

Experimentació en el cultiu de juvenils de nàiade allargada (*Unio mancus* Lamarck 1819) en condicions de laboratori

Estudiant: Núria Coma Leal

Grau en Biologia

Correu electrònic: u1911090@campus.udg.edu

Tutor: Anna Maria Romaní Cornet

Cotutor: Miquel Campos Llach

Empresa / institució: Consorci de l'Estany, Banyoles

Vistiplau tutor i cotutor:

Nom del tutor: Anna Maria Romaní Cornet

Nom del cotutor: Miquel Campos Llach

Empresa / institució: Consorci de l'Estany

Correu(s) electrònic(s): anna.romani@udg.edu

mcampos@consorcidelestany.org

RESUM

Les nàïades d'aigua dolça (Mollusca, Bivalvia, Unionoidea) són un dels grups més amenaçats a Catalunya, de manera que la seva cria en captivitat s'ha establert com la principal eina de conservació. El projecte LIFE Potamo Fauna treballa en la conservació de les poblacions de nàïades als rius de Girona a partir d'un procediment de cria en captivitat basat en tres passos: obtenció de gloquidis de les femelles reproductores, infestació a peixos hoste i cria i engreix del juvenils.

L'objectiu d'aquest treball és conèixer quina és la millor estratègia per a la cria i l'alimentació dels juvenils d'*Unio mancus* Lamarck, 1819 al laboratori, a partir dels valors de creixement i supervivència de dos mètodes de cria diferents.

Al primer mètode els juvenils van ser alimentats amb tres tipus d'aliments (basats en combinacions d'algues i detritus) i cinc dosis algals diferents, dins de recipients de vidre amb 500 ml d'aigua durant un període de 40 dies. Als 15 primers dies, els resultats mostren un major creixement en resposta a un tipus d'alimentació basada en un mix de les següents algues: *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chuii* i *Phaeodactylum tricornutum*, tot i que l'alta mortalitat dels juvenils degut a la presència incontrolada de factors externs a l'experiment ha fet que no es pugui comprovar si la resposta continua més enllà dels 15 dies. Afegir detritus a la dieta, per contra, provoca una disminució del creixement dels juvenils.

Al segon mètode es va dissenyar un sistema tancat d'aqüicultura on els juvenils es disposaven en tres tractaments diferents segons la velocitat de recirculació de l'aigua (alta, baixa o nul·la) i amb el mateix tipus d'alimentació. Els tractaments amb recirculació alta i baixa mostren grans mortalitats als 40 dies degut a l'efecte conjunt de la recirculació d'aigua i la ventilació del medi.

S'ha comprovat que el millor mètode per a la cria de juvenils d'*Unio mancus* al laboratori és un sistema d'aqüicultura sense recirculació, on els juvenils han mostrat els majors creixements ($1.432,17 \pm 136,6 \mu\text{m}$) i les majors supervivències ($57,5 \pm 15,26\%$) als 60 dies.

Es demostra que el mètode més efectiu per al cultiu de juvenils és aquell que presenta una dieta algal específica per l'espècie i una bona qualitat de l'aigua i del medi de cultiu.

RESUMEN

Las náyades de agua dulce (Mollusca, Bivalvia, Unionoidea) son uno de los grupos más amenazados de extinción en Catalunya. Por esa razón, la cría en cautividad ha prevalecido como la principal herramienta de conservación. El proyecto LIFE Potamo Fauna trabaja para la conservación de las poblaciones de náyade en los ríos gerundenses a partir de un protocolo de cría en cautividad basado en tres pasos: obtención de gloquidios de hembras reproductoras, infestación a peces huéspedes y cría y engorde de los juveniles.

El objetivo de este trabajo es conocer cuál es la mejor estrategia para la cría y alimentación de los juveniles de *Unio mancus* Lamarck, 1819 en el laboratorio, a partir de valores de crecimiento y supervivencia de dos métodos de cría diferentes.

En el primer método los juveniles fueron alimentados con tres tipos de alimentos (basados en combinaciones de algas y detritus) y cinco dosis de algas diferentes, dentro de recipientes de cristal con 500 ml de agua durante un periodo de 40 días. A los 15 primeros días, los resultados muestran un mayor crecimiento de juveniles en respuesta a un tipo de alimentación con las siguientes algas: *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chuii* y *Phaeodactylum tricorutum*. No obstante, la elevada mortalidad de los juveniles a causa de factores externos incontrolados no permite corroborar si la respuesta continúa más allá de los 15 días. Por contra, la adición de detritus en la dieta provoca una disminución del crecimiento de los juveniles

En el segundo método se diseñó un sistema cerrado de acuicultura donde los juveniles se mantenían en tres tratamientos diferentes según la velocidad de recirculación del agua en el sistema (alta, baja o nula) y con el mismo tipo de alimentación. Los tratamientos de alta y baja recirculación muestran grandes mortalidades a los 40 días como consecuencia de la propia recirculación del agua y la ventilación del medio.

Se ha comprobado que el mejor método de cría de juveniles de *Unio mancus* en el laboratorio es un sistema de acuicultura sin recirculación, donde los juveniles han alcanzado los mayores crecimientos ($1.432,17 \pm 136,6\mu\text{m}$) y supervivencias ($57,5 \pm 15,26\%$) en los 60 días.

Se demuestra que el método más efectivo para el cultivo de juveniles es aquel que presenta una dieta específica para la especie y una buena calidad del agua y del medio de cultivo.

ABSTRACT

Freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia, Unionoidea) are one of the most threatened animal groups in Catalonia. Therefore, artificial culture establishes itself as a very important tool for their conservation. LIFE Potamo Fauna works for the conservation of freshwater mussels in Girona's rivers from a captive breeding program carried out in three steps: obtain glochidia from breeding females, infestation of host fish and breeding and fattening of juveniles.

The aim of this paper is to understand what is the best rearing and feeding strategy of juveniles mussels *Unio mancus* Lamarck, 1819 in the laboratory from growth and survival values of two different breeding methods.

In the first experiment juveniles were fed with three different diets (based on combinations of algae and detritus) and five different food doses and put inside glass containers with 500 ml of water during a period of 40 days. In the first 15 days, results shown a major growth of juveniles in response to a diet based on different algae: *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chuii* and *Phaeodactylum tricornutum*. However, high mortality due to uncontrollable external factors, make impossible to know if this results occur along experimental days. Feeding juveniles with detritus, however, decrease growth values.

In the second experiment we breed juveniles in a closed aquaculture system with three different treatments based on water recirculating speed (high, low or null) and with the same kind of diet. Treatments with high and low recirculation shown major mortalities in 40 days due to the effect of both the recirculation of water and the aeration.

We determined that the best way to breed juveniles of *Unio mancus* indoor is an aquacultural system without water recirculation, where juvenile mussels showed the most favorable growth ($1.432,17 \pm 136,6\mu\text{m}$) and survival values ($57,5 \pm 15,26\%$) at 60 days.

It can be concluded that the most effective method for breeding juveniles is the one with the best algae formulation for the species studied and excellent qualities of water and culture environment.

ÍNDEX

	Pàg.
I. INTRODUCCIÓ	2
II. OBJECTIVES	5
III. METODOLOGIA	
III.a. Obtenció de juvenils	
<i>Material d'estudi</i>	5
<i>Infecció de peixos amb gloquidis</i>	6
<i>Obtenció de juvenils</i>	6
III.b. Seguiment de juvenils amb aplicació diferencial d'aliment i d'addició de detritus	
<i>Preparació de l'alimentació</i>	8
<i>Protocol experimental</i>	9
III.c. Seguiment de juvenils amb diferents tractament de recirculació d'aigua	
<i>Disseny de recirculació de l'aigua</i>	10
<i>Preparació de l'alimentació</i>	11
<i>Càlcul de fluxos</i>	11
<i>Protocol experimental</i>	12
III.d. Anàlisi de dades	12
IV. RESULTATS	
IV.a. Aplicació diferencial d'aliment i d'addició de detritus	
<i>Taxes de creixement i supervivència dels juvenils</i>	15
<i>Corbes de creixement i supervivència segons l'edat dels juvenils</i>	16
<i>Comparació entre tractaments</i>	19
IV.b. Diferents tractaments de recirculació d'aigua	
<i>Taxes de creixement i supervivència dels juvenils</i>	19
<i>Corbes de creixement i supervivència dels juvenils</i>	20
<i>Comparació entre tractaments</i>	22
V. DISCUSSIÓ	
V.a. Tipus d'algues i alimentació	24
V.b. Circulació i qualitat de l'aigua	26
VI. CONCLUSIONS	28
VII. AGRAIMENTS	29
VIII. BIBLIOGRAFIA	29

I. INTRODUCCIÓ

La nàiade allargada de l'espècie *Unio mancus* Lamarck, 1819 és un mol·lusc bivalve d'aigua dolça de la família dels Uniònids. Es distribueix a les conques dels rius mediterranis de la península Ibèrica i a França. En concret, a la península Ibèrica la trobem des del sud dels Pirineus fins a la conca del riu Xúquer, al País Valencià (Araujo *et al.*, 2009). A la província de Girona, les seves poblacions es localitzen al curs mig i baix del riu Ter i als seus afluent (Llémena i Brugent), al llac o Estany de Banyoles, al riu Fluvià i a la Muga. A l'Estany de Banyoles, *Unio mancus* conviu amb altres espècies molt menys freqüents com són *Potomida litoralis*, *Anodonta anatina* i *Unio ravoisieri* (Campos *et al.*, 2014).

Històricament, es pensava que totes les poblacions d'aquesta nàiade formaven part del complex taxonòmic anomenat *Unio elongatulus* C. Pfeiffer, 1825. Recentment, els estudis moleculars han confirmat que les dues espècies de nàiade del gènere *Unio* que es troben al nord-est de la península Ibèrica corresponen a *Unio mancus* i *Unio ravoisieri* (Araujo, 2012).

A Catalunya, l'ordre dels uniònids és un dels grups més amenaçats a desaparèixer (Campos *et al.*, 2014). Segons l'estudi d'Araujo (2012) a la península, al 2010 hi havia menys de 5.000 exemplars lliures d'*Unio mancus* a Catalunya; una contribució del 8% dels individus de tot l'Estat. La distribució puntualment localitzada, la seva baixa densitat i l'alta regressió que han sofert les seves poblacions, han estat els motius que han promogut la inclusió dels uniònids en documents legals i ser considerades espècies protegides a Catalunya per la Llei 3/1988 de protecció dels animals (DOGC nº 967, de 18/03/1988). A Europa, l'espècie està emparada per dues legislacions: la Directiva Hàbitats (Annex V) i el conveni de Berna (Annex III).

Morfològicament, es tracta d'un bivalve de forma i mida variable, tot i que els individus més grans poden assolir els 12 cm. La valva externa té una coloració marró-negrosa o marró-groguenca i zones més verdes, amb una part anterior arrodonida i una posterior allargada.

Unio mancus és una espècie típicament fluvial. Viu semi enterrada, preferentment en fons de sorres i llims, i en zones de poca corrent (Araujo, 2012). Presenta una elevada importància en els sistemes aquàtics, vist que actua en la dinàmica de nutrients remonent el sediment, fixant les partícules en suspensió com el fitoplàncton, les bacteris i la matèria orgànica de l'aigua i del sediment, i augmentant el contingut d'oxigen del fons (Campos *et al.*, 2014).

És tracta d'un animal filtrador. Actualment encara no es coneix amb exactitud la seva alimentació, sobretot durant el seu primer any de vida. Probablement, la seva dieta estigui composta per algues uni o pluricel·lulars de mida petita, bacteris i altres partícules orgàniques (detritus). Aquesta forma d'alimentació i la poca discriminació dels materials ingerits les converteix en organismes bioacumuladors, ja que poden acumular als seus òrgans grans quantitats de qualsevol compost que es trobi a l'aigua (Zapater *et al.*, 2014).

