase en auga doce e conxelase en bolsas de 1 Kg que se desconxelan o día de subministro.
DIETA	3 días/semana: luns, mércores e venres 3,5-4 g/ ourizo x día.
SUMINISTRO	Desconxelado/picado en anacos de 2x2 cm aproximadamente e reparto nos tanques.

HIXIENE E PROFILAXE	
SALA E MATERIAIS	A sala debe ter unha cubeta de desinfección para o material de cultivo. A entrada da sala ten que ter un pediluvio con desinfectante. Debe traballarse con roupa adecuada e propia desta sección, e non usada en áreas de maior control como larvario ou sala de algas. Deben desinfectarase as man antes de entrar na sala. A sala debe ser desinfectada unha vez por semana (chan e canles).
TANQUES	Os tanques deben sifonarse 3 veces por semana antes da toma de comida. Cada mes deben limparse a fondo con estropallo con coidado de non inducir posta dos proxenitores.
XERAL	Debe establecerse un PROGRAMA DE LIMPEZA E DESINFECCIÓN.

COIDADOS E MANEXO
• Eliminar baixas. • Observar evolución de problemas de calvicie. • Manter boa renovación de auga e evitar cambios bruscos de temperatura, así como cortes de auga. • Débese evitar unha excesiva carga de detritos durante mais de 4 días.

7. Cultivo larvario

Trátase do período dende a fecundación ata a fixación e metamorfose das larvas.

7.1. Medios materiais

- Sala de cultivo preferentemente climatizada e con control de fotoperíodo.
- Tanques de cultivo larvario troncocónicos de fibra de vidro, PP ou PE de 50-500 l.
- Dosificadoras de microalgas.
- Mesado de traballo.
- Liña de Auga de mar a 18°C, filtrada a 1µ absoluta e desinfectada mediante UVC.
- Liña de auga doce declorada e filtrada a 1µ nominal.
- Liña de aire de 300-450 mbar de presión, con menos do 15% humidade e filtrado a 0,22 micras.
- Microscopio.
- Placas de recuento Sedgewick Rafter de vidro.
- Outros recipientes de cultivo (xerras, material de vidro,...) de diferentes volumes.
- Pediluvios, baños para material
- Outros: caldeiros, pipetas, xerras, trueiros, rasquetas, palillos, etc.

7.2. Sala de desenvolvemento larvario

Neste espazo, realízase a fase de cultivo larvario dende a fecundación ata a obtención de larvas competentes o que supón un cultivo de entre 18 e 20 días. Os tanques utilizados nesta fase son xeralmente cilíndricos e a cantidade e volume dependerá dos requisitos de produción de larvas (Fig.20). 51



Figura 20. Tanques cilíndricos para o cultivo larvario.

A sala debe dispor de control de temperatura e fotoperíodo e ser axeitada para o cultivo larvario de especies mariñas con liñas de auga doce, aire e auga de mar; canles para desaugadoiros, pintura epoxi en chan e paredes e medias cañas nos encontros das paredes co chan.

7.3. Sistema de cultivo

A densidade de cultivo recomendada é de 1 larva/ml. Os tanques deben encherse previamente á fecundación con auga de mar a 18-20°C, cun único punto de aireación central no fondo do cono do tanque. A aireación manterase suave rompendo a columna de auga, homoxeneizando o medio e evitando a sedimentación das larvas. Deben evitarse pedras difusoras con microburbullas e manter unha burbulla de aireación grande e pausada, por exemplo a través dun tubo ou vara oca de 4 mm.

52

Os tanques posúen un desaugadoiro superior cun baruto de 100 micras que debe limparse para evitar o desbordamento do tanque. Este baruto acada o centro superficial do tanque e o burbullar da aireación pasa ó redor do mesmo (Fig.21). Por outra banda, a entrada de auga en circuito aberto realizarase pola parte inferior do tanque.

A alimentación realízase mediante dosificadoras con a lo menos 6 doses diarias nas que se proporciona a ración total diaria.

Diariamente compre realizar una pequena purga que se recollerá nunha xerra o convido para observar no microscopio.

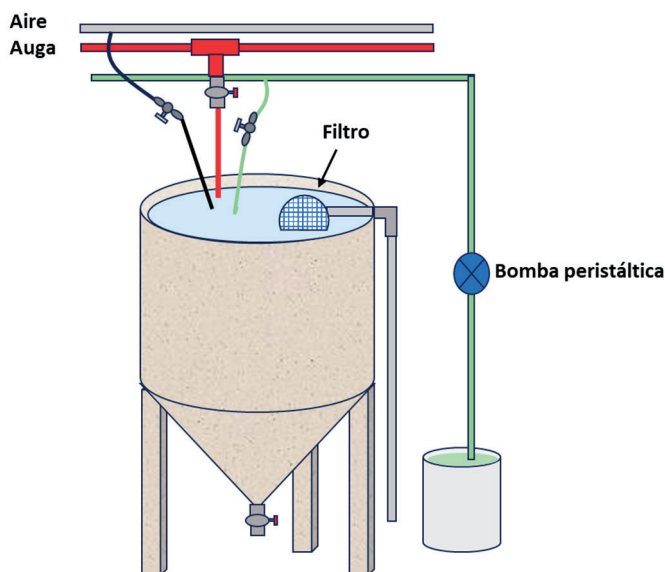


Figura 21. Esquema de tanque de cultivo en circuito aberto.

7.4. Desenvolvemento larvario de *Paracentrotus lividus*

Dado que o circuito é aberto só é necesario colleitar o tanque 1 vez por semana. Isto realízase con suavidade sempre nun baruto de 40 micras evitando danos das larvas.

Logo da colleita de todo o tanque realizarase unha mostraxe que nos permite estimar a densidade das larvas. Para realizar este procedemento introdúcense tódalas larvas nunha probeta de 1000-2000 ml e unha vez homoxeneizada cunha baqueta recóllense varias alícuotas de 0,05-1 ml para realizar os cónteos nunha cámara Sedgewick Rafter. Mantendo unha densidade de entre 1-1,5 larvas/ml, permítenos obter unha supervivencia maior do 50-76% ata estadio premetamórfico e un desenvolvemento larvario adecuado en talle.

Dende a formación da larva é necesario o subministro de microalgas, que na ECI-MAT-CIM baséase nunha dieta de 4 especies de microalgas de diferentes tamaños e características nutricionais: *Tisochrysis lutea* (T-ISO), *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros neogracilis* e *Rhodomonas lens*. (1:1:1:1), a unha concentración de inicio de 40 equivalentes, que estará aumentando a un ritmo de 20 equivalentes de cada 4-5 días de cultivo segundo as necesidades que se poden observar diariamente por cor do tanque ou contaxe.

Neste caso usaremos unha dieta composta polas seguintes especies en cantidades equivalentes cunha relación 1:1:1:1 en células/microlitro:

- *Chaetoceros neogracilis*
- *Tisochrysis lutea* (T-ISO)
- *Phaeodactylum tricornutum*
- *Rhodomonas lens*

A partir das 48 horas tras a fecundación (DDF) comezamos a alimentación continua das larvas coa seguinte dieta:

- 2-6 DDF: 40 células/ μ l
- 6-10 DDF: 60 células/ μ l
- 11-18 DDF: 80 células/ μ l
- 19-24 DDF: 100 células/ μ l
- 25-fin DDF: 120 células/ μ l

Dado que se trata dun circuíto aberto a entrada da ración diaria realízase en varias tomas o que permite manter unha baixa concentración de algas no tanque, pero mais estable e continua, ademais de minimizar as perdas de microalgas polo desaugadoiro superficial. A entrada das algas no tanque tamén se realiza pola parte inferior, na parte final do cono xunto coa aireación e a entrada profunda de auga nova.

Unha vez á semana debemos colleitar todo o tanque, normalmente os días 2-8-15 despois da fecundación (DDF)-fin.

O desenvolvemento larvario comeza coa formación das larvas prisma que van evolucionando ó longo do cultivo ata converterse en larvas de 8 brazos. Finalmente, cando aparece o rudimento e este alcanza 1/3 do tamaño do estómago, a larva entra no estado premetamórfico e é nese momento, cando se produce o seu traslado aos tanques de fixación-metamorfose (Fig. 22). Este período ten unha duración de entre 15-21 días, como regra xeral, dependendo da época do ano, calidade das larvas e das condicións de cultivo que poden influír na velocidade de desenvolvemento larvario.

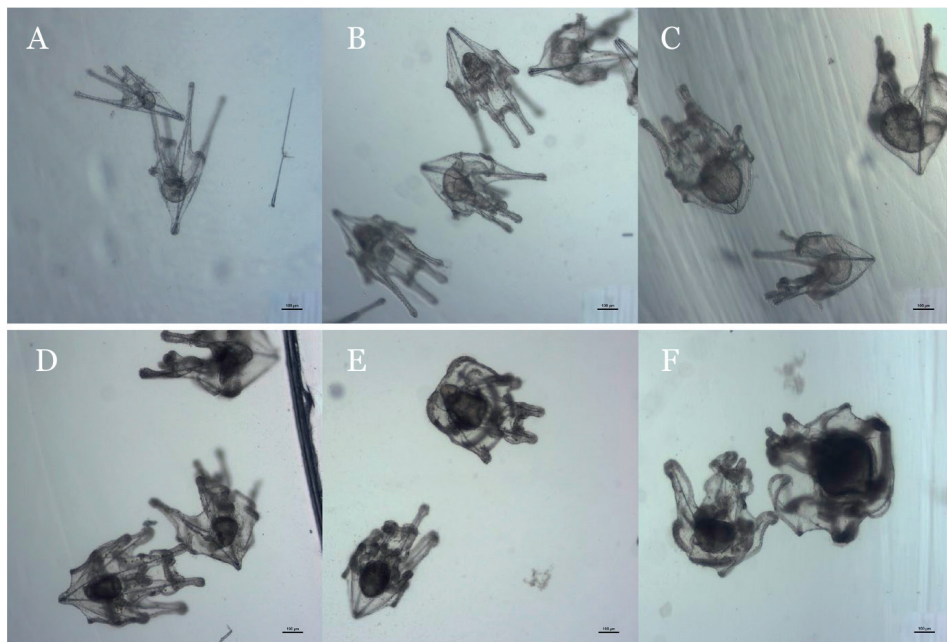


Figura 22. Desenvolvemento de larvas pluteus de *P. lividus* dende os 10 días de vida ata os 21 (A) Larva de 4 brazos con 10 días de vida, (B) larva de 6 brazos con 12 días de vida, (C) larva de 6 brazos con 14 días de vida, (D) larva de 8 brazos con 17 días de vida, (E) larva de 8 brazos con 19 días de vida e (F) larva de 8 brazos con 21 días de vida.