El seu cicle vital és complex (Figura 1). Inclou un únic estadi larval, conegut amb el nom de gloquidi. Els gloquidis són paràsits dels peixos, i només poden viure lliurement pocs dies abans

que trobin un peix hoste on enganxar-se i parasitar-lo. El principal lloc de fixació és a les brànquies (90%), tot i que en un 10% dels casos es poden fixar a les aletes (Araujo et al., 2004). Les femelles adultes alliberen gloquidis durant la seva època de reproducció, que va de finals de març fins a l'agost (Araujo et al., 2004). Durant aquesta fase paràsita, els gloquidis formen un petit quist i obtenen nutrients del seu hoste. Al cap de 10 a 20 dies (segons la temperatura) la larva pateix un procés de metamorfosi i es transforma en un petit juvenil, trenca el quist i s'allibera de peix; a partir d'aquest moment comença la seva vida lliure al substrat.

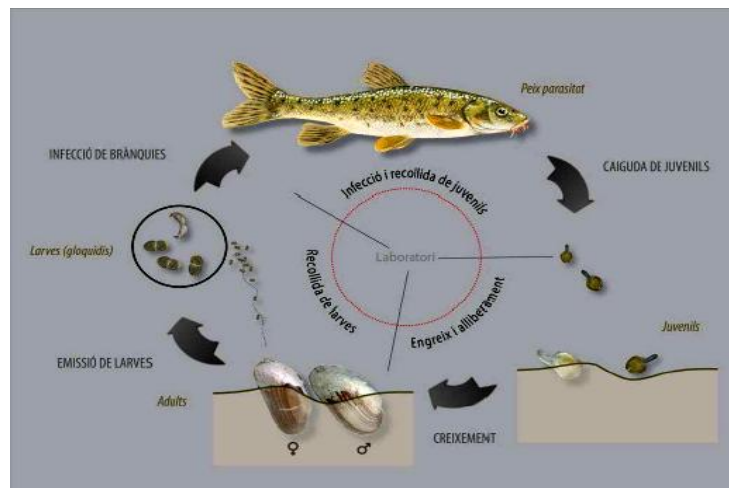


Figura 1: Cicle vital de les nàiades a la natura i gràfic de com es tradueix aquest cicle en la cria al laboratori en tres etapes: recollida de larves, infecció i cria de juvenils i engrèix i alliberament. Font: M. Campos *et al.*, 2014.

Així doncs, el principal factor que influeix fortament en la dinàmica poblacional dels uniònids és l'existència d'una població estable i sana de peixos hosts, sense els quals la nàiade no podria reproduir-se (Araujo, 2012). Cal indicar que aquests bivalves presenten una elevada especificitat amb els peixos que parasiten. En el cas d'*Unio mancus*, les espècies que funcionen bé són els ciprínids autòctons com el barb de muntanya (*Barbus meridionalis*) o el barb de l'Ebre (*Luciobarbus graellsii*), com també la bagra (*Squalius cephalus*) o la bavosa de riu (*Salaria fluviatilis*) [Campos et al. 2014].

Les dues causes principals de regressió de les poblacions de nàiades són: la pèrdua dels hàbitats fluvials i de la seva qualitat (regulació dels cabals d'aigua, alteració dels boscos de ribera, contaminació, pèrdua de connectivitat fluvial, etc.) i la forta caiguda de les poblacions de ciprínids autòctons deguda als canvis en l'hàbitat i a la forta competència amb espècies exòtiques invasores. L'Estany de Banyoles és un dels exemples clars on trobem la imminent desaparició de les població de peixos autòctons des de les dues últimes dècades degut a la forta expansió de les poblacions de la perca americana (*Micropterus salmoides*) i el peix sol (*Lepomis gibbosus*) [Campos et al. 2014].

Arran d'aquesta forta regressió de les poblacions de nàiades i de la població de peixos autòctons a l'espai natural protegit de l'Estany de Banyoles, el Consorci de l'Estany (ens de

gestió d'aquest espai natural), va executar, entre 2010-2013, el projecte LIFE Projecte Estany (LIFE08 NAT/ES/000078). El projecte tenia per objectiu posar en marxa una sèrie de mesures de lluita contra les espècies exòtiques invasores a l'Estany (sobretot peixos) i dur a terme accions de millora de les poblacions dels peixos autòctons i les nàiades. Al 2010, el Consorci posa en marxa el Laboratori de cria de nàiades de l'Estany de Banyoles. Actualment, el laboratori continua treballant en la producció de juvenils de nàiades de les espècies *Unio mancus* i *U. ravoisieri* de les poblacions dels rius de Girona en el marc d'un nou projecte LIFE Natura subvencionat per la CE, el LIFE Potamo Fauna (LIFE NAT/ES/001091). Durant aquests anys de funcionament del laboratori s'han pogut establir els procediments de cria de nàiades en captivitat, amb resultats d'èxit i gran quantitat de juvenils criats, sent el primer cop que s'aconsegueix a Europa (es van obtenir 132.918 juvenils entre el 2011-2013, i, només al 2015, se n'han obtingut 200.000). El procediment de cria en captivitat es basa en els tres estadis vitals de l'espècie: l'obtenció de gloquidis de les femelles reproductores, la seva infestació a peixos hoste i la cria i engreix dels juvenils per tal de poder-los alliberar al medi quan disposin de mides entre 3 i 4 cm (veieu Figura 1).

No obstant, la supervivència d'aquests juvenils durant el seu primer any de vida és molt baixa (Campos et al. 2014). El principal problema que s'ha trobat en la cria de nàiades en captivitat és l'alta mortalitat dels juvenils durant el seu període d'engreix. Bolland *et al.* (2010) va dir que la probabilitat de que els juvenils sobrevisquin fins a l'edat adulta augmenta quan les nàiades es mantenen en condicions estables de cria durant les seves etapes més crítiques, que són, aproximadament, els primers 60 dies des de la seva caiguda. Molts projectes s'han dut a terme per tal de fer criar les nàiades fora de la natura. No obstant, el mètode òptim per a la cria de juvenils de *Unio mancus* és actualment desconegut. Els tècnics del Laboratori de cria de nàiades a Banyoles parteixen de la hipòtesi que l'alimentació durant els primers mesos de vida i la depredació en els sistemes d'engreix són les dues causes que provoca aquesta mortalitat.

En aquest present treball es compararan dos mètodes diferents de cria de juvenils d'*Unio mancus* per tal d'experimentar sobre l'alimentació òptima de l'espècie i posar en pràctica una nova tècnica de cultiu que permeti, per una banda, obtenir una màxima supervivència dels juvenils i, per l'altre, assegurar un bon creixement durant aquesta fase inicial.

- El primer mètode es basa en descobrir les preferències alimentàries dels juvenils d'*U. mancus* a partir del manteniment d'aquests en medis enriquits amb diferents tipus d'aliment i diferents dosis. Aquest mètode ja s'ha donat en altres treballs centrats a altres espècies d'uniònids (Eybe *et al.*, 2013; Kovitvadhi *et al.*, 2006) i obtenint resultats satisfactoris.
- El segon mètode es basa en el cultiu de juvenils en un sistema tancat d'aqüicultura on s'hi faci circular aigua a diferents velocitats. Aquest mètode ha estat efectiu en la cria de juvenils de diverses espècies de nàiades, i sosté que genera majors creixements i supervivències degut a una millor qualitat de l'aigua durant la seva recirculació (Kovitvadhi *et al.*, 2007).

II. OBJECTIVES

The main objective of this study is to determine the optimum rearing conditions for juvenile mussels of the species *Unio mancus* in order to breed them in the laboratory to a size at which survival in the nature is likely. With this purpose, two different experiments have been performed in the laboratory with two specific objectives:

- 1) To test different feeding treatments with algae and detritus in different doses of application by measuring growth rates and survival rates of juvenile mussels.
- 2) To compare three different water recirculating aquaculture systems by measuring growth rates and survival rates of juvenile mussels.

III. METODOLOGIA

III.a. Obtenció de juvenils

Material d'estudi

Es van recollir 23 femelles de nàiade allargada (*Unio mancus*) al riu Brugent, conca del Ter, al seu pas pel municipi d'Amer (la Selva, Girona) durant la segona quinzena de març de 2015. Es va observar directament al camp que fossin gràvides i es van descartar les que no ho eren retornant-les al riu. Aquests exemplars van ser transportats amb un cubell d'aigua fins al Laboratori de nàiades de l'Estany de Banyoles, situat a Porqueres (Pla de l'Estany, Girona). Immediatament, van ser dipositades en aquaris de vidre de 100 litres plens d'aigua de l'estany de Banyoles i amb presència d'un airejador, el qual permetia augmentar la concentració d'oxigen a l'aigua i oferir millors condicions d'estabulació. Diàriament es feia una neteja del fons de l'aquari amb un sifó de succió, es renovava l'aigua (1/2 del total) i s'extreien els gloquidis que hi podien ser presents amb l'ajuda d'una pipeta o filtrant l'aigua succionada amb una malla de 200 micròmetres (veure làmina 1). Per tal d'evitar mortalitat d'adults degut a una mala alimentació, la duració de les nàiades reproductores dins dels aquaris ha estat d'aproximadament d'un mes (Campos et al., 2013).

En el laboratori es treballa amb el barb de muntanya (*Barbus meridionalis*) com a peix hoste; espècie autòctona a les conques fluvials de Girona. Els exemplars necessaris per la infecció van ser recollits setmanes abans al riu Fluvià i mantinguts en tancs amb ventilació i renovació de l'aigua de forma automàtica a l'interior del laboratori (veure làmina 1). Diàriament es neteja el fons del tanc gràcies a un sifó de succió i s'alimentava els peixos amb pinso per a truites complementat amb espirulina i larva vermella congelada; la dosi era calculada en funció del número de peixos per tanc i la seva mida.

L'augment de temperatura i l'estrès són causants de l'aparició de malalties i infeccions en els peixos (Campos et al., 2013), per la qual cosa es disposava d'un termòmetre que indicava la temperatura de l'aigua del tanc. A més, la sala d'estabulació es trobava climatitzada per evitar oscil·lacions tèrmiques (20 graus de temperatura constant).

Infecció de peixos amb gloquidis

La infecció dels peixos amb gloquidis al laboratori té el principal objectiu d'augmentar l'eficiència en la fixació d'aquestes larves i, conseqüentment, obtenir un major producció de juvenils. La infecció de peixos es va realitzar a principis d'abril del 2015, i va constar de dos passos:

- El primer pas va ser la recollida de gloquidis, els quals són alliberats per les nàïades adultes de manera natural dins de l'aquari. Els gloquidis es troben en suspensió en forma de filament, de manera que molts d'ells van ser fàcilment recollits amb una pipeta i observats en una lupa binocular. Amb unes pinces es desenganxen del glomèrul que formen (gràcies a un filament on estan agafats) i s'individualitza cadascuna de les larves. Procés que permet obtenir milers de gloquidis.
- El segon pas va ser la infecció dels barbs seguint el Protocol de Reproducció en Captivitat de *Unio elongatulus* (LIFE12 NAT/ES/001091). La infecció dels peixos es produeix en recipients de plàstic d'un volum d'un litre que són omplerts amb aigua 1/3 part. A cada recipient se li col·loca un airejador i tres o quatre barbs, depenent de la mida. El número de gloquidis que es van afegir a cada recipient és d'aproximadament 200 per peix, tot i que en peixos més grans se'n podien afegir fins a 400. Amb l'ajuda de l'airejador es van generar turbulències a l'aigua durant un període de cinc minuts, i així facilitar l'arribada dels gloquidis a les brànquies del peix. Aquest mètode d'infecció implica poca manipulació dels peixos, resultant en un menor estrés per a ells i una disminució de la seva mortalitat durant el procés (Lima et al., 2012). A continuació, els peixos van ser incorporats en caixes de plàstic de 70 litres, amb airejador, renovació automàtica de l'aigua i una administració diària d'aliment, on van romandre-hi 15 dies durant els quals es produí la metamorfosi de les larves cap a juvenils.