7.5. Parámetros xerais do cultivo

- **Temperatura:** A temperatura óptima no cultivo larvario está en 20 ± 1 °C e debe controlarse diariamente. Deste xeito poden conseguirse larvas competentes con ata 15DDF, e xeralmente entre 18-21 DDF.
- **Salinidade:** A salinidade óptima de **35 ppt**. A medida que a salinidade diminúe faino tamén drasticamente a supervivencia xa en valores de 30 ppt. Este parámetro inflúe na distribución dos ourizos no medio natural de xeito relevante.
- **pH:** para todas as fases de cultivo o pH debe estar en valores propios do medio natural, **entre 7,9 e 8,2**. Debe controlarse semanalmente.
- **Amonio:** O amonio pode presentar unha fracción tóxica, que segundo outros parámetros, principalmente o pH, variará nunha proporción maior ou menor. O **Amonio total disolto non debe exceder os 0,5 ppm**. Xeralmente non se presenta como un problema en circuíto aberto e densidade baixa de algas e larvas. Pode medirse preventivamente ou se hai dúbidas por mortalidades inesperadas.

- **Fotoperíodo:** En xeral **non presenta influencia** no cultivo larvario, polo que pode manterse o fotoperíodo natural ou en valores intermedios de primavera de 12:12.
- **Iluminación:** A intensidade luminosa non é relevante neste cultivo.

Recomendase a recollida de datos diarios en rexistros do cultivo larvario como o que se amosa no anexo do punto 9 deste capítulo.

Neste punto, aclárase a importancia do control estrito do pH, xa que estudos recentes, detectaron a presenza de respostas homeostáticas e asociadas ao custo enerxético para facer fronte a condicións de pH máis baixo que o habitual, resultando nunha diminución no crecemento (Byrne & Przeslawski, 2013; García et al., 2018).

O proceso de acidificación da auga producido polo aumento da presión parcial de CO₂, diminúe a dispoñibilidade de minerais como calcita e aragonito disoltos na auga, polo que organismos con esqueletos calcáreos ven aumentado o seu gasto enerxético necesario para o proceso de esqueletoxénese e limitando o crecemento posoral dos brazos, durante as súas primeiras etapas de vida (Byrne & Przeslawski, 2013; Cohen-Rengifo et al., 2013). A falta de desenvolvemento dos brazos posorales, necesarios para a captación de alimento e natación, pode afectar o crecemento, desenvolvemento normal e supervivencia das larvas por inanición ou que estas sexan máis propensas a ser depredadas.

En condicións naturais este atraso no crecemento podería afectar á relación alimento/ consumidor, ao existir unha desincronización entre o momento do afloramento primaveral e o estado de desenvolvemento larvario, chegando a alterar a dinámica poboacional. Ademais, debido ao seu importante herbívora, un atraso no crecemento da larvas de equinodermos, pode chegar a producir un efecto cascada, actuando sobre o funcionamento e estrutura do ecosistema (Cohen-Rengifo et al., 2013),

Con todo, existe constancia de que especies de ourizos de mar típicas de augas pouco profundas e zonas costeiras, parecen presentar unha maior capacidade de regulación de ións, debido a que, de forma natural, atopan sometidos a oscilacións ambientais máis bruscas que aqueles de augas máis profundas (García et al., 2018; Moulin et al., 2011). A isto hai que sumarlle, que concretamente os individuos adultos de *P. lividus* parecen presentar unha maior capacidade de regular o pH do seu líquido extracelular en condicións de aumento moderado da presión parcial de CO₂ ou hipercapnia no mar (Catarino et al., 2012). En resumo, os resultados de ambos bioensaios de pH mostran que, o pH óptimo para o crecemento e desenvolvemento de *P. lividus*, é pH 8, aínda que poidan existir pequenas variacións, as cales xa ocorren de forma natural na súa zona de distribución. Con todo, debido á súa extensa área de distribución, xunto coa ampla variedade de ambientes onde se atopa *P. lividus*, relaciónanse co seu alto potencial de adaptación, o cal podería supoñer unha vantaxe importante fronte ao CCG (García et al., 2018).

7.6. Análise microbiolóxica

56 É recomendable a realización periódica e preventiva de análises da auga de cultivo en puntos de control crítico, como pode ser despois do UV, o que nos permitirá detectar crecementos de microorganismos que son potencialmente patóxenos para o cultivo, mal funcionamento dos sistemas de filtración e desinfección ou crecementos nas liñas de auga.

Existen diferente medios de cultivo que son xeralmente utilizados para realizar estes análises, en función do microorganismo que se destina a detector na auga de cultivo. En xeral:

- **Agar mariño:** medio de cultivo sólido para bacterias heterótrofas mariñas.
- **Agar TCBS:** medio de cultivo selectivo para o illamento e cultivo de Vibrios.
- **Opcionalmente:**
 - **Agar Sabouraud:** medio utilizado para o illamento, identificación e conservación de fungos e fermentos.
 - **Agar SPG:** Agar GSP Agar Selectivo para Pseudomonas-Aeromonas.

7.7. Esquema xeral do cultivo larvario

CONDICIÓNS XERAIS	
DESCRICIÓN	A fase de cultivo larvario comeza coa fecundación dos ovos e finaliza coa obtención de larvas con rudimento denominadas competentes.
LUGAR-SALA	Adecuada segundo as condicións descritas necesarias para a fase do cultivo onde xeralmente debemos dispor de tanques cilíndrocónicos, control de temperatura, fotoperíodo e unha configuración construtiva que facilite a limpeza.
Nº LARVAS	Segundo as necesidades.
ORIXE LARVAS	Fecundación de a lo menos 3 ♀ + 3 ♂.
IDADE INICIO	0 DDF.
Nº TANQUES	Segundo as necesidades de produción.
TIPO TANQUES	Material: PEAD, PP ou fibra de vidro . Volume: 0,1-0,5 m3. Forma: cilíndrocónica. Saída: central para colleita e por desborde lateral superficial para renovación de auga diaria. Cor: indiferente.

DENSIDADE	1-1,5 larvas/ml.
Nº LARVAS/ TANQUE	Segundo volume.
FLUXO DE AGUA	Fluxo: inicialmente de 0-3DDF mantense o tanque en circuíto pechado, posteriormente aberto con malla central de 100 micras. Entrada: fondo do tanque. Filtrado: ata 1 micra e esterilización con UV (20-30 mJ/cm2). Renovación ata 100% volume do tanque por día.
AIREACIÓN	Subministro de aire seco filtrado a 0,22 micras con burbullas (1-2/segundo), central dende o fondo do tanque.
DESTINO	Segundo necesidades: investigación, repoboación, etc.

PARAMETROS (SISTEMA MEDICION, FRECUENCIA)	
OSÍXENO	Manter en saturación. En fluxo aberto nestas condicións non é un problema.
TEMPERATURA	20±1 °C con control diario.
SALINIDADE	35 ppt.
FOTOPERIODO	12/12 (luz/escuridade).
pH	Natural, entre 7,9 e 8,2.
AMONIO	Valores recomendado de 0 ppm.
TIPO LUZ E INTENSIDADE	Temperatura: 6500-7000º Kelvin. Intensidade: baixa. Valores de menos de 300 luxes.

ALIMENTO MICROALGAS	
ESPECIES	Tisochrysis lutea (Tiso), Phaeodactylum tricornutum (Pht), Chaetoceros neogracilis (Chn) e Rhodomonas lens (Rl) <i>en relación</i> 1:1:1:1 en células equivalentes de Tiso/µl.
DIETA	A dieta diaria vaise aumentando coa idade do cultivo coa seguinte secuencia: 2-5 DDF: 40 ceqlg/µl; 6-8 DDF: 60 ceqlg/µl; 9-12 DDF: 80 ceqlg/µl; 13-16 DDF: 100 ceqlg/µl; >17 DDF: 120 ceqlg/µl. A secuencia debe adaptarse á supervivencia en cada caso.
SUMINISTRO	Mediante bomba dosificadora. Reparto en 6 tomas diarias. (1 toma cada 4 horas: 8:00-12:00-16:00-20:00-00:00-04:00 h)

58

HIXIENE E PROFILAXE	
SALA E MATERIAIS	A sala debe ter unha cubeta de desinfección para o material de cultivo. A entrada da sala ten que ter un pediluvio con desinfectante. Debe traballarse con roupa adecuada e propia desta sección, e non usada en exterior nin con reprodutores ou no medio natural. Deben desinfectarase as man antes de entras na sala. A sala debe ser desinfectada unha vez por semana (chan e canles) O circuito de dosificación de microalgas debe pasarse diariamente auga doce e semanalmente auga doce + cloro.
TANQUES	Os tanques deben lavarse con desinfectante 1 vez/semana coincidindo coa colleita de todo o tanque para reconto. Diariamente pódese implementar unha pequena purga para observar cor e cheiro da mesma. Cando sexa necesario limpar malla da pandeireta reborde lateral.
XERAL	Debe establecerse un PROGRAMA DE LIMPEZA E DESINFECCIÓN .

COIDADOS E MANEXO
• Con 3-10-17 DDF (semanalmente) colleitamos todo o tanque, devagar nun baruto de 40 micras para limpeza e control de supervivencia. O resto do tempo as condicións mantéñense estables. • Diariamente, debemos observar as larvas en número e comportamento con lanterna. • Diariamente, debemos observar o estado do fondo mediante purga. • Débese evitar unha excesiva carga de alimento.

8. Bibliografía

- Boudouresque, C., & Verlaque, M. (2007). Chapter 13 Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 37, 243-285. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(07\)80077-9](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(07)80077-9)
- Byrne, M., & Przeslawski, R. (2013). Multistressor Impacts of Warming and Acidification of the Ocean on Marine Invertebrates' Life Histories. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 582-596. <https://doi.org/10.1093/icb/ict049>
- Catarino, A. I., Bauwens, M., & Dubois, P. (2012). Acid-base balance and metabolic response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to different seawater pH and temperatures. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(6), 2344-2353. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0743-1>
- Catoira, J. L. (1995). Spatial and temporal evolution of the gonad index of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in Galicia, Spain. *Echinoderm research*, 1995, 295-298.
- Cohen-Rengifo, M., García, E., Hernández, C., Hernández, J. C., & Clemente, S. (2013). Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Cahiers de Biologie Marine*, 54.
- García, E., Clemente, S., & Hernández, J. C. (2018). Effects of natural current pH variability on the sea urchin *Paracentrotus lividus* larvae development and settlement. *Marine Environmental Research*, 139, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.012>
- Moulin, L., Catarino, A. I., Claessens, T., & Dubois, P. (2011). Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). *Marine Pollution Bulletin*, 62(1), 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.09.012>
- Ouréns, R., Fernández, L., & Freire, J. (2011). Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*, 158, 793-804.

9. Anexos

1. Anexos do acondicionamento

60

ECIMAT
Estación de Ciencias
Maríñas de Toralla

Universidade de Vigo

PLAN ANUAL DE ACONDICIONAMENTO DE OURIZO

A1-IT-CU-29

Revisión: 00

Data: Maio 2023

SEA URCHING MATURATION CYCLE_20__20___. ECIMAT

LOTE

01.XX

CAGE NUMBER

12,00

TANK VOL (L)

50,00

Stocking density (Nº/l)

0,50

Stocking density (Nº/CAGE)

25,00

URCHING STOCKING #

300,00

FOOD TYPE

LAMINARIAS

1

MUSSELL

2

DRY-FEED

3

DIET

A

LU-MA-JU-VI LAMINARIAS (1)

B

PIENSO-LAMINARIA (3+1)

C

MA-VI LAMINARIAS (1)

D

LU-MI-VI LAMINARIAS (1)

OPTIONALLY ADD COOKED FROZEN MUSSELS (2)

Feed amounts are orientative.

FOOD consumption

Kg/SEAWEED/INDIV

% survival

DATE	Days	TEMP		FLOW			LIGHT		FOOD		STEPS	TECHNICIAN
		Grados día	°C	(%h)	m3/h	m3/h TOT	HORAS LUZ	ON-OFF	DIET	AMOUNT		
05/07/23	0	16	16	120%	0,06	0,72		natural	D	food-normal feed	Increase in T*	
06/07/23	2	33	17	100%	0,05	0,60		natural	D	food-normal feed	Increase in T*	
07/07/23	3	50	17	100%	0,05	0,60		natural		0	Increase in T*	
08/07/23	4	68	18	100%	0,05	0,60		natural	D	food-normal feed		
09/07/23	5	86	18	100%	0,05	0,60		natural	D	food-normal feed		
10/07/23	6	104	18	100%	0,05	0,60		natural	D	food-normal feed		
11/07/23	7	122	18	100%	0,05	0,60		natural	D	food-normal feed		
12/07/23	8	140	18	100%	0,05	0,60		natural		0	Step1	
13/07/23	9	158	18	100%	0,05	0,60		natural		0		
14/07/23	10	176	18	100%	0,05	0,60		natural		0	Resting	
15/07/23	11	194	18	100%	0,05	0,60		natural		0	Resting	

Anexo 1. Modelo de Plan anual de acondicionamento de Ourizo.

2. Seguimento e mantenza de ourizo

ECIMAT
Estación de Ciencias
Maríñas de Toralla

Universidade de Vigo

SEGUIMIENTO E MANTENZA DO OURIZO

A2-IT-CU-29

Revisión: 00

Data: Maio 2023

LOTE

REAL DATA										OBSERVATIONS
DATA	DAYS	TEMP °C	Light (H)	DIET	FOOD TYPE	FOOD AMOUNT	MORTALITY	EXITS MALE	EXITS FEMALE	TECHNICIAN

Anexo 2. Modelo de ficha de seguimento e mantenza do acondicionamento

3. Ficha de cultivo larvario de ourizo

		FICHA DE CULTIVO LARVARIO DE OURIZO										A1-IT-CU-29						
												Revisión: 00						
												Data: Maio 2023						
Especie			Tanque:			Orixe												
Data desove			Nº Ovos desove			%fecundación												
Volume tanque:			Cambios de auga			Sistema cultivo												
DATA	IDADE	T°	Nº LARVAS (X1 000)	DENS Larvas / ml	TAMICES (µm)	ALIMENTACIÓN								TECNICO	NOTAS	OBSERVACIÓNS		
						Fg. Ig	RACION POR ESPECIE				CANTIDADE (ml)							
							TISO	EL	GHG	PHT		TISO	EL	GHG	PHT			
0																		
1																		

Anexo 3. Ficha de cultivo larvario.

Capítulo 04

Asentamento larvario

Alba Lago e Damián Costas

63

1. Obxecto

O presente capítulo describe a metodoloxía utilizada na ECIMAT-CIM-UVigo para levar a cabo o asentamento e metamorfose do ourizo de mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).

2. Medios materiais

- Sala de cultivo.
- Andeis de cultivo.
- Tanques de fixación.
- Dosificadoras de microalgas.
- Mesado de traballo.
- Liña de Auga de mar a 15-18°C, filtrada a 1 μ absoluta e desinfectada mediante UVC.
- Liña de auga doce declorada e filtrada a 1 μ nominal.
- Liña de aire de 300-450 mbar de presión, con menos do 15% humidade e filtrado a 0,22 micras.
- Microscopio.
- Tanques e recipientes de cultivo (xerras, material de vidro, etc.) de diferentes volumes.
- Pediluvios, baños para material.
- Outros: caldeiros, pipetas, xerras, trueiros, rasquetas, palillos, etc.

3. Fundamento teórico

O ourizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), é un recurso moi apreciado gastronómicamente en moitos países do mundo polo valor culinario das súas gónadas, presentado una elevada importancia comercial en diversos países de Europa e Asia. Esta especie pode atoparse ao longo de todas a costa do Noroeste Atlántico e o Mediterráneo, e xoga un importante papel nos ecosistemas mariños nos que se atopa, actuando como “enxeñeiros” do ecosistema.

Ademais, as súas larvas presentan unha elevada importancia científica, utilizándose en estudos de embrioloxía, bioloxía molecular, toxicoloxía, estudos Evo-Devo, etc (Cirino et al., 2017; Privitera et al., 2011).

Unha vez que os individuos adultos liberan a súas células gonadais á auga, prodúcese a fertilización externa. Nese momento o embrión comeza a desenrolarse ata dar lugar a unha fase plantónica denominada larva pluteus. No medio natural esta fase larvaria ten unha duración aproximada de entre 23-29 días, mentres que no caso de cultivo *in vitro* esta fase pode reducirse ata os 14-19 días. Pasado este tempo a larvas pluteus fíxanse nun substrato adecuado, sofren unha metamorfose converténdose en individuos xuvenís de 0,3-0,4mm (C. F. Boudouresque & Verlaque, 2013) de vida bentónica.

Para que se produza este proceso de metamorfose, é necesario un contacto físico co substrato, o cal libera sinais bioquímicas que son captadas a través da rede neuronal sensorial das larvas, indicándolles que se atopan na presenza dun bo lugar para metamorfosearse e iniciar así o seu proceso de asentamento. De tal forma, que no caso de non existir estas sinais bioquímicas o asentamento non acontece (C. Boudouresque & Verlaque, 2007; Hadfield & Paul, 2001).

Dentro destas sinais químicas coñécense diferentes moléculas bioxénicas tales coma a histamina, ácido gama-aminobutírico, dopamina, serotonina ou incluso hormonas coma a tiroxina que poderían estar asociadas ao fenómeno de asentamento e que actualmente atópanse descritas como indutores do mesmo para diferentes especies de larvas de moluscos, hidrozoo e especies de equinodermos (Mos et al., 2011).

Actualmente, coñécense multitude de substratos que inducen ao asentamento dos ourizos de mar, os cales varían en eficacia dependendo da especie de ourizo. Entre eles podemos atopar substratos que non forman biopelículas como poden ser marcoalgas (*Sargassum linearifolium* (Turner) C. Agardh, 1820, *Corallina officinalis* Linnaeus, 1758, etc), microalgas (*Tetraselmis marina* (Cienkowski) R.E.Norris, Hori & Chihara, 1980, *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin, 1964, *Nitzschia* sp, etc), fondos de Maërl e outros que forman biopelículas (C. F. Boudouresque & Verlaque, 2013; Mos et al., 2011; Swanson et al., 2012).

Neste último caso, as biopelículas poden ser bacterianas ou estar formadas por diatomeas bentónicas onde podemos atopar gran número de especies como (*Nitzschia*

levis Frenguelli, 1923, *Halamphora coffeaeformis* (C. Agardh) Levkov, 2009, etc), ou por unha combinación de varias. Estas biopelículas poden ser monoespecíficas ou multiespecíficas. Baseándonos na nosa experiencia experimental previa, aquelas biopelículas multiespecíficas maduras de diatomeas bentónicas con alta capacidade tapizante, son as que presentan un porcentaxe de asentamento e supervivencia maior. É por iso que neste capítulo abordaremos o asentamento de *P. lividus* utilizando este tipo de biopelículas.