Obtenció de juvenils

Al cap de 15 dies, els peixos infectats són traslladats a uns altres dipòsits cilíndrics, on hi romandran sense alimentació fins a la caiguda dels juvenils (veure làmina 1). El laboratori disposa de 6 cilíndrics de 300 litres i capacitat total per a 240 peixos. El màxim número de juvenils que es podrien obtenir a cada infecció, considerant que cada cilíndric té capacitat per 40 peixos i que aquests han estat infectats amb 300 gloquidis, és de 72.000 (12.000 per cilíndric), tot i que a la pràctica aquest nombre sempre és inferior, degut a la impossibilitat que tots els gloquidis hagin pogut realitzar correctament tot el procés de metamorfosi, i també per la mortalitat de peixos (segons el Protocol de Reproducció en Captivitat de *Unio elongatulus*).

Cada cilíndric presenta una forma d'embut al fons on hi trobem un sistema de filtratge que facilita la sortida de juvenils. Aquest sistema consta d'una malla de 200 micròmetres subjectat a un filtre per on hi passa tota l'aigua i on es queden atrapats els juvenils. Aquesta malla de filtre és netejada i els juvenils es recullen i es concentren en altres filtres fins a poder

passar-los a una placa de petri. Un cop a la placa, es comptabilitzen mitjançant una lupa binocular (15X augments). Durant aquest fase, l'aigua dels cilindrocònics es renova automàticament i és airejada. És important revisar les malles filtre cada dia per tal d'assegurar la supervivència dels juvenils.

III.b. Seguiment de juvenils amb aplicació diferencial d'aliment i d'addició de detritus

Aquest experiment es basa en el manteniment de juvenils d'*Unio mancus* en recipients de vidre de 500 ml amb aigua filtrada de l'Estany sense sediment, per tal de comparar el seu creixement i supervivència en resposta a tres tipus d'aliments i de cinc dosis algals diferents. Com es mostra a la Figura 2, cada tractament consta de tres rèpliques ordenades amb un codi numèric. A cada recipient hi ha 100 individus, donant un total de 42 recipients i un recompte inicial de 4.200 juvenils. Aquest experiment s'ha dut a terme durant un mes i pocs dies (de finals d'abril a principis de juny de 2015).

Dosi o densitat	TIPUS ALIMENT 1 Algues marines 1	TIPUS ALIMENT 2 Algues marines 2	TIPUS ALIMENT 1 + Detrits Algues marines 1
D ₀	(1) (2) (3)	/	(28) (29) (30)
D ₁	(4) (5) (6)	(16) (17) (18)	(31) (32) (33)
D ₂	(7) (8) (9)	(19) (20) (21)	(34) (35) (36)
D ₃	(10) (11) (12)	(22) (23) (24)	(37) (38) (39)
D ₄	(13) (14) (15)	(25) (26) (27)	(40) (41) (42)

Figura 2: Esquema de l'experiment, on es mostren els tres tipus d'aliment en relació a les cinc dosis d'administració. En total, s'elaboren 14 tractaments (s'omet un tractament al ser reiteratiu, ja que al no presentar dosi d'alimentació, presenta les mateixes característiques que les tres primeres rèpliques). S'indica el codi numèric de cadascun dels recipients a elaborar.

Per aquest estudi, s'ha optat per alimentar els juvenils amb algues disponibles comercialment, tal i com s'ha donat amb èxit en altres experiments de cria de nàiades (Eybe et al., 2013), ja que el cultiu de diferents espècies d'algues continentals requereix molt de temps i, consegüentment, és més car. Els tres grups d'alimentació són:

- **Algues marines 1.** Algues liofilitzades de la marca Easy Reefs®, amb una composició del 33% de les següents algues marines: *Nannochloropsis gaditana* (250.000 cel/ml), *Tetraselmis chuii* (50.000 cel/ml) i *Phaeodactylum tricornutum* (250.000 cel/ml). L'ús d'aquestes algues per a la alimentació de juvenils de nàiade allargada ja s'ha donat en un altre experiment LIFE del Projecte Estany (Campos et al., 2013).

- **Algues marines 2.** Combinació d'algues marines de la marca Shellfish Diet 1800® (Reed Mariculture Inc.) i *Nannochloropsis* 18% (ACUINUGA). Shellfish Diet 1800 està composta per 40% de *Isochrysis*, 15% de *Pavlova*, 25% de *Tetraselmis* i 20% de *Thalassiosira pseudonana*. Aquesta composició d'algues ja ha estat utilitzada a Luxemburg en el cultiu de juvenils de *Margaritifera margaritifera* L. (Eybe et al., 2013).

- **Algues marines 1 + Detritus:** El detritus s'utilitza com a suplement alimentari i té un paper crucial en el desenvolupament de moltes espècies de nàiades (Hruska, 1999, 2001). Ha estat recollit en un prat humit a prop de les instal·lacions del laboratori per tal de proporcionar majors concentracions de detritus que les del riu. Tot i que no s'ha analitzat la composició del detritus recollit, aquest està format per material orgànic, zooplàncton, bacteris i fongs i sediments d'argila o sorra en proporcions variables (Eybe et al., 2013).

La taula 1 ens mostra el perfil nutricional de cada producte a partir de la informació descrita a les pàgines web dels proveïdors.

Taula 1: Composició de la biomassa de Easy Reefs, Shellfish Diet 1800 i *Nannochloropsis* 18% segons les webs de les empreses manufactureres. Els valors per a Easy Reefs estan calculats a partir de la composició mitjana de cada biomolècula per les diferents espècies presents en el producte.

	Easy Reefs	Shellfish Diet 1800	<i>Nannochloropsis</i> 18%
Proteïnes	37%	52%	52%
Lípids	20%	16%	28%
Carbohidrats	22%	22%	12%

Preparació de l'alimentació

En primer lloc, es va calcular la densitat d'alimentació inicial de producte per tal d'obtenir el número de cèl·lules algals (cel/ml) associat. Treballar amb número de cèl·lules ens permet obtenir unes dades més reals de la concentració d'algues a cada dosi i poder establir-hi comparatives.

A partir de les dosis emprades en els protocols esmentats per a cadascun del tipus d'algues, es va calcular la quantitat d'algues necessàries per al nostre experiment.

En la preparació de les algues marines 1 s'afegeix 100 mg de producte (cullerada enrassada) en un litre d'aigua i es barreja amb la batidora. La dosi emprada en l'anterior Projecte Estany va ser 0,8 mg en recipients de 400 ml (Campos et al., 2013), la mateixa que aquest experiment: 2mg/l, 592.767 cel/ml.

En la preparació de les algues marines 2, Shellfish Diet 1800 presenta una dosi original de 2×10^9 cel/ml. La dosi emprada per la cria de *M. margaritifera* va ser de 24.000 cel/ml (Eybe et

al., 2013). Per tal d'utilitzar la mateixa dosi, es van calcular 0,012 ml/l. Pel que fa a *Nannochloropsis* 18%, presentat en un producte de 55×10^9 cel/ml, la dosi utilitzada va ser de $1,836 \times 10^6$ cel/ml (Eybe et al., 2013), mentre que en el nostre experiment es va calcular una densitat d'alimentació de 0,033 ml/l. Degut a la incapacitat d'obtenir volums tant baixos, es va preparar una sopa intermèdia de 2 litres amb 10,33 ml ($10,327 \times 10^6$ cel/ml) de Shellfish Diet i 28,73 ml (790×10^6 cel/ml de *Nannochloropsis* 18%.

A partir d'aquestes densitats es va calcular el número de cèl·lules (cel/ml) per a cadascuna de les cinc dosis, que van de zero (D_0 ; absència de cèl·lules) a cinc (D_5 ; màxim nombre de cèl·lules). Per realitzar-ho, s'ha calculat el percentatge relatiu de cada dosi (%) a partir de la dosi d'alimentació inicial mitjançant un model d'increment exponencial (e^x). Aquest model ens permet realitzar un augment en el número de cèl·lules a cada dosi a partir d'un increment exponencial.

A continuació, es calcula el volum d'algues (ml) a aplicar a cada recipient de 500 ml i el número de cèl·lules totals que això correspon (taula 2).

La preparació de la sopa es va elaborar tenint en compte un màxim de 20 renovacions de l'alimentació durant tot l'experiment (suposant 2 mesos de durada amb renovació d'aliment cada tres dies). Per a les algues 1 es van diluir 1.600 mg de producte en 4.350 ml de sopa i es va congelar un volum de 187 ml en ampolles de plàstic de 350 ml. Per a les algues 2, es va congelar un volum 75 ml de la sopa de 2.000 ml en ampolles de 350 ml.

El detritus va ser recollit contínuament i filtrat amb malles de 100 i 50 micròmetres abans de la seva utilització. Dins del laboratori, va ser mantingut en un petit cubell amb presència d'un airejador i descartat al mateix dia. Per al tractament amb algues de tipus 1 i detritus, es va afegir la dosi algal corresponent a cada recipient i una dosi fixada de detritus de 12,5 ml de pes fresc/500 ml.

Taula 2: Número de cèl·lules presents a cada recipient de 500 ml segons la dosi i el tipus d'alimentació. Aquests valors han estat calculats a partir de les densitats de sopa utilitzades per a cada recipient (ml) i del percentatge relatiu que aquesta dosi correspon utilitzant un model exponencial.

Dosi	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4
Algues marines 1	0	$109,03 \times 10^6$	$296,38 \times 10^6$	$805,65 \times 10^6$	2.189×10^6
Algues marines 2	0	337×10^3	918×10^3	$2,49 \times 10^6$	$6,78 \times 10^6$

Protocol experimental

A cada recipient de vidre se li van afegir 100 juvenils procedents d'una mateixa infecció, 500 ml d'aigua de l'estany filtrada per 50 micròmetres i la densitat d'alimentació definida per a cada tractament. Els 42 recipients, retolats per tractament i rèplica, es van col·locar semi tancats dins d'un armari a la foscor, per tal de permetre intercanvi de gasos i mantenir la temperatura

el més constant possible. Es va col·locar un termòmetre en un recipient amb només 500 ml d'aigua de l'estany filtrada per tal de monitoritzar la temperatura durant el transcurs de l'experiment (veure làmina 1).

L'aigua i l'alimentació es renovaven cada 4-5 dies, amb un màxim de 6 dies entre canvi i canvi, i es donava en grups de 3 recipients. Per extreure els juvenils dels recipients es va utilitzar una malla de 200 micròmetres i, a continuació, es van col·locar en plaques de petri diferents vigilant les pèrdues d'individus, la contaminació entre rèpliques i l'escalfament excessiu de les mostres. Amb una lupa binocular es feia una revisió de cada placa i s'extreien els exemplars morts amb l'ajuda d'una pipeta. Cada 15 dies, a més, es prenen mesures dels exemplars vius (a excepció de la última mesura, que es va realitzar al cap de 10 dies a partir de l'anterior) mitjançant una lupa amb càmera digital integrada, realitzant una fotografia i utilitzant un calibrador del programa per mesurar la llargada màxima dels individus. Un cop comptats, els juvenils restants es retornaven als recipients, controlant que no hi hagués variacions en la temperatura, mentre que el material utilitzat es neteja amb aigua de l'estany per a una nova utilització.

III.c. Seguiment de juvenils amb diferents tractaments de recirculació d'aigua

Aquest experiment es basa en el cultiu de juvenils d'*Unio mancus* en tres tractaments de recirculació d'aigua diferents: alta, baixa i nul·la. Cadascun dels tractaments presenta tres rèpliques, i cadascuna d'elles consta d'un recipient cilíndric de plàstic de 16 cm de diàmetre amb una malla de 200 micròmetres a la part inferior per tal de poder col·locar-hi els juvenils. Cada recipient conté 200 juvenils i un sistema de corrent que genera un flux continu d'aigua de l'estany a l'interior del recipient. En total, hi ha nou recipients i un recompte inicial de 1800 juvenils de nàide allargada. La durada de l'experiment va ser de dos mesos (de principis de maig a finals de juny de 2015).

Disseny de circulació de l'aigua

Els recipients cilíndrics van ser repartits entre tres tancs de plàstic amb capacitat de 70 l (33cm x 46cm x 44cm), plens d'aigua de l'estany enriquida amb algues, on se situava una de les tres rèpliques de cada tractament.

Per a la recirculació interna de l'aigua es va disposar d'un sistema de tubs situats dins dels tancs, els quals feien penetrar aigua de l'estany verticalment de dalt a baix cap a l'interior dels recipients (Figura 3). Aquest bombeig regular permetia l'oxigenació de l'aigua i un transport de l'alimentació allà on es trobaven els juvenils. Cada tanc, a més, presentava un sistema automàtic de renovació de l'aigua.