O período metamórfico é un proceso esencial na historia de vida de *P. lividus* e un colo de botella na obtención de xuvenís. Este período ten lugar inmediatamente despois da fase larvaria, dando lugar a aparición do individuo xuvenil e reúne todos os eventos para a transformación dun organismo peláxico nun bentónico. Estes eventos poden agruparse en tres etapas (Táboa 3):

- 1) Etapa competente, na que a larva adquire a capacidade de metamorfosearse e durante o cal busca un substrato adecuado no que establecerse.
- 2) Estadio metamórfico, no que a larva competente transfórmase nunha postlarva bentónica.
- 3) Postlarva, onde o individuo postmetamórfico, que aparece trala metamorfose, prepárase para o seu paso a xuvenil.

Táboa 3. Ciclo de vida de *P. lividus*. (Adaptada de (Gosselin & Jangoux, 1998)).

Tipo de vida	Período	Características	Alimentación	Duración
Peláxica	Embrionario	Fertilización ata larva de 4 brazos	Endotrófica	3 días
	Larvario	4-8 brazos	Exotrófica	15-18 días
Bentónica	Larva competente	Capacidade de realizar a metamorfose	Exotrófica	1-4 días
	Metamorfose	Cambio de forma	Endotrófica	1 hora
	Postlarva	Ontoxénese xuvenil	Endotrófica	Aprox. 8 días
	Xuvenil	Crecemento e diferenciación gonadal	Exotrófica	Aprox. 6 meses
	Adulto	Capacidade de producir gónada	Exotrófica	Hasta 9 anos

4. Método

4.1. Obtención e maduración de biopelículas

66

Para optimizar a indución do asentamento de larvas de *P. lividus* é necesario partir de biopelículas maduras de diatomeas tapizantes con gran capacidade de adherencia ó substrato proporcionado.

Estas biopelículas poden obterse partindo de:

1. Biopelículas de diatomeas do medio natural.
2. Biopelículas formadas nos tanques de cultivo de individuos xuvenís.
3. Algas de colección.

No caso das biopelículas do medio natural podemos obtelas no propio medio natural mediante raspado de estruturas maduras no medio, nun tanque da propia instalación ou filtrando auga de medio natural e introducíndoa nun tanque con auga de mar filtrada a 1 μm e esterilizada con luz ultravioleta (UV-FSW) e nutrientes.

Tamén podemos obter biopelículas en tanques de cultivo de ourizo alimentados con alga fresca. Esta biopelícula fórmase a partires das diatomeas epibiontes que medran sobre a superficie das algas coas que son alimentados formando un tapiz no propio tanque que pode servir de inóculo para os nosos tanques de asentamento.

Por último, dispoñer dunha colección de cultivos monoespecíficos de diatomeas bentónicas seleccionadas con alto poder tapizante e de indución ó asentamento e que servirán de inóculo para estruturas e tanques de asentamento.

En tódolos casos, é necesario preparar con tempo suficiente, tomar inóculos, deixar que estas se desenvolvan o suficiente para que formen de novo biopelículas nos recipientes de traballo co fin de obter un porcentaxe de asentamento o máis alto posible.

PRECAUCIÓNS

O feito de traballar con biopelículas procedentes do medio natural facilita a obtención das mesmas e reduce ao mínimo os costes. Sen embargo, a variabilidade de especies que forman estas biopelículas multiespecíficas é moi alta e pode cambiar ao longo do tempo e depende directamente das condicións oceanográficas da localidade.

5. Procedemento de obtención de biopelículas naturais

1. No caso das biopelículas do medio natural podemos obtelas de dúas maneiras diferentes:
 - 1) No propio medio natural, madurando estruturas non porosas como poden ser láminas de plástico nunha zona onde se dispoña dun contacto directo coa auga de mar no propio medio, como pode ser un pantalán ou nun tanque da propia instalación onde circule auga crúa ou filtrada por area.
 - 2) Filtrando auga de mar por 20 micras e usándoa como inóculo nun tanque con auga de mar filtrada con estruturas planas e medio de cultivo. Desta forma, pasado un tempo formarase unha biopelícula madura sobre estas láminas e paredes do tanque.
2. Cando se aprecie crecemento, a estrutura tapizada debe lavarse suavemente con auga doce sen cloro ou UV-FSW, co fin de eliminar aquelas algas menos tapizantes, as algas dinoflaxeladas que poidan afectar á saúde das nosas larvas, ou depredadores presentes no zooplancto e os seus ovos que poden tanto consumir o biofilm como provocar efectos nas propias larvas de ourizo.
3. Estes tanques e estruturas poden usarse directamente para a fixación ou escalar o cultivo a tanques maiores. Así, mediante raspado manual obter inoculos para os tanques onde se realizará a fixación. Hai que ter coidado de non traballar nunca en seco. O contido resultante deste raspado resuspéndese e fíltrase por un baruto cunha luz de malla de 20 μm .
4. As algas deben cultivarse en UV-FSW e medio de cultivo para microalgas como pode ser GOLDMEDIUM, AQUALGAE e silicatos. Para desenvolvementos experimentais que requiran un reconto de larvas asentadas, os recipientes poden ser transparentes e divididos en cuadrículas do mesmo tamaño, có fin de facilitar o reconto das larvas asentadas.
5. Durante a lo menos 15 días, os tanques con estruturas planas inoculados con microalgas e medio de cultivo déixanse crecer en circuíto pechado, a 18-20°C, 35 ‰ de salinidade, fotoperíodo de 16/8 e 100-3000 luxes de luz natural ou artificial mediante fluorescente cool day light 865 ou LED equivalentes. Realízase a renovación da auga cada 7 días e engadindo novo medio de cultivo tras unha limpeza suave das paredes.
6. Pasados eses 15 días, as biopelículas atópanse listas para engadir ás larvas competentes, listas para o proceso de asentamento.

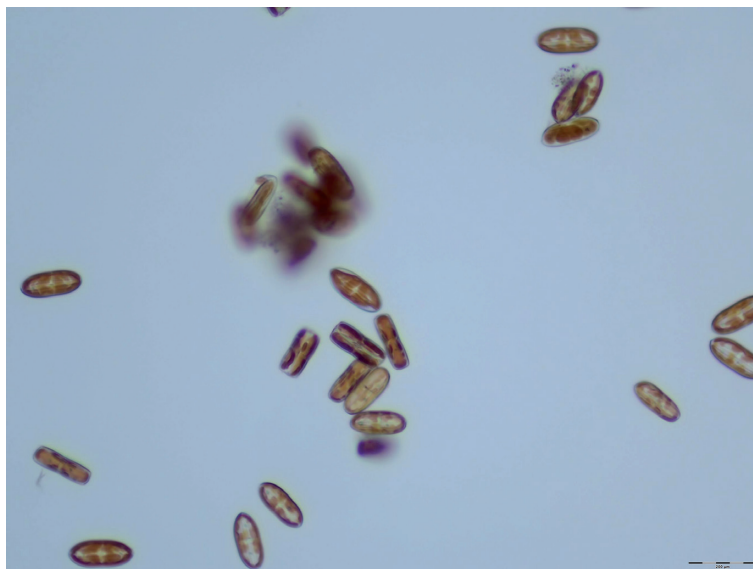


Figura 23. Diferentes especies de diatomeas bentónicas de orixe "natural".

A presenza maioritaria dunha ou doutras especie varía segundo a localidade, época do ano e condicións oceanográficas. Maioritariamente nun pantalan con mais hidrodinámica atopamos xéneros como *Achnanthes* e *Gyrosigma* entre outros (Fig.23), mentres que en crescendo en tanques aparecen xéneros como *Nitzschia* ou *Grammatophora*.

Para a obtención de biopelículas procedentes de cultivos monoespecíficos é necesario previamente illar diatomeas bentónicas procedentes de biopelículas naturais xeralmente mediante raspado, filtrado, homoxeneizado e dilucións seriadas en medio de cultivo.

Posteriormente, tanques con estruturas planas deben inocularse cunha ou varias das cepas procedentes da colección. O illamento e mantenza dun mix de cepas coñecidas pode permitir estandarizar o proceso.

5.1. Obtención de larvas competentes

A **obtención** de larvas competentes de ourizo de mar realízase mediante os procesos descritos no Capítulo 2-3 deste manual e acádase aproximadamente ós 18 días de cultivo coa aparición do rudimento. Neste momento as larvas posúen 8 brazos, teñen unhas 500 micras de lonxitude e 300 micras de ancho (Fig.24).

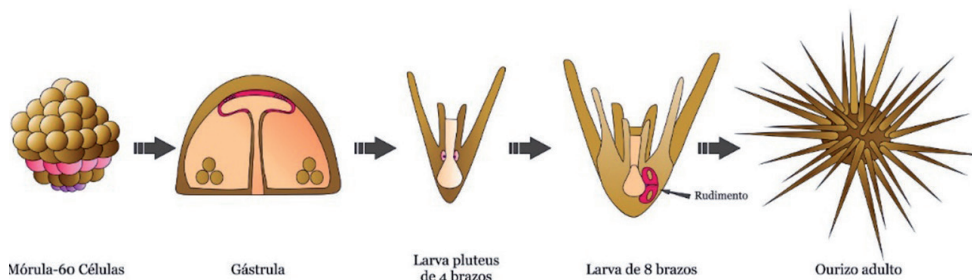


Figura 24. Desenvolvemento embrionario dende embrión a adulto de *P. lividus*. Imaxe inspirada en (Warner *et al.*, 2012).

A metamorfose consiste esencialmente na invaxinación do rudimento equiniano e a reabsorción da maior parte dos tecidos larvais. Terá lugar só despois dun recoñecemento positivo do substrato pola larva. Este proceso comeza ao mesmo tempo que a metamorfose e dura uns 30 minutos, a metamorfose completa aproximadamente 1 h, rematando coa formación dun individuo endotrófico xa denominado postlarva. A postlarva esférica presenta unha simetría radial, e precisará duns 8 días para adquirir todas as capacidades propias dun xuvenil (Fig.25).

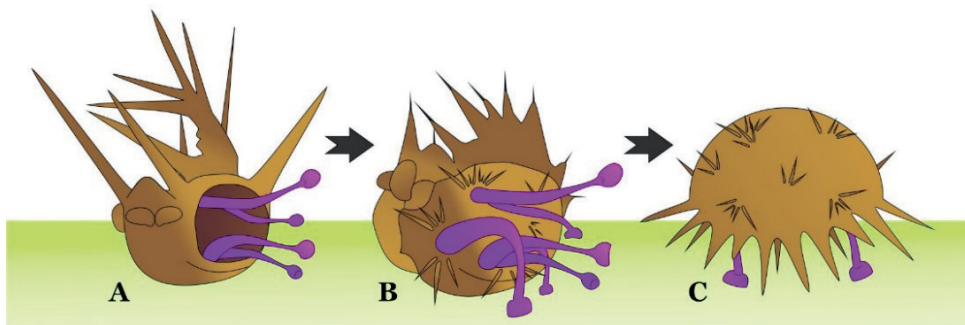


Figura 25. Metamorfose de *P. lividus*. Despois dun recoñecemento positivo do substrato (A), a larva abre o seu vestibulo, permitindo a saída do rudimento ó substrato (B), e transformándose en menos de 1 h nunha postlarva esférica (C). Imaxe inspirada en (Gosselin & Jangoux, 1998).

5.2. Asentamento larvario

- Tras a lo menos 15 días de maduración das biopelículas, substitúese a auga dos tanques de fixación por auga UV-FSW e finalmente introdúcense as larvas competentes, cunha densidade larvaria de 1,5 larvas/cm² (1-3 larvas/cm²).

- Os tanques deben estar nunha sala con temperatura controlada, con control opcional de fotoperíodo e iluminación. Durante os primeiros días recomendase manter (1) fluxo pechado con cambios de auga parciais ou totais cada varios días ou (2) manter ou circuito aberto cunha renovación do 5 %/h. Nesta segunda opción será necesario implementar uns filtros de 40 micras na saída do tanque e un sistema de dosificación de microalgas.
- Durante os primeiros días, mentres existan larvas nadadoras, mantense a mesma dieta microalgal que no cultivo larvario. Deste xeito as larvas aliméntanse "ad libitum" cunha dieta tetralgal, composta por *Tisochrysis lutea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Rhodomonas lens* e *Chaetoceros neogracilis*.
- A nivel experimental, ao cabo duns 15 días, analízase a porcentaxe de larvas asentadas, a porcentaxe de larvas nadadoras restantes, a porcentaxe de supervivencia total e a porcentaxe de mortalidade.

Como se pode apreciar na figura 26 as porcentaxes de asentamento están moi condicionadas pola composición da biopelícula, acadando valores de asentamento entre 14-69%. Ademais, pode observarse como aqueles biofilms multiespecíficos procedentes do medio natural (D1, D2 e D3), presentan unha maior porcentaxe de asentamento fronte aos monoespecíficos procedentes de coleccións (D4 e D5).

A mortalidade dáse tanto por un insuficiente estímulo de asentamento como posteriormente en postlarvas xa asentadas pero con insuficiente "competencia" para acadar o fase de xuvenil. Deste xeito a alimentación larvaria e a calidade das propias larvas ten unha gran importancia de cara a maximizar ambos procesos.

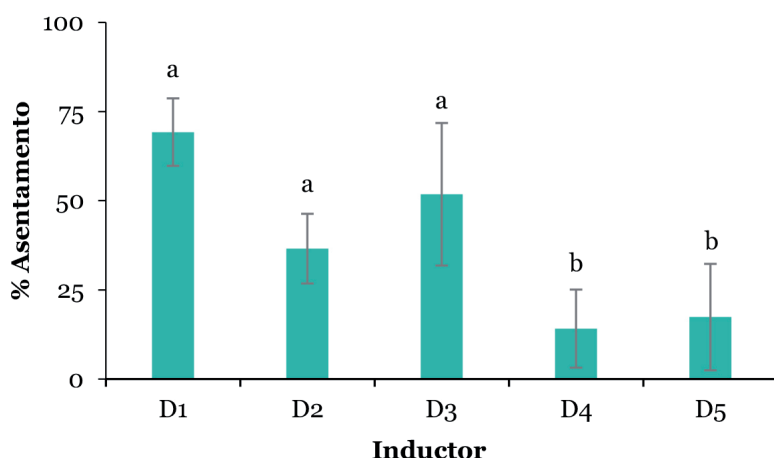


Figura 26. Diferentes porcentaxes de asentamento de larvas de *P. lividus* en relación ó tipo de inductor.

6. Parámetros xerais do cultivo

- **Temperatura:** A temperatura óptima no cultivo larvario está entre os 18-20 °C e debe controlarse diariamente. Para os tanques de asentamento a variación brusca de temperatura a valores de 25 ou **15°C** mellora a porcentaxe de asentamento significativamente con respecto a mantela nos mesmos valores de temperatura que no larvario, sendo xunto a unha biopelícula de calidade o factor mais relevante. Recoméndase un asentamento a 15°C. Unha vez conseguida a fixación volvese a subir a temperatura a valores que melloren o crecemento dos xuvenís.
- **Salinidade:** A salinidade óptima de **35 ppt**. A medida que a salinidade diminúe faíno tamén drasticamente o asentamento e supervivencia xa en valores de 30 ppt. Este parámetro inflúe na distribución dos ourizos no medio natural de xeito relevante.
- **pH:** para toda as fases de cultivo, o pH debe estar en valores propios do medio natural **entre 7,9 e 8,2**. Debe controlarse semanalmente.
- **Amonio:** O amonio pode presentar unha fracción tóxica, que segundo outros parámetros, principalmente o pH, variará nunha proporción maior ou menor. O **amonio total disolto non debe exceder os 0,5 ppm**. Debe medirse quincenalmente.
- **Fotoperíodo:** En xeral **non presenta influencia** no asentamento nos diferentes fotoperíodos testados entre 0 e 24 horas de luz (12/12, 24/0, 16/8 e 0/24), polo que pode manterse o fotoperíodo natural. Dado que debe manterse un biofilm en boas condicións recoméndase manter a lo menos un fotoperíodo 12:12.
- **Iluminación:** A intensidade luminosa debe manterse en valores cun **mínimo de 600 luxes**. A iluminación ten maior influencia na conservación do biofilm. En cambio, a partir do día 35 poden disporse intensidades ata os 200 luxes.

71



Figura 27. Tanques de fixación e asentamento de 400 L de capacidade para o cultivo de *P. lividus*.

7. Esquema xeral do proceso

72

CONDICIÓNS XERAIS	
DESCRICIÓN	A fase de asentamento comeza coa transferencia de larvas competentes a tanques novos con algún tipo de indutor. O asentamento é a fase de transición entre unha forma de vida libre, filtradora, planctónica ata unha forma de vida xuvenil e adulta bentónica, omnívora.
LUGAR-SALA	Adecuada segundo as condicións descritas necesarias para a fase do cultivo onde xeralmente debemos dispor de caixas/tanques de formas e tamaños variados onde se maximice a relación superficie/volume mediante o uso de estruturas (Fig.27).
NºLARVAS	Segundo as necesidades.
ORIXE LARVAS	Da fase de cultivo larvario.
IDADE INICIO	18-21 DDF.
Nº TANQUES	Segundo as necesidades de produción. Aumentar a relación superficie volume ó máximo posible mediante placas ou laminas onduladas.
TIPO TANQUES	Material: PEAD, PP ou fibra de vidro. Volume: 0,1-0,5 m3. Forma: xeralmente plana. Saída: central ou con desbordamento lateral superficial. Cor: indiferente.
DENSIDADE	1 a 3 larvas/cm2.
NºLARVAS/ TANQUE	Segundo área de asentamento.
FLUXO DE AGUA	Fluxo: inicialmente pechado e aberto unha vez finalice a fase postlarvaria. Entrada: superficial. Filtrado: ata 1 micra e esterilización con UV (20-30 mJ/cm2). Renovación ata 100% volume do tanque por día segundo necesidades do cultivo.
AIREACIÓN	Subministro de aire seco filtrado a 0,22 micras na fase de circuito pechado.
DESTINO	Segundo necesidades: investigación, repoboación, etc.

PARAMETROS (SISTEMA MEDICIÓN, FRECUENCIA)	
OSÍXENO	Manter entre 5-9 ppm. Medición 1 por semana.

TEMPERATURA	Recomendase un asentamento a 15°C. Unha vez conseguida a fixación volverase a subir a temperatura a 18-20°C.
SALINIDADE	35 ppt.
FOTOPERIODO	12/12 (luz/escuridade).
pH	Natural, entre 7,9 e 8,2.
AMONIO	Control en circuíto pechado. Valores recomendados de 0 ppm.
TIPO LUZ E INTENSIDADE	Temperatura: 6500-7000° Kelvin. Intensidade: 600 luxes.

PREPARACIÓN DA BIOPELÍCULA	
TANQUES	Tanques planos con estruturas que xeren unha elevada relación superficie/volume. Medio de cultivo e auga.
INÓCULO	Raspado de superficies, lavado, filtrado 20 micras e selección de comunidades con especies moi adherentes.
TEMPERATURA	18-20°C.
SALINIDADE	35 ppt.
FOTOPERIODO	18/6 (luz/escuridade). Cool day light865 ou LED equivalente.
pH	Natural, entre 7,9 e 8,2.
XERAL	Baleirado e lavado suave do tanque ós 7 días.

ALIMENTO	
MICROALGAS	Os tanques de asentamento manteñen as condicións de alimentación do cultivo larvario, a lo menos mentres haxa larvas planctónica, o que pode adiarse 1-2 semanas.
BIOFILM	Biofilm non só facilita o asentamento senón que será o primeiro alimento unha vez comeza a alimentación exóxena.
MACROALGAS	Inicialmente subministramos <i>Ulva spp</i> viva, lavada con auga doce. Posteriormente os xuvenís son alimentados con <i>Saccorhiza polyschides</i> (Lightfoot) Batters, 1902.