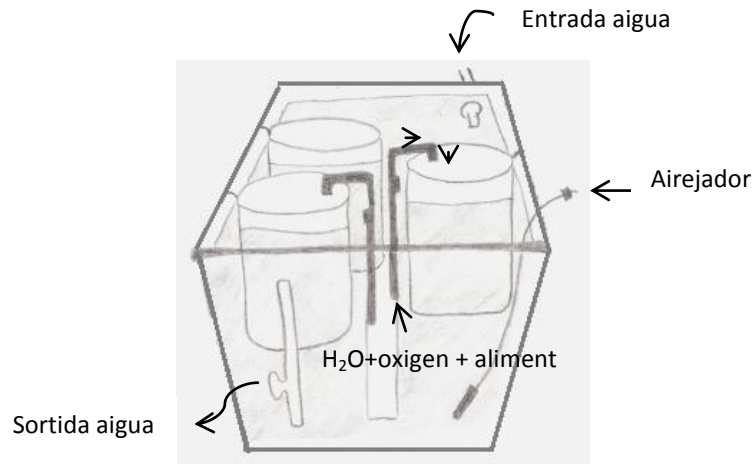


Figura 3: Disseny del sistema de recirculació interna de l'aigua per a la cria de juvenils de nàiade. Tres recipients cilíndrics amb 200 juvenils cadascun es mantenen en suspensió en un tanc de 70 l amb aigua de l'estany. Dos tubs amb aixetes reguladores de cabal transporten aigua, oxigen i aliment verticalment cap a l'interior dels recipients, mentre que el recipient restant no presenta recirculació. La renovació dels tancs es dona a partir de tubs d'entrada i sortida d'aigua regulats per aixetes externes al sistema.

Preparació de l'alimentació

Com a alimentació s'han utilitzat algues marines liofilitzades de la marca Easy Reefs®, amb una composició del 33% de les següents algues marines: *Nannochloropsis gaditana* (250.000 cel/ml), *Tetraselmis chunii* (50.000 cel/ml) i *Phaeodactylum tricornutum* (250.000 cel/ml). L'ús d'aquestes algues per a la alimentació de juvenils de nàiade allargada ja s'ha donat en un altre experiment del projecte LIFE Projecte Estany (Campos et al., 2013). La dosi d'alimentació ha estat calculada a partir d'un increment exponencial del 272% de la dosi inicial de 2 mg/l utilitzada en l'anterior experiment. A partir d'aquí, s'ha calculat el volum d'algues a aplicar a cada tanc de 70 litres a partir del número de cèl·lules de la dosi inicial, el qual ens dona un valor de 7,39 ml de sopa per tanc (aproximadament 10×10^{10} cèl·lules).

La preparació de la sopa es va elaborar tenint en compte un màxim de 20 renovacions de l'alimentació durant tot l'experiment (suposant 2 mesos de durada amb canvi d'aliment cada dos dies). Es van diluir 22.000 mg de producte en 446,3 ml de sopa i es va congelar un volum de 7,39 ml en vials de 10 ml (veure làmina 1).

Càlcul dels fluxos

La taula 3 ens mostra el cabal (ml/s) de cada bomba en els tractaments de baixa i alta recirculació. Per calcular-ho, es va partir d'un volum de referència de 500 ml i es va calcular el temps (segons) que tardava cada bomba en assolir el volum de referència. La prova es va repetir cinc vegades per a cada bomba. A partir de la mitjana de les cinc proves i del volum utilitzat, es va calcular el cabal per a cadascuna de les bombes de l'experiment. Els resultats mostren que, de mitjana, les bombes amb alta recirculació tenen un cabal cinc vegades més gran que les bombes amb recirculació baixa.

Taula 3: Cabal mitjà de cada aixeta en els diferents tractaments de recirculació.

Recirculació	Tanc 1		Tanc 2		Tanc 3	
	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Cabal (ml/s)	40,29	7,41	37,99	7,34	36,35	8,77

Protocol experimental

A cada tanc de 70 l se li va afegir aigua de l'estany, tres recipient cilíndrics amb malla de 200 micròmetres a la part inferior i 200 juvenils procedents d'una mateixa infecció. A cada recipient se li va aplicar la recirculació pertinent segons el tractament. Es va col·locar un termòmetre en un dels recipients per tal de monitoritzar la temperatura (veure làmina 1).

L'aigua i l'alimentació dels tancs es renovaven cada 2 dies, tot i que diàriament es realitzaven moviments de dins a fora de l'aigua dels recipients sense recirculació per tal de renovar manualment l'aigua i l'aliment. La revisió de juvenils es feia, aproximadament, cada 10 dies. Per extreure els juvenils dels recipients es va utilitzar un ruixador amb aigua de l'estany i una safata a sota on s'hi dipositava l'aigua i els juvenils. El contingut de la safata es filtrava per una malla de 200 micròmetres i, tot seguit, es col·locaven els juvenils en plaques de petri diferents. En tot moment es vigilava de no perdre individus, la contaminació entre rèpliques i l'escalfament excessiu de les mostres. Amb una lupa binocular es feia una revisió i presa de mesures de cada placa i s'extreien els exemplars morts amb l'ajuda d'una pipeta. Per a mesurar els exemplars vius s'utilitzava una lupa amb càmera digital integrada, realitzant una fotografia i utilitzant un calibrador del programa per mesurar la llargada màxima dels individus. Un cop comptats, els juvenils restants es retornaven als recipients, controlant que no hi hagués variacions en la temperatura, mentre que el material utilitzat es netejava i desinfectava amb lleixiu i aigua de l'estany per ser posteriorment utilitzat.

III.d. Anàlisi de dades

Tots els anàlisis estadístics s'han realitzat mitjançant el programa informàtic R i la seva interfase R commander (Rcmdr).

La taxa de creixement dels juvenils ha estat calculada com a taxa de creixement mitjà en $\mu\text{m}/\text{dia}$ (creixement mitjà al final del període de creixement – creixement mitjà abans del període de creixement / període de creixement); essent el període de creixement el nombre de dies entre mesura i mesura. La supervivència dels juvenils als diferents tractaments (%) es calcula partint del número de juvenils vius al inici de l'experiment (100%).

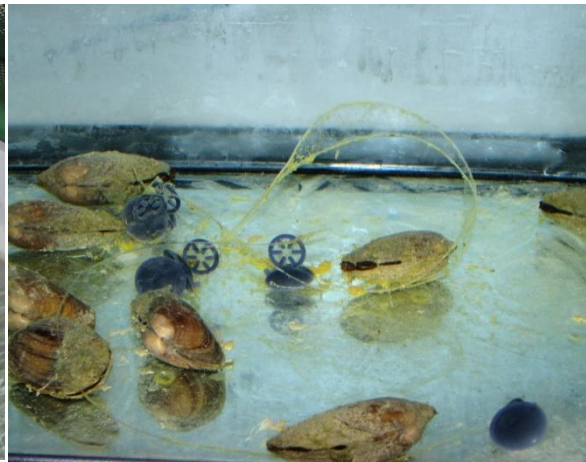
Per analitzar la relació entre la mida i el tipus de tractament, i la supervivència i el tipus de tractament, es va generar un model de correlació lineal amb la variable "dies" com a dependent i el "percentatge de supervivents" o la "mida acumulada al llarg dels dies" com a

variable independent. El coeficient de correlació lineal ens indicarà la validesa de la regressió i la relació entre variables.

Les relacions entre diferents tractaments i la comprovació de possibles diferències significatives entre ells s'ha donat de manera diferent per a cadascun dels experiments realitzats: en el mètode basat en l'aplicació diferencial d'aliment, l'estudi aplicat ha estat un anàlisi de variància (ANOVA) de dos factors, on s'ha volgut comprovar diferències significatives entre tractaments i dosis (factors) en relació al creixement i la supervivència dels juvenils (variables dependents). En el segon experiment, basat en un sistema tancat amb moviment d'aigua, l'estudi aplicat ha estat un anàlisi de covariància (ANCOVA), on s'ha estudiat la relació de cada categoria de recirculació (factor) amb la supervivència i el creixement dels juvenils (variable dependent), segons la relació existent entre aquestes variables i la nostra covariable (edat dels juvenils).



A



B



C



D



E



F

Làmina 1: Representació dels material i els mètodes utilitzats al laboratori. **A:** Tanc de manteniment dels barbs de muntanya a l'interior del laboratori. **B:** Femelles d'*Unio mancus* adultes mantingudes en un aquari. S'observa l'alliberament de gloquidis en forma de filament. **C:** Cilindrocònics utilitzats en l'obtenció de juvenils. **D:** Procés de preparació de les algues Easy Reefs® i manteniment en vials per a l'alimentació dels juvenils mantinguts en un sistema de recirculació. **E:** Recipients de vidre de 500 ml d'aigua mantinguts dins l'armari on es fan créixer 100 juvenils d'*Unio mancus* en una concentració algal determinada. **F:** Tanc proveït d'un sistema de tubs on s'hi dipositen tres recipients, cadascú dels quals amb un tractament de recirculació diferent i 200 juvenils d'*Unio mancus*.

IV. RESULTATS

IV.a. Aplicació diferencial d'aliment i d'addició de detritus

Taxes de creixement i supervivència dels juvenils

S'ha calculat la taxa de creixement i la supervivència al llarg de l'experiment a partir de la mida inicial dels juvenils i el període de creixement. La mida inicial dels juvenils es va calcular a partir de la llargada mitjana de 26 individus elegits a l'atzar al inici de l'experiment, i pren un valor de 260,5µm. Les taules 4, 5 i 6 ens mostren els valors obtinguts per a cada tractament.

Taula 4: Taxa de creixement (increment de llargada mitjana +/- SD) i supervivència (%) dels juvenils de 0 a 40 dies alimentats amb algues de tipus 1. Les dades de creixement representen l'increment de llargada mitjana (µm/dia) calculada a partir dels individus mesurats en cadascuna de les tres rèpliques i per a cada dosi. La desviació s'ha estandarditzat al nombre de rèpliques restants a cada mesura. Cada dosi presentava inicialment 100 individus de 260,5µm i una supervivència del 100%.

Edat (dies)	Increment de llargada dels juvenils (µm/dia)					Dies	Supervivència (%)				
	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄		D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
0-15	6,71 +/-	7,87 +/-	6,31 +/-	5,5 +/-	7,36 +/-	15	53,3 +/-	2 +/-	52,3 +/-	0,7 +/-	9,3 +/-
	1,58	0,67	3,08	0,00	0,24		31,72	1,73	40,13	1,15	11,37
15-30	3,91 +/-	-	6,30 +/-	-	4,95 +/-	30	40,3 +/-	-	16,7 +/-	-	9,5 +/-
	3,58	-	2,36	-	3,46		29,87	-	15,30	-	4,95
30-40	2,2 +/-	-	5,29 +/-	-	3,65 +/-	40	17,7 +/-	-	5 +/-	-	6 +/-
	1,59	-	2,58	-	2,54		10,50	-	7,81	-	4,24

-: no hi ha prou dades per calcular el creixement per manca de rèpliques viables.

Taula 5: Taxa de creixement (increment de llargada mitjana +/- SD) i supervivència (%) dels juvenils de 0 a 40 dies alimentats amb algues de tipus 2. Les dades de creixement representen l'increment de llargada mitjana (µm/dia) calculada a partir dels individus mesurats en cadascuna de les tres rèpliques i per a cada dosi. La desviació s'ha estandarditzat al nombre de rèpliques restants a cada mesura. Cada dosi presentava inicialment 100 individus de 260,5µm i una supervivència del 100%. La D₀ actua com a control i pren els mateixos valors que al tractament amb algues de tipus 1.