74

HIXIENE E PROFILAXE	
SALA E MATERIAIS	A sala debe ter unha cubeta de desinfección para o material. A entrada da sala ten que ter un pediluvio con desinfectante. A sala debe ser desinfectada unha vez por semana (chan e canaletas).
TANQUES	Os tanques deben ser sifonados segundo as necesidades. Normalmente, o sifonado semanal unha vez comezan a alimentarse de microalgas e cada 2 días cando a alimentación é intensa. Retirando detritos e restos de algas.
OUTROS	As macroalgas subministradas vivas despois do inicio da alimentación con macroalga, como o caso da <i>Ulva</i> spp deben lavarse con abundante auga doce e manterse viva en tanques de auga a 1 micra.
XERAL	Debe establecerse un PROGRAMA DE LIMPEZA E DESINFECCIÓN

COIDADOS E MANEXO
• O día da sementeira dos tanques de asentamento, as larvas deben ser homoxeneamente repartidas no tanque e usando un punto de aireación débese impedir a formación de agrupación de larvas en superficie. O obxectivo é ter as larvas o mellor repartidas polo tanque, retirando posteriormente a aireación ou deixándoa reducida ó máximo posible. • Cada 2 días subministrar microalgas cunha dieta igual á do cultivo larvario. • Diariamente, debemos observar o número de larvas nadadoras e o seu comportamento. • Diariamente, debemos observar o estado do fondo e paredes do tanque. • Nesta fase, débese evitar unha excesiva carga de alimento non inxerido no fondo do tanque. Progresivamente as larvas deixan de comer a dieta de microalgas, polo que a súa adición vaise retirando progresivamente.

8. Bibliografia

- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2013). Chapter 21—*Paracentrotus lividus*. En J. M. Lawrence (Ed.), *Sea Urchins: Biology and Ecology* (Vol. 38, pp. 297-327). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00021-6>
- Boudouresque, C., & Verlaque, M. (2007). Chapter 13 Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 37, 243-285. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(07\)80077-9](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(07)80077-9)
- Cirino, P., Ciaravolo, M., Paglialonga, A., & Toscano, A. (2017). Long-term maintenance of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in culture. *Aquaculture Reports*, 7, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.04.003>
- Gosselin, P., & Jangoux, M. (1998). From competent larva to exotrophic juvenile: A morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoida). *Zoomorphology*, 118(1), 31-43. <https://doi.org/10.1007/s004350050054>
- Hadfield, M. G., & Paul, V. J. (2001). *Natural Chemical Cues for Settlement and Metamorphosis of Marine-Invertebrate Larvae*.
- Mos, B., Cowden, K. L., Nielsen, S. J., & Dworjanyn, S. A. (2011). Do Cues Matter? Highly Inductive Settlement Cues Don't Ensure High Post-Settlement Survival in Sea Urchin Aquaculture. *PLOS ONE*, 6(12), e28054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028054>
- Privitera, D., Noli, M., Falugi, C., & Chiantore, M. (2011). Benthic assemblages and temperature effects on *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* larvae and settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(1), 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.030>
- Swanson, R. L., Byrne, M., Prowse, T. A. A., Mos, B., Dworjanyn, S. A., & Steinberg, P. D. (2012). Dissolved histamine: A potential habitat marker promoting settlement and metamorphosis in sea urchin larvae. *Marine Biology*, 159(4), 915-925. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1869-2>
- Warner, J., Lyons, D., & McClay, D. (2012). Left-Right Asymmetry in the Sea Urchin Embryo: BMP and the Asymmetrical Origins of the Adult. *PLoS biology*, 10, e1001404. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001404>

Capítulo 05

Crecemento dos xuvenís nos primeiros meses

77

Estefanía Paredes e Damián Costas

1. Obxecto

O presente capítulo describe a metodoloxía utilizada na ECIMAT-CIM-UVigo para levar a cabo o cultivo de semente ata os 15-20 mm en laboratorio e o seguimento do crecemento no primeiro ano de vida do Ourizo de Mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).

2. Medios materiais

- Sala de cultivo.
- Andeis de cultivo.
- Liña de Auga de mar a 15-18°C, filtrada a 1 μ absoluta e desinfectada mediante UVC.
- Tanques de semente e outros recipientes de cultivo (xerras, material de vidro, etc.) de diferentes volumes.
- Cestas con laminas onduladas e planas de plástico.
- Pediluvios, baños para material.
- Sifón.
- Barutos de varios tamaños.
- Calibre.

3. Fundamento teórico

Cóñecer o crecemento das especies na acuicultura é fundamental. Comprender as taxas de crecemento das especies acuáticas axuda aos acuicultores a optimizar os seus sistemas de produción, axuda a estimar o tempo e os recursos necesarios para levar un cultivo ao tamaño do mercado. Esta información é esencial para a planificación financeira e as decisións de investimento.

Tamén é crucial para o axuste de cantidades de alimentación e redución do desperdicio. Planificación temporal das colleitas, posible selección xenética de individuos de rápido crecemento entre outras.

En resumo, comprender o crecemento das especies na acuicultura é fundamental para unha produción eficiente e sostible, viabilidade económica e xestión responsable dos recursos na acuicultura.

A taxa de crecemento dos ourizos de mar como xuvenís pode variar significativamente dependendo de varios factores, incluíndo especies, condicións ambientais, dispoñibilidade de alimentos e temperatura. As taxas de crecemento adoitan medirse en termos de tamaño ou aumento de peso durante un período de tempo específico (Azad et al., 2010; Lawrence, 2020).

Dado que o crecemento é moi variable e depende de moitos factores, é de esperar que será variable tamén segundo as condicións de cría, o crecemento dos xuvenís libres no mar e o crecemento nunha instalación de acuicultura en interior ou en exterior.

4. Sistema de cultivo

Unha vez finalizada a fixación, individuos xa con alimentación con macroalgas e talle superior ós 2 mm poden desdobrase ou trasladarse a tanques de semente onde alimentalos ata a saía ó mar estimada uns 15-20 mm, xa sexa para repoboación ou continuar o engorde en sistemas suspendidos. Estes tanques poden ser de diferentes tipos e formas, fomentando a eliminación de feces e facilitando o subministro de alimento. Existen tanques cónicos, en cuña, en andeis con pouca columna de auga ou de fondo plano onde se segue a maximizar a superficie/volume mediante placas que maximicen a relación superficie/volume (Fig.28). A densidade de cultivo adoita ser alta con 400-1000 individuos/m² sen problemas no cultivo. Dada a dispersión de tamaños que temos a clasificación manual nestas talles facilita o manexo homoxéneo dos lotes.

A alimentación realízase xeralmente con *Saccorhiza polyschides* (argazo bravo ou golfo) que é unha alga parda moi común na costa atlántica. As algas poden recollese periodicamente e manter conxeladas en bolsas.

As principais tarefas nesta etapa radican na alimentación e limpeza dos tanques. A figura 27 suxire varios tipos de tanques para facilitar o fluxo de auga, acceso ao alimento e facilidade de limpeza.

En canto ós parámetros xerais de cultivo, tratase dun cultivo en circuíto aberto onde as características da auga deben ser similares en salinidade, pH, amonio ás naturais, debese manter as condicións previas de filtración + UV, a temperatura está en 20 ± 1 °C e debe controlarse diariamente. A intensidade de luz debe ser baixa con menos de 200 lux e o fotoperíodo corto de menos de 12 horas que facilita a alimentación, se ben se a instalación non dispón de control de iluminación ou está en invernadoiros non é un factor, ata o de agora, relevante ou limitante.

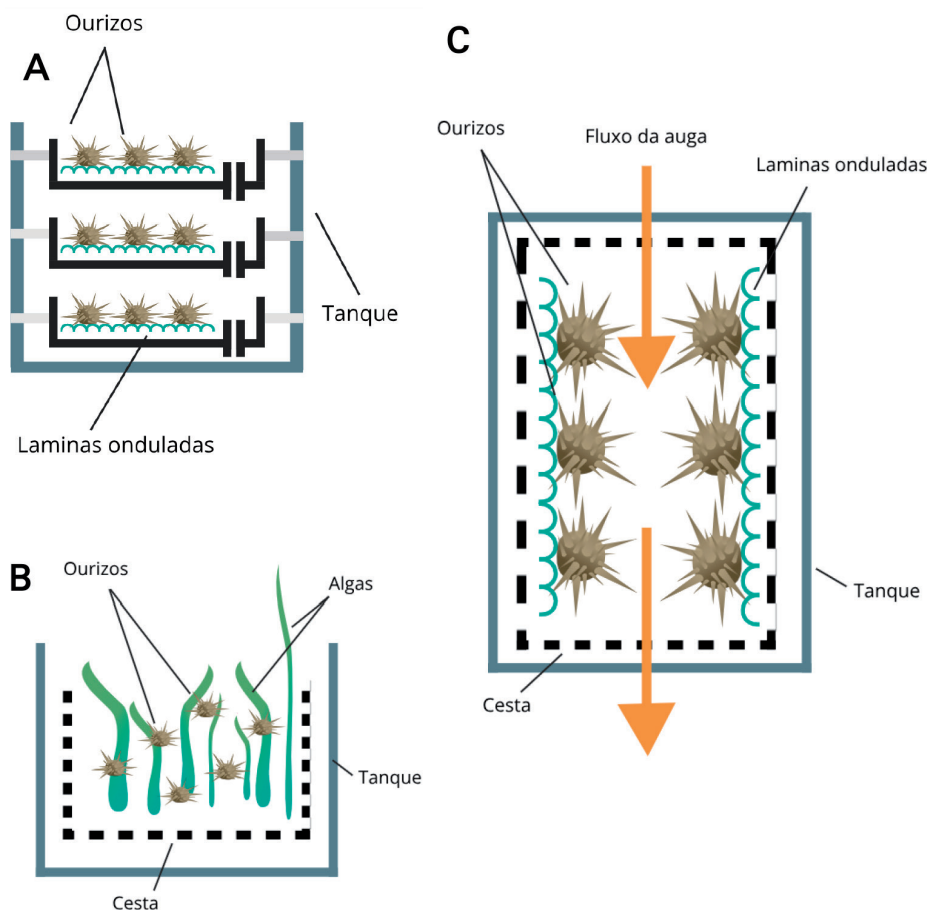


Figura 28. Esquema de diferentes tanques de cultivo. (A) tanque de cultivo cos ourizos a tres alturas distintas. (B) Cultivo de ourizos en cesta. (C) Cultivo de orizo en cesta combinado con RAS.