Edat (dies)	Increment de llargada dels juvenils (µm/dia)					Dies	Supervivència (%)				
	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄		D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
0-15	6,71 +/-	4,53 +/-	4,96 +/-	5,57 +/-	4,43 +/-	15	53,3 +/-	63,3 +/-	31,3 +/-	11,7 +/-	13,5 +/-
	1,58	1,21	0,38	0,38	0,00		31,72	25,48	50,00	18,50	19,09
15-30	3,91 +/-	4,96 +/-	-	2,33 +/-	-	30	40,3 +/-	21 +/-	1 +/-	1,5 +/-	0 +/-
	3,58	1,48	-	0,00	-		29,87	18,73	1,41	2,12	0,00
30-40	2,2 +/-	0,84 +/-	-	-	-	40	17,7 +/-	9 +/-	-	-	-
	1,59	4,09	-	-	-		10,50	4,24	-	-	-

-: no hi ha prou dades per calcular el creixement per manca de rèpliques viables.

Taula 6: Taxa de creixement (increment de llargada mitjana \pm SD) i supervivència (%) dels juvenils de 0 a 40 dies alimentats amb algues de tipus 1 + un suplement de detritus. Les dades de creixement representen l'increment de llargada mitjana ($\mu\text{m}/\text{dia}$) calculada a partir dels individus mesurats en cadascuna de les tres rèpliques i per a cada dosi. La desviació s'ha estandarditzat al nombre de rèpliques restants a cada mesura. Cada dosi presentava inicialment 100 individus de $260,5\mu\text{m}$ i una supervivència del 100%.

Edat (dies)	Increment de llargada dels juvenils ($\mu\text{m}/\text{dia}$)					Dies	Supervivència (%)				
	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄		D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
0-15	3,22 \pm /.	4,14 \pm /.	3,33 \pm /.	5,5 \pm /.	5,15 \pm /.	15	4,8 \pm /.	4,3 \pm /.	18,7 \pm /.	3 \pm /.	23 \pm /.
	0,33	1,15	0,97	0,30	1,25		4,75	3,79	27,21	3,00	25,24
15-30	6,85 \pm /.	-	9,49 \pm /.	-	12,41 \pm /.	30	0,5 \pm /.	-	1,5 \pm /.	-	11 \pm /.
	0,00	-	0,00	-	0,00		0,64	-	2,12	-	15,56
30-40	-	-	-	-	10,32 \pm /.	40	-	-	-	-	8 \pm /.
	-	-	-	-	0,00		-	-	-	-	0,00

-: no hi ha prou dades per calcular el creixement per manca de rèpliques viables.

Corbes de creixement i supervivència segons l'edat dels juvenils (dies)

Les figures 4, 5 i 6 mostren les corbes de creixement i de supervivència per a cada tractament alimentari. Les corbes de creixement ens indiquen la llargada mitjana acumulada dels juvenils per a cada dosi al llarg de l'experiment, començant per un valor inicial de $260,5\mu\text{m}$ per a totes les mostres. La supervivència s'ha calculat a partir de la supervivència mitjana de cada dosi.

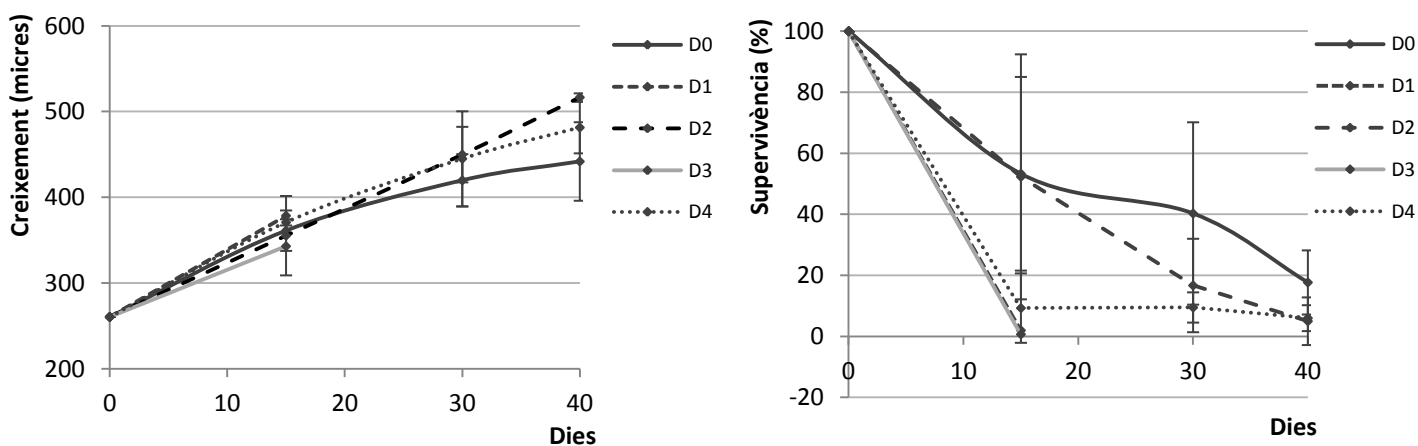


Fig. 4: Corbes de creixement i supervivència segons l'edat dels juvenils per al tractament amb algues de tipus 1. **A:** corba de creixement, en micròmetres, calculada a partir dels creixements mitjans per a cada dosi als 15, 30 i 40 dies. **B:** corba de supervivència, en %, calculada a partir de la supervivència mitjana de cada dosi als 15, 30 i 40 dies.

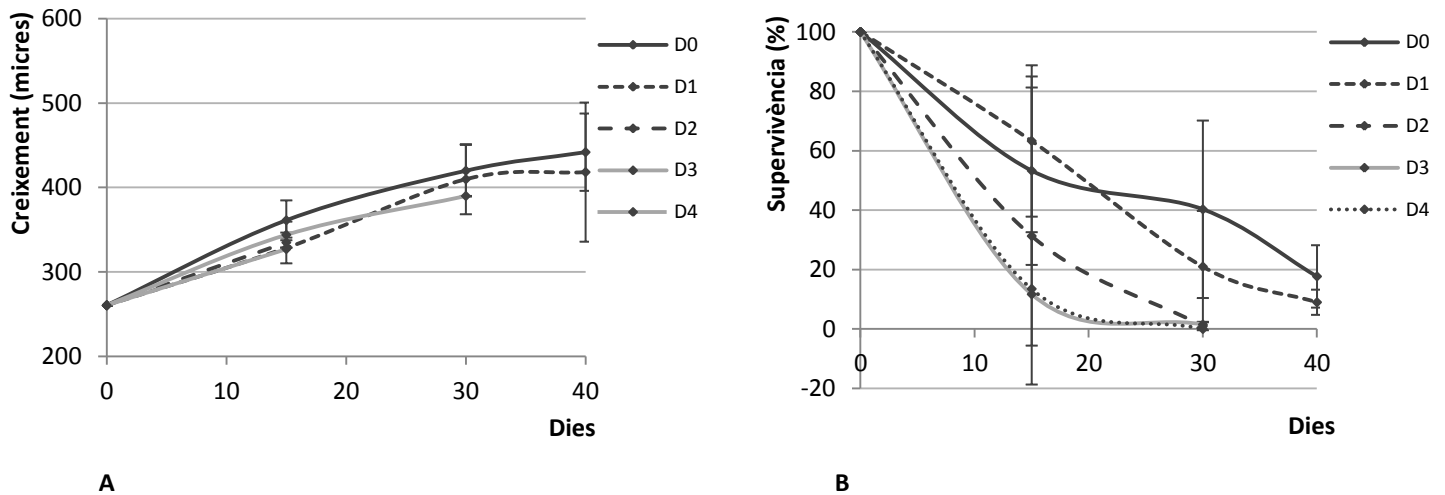


Fig. 5: Corbes de creixement i supervivència segons l'edat dels juvenils per al tractament amb algues de tipus 2. **A:** corba de creixement, en micròmetres, calculada a partir dels creixements mitjans per a cada dosi als 15, 30 i 40 dies. **B:** corba de supervivència, en %, calculada a partir de la supervivència mitjana de cada dosi als 15, 30 i 40 dies.

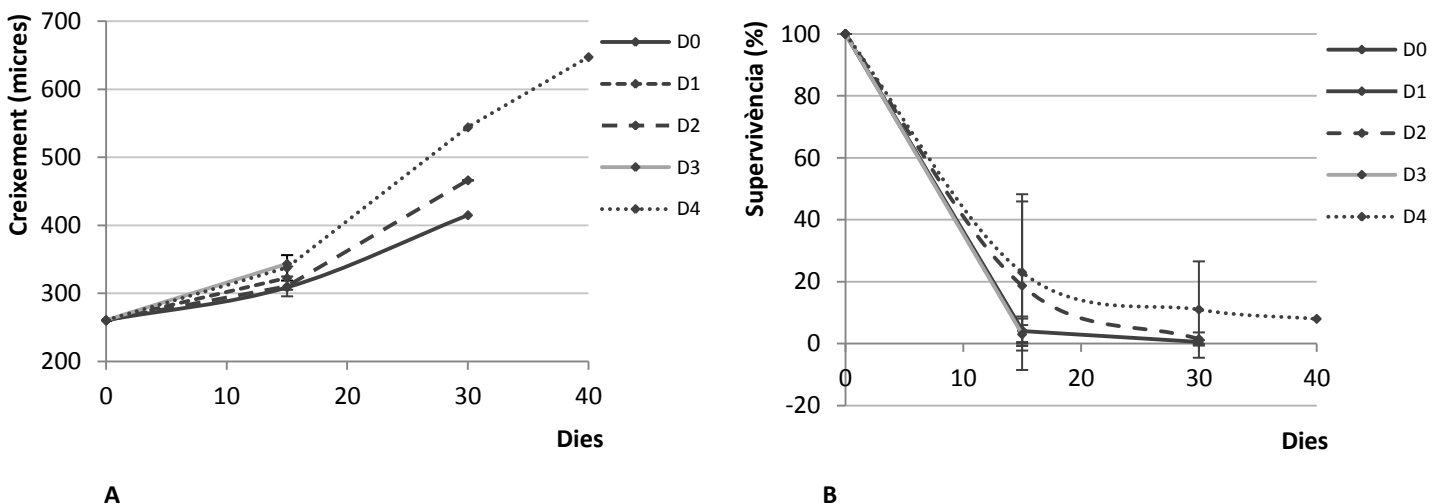


Fig. 6: Corbes de creixement i supervivència segons l'edat dels juvenils per al tractament amb algues de tipus 1 + un suplement de detritus. **A:** corba de creixement, en micròmetres, calculada a partir dels creixements mitjans per a cada dosi als 15, 30 i 40 dies. **B:** corba de supervivència, en %, calculada a partir de la supervivència mitjana de cada dosi als 15, 30 i 40 dies.

Tal i com s'observa a les taules anteriors, hi ha mesures que no presenten valor per manca de rèpliques viables. La viabilitat de les mostres es donava si el nombre de juvenils vius al final del recompte era igual o superior a 5 (criteri personal). Si era inferior, la mostra es descartava (els juvenils es mantenien en altres instal·lacions del centre).

Pel que fa al tractament amb algues de tipus 1 (taula 4 i figura 4), només D₀ i D₂ han mantingut les tres rèpliques viables fins al final de l'experiment. D₄ va presentar una rèplica amb zero individus vius durant els primers 15 dies, mentre que les supervivències de les altres dues van ser molt baixes (de 9,3 ± 11,37% els primers 15 dies a 6 ± 4,24% als 40 dies). D₀, sense contingut algal, presenta les taxes de creixement més petites (2,2 ± 1,59 μm/dia als 40 dies), arribant a una mitjana de 441,87 ± 45,8 μm als 40 dies, mentre que els creixements més grans

es troben a D_2 ($5,29 \pm 2,85 \mu\text{m}/\text{dia}$ als 40 dies), assolint llargades finals de $516,65 \pm 4,7 \mu\text{m}$. No obstant, la supervivència més alta de juvenils es dona a D_0 ($17,7 \pm 10,5\%$ als 40 dies respecte el $5 \pm 7,81\%$ de D_2). S'ha de tenir en compte que els valors de desviació ens indiquen una forta variabilitat entre rèpliques, sobretot en la supervivència. D_1 i D_3 van ser descartats als 15 dies després que cap de les tres rèpliques presentés més de 5 individus.