80

Existen gran número de proxectos nos que se están a traballar dietas secas, húmidas ou semihúmidas que permiten, aumentando el valor nutricional das algas especialmente con maior porcentaxe de proteína, reducir os tempos para producir xuvenís aptos para repoboación en máis dun 35% respecto a alimentación con macroalgas (Besada et al., 2022). Outros traballos redundan na substitución prometedora de alimento por hortalizas de terra subprodutos da industria agrícola contribuíndo á economía circular sostible (Santos et al., 2020). Finalmente as dietas que buscan incremento de gónada tamén son posibles. A dispoñibilidade dunha dieta formulada, balanceada para mellorar crecemento ou gónada é un dos retos da equinicultura como candidata a un novo tipo de acuicultura, non só orientada á produción de xuvenís para repoboación e recuperación de bancos senón tamén para outros tipos de sistemas suspendidos, RAS, multitróficos, etc.

5. Método

5.1. Taxa de crecemento no laboratorio nos primeiros meses

Durante os cultivos larvarios realizáronse medidas de submostras para facer un seguimento do crecemento dos xuvenís do ourizo durante un cultivo en laboratorio en condición de alta densidade.

Os ourizos xuvenís criáronse en tanques de 400 litros divisións internas mediante láminas plásticas planas ou onduladas para maximizar a relación superficie/volume no cultivo, onde se alimentaban "*ad libitum*" con macroalgas pardas (Fig.29). Durante os primeiros sete meses de crecemento, unha submostra de cen individuos. Segundo se mostra na Fig.29 o rango de crecemento foi de 4,6 mm a 12,5 mm.

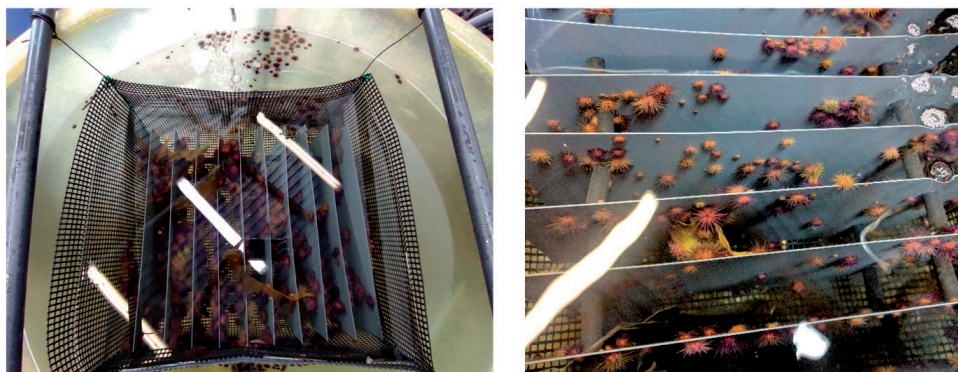


Figura 29. Sistema de engorde de alta densidade en tanques.

Taxa de crecemento (G) calculada coma o crecemento en diámetro (mm) durante un período de tempo (t). Onde G_f é a media do diámetro de testa e G_i é o diámetro medio inicial:

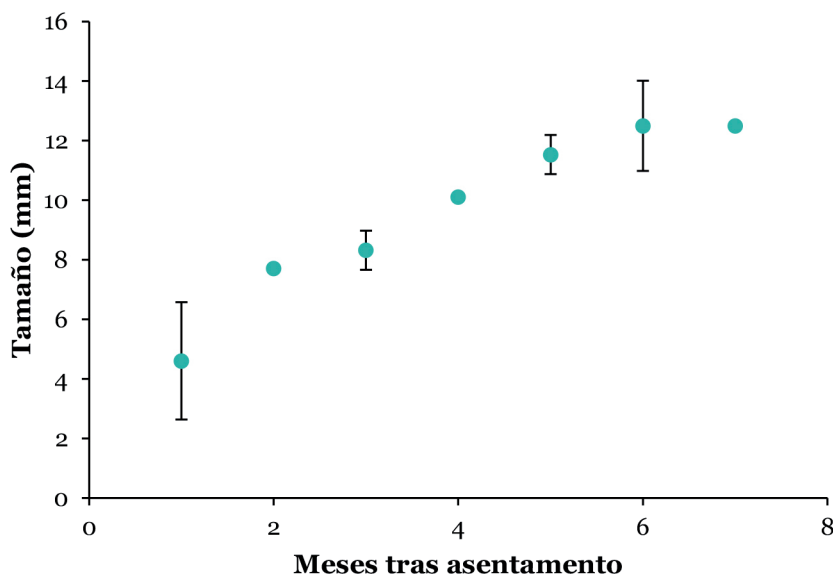


Figura 30. Datos de tamaño (Diámetro) ao longo do tempo durante 3 experimentos diferentes, $n=100$.

Nestes experimentos de engorde de xuvenís en alta densidade no laboratorio a taxa de crecemento é de 0,04mm/día ou aproximadamente 7,2 mm nos primeiros 6 meses (Fig.30). Segundo resultados publicados ao longo dos anos é posible atopar de 0,6 a 5,0 mm de crecemento nos primeiros 6 meses no mar (Suarez et al., 2021) pero depende moi fortemente de factores coma a temperatura, a cantidade e calidade do alimento, e a depredación entre outros factores.

Observouse dende os primeiros meses tras o asentamento (Fig.31) unha clara dispersión de tamaño dos individuos que nos levou a estudar con detemento este fenómeno antes das soltas de repoboación.

5.2. Dispersión do tamaño nas poboacións cultivadas en alta densidade

Realizamos un estudo da dispersión de tamaño dos xuvenís de ourizo de mar obtidos no laboratorio antes ser liberados ao mar durante as iniciativas de repoboación do proxecto OCIMER cunha idade de 9 meses en cultivo.

A metodoloxía de mostraxe consistiu na recolección duns 10.000 ourizos xuvenís que estaban en tanques de engorde, todos foron recollidos e colocados nunha caixa da cal se retirou unha mostra aleatoria e colocouse nunha bandexa con auga para medir en serie o diámetro de 150 ourizos ao azar. Este proceso repetiuse aleatoriamente catro veces en diferentes zonas da caixa (cada ronda está sinalada nunha cor diferente) e comprobouse visualizando a dispersión de datos que a serie incluía todos os tamaños (Fig.31).

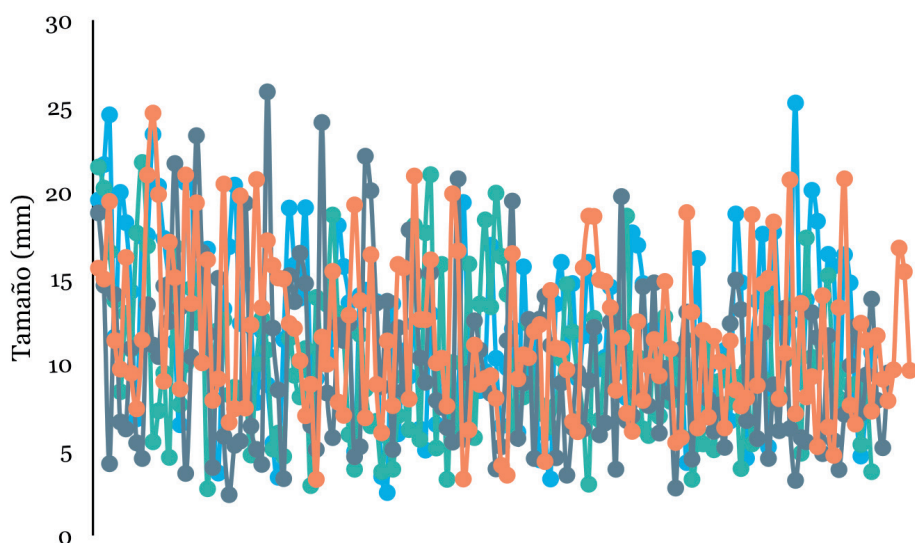
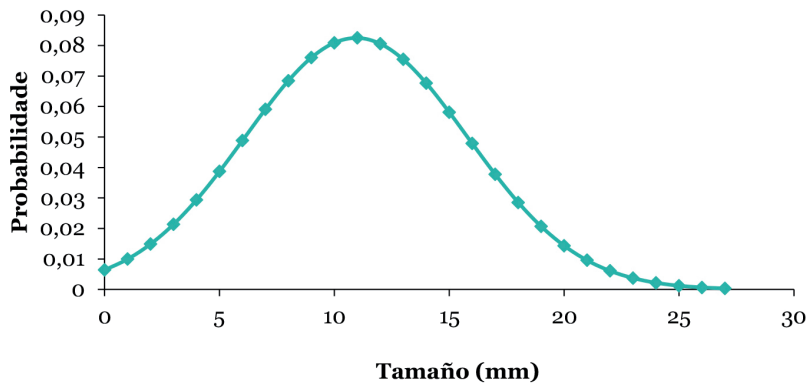
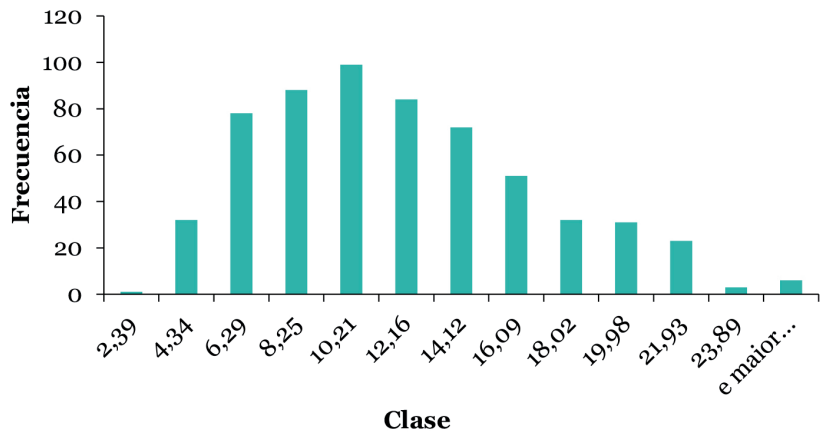


Figura 31. Gráfica de dispersión de tallas dos xuvenís obtidos $n=150$ para cada mostraxe (4 mostraxes).