En el tractament amb algues de tipus 2 (taula 5 i figura 5), només D_0 i D_1 van mantenir creixement fins als 40 dies. D_1 presentava dos rèpliques viables i els valors de supervivència més alts els primers 15 dies ($63,3 \pm 25,48\%$), després superats per D_0 . D_1 , a més, va presentar una taxa de creixement molt baixa ($0,84 \pm 4,09 \mu\text{m}/\text{dia}$ als 40 dies), passant dels $409,85 \pm 41,5 \mu\text{m}$ als 30 dies als $418,25 \pm 82,4 \mu\text{m}$ als 40. D_0 presentava la taxa de creixement més alta durant els primers 15 dies, seguida per D_3 ($5,57 \pm 0,38 \mu\text{m}/\text{dia}$), tot i que la supervivència va baixar als 30 dies amb només una rèplica viable. D_2 i D_4 van presentar creixement als primers 15 dies, mentre que la supervivència als 30 dies era nul·la o quasi nul·la. La desviació en la supervivència dels juvenils és elevada, sobretot durant els 15 primers dies, indicant rèpliques amb alta supervivència i rèpliques amb baixa dins d'una mateixa dosi i mesura.

En el tractament d'algues de tipus 1, més un suplement fix de detritus (taula 6 i figura 6), trobem un model similar al tractament amb algues 1. D_2 i D_4 han estat les mostres amb més supervivència, mentre que D_1 i D_3 només van presentar creixement als primers 15 dies, amb només dues rèpliques viables i supervivències molt reduïdes ($4,3 \pm 3,79\%$ i $3 \pm 3\%$, respectivament). D_4 presentava una sola rèplica als 40 dies amb supervivència del 8%, i les taxes de creixement més altes ($5,15 \pm 1,25 \mu\text{m}/\text{dia}$ els primers 15 dies; $12,41 \mu\text{m}/\text{dia}$ als 30 i $10,32 \mu\text{m}/\text{dia}$ als 40). A més, presenta els valors més alts de creixement de juvenils, amb una mitjana de $544,2 \pm 0,00 \mu\text{m}$ als 30 dies i $647,4 \pm 0,00 \mu\text{m}$ al final de l'experiment. D_0 , sense contingut algal però amb detritus, presentava valors més petits de supervivència i creixement, tot i que s'ha pogut prendre mesures d'una rèplica fins als 30 dies.

La làmina 2 ens mostra exemples de creixements dels juvenils en diferents tractaments.

Per analitzar les tendències de les diferents dosis al llarg dels dies i comprovar si el creixement i la supervivència dels juvenils varien al llarg de l'experiment, s'ha calculat un coeficient de correlació a partir de les dades utilitzades en les corbes de creixement i supervivència (taules 6 i 7).

Taula 6: Test de correlació entre l'edat dels juvenils (dies) i el creixement (μm) en cadascun dels tractaments i per cada dosi. T1: tractament amb algues de tipus 1. T2: tractament amb algues de tipus 2. T3: tractament amb algues de tipus 1 + detritus.

-: no hi ha prou dades per a realitzar una correlació. ns= la correlació no és significativa ($P > 0,05$).

	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4
T1	0,979	-	0,999	-	0,989
T2	0,979	0,982	-	ns	-
T3	ns	-	ns	-	0,983

Taula 7: Test de correlació entre l'edat dels juvenils (dies) i la supervivència (%) en cadascun dels tractaments i per cada dosi. T1: tractament amb algues de tipus 1. T2: tractament amb algues de tipus 2. T3: tractament amb algues de tipus 1 + detritus.

-: no hi ha prou dades per a realitzar una correlació. ns= la correlació no és significativa ($P > 0,05$).

	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
T1	-0,973	-	-0,986	-	ns
T2	-0,973	-0,993	ns	ns	ns
T3	ns	-	ns	-	ns

El creixement dels juvenils augmenta amb l'edat quan la correlació sigui forta (taula 6). El tractament 1 presenta les tendències més clares de creixement en relació amb l'edat.

Pel que fa a la supervivència (taula 7), els valors amb correlació fortament negativa indiquen que la supervivència dels juvenils disminueix a mesura que avancem en el tractament, i serien dosis on s'ha donat el resultat esperat. Les dosis sense significació ens indiquen que la mortalitat dels juvenils no ve relacionada amb l'edat, sinó que altres factors hi estan formant part o hi estan afectant.

Comparació entre tractaments

Per tal de quantificar la contribució de les diferents fonts de variació (tipus de tractament i dosis) al total de la variabilitat observada en el creixement i la supervivència dels juvenils, s'ha realitzat una ANOVA de dos factors. L'ANOVA s'ha realitzat durant el període de creixement de 0-15 dies, l'únic amb totes de dades disponibles per a totes les dosis.

Pel que fa al creixement, no trobem diferències significatives entre dosis ($P=0,4718$; $>0,05$), tot i que sí que trobem diferències significatives segons el tipus de tractament ($P=0,0004$; $<0,05$). A partir de les comparacions de les mitjanes dos a dos, veiem que el tractament amb algues 1 difereix significativament dels altres dos en el creixement durant els primers 15 dies.

No existeix interacció entre factors ($P=0,6046$; $>0,05$), per la qual cosa les diferències en els tractaments no s'expliquen per les diferents dosis.

Pel que fa a la supervivència, no trobem diferències significatives ni entre les diferents dosis ($P=0,2842$; $>0,05$) ni entre els tres tractaments ($P=0,0504$; $>0,05$). No existeix interacció entre el tipus de tractament i les dosis aplicades ($P=0,3585$; $>0,05$).

IV.b. Diferents tractaments de recirculació d'aigua

Taxes de creixement i supervivència dels juvenils

S'ha calculat la taxa de creixement i la supervivència al llarg de l'experiment a partir de la mida inicial dels juvenils i el període de creixement. La mida inicial dels juvenils es va calcular a partir

de la llargada mitjana de 26 individus elegits a l'atzar l'inici de l'experiment, i pren un valor de 260,5µm. La taula 8 ens mostra els valors obtinguts per cada sistema de recirculació.

Taula 8: Taxa de creixement (increment de la llargada mitjana \pm SD) i supervivència (%) dels juvenils de 0 a 60 dies disposats en tres sistemes de recirculació d'aigua: nul·la, baixa i alta. Les dades de creixement representen l'increment de la llargada mitjana (µm/dia) calculada a partir dels individus mesurats en cadascuna de les tres rèpliques i per a cada tractament. La desviació s'ha estandarditzat al nombre de rèpliques restants a cada mesura. Cada dosi presentava inicialment 200 individus de 260,5µm i una supervivència del 100%.

Edat (dies)	Increment de llargada dels juvenils (µm/dia)			Dies	Supervivència (%)		
	Tipus de recirculació				Tipus de recirculació		
	Nul·la	Baixa	Alta		Nul·la	Baixa	Alta
10	15,96	12,4	10,94	10	72,5	71,3	61,2
	\pm 4,80	\pm 1,00	\pm 1,75		\pm 15,39	\pm 11,24	\pm 12,52
20	23,18	13,18	SENSE	20	65,2	23,2	SENSE
	\pm 5,30	\pm 3,22	DADES		\pm 14,47	\pm 12,27	DADES
30	SENSE	SENSE	7,36	30	SENSE	SENSE	7,5
	DADES	DADES	\pm 3,09		DADES	DADES	\pm 5,55
40	23,41	6,86	0,16	40	62,3	5,2	3,6
	\pm 5,61	\pm 5,88	\pm 1,44		\pm 14,29	\pm 2,93	\pm 2,80
50	34,60 \pm 1,96	-	-	50	58,7	-	-
					\pm 12,86		
60	21,91 \pm 20,00	-	-	60	57,5	-	-
					\pm 15,26		

-: no hi ha prou dades per calcular el creixement per manca de rèpliques viables.

SENSE DADES: no es van poder prendre mesures d'aquests tractaments.

Corbes de creixement i supervivència segons l'edat dels juvenils (dies)

La figura 8 mostra la corba de creixement i de supervivència per a cada tractament. La corba de creixement indica la llargada mitjana acumulada a cada període de creixement, començant per un valor de 260,5µm per a totes les mostres. La supervivència s'ha calculat a partir de la supervivència mitjana de cada tractament.

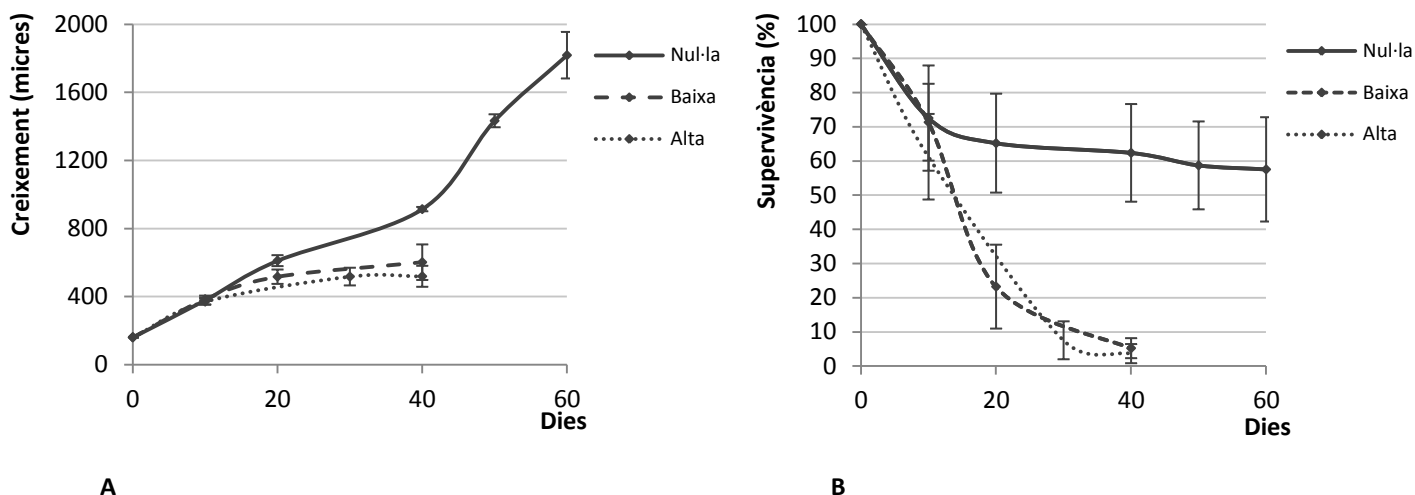


Fig. 8: Corbes de creixement i supervivència segons l’edat dels juvenils per a cadascun dels tractaments de recirculació: nul·la, baixa i alta. **A:** corba de creixement, en micròmetres, calculada a partir dels creixements mitjans per a cada tractament dels 10 als 60 dies. **B:** corba de supervivència, en %, calculada a partir de la supervivència mitjana de cada tractament dels 10 als 60 dies.

La làmina 2 ens mostra exemples de creixements dels juvenils continguts en diferents tractaments.

Pel que fa al tractament sense recirculació d’aigua, totes les rèpliques han sobreviscut fins al final de l’experiment. Les tres rèpliques presenten els majors valors de creixement dels juvenils, arribant als 913,27µm als 40 dies i als 1.432,17µm als 60 dies, amb taxes finals de 21,91⁺/ 20,00µm/dia. Les taxes de creixement, a més, han augmentat al llarg dels dies, amb taxes màximes als 50 dies d’experiment i valors de 34,60⁺/ 1,96µm/dia.

Les mostres amb recirculació baixa i alta van arribar als 40 dies amb les tres rèpliques viables. Els valors de creixement, però, van ser baixos i van anar disminuint al llarg de l’experiment, assolint llargades finals dels juvenils de 518,67µm en el tractament amb recirculació baixa i 517,03 en el d’alta. La supervivència final en els dos casos també va ser molt baixa, amb un 5,2⁺/ 2,93% i un 3,6⁺/ 2,80%, respectivament.

Per estudiar la relació entre l’edat dels juvenils i el seu creixement, així com l’edat dels juvenils i la seva supervivència al llarg de l’experiment, s’ha calculat un test de correlació a partir de les dades utilitzades en les corbes de la figura 8 (taules 9 i 10).