Como se pode ver na gráfica 31 as mostraxes aleatorias recolleron una amplitude de rango de tamaños considerable e consistente nas catro mostraxes. Dende individuos de 3 a 25 mm de diámetro a partir dun mesmo cultivo larvario e mantidos en engorde de alta densidade (Fig.29).

Para analizar a distribución de tamaños na poboación realizáronse histogramas de frecuencias de talla, resultado nunha mediana de 8,25 mm e moda de 10,20mm de diámetro para xuvenís de 7/8 meses de idade.



	Clase	Frecuencia
Mediana	8,25	88
Moda	10,20	99

Figura 32. Histograma de frecuencias das tallas dos xuvenís obtido, así coma a mediana e a moda. O número de intervalos foi determinado seguindo o método de Sturges e a amplitude dos intervalos calculada coma: $w=(\text{Núm.maior} - \text{Núm.menor}) / \text{Núm.Intervalos}$.

Pode verse que o histograma de frecuencias da figura 32, coma este non é simétrico, a distribución de tamaños dan un nesgo positivo (cara as tallas maiores). A distribución é unimodal, cunha mediana de 8,3 mm, moda de 10,2 mm e media de 10,9 mm. Esta dispersión de tamaños é posibelmente en parte causa das condicións de cultivo

en alta densidade, pero ven tamén determinada polo cultivo dunha especie salvaxe en condicións de laboratorio. Este é un fenómeno ben coñecido na acuicultura de peixes, a ampla variabilidade xenética dunha poboación salvaxe que non ten sido domesticada en cultivo, xera dispersión das características fenotípicas do organismo, que co tempo serán seleccionadas en cultivo, xeración tras xeración até reducir a dispersión nos caracteres de interese, coma crecemento ou cor (Teletchea, 2021). Estes datos pertencen ás mostraxes correspondentes aos 9 meses de idade dando unha talla media de 11 mm de diámetro, a cal se corresponde cunha taxa media de crecemento de 0,03 mm/día, similar ao rexistrado durante o seguimento dos outros cultivos larvarios asentados neste proxecto e cultivados en similares condicións.

5.3. Condicións de densidade en cultivo

Sen embargo, quixemos coñecer a taxa de crecemento de individuos asentados tras un cultivo larvario, previamente seleccionados por un tamaño de 2 mm durante un cultivo de un ano de duración en condicións de baixa densidade e alimentación *ad libitum* (Fig.31).

Neste caso 90 ourizos de mar foron mantidos en caixas de 50L, en circulación aberta a 18°C durante un ano en 3 caixas de n=30. A alimentación baseouse en algas pardas frescas *ad libitum* e o tamaño rexistrouse de forma periódica cada 3 meses.

O resultado amosou unha taxa de crecemento de 0,1 mm/día; moito maior ca obtida nos nosos estudos previos (Fig.33) e nos estudos de (Rey-Méndez et al., 2015) (taxa de crecemento de 0,04mm/día).

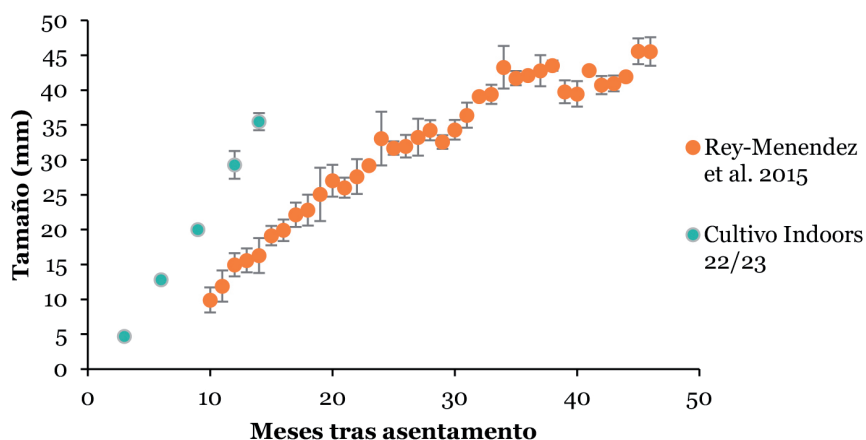


Figura 33. Crecemento de xuvenís de ourizo de mar producidos durante o proxecto OCIMER plus na ECIMAT comparados con datos bibliográficos representados dende Rey-Menendez et al, 2015 de cultivo en batea.

Finalmente, a dispersión do tamaño é relativamente baixa ao longo do ano de cultivo, dado a nosa pre-selección de ourizos de 2 mm para comezar o experimento, aumentando lixeiramente co tempo, pero menor á comunmente reportada na bibliografía. A taxa de mortalidade en cultivo durante este ano foi en media do 22%.

A talle de primeira madurez nos ourizos de mar mostra unha variación dende os 20,4 ate os 27,9 mm (Ouréns, 2013) deste xeito individuos subadultos en talle previa á repoboación inverten toda a súa enerxía en crecemento somático, mentres que unha vez acadada a madurez o seu crecemento faise máis lento dado que a maior parte da enerxía destinarase á maduración gonadal.

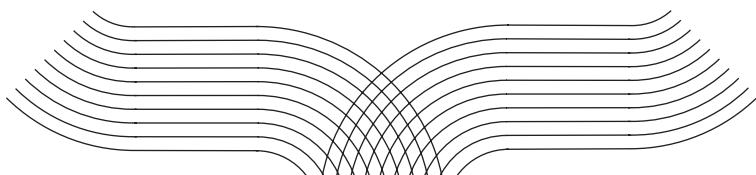
6. Bibliografía

- Azad, A. K., McKinley, S., & Pearce, C. M. (2010). Factors influencing the growth and survival of larval and juvenile echinoids. *Reviews in Aquaculture*, 2(3), 121-137. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01030.x>
- Besada, N. T., Rosendo, E. P., & Costas, D. C. (2022). Comparison of the Effectiveness of Different Tags in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Biodiversity of Ecosystems*, 2022, ISBN 1-83969-488-2, Págs. 93-103, 93-103. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8979084>
- Lawrence, J. M. (Ed.). (2020). Series Page. En *Sea Urchins: Biology and Ecology* (Vol. 43, p. ii). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.09991-1>
- Ouréns, R. (2013). *Estrategia vital y dinámica poblacional del erizo "Paracentrotus lividus"*.
- Rey-Méndez, M., Touron Besada, N., Rodríguez-Castro, B., Rama-Villar, A., Fernández-Silva, I., González-Henríquez, N., Martínez, D., Ojea, J., & Catoira, J. (2015). Crecimiento y mejora del índice gonadal en el cultivo del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Echinoida: Echinidae) en Galicia (España). *Revista de biología tropical*, 63, 261-272.
- Santos, P. M., Ferreira, S. M., Albano, P., Raposo, A., Costa, J. L., & Pombo, A. (2020). Can artificial diets be a feasible alternative for the gonadal growth and maturation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)? *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(2), 463-487.
- Suarez, J. D. U., Wong, J. C. Y., Lui, G., Dumont, C. P., Qiu, J.-W., & Ganmanee, M. (2021). Seasonal Growth of the Purple Sea Urchin *Heliocidaris crassispina* Revealed by Sequential Fluorochrome Tagging. *Zoological Studies*, 60. <https://doi.org/10.6620/ZS.2021.60-38>
- Teletchea, F. (2021). Fish domestication in aquaculture: 10 unanswered questions. *Animal Frontiers: The Review Magazine of Animal Agriculture*, 11(3), 87. <https://doi.org/10.1093/af/vfab012>

Os Autores e Editoras queren agradecer as fontes de financiamento da investigación presentada neste manual.

Os datos experimentais mostrados aquí foron, en parte, obtidos durante a realización dos proxectos "OCIMER: Optimización del cultivo integral del erizo de mar (*Paracentrotus lividus*)" e máis "OCIMER+ - Enfoque holístico para el cultivo y conservación de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)" ambos financiados no marco Pleamar da Fundación Biodiversidade.

Estefania Paredes contou con financiación Juan de la Cierva de Incorporación e Ramón y Cajal do Ministerio de Ciencia, Innovación e Universidades durante a obtención dos datos e a publicación deste manual.



Manuais

Serie de manuais didácticos

Últimas publicacións na colección

Problemas de Ocenografía Física: Ejercicios resueltos con y sin solución numérica (2024)

Gabriel Rosón Porto

Pensamento, sociedade e cultura. A relevancia da filosofía na educación (2024)

Abraham Rubín Álvarez e Brais González Arribas

Problemas de estruturas de barras. 50 Exercicios resoltos paso a paso (2024)

Manuel Cabaleiro Núñez, Borja Conde Carnero,
José Carlos Caamaño Martínez e Belén Riveiro
Rodríguez

MAReMÁTICAS. Contidos matemáticos para os estudos universitarios de Ciencias (2024)

Manuel Besada Moráis, F. Javier García Cutrín,
Miguel Ángel Miras Calvo, María del Carmen
Quinteiro Sandomingo e Carmen Vázquez Pampín

Modelado e Simulación de Sistemas Biomédicos (2024)

Alejandro Fernández Villaverde



Manual de cultivo e asentamento do ourizo de mar

Paracentrotus Lividus

O cultivo dos ourizos de mar é un tema de actualidade na comunidade da bioloxía mariña e acuicultura. Este manual poderá servir de referencia e de fonte de inspiración para quen queira aprender máis sobre a bioloxía xeral dos ourizos de mar grazas a coñecementos actualizados, ex-

plicados de forma moi detallada pero docente que permitirá a estudantes, investigadores e membros da cadea extractiva e comercializadora acceder a información actual, coas últimas tecnoloxías obtida de dous proxectos investigación recentes realizados na Universidade de Vigo.

Servizo de Publicacións

Universidade de Vigo