Taula 9: Test de correlació entre l’edat dels juvenils (dies) i el creixement (µm) en cadascun dels tractaments de recirculació: nul·la, baixa o alta.

Nul·la	0,977
Baixa	0,937
Alta	0,921

Taula 10: Test de correlació entre l’edat dels juvenils (dies) i la supervivència (%) en cadascun dels tractaments de recirculació: nul·la, baixa o alta.

Nul·la	- 0,826
Baixa	- 0,951
Alta	- 0,965

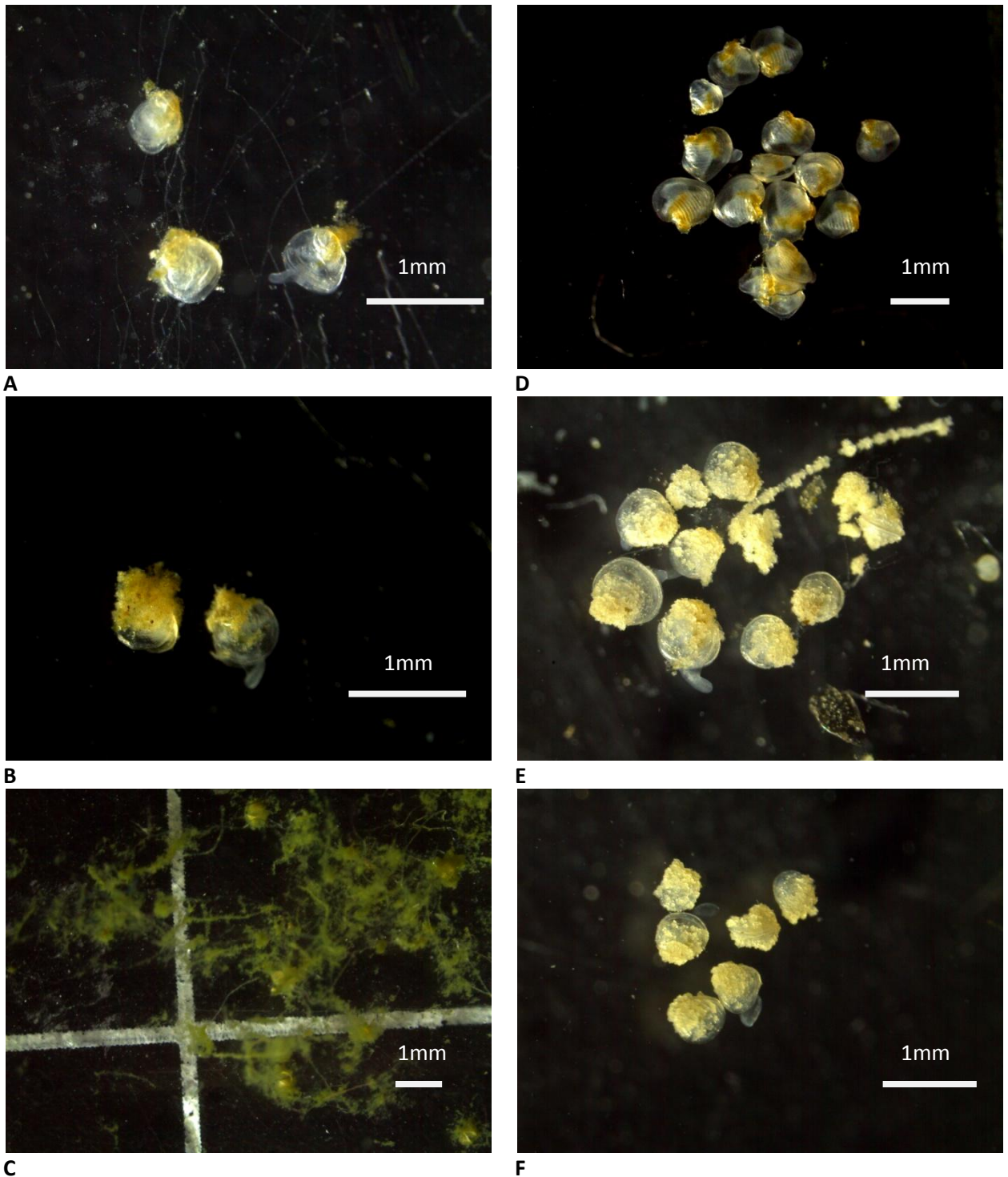
La supervivència i el creixement estan correlacionats amb l'edat dels juvenils (dies) en tots els tractaments. Per tant, a més edat, el creixement dels juvenils augmenta i la seva supervivència als recipients disminueix. El tractament sense circulació d'aigua presenta la correlació més forta en el creixement (0,997), però presenta la correlació més baixa en la supervivència (-0,826), degut a la poca mortaldat d'individus al llarg dels 60 dies de durada de l'experiment.

Comparació entre tractaments

L'anàlisi de covariància o ANCOVA ens permetrà estudiar les relacions existents entre el tipus de tractament, la variable a estudiar (supervivència i creixement) i l'edat dels juvenils.

Els resultats mostren diferències significatives entre el creixement dels juvenils i el tipus de tractament ($P=0,0150$; $<0,05$. Error tipus II), i entre la supervivència dels juvenils i el tipus de tractament ($P=0,0040$; $<0,05$. Error tipus II).

A més, existeix una interacció significativa entre el tractament (factor) i l'edat dels juvenils (covariable), que ens indica que el creixement i la supervivència dels juvenils enfront la seva edat, depèn del tipus de tractament que s'efectuï (per al creixement, $P=0,0287$; $<0,05$ i per la supervivència, $P=0,0299$; $<0,05$). Així, els juvenils tractats sense recirculació, presenten més creixement ($P=0,0168$; $<0,05$) i més supervivència ($P=0,0280$; $<0,05$) que els altres tractaments al llarg dels dies d'experiment.



Làmina 2: Exemples de creixement dels juvenils d'*Unio manicus* al llarg dels diferents períodes de mesura en els dos experiments realitzats. **A:** Juvenils de 40 dies alimentats amb algues de tipus 1 en una dosi 2 **B:** Juvenils de 40 dies alimentats amb algues de tipus 1, més un suplement de detritus, en una dosi 4. S'observa com les valves estan envaïdes per una massa filamentosa. **C:** Placa amb presència de fibres procedents de les llavors de pollancre. **D:** Juvenils de 40 dies mantinguts en un sistema de corrent sense recirculació d'aigua. **E:** Juvenils de 40 dies mantinguts en un sistema de corrent amb velocitat baixa de recirculació d'aigua. **F:** Juvenils de 40 dies mantinguts en un sistema de corrent amb velocitat alta de recirculació d'aigua.

V. DISCUSSIÓ

V.a. Tipus d'algues i alimentació

El resultat d'aplicar juvenils de nàiade allargada a diferents tractaments alimentaris i a diferents dosis de contingut algal mostra resultats molt poc significatius. Moltes dosis no han presentat un creixement normal en relació a l'edat, alhora que s'han produït moltes morts en massa en certes rèpliques, assumint l'existència d'un o varis factors incontrolats al llarg de l'experiment.

En primer lloc, ens hem de fixar en els diferents tipus d'alimentació i en com han influenciat aquests en el creixement. Segons els resultats, el creixement dels juvenils varia als 15 primers dies d'experimentació amb el tipus de tractament. Per una banda, el contingut de lípids de les algues està directament correlacionat amb el creixement dels juvenils (Carvalho *et al.*, 2004). Si ens fixem en el contingut de lípids de les algues utilitzades a l'experiment, veiem com *Nannochloropsis* 18%, dins de les algues de tipus 2, són les que presenten major quantitat de lípids (28%), seguit per les algues liofilitzades del tipus 1 (20%). Seguint aquest paràmetre, el tractament amb algues de tipus 2 hauria de tenir més creixement de juvenils, tot i que a la realitat no és així, ja que durant els primers 15 dies d'experiment, el creixement de juvenils amb algues de tipus 1 ha estat significativament més elevat.

A part del contingut de lípids, s'ha de tenir en compte l'alta especificitat que presenten els juvenils de nàiade per uns tipus d'alimentació de mida i forma determinada. De fet, l'edat dels juvenils no afecta a les seves preferències per un determinat grup d'algues, encara que la manca d'una anatomia i una fisiologia completament formada els hi fa difícil poder escollir certes partícules de la mateixa manera que ho fan els individus adults (Lima *et al.*, 2012).

Comparant la mida de les algues seleccionades, veiem que el conjunt d'algues de tipus II són relativament més petites (de 1 a 10µm) que les algues de tipus I (de 2 a 14µm), tot i que *Nannochloropsis*, l'alga de mida més petita, es troba a les algues liofilitzades en una major proporció de cèl·lules per mil·lilitre respecte les altres. No obstant, s'ha comprovat que una mescla de diferents espècies d'algues resulta, generalment, en majors taxes de creixement i major supervivència comparat amb una sola espècie (Eybe *et al.*, 2013), ja que pots contrarestar el problema de quina és la mida d'algues que prefereixen els juvenils, quines espècies són millors i amb quina mesura s'ha de fer una renovació d'aliment.

Amb els nostres resultats podem inferir que, al menys durant els 15 primers dies, els juvenils d'*Unio mancus* presenten més creixement, i per tant, més preferència alimentària per les algues de tipus 1, tot i tenir menys contingut de lípids i ser proporcionalment més grosses que les de tipus 2.

La ingestió de sediment fi permet ajudar a la digestió d'aquelles algues amb parets cel·lulars rígides, a més de contenir material orgànic utilitzat en l'alimentació (Lima *et al.*, 2012).

Semblaria que el tractament amb algues de tipus 1 més un suplement de detritus hauria de presentar millors creixements que el tractament amb algues de tipus 1, tot i que els resultats mostren que el detritus ha fet disminuir significativament el creixement dels juvenils en els primers 15 dies. És possible que la qualitat del detritus agafat al prat humit no sigui apte per a l'alimentació de les nàiades, i que, a més, presentés algun component poc digerible o contaminant que provoqués la mort dels individus a pocs dies del inici de l'experiment.

També ens cal analitzar els resultats a nivell de les diferents dosis d'aplicació. Altes concentracions d'algues són perjudicials per als juvenils de nàiades (Eybe *et al.*, 2013), per tant, les dosis massa baixes o les dosis massa altes haurien de presentar menys creixement i supervivència que les dosis intermèdies. No obstant, no s'han trobat diferències significatives entre el tipus de dosi i el tractament aplicat. És interessant remarcar el cas de la dosi control, sense contingut algal i sense detritus, i que ha presentat creixements durant els 40 dies amb una supervivència ben correlacionada amb l'edat dels juvenils. Els juvenils de nàiade presenten reserves de menjar per menys de vuit dies després de l'alliberament del seu hoste i necessiten menjar addicional el més aviat possible (Eybe *et al.*, 2013). L'aigua de l'Estany de Banyoles és possiblement una aigua amb prous nutrients com per mantenir els juvenils, al menys, un mes i mig.

Els juvenils alimentats amb algues de tipus 1, tot i no presentar dosis significativament diferents entre elles, presenten més creixement quan s'alimenta els individus amb $296,38 \times 10^6$ cèl·lules provinents d'algues liofilitzades en recipients de 500 ml d'aigua (D₂). Tot i que només es basa en una tendència sense valor estadístic, és un bon punt de partida per a una futura recerca que ens permeti formular una millor dieta per a la cria de juvenils.

Eybe *et al.* (2013), en el seu experiment de cria de juvenils de nàiade, van suggerir alimentar-los amb una quantitat petita d'algues de tipus 2 durant el primer mes i anar incrementant la quantitat a mesura que els juvenils augmentaven de mida. Els resultats van presentar les taxes de creixement més altes. En el nostre cas, la manca d'una possible relació entre el creixement i les diferents dosis del tractament amb algues de tipus 2 pot ser degut a una formulació algal poc específica per als juvenils d'*Unio mancus*, els quals no han pogut ingerir i digerir naturalment el tipus de cèl·lules fitoplanctòniques presents.

En les algues de tipus 1, més un suplement de detritus, cal destacar la tendència dels juvenils a augmentar la seva taxa de creixement a cada període de mesura. Als primers 15 dies, els seus creixements són significativament inferiors als del tractament amb algues de tipus 1, tot i que, a mesura que avancem en l'experiment, les taxes del tractament amb detritus van augmentant mentre que les altres van disminuint. La prova d'això la trobem als valors de creixement observats a D₄, amb taxes de creixement molt altes i juvenils que sobrepassen els 600 micròmetres. Es tracta d'una dada poc representativa del tractament, ja que està calculada a partir de pocs individus d'una sola rèplica viable.

L'estadi juvenil de molts animals aquàtics, incloses les nàiades, és més sensible a les condicions del medi que l'estadi adult (Kovitvadhi *et al.*, 2007). Aquest fet ens podria explicar les altes mortalitats que hi ha hagut al llarg dels dies, tot i que sobretot s'ha donat en els 15 primers dies d'experiment i de manera independent al tipus de dosi o tractament. Per tant, és impossible associar la supervivència a un tipus d'alimentació en concret. Varis factors incontrolats han pogut contribuir a aquest fenomen, tot i en poden haver d'altres que no s'han pogut constatar.

Per una banda, el fet que els recipients hagin estat emmagatzemats en la foscor ha pogut generar el medi idoni per al creixement de fongs o demás microorganismes. Un desavantatge d'aquest mètode de cria de juvenils es troba en que si hi ha una contaminació amb fongs o altres microorganismes dins d'un mateix recipient, aquests poden dispersar-se ràpidament entre els altres individus degut al poc volum d'aigua utilitzat (Eybe *et al.*, 2013). La presència d'aquests organismes era visible a la lupa binocular, on es podien veure els juvenils coberts per una pel·lícula filamentosa que impedia el correcte desenvolupament dels juvenils i en produïa la seva mort, tot i que no se'n va poder determinar l'espècie. Aquestes característiques van ser visibles en una rèplica de la D₂ del tractament amb algues 1 i en vàries dosis del tractament amb algues 1 més detritus. Possiblement, la contaminació entre rèpliques a partir de material contaminat és la causa de la contaminació de les rèpliques dins d'un mateix tractament, tot i que es podrien tractar d'invasions independents. Per tal d'eradicar el problema, una solució hagués estat la neteja dels recipients i el material amb aigua calenta o alcohol 70% després de cada renovació de l'alimentació (Eybe *et al.*, 2013).

La presència de microorganismes no és la única causa de mortalitat que poden haver patit els juvenils durant el seu desenvolupament. Els ambients del voltant del Centre de Reproducció de Nàiades està envoltat per una gran comunitat de pollancre (*Populus* sp.). Durant el període de realització de l'experiment (època primaveral) a l'ambient s'hi trobava multitud de llavors de pollancre en forma de borrissol o fibres, les quals arribaven fàcilment dins les instal·lacions dels centre i envaïen els medis de creixement. A més, aquestes fibres també podien arribar a les instal·lacions per via directe de l'aigua de l'Estany. Les fibres van ser observades a les plaques de petri mitjançant la lupa binocular i apareixien formant agregats amb els juvenils, impeding el seu lliure moviment i provocant la seva mort per falta de nutrients o per apilonament. Aquest fenomen podria haver estat el causant de les altes mortalitats que s'han donat en aquelles dosis que no han arribat a sobreviure als 30 dies experimentals, com les rèpliques D₃ del tractament amb algues de tipus 1 o algunes de les rèpliques de D₂ i D₄ del tractament amb algues de tipus 2. Per tal d'evitar aquest problema, cal un millor control dels recipients i de les plaques de petri que estan en ús, evitant que romanguin obertes durant el procés de mesura de juvenils i renovació de l'alimentació.

V.b. Circulació i qualitat de l'aigua

Varis sistemes de cultiu han estat portats a terme per la cria de juvenils de nàiade, tot i que el sistema de recirculació ha estat el més utilitzat (Kovitvadhi *et al.*, 2007).

Dos paràmetres importants en el cultiu de juvenils en sistemes d'aqüicultura són, per una banda, la qualitat de l'aigua utilitzada (en el nostre cas, l'aigua prové directament de l'Estany de Banyoles), i, per una altra, una alimentació fitoplanctònica que pugui ser ingerida i correctament digerida pels juvenils (Kovitvadhi *et al.*, 2006). *Nannochloropsis* sp. és una espècie freqüentment introduïda al disseny de sistemes de cria amb recirculació com a font primària d'aliment (Eybe *et al.*, 2013). L'alimentació utilitzada en aquest experiment s'ha basat en un barreja d'algues liofilitzades, entre elles *Nannochloropsis gaditana*.

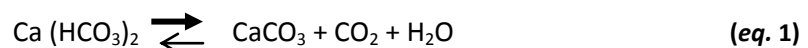
Els sistemes de malla sense sediment, com en el nostre cas, també han tingut èxit en la cria de molts juvenils, ja que la malla proporciona una superfície adequada per atrapar materials orgànics de l'aigua i proporcionar un suplement alimentari natural (Lima *et al.*, 2012). El material orgànic, a més, fa disminuir els processos de desnitrificació del medi (Eybe *et al.*, 2013), principal causa de mortalitat dels juvenils en condicions de laboratori (Kovitvadhi *et al.*, 2007), aportant una major qualitat de l'aigua.

Segons els resultats obtinguts, el creixement i la supervivència del tractament sense recirculació de l'aigua han estat significativament més elevats que els altres tractaments.

Per una banda, podríem determinar que la qualitat de l'alimentació aportada era bona per als juvenils, ja que era la mateixa per als tres tractaments i ens ha donat mesures de creixement i supervivència fins als 60 dies, quan els juvenils ja presenten tots els seus òrgans completament formats (Kovitvadhi *et al.*, 2006).

El motiu pel qual la supervivència dels juvenils en els tractaments de baixa i alta recirculació no ha estat bona el trobem en els canvis químics de l'aigua deguts a l'efecte de la ventilació i l'elevada duresa de l'aigua de l'Estany de Banyoles. En condicions normals, el bicarbonat de calci es troba en equilibri al medi (eq. 1). El sistema de recirculació d'aigua porta associat un bombeig vertical d'aigua, des del fons del tanc fins a la sortida dels tubs cap els recipients, gràcies a les bombes d'aire emprades. Durant aquest procés es genera una oxigenació de l'aigua gràcies a la seva ventilació (es formen bombolles que arrossegueu l'aigua de forma ascendent i que, al trencar-se, donen lloc a un intercanvi de gasos). Aquest mecanisme suposa una pèrdua de diòxid de carboni que desplaça la reacció cap a la formació de carbonats, els quals precipiten al fons del recipient en forma de cristalls i també a sobre les closques dels juvenils. Aquests cristalls, situats sobre els juvenils d'*Unio mancus*, provoquen la saturació dels mateixos impeding el seu desenvolupament normal i provocant la seva mort.

Aquests cristalls van ser visibles a la lupa binocular, i es va poder comprovar que eren els causants de l'alta mortalitat dels juvenils en els dos tractaments amb recirculació d'aigua.



D'aquesta manera, els grans creixements trobats en el tractament sense recirculació d'aigua s'expliquen per la suma de: a) una dieta específica i apropiada per al desenvolupament dels juvenils i b) una millor qualitat de l'aigua en la no recirculació d'aquesta.

VI. CONCLUSIONS

- Growth rates indicate high preference for a diet based on a mix of algae from Easy Reefs® with the following composition: *Nannochloropsis gaditana* (250.000 cel/ml), *Tetraselmis chuii* (50.000 cel/ml) and *Phaeodactylum tricornutum* (250.000 cel/ml). On the contrary, adding terrestrial detritus in plastic boxes led to a decrease of growth rates of juveniles.
- Rearing juvenile mussels in 500 ml glass boxes with different food mixtures is not an effective method for *Unio mancus* since survival of juveniles has been affected for uncontrolled agents such as foreign microorganisms or fibrous particles from poplar seeds.
- When putting juveniles on an aquacultural system with high and low water recirculation, the effects of both the aeration and a high water recirculation can provoke the precipitation of calcium carbonate on the filter mesh as well as in container's walls and upon juvenile shells. Juvenile exposures to carbonates probably disturb them and end in high mortality and low growths.
- Experimentation in the culture of *Unio mancus* shown that the most effective method for rearing juveniles is a laboratory-scale aquaculture system, with 200 juveniles per plastic container provided with a mesh at the bottom, maintained in a tank with pond water without recirculation and feed with a mix of marine algae from Easy Reefs®. With this method we obtained healthy mussels of more than 1,8 mm in 60 days and with a survival of more than 50%.
- From the present study is possible to propose a very profitable aquaculture system to maintain a population of *Unio mancus* under excellent conditions in the laboratory, while it enable us to focus our research in a better algae diet, a major control of environmental factors and consequently, a higher survival of juveniles in stabling conditions.

AGRAÏMENTS

Voldria agrair, en primer lloc, al Consorci de l'Estany de Banyoles per haver-me brindat l'oportunitat de realitzar les pràctiques del meu treball final de grau amb ells i poder col·laborar en el seu projecte LIFE de manera directa.

També voldria agrair a tots els treballadors del Laboratori de Nàiades de Banyoles per haver-me ensenyat tantes coses sobre les nàiades i sobre el treball que estan realitzant en el centre, en especial al Miquel Campos, que m'ha guiat i ajudat durant totes les pràctiques i en la redacció d'aquesta memòria.

Finalment, agrair a la meva tutora de la UdG, Anna Romaní, per haver revisat la memòria i haver aportat el seu criteri.

BIBLIOGRAFIA

Araujo, R. *Unio elongatulus*. 2012. En: VV.AA., Bases ecológicas para la conservación de las especies de interés comunitario en España: Invertebrados. *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente*. Madrid. 62 pp

Araujo, R., Gómez, I., Machordom, A. 2004. The identity and biology of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (= *U. elongatulus*) (Bivalvia: Unionidae) in the Iberian peninsula. *Journal of Molluscan Studies* **71**: 25-31

Araujo, R., Reis, J., Machordom, A., Toledo, C., Madeira, MJ., Gómez, I., Velasco, JC., Morales, J., Barea, JM., Ondina, P., Ayala, I. 2009. La náyades de la península Ibérica. *Iberus*, 27 (2)

Bolland, JD., Bracken, LJ., Marin, R., Lucas, MC. 2010. A protocol for stocking hatchery reared freshwater pearl mussel Margaritifera. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **20**: 695–707.

Campos, M., Araujo, R., Feo, C. 2013. Informe de los resultados de la cría en cautividad y reproducción de *Unio elongatulus*. LIFE08 NAT/E/000078 "Mejora de los hábitats y especies de la Red Natura 2000 en Banyoles: Un proyecto demostrativo".

Campos, M., Feo, C., Pou, Q., Araujo, R., Carrillo, I. Informe Layman 2010-2013. Consorci de l'Estany. DL: GI.1727-2013

Eybe, T., Thielen, F., Bohn, T., Sures, B. 2013. *The first millimetre- rearing juvenile freshwater pearl mussels (Margaritifera margaritifera L.) in plastic boxes*. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* **23**: 964-975

Feo, C., Araujo, R., Campos, M., Pou, Q. Protocolo de reproducción en cautividad de *Unio elongatulus*. LIFE12 NAT/ES/001091. "Conservación de fauna fluvial de interés europeo en red Natura 2000 de las cuencas de los ríos Ter, Fluviá y Muga"

Helm, Michael M., Bourne, N. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*.

Kovitvadi, S., Kovitvadi, U., Sawangwong, P., Machado, J. 2007. A laboratory-scale recirculating aquaculture system for juveniles of freshwater pearl mussel *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856). *Aquaculture* 275 (2008) 169-177

Kovitvadi, S., Kovitvadi, U., Sawangwong, P., Thongpan, A., Machado, J. 2006. Optimization of diet and culture environment for larvae and juvenile freshwater pearl mussels, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* Lea, 1856. *Invertebrate Reproduction and Development*, **49**: 1-2 (2006) 61-70

Lima, P., Lopes Lima, M., Kovitvadi, U., Kovitvadi, S., Owen, C., Machado, J. 2012. A review on the "in vitro" culture of freshwater mussels (Unionida). *Hidrobiologia* (2012) **691**: 21-33