



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Distribution and ecology of soft-bottom
Sipuncula from the western Mediterranean
Sea

Luis Miguel Ferrero Vicente



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Distribution and ecology of soft-bottom Sipuncula from the western Mediterranean Sea

Luis Miguel Ferrero Vicente

PhD Thesis 2014



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Dpt. Ciències del Mar i Biologia Aplicada
Dpto. Ciencias del Mar y Biología Aplicada



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Dpt. de Ciències del Mar i Biologia Aplicada
Dpto. de Ciencias del Mar y Biología Aplicada

DOCTORADO EN CIENCIAS DEL MAR Y BIOLOGÍA APLICADA

**Distribution and ecology of soft-bottom Sipuncula
from the western Mediterranean Sea**

**Distribución y ecología de los sipuncúlidos de fondos
blandos del mar Mediterráneo occidental**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor
Internacional en la Universidad de Alicante por**

LUIS MIGUEL FERRERO-VICENTE

ALICANTE, Octubre 2014

Dirigida por: Dr. José Luis Sánchez Lizaso



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

*«If I saw further than other men, it was
because I stood on the shoulders of giants»*

—Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGEMENTS

En primer lugar quiero agradecer a la Mancomunidad de los Canales del Taibilla la financiación aportada a través de los diferentes proyectos en los que hemos colaborado. También agradezco a José Luis el haberme ofrecido la oportunidad de trabajar en lo que me gusta, el mar y los animales, aunque sean pequeños y raros. Muchas gracias por la confianza, por permitirme realizar esta tesis y participar en otros proyectos de investigación en los que tantas cosas he aprendido.

En un plano más personal quiero expresar mi gratitud a toda mi familia y amigos, especialmente a mis padres y hermanos, que saben lo difícil que ha sido este camino. Parecía que nunca iba a llegar el momento de terminar, pero al fin ha llegado, muchas gracias por todo vuestro apoyo. También mi agradecimiento a Ángel Loya, porque sin él esta oportunidad posiblemente no habría existido, y por todo su apoyo y amistad durante estos años. Él lo ha vivido conmigo, los momentos buenos y también los malos. Agradecer también a Eva su apoyo durante la primera etapa de este proyecto y por compartir la aventura de iniciar algo nuevo en un lugar distinto.

Muchas gracias también a todos mis compañeros/profesores del departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada y del CIMAR. Cada uno ha ayudado de una u otra forma a que esta tesis salga adelante; por su ayuda en el trabajo de campo, en el laboratorio o en el despacho, por sus consejos, por compartir su experiencia conmigo y por los buenos momentos dentro y fuera del trabajo. La lista es grande pero espero no olvidarme de nadie: Candela, Elena, Ángel, José, Yoana, Arecha, Maite, Tocho, Andrés, Irene, Aitor, Esther, Damián, Carlos, Yolanda, Vicky, Kilian, Lute, Lydia, Agustín, José Miguel, Aurora, Marta D, Mercedes, Antonio, Isidro, Celia, Elia, Bea, Cristina, Mohamed, Ana F, Ana N, José Vicente, Rosa, Marta, José Luis, Pablo S, Just B, Alfonso, Paqui, Zubcoff... perdón si me olvido de alguien. Muchísimas gracias a todos!

Tengo que agradecer a Iñaki Saiz el haberme mostrado el camino. Mi estancia en la UPV en 2006 fue muy corta, apenas una mañana, pero llegué allí con una caja llena de ascidias, actinias, nemertinos, platelmintos y algún que otro sipuncúlido... cuando regresé a Alicante ya tenía claro lo que era un sipuncúlido y la metodología a seguir para identificarlos. Ese fue el verdadero inicio de este trabajo. Gracias también por la orientación que me has dado cuando te he trasladado alguna duda. Agradezco también el gran trabajo y el esfuerzo realizado por mis predecesores en este campo, en especial a Edward Cutler, al que no tuve la suerte de conocer, pero aun así me lo ha hecho todo más fácil. También gracias a Serge Gofas y Jesús Troncoso por los consejos y la ayuda en la identificación de los pequeños bivalvos que han aparecido en este trabajo.

Muchas gracias a Just Cebrián por permitirme realizar una estancia en su laboratorio del DISL en Alabama y por portarse conmigo como un buen amigo más que como un jefe; tus consejos son siempre bien recibidos. Allí conocí a gente maravillosa y aprendí muchísimo, tanto en el plano laboral como en el personal. Muchas gracias también a todo el staff del DISL por ponérmelo todo tan fácil durante la estancia, especialmente

a Aaron M por su ayuda con el inglés y a Ken Heck por muchísimas cosas. Thank you all!.

Por último y más importante muchas gracias a Candela, por estar siempre a mi lado, tanto en el plano personal como en el profesional, y porque no has dejado de apoyarme ni un segundo en los momentos buenos y en los más bajos. Eres lo más importante que me llevo de todos estos años. Gracias por ser el faro que ilumina mi camino.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

TABLA DE CONTENIDOS / TABLE OF CONTENTS

Agradecimientos / Acknowledgements	7
Resumen	11
1. Introducción general	25
1.1—Antecedentes históricos	29
1.2—Contribuciones recientes.....	30
1.3—Posición filogenética del phylum Sipuncula	31
1.4—Distribución del phylum Sipuncula.....	33
1.5—El Phylum Sipuncula en el Mediterráneo español.....	35
1.6—Aspectos morfológicos.....	35
1.7—Aspectos ecológicos	36
1.8—Valor comercial.....	38
1.9—Justificación y objetivos	39
2. First record of the sipunculan worm <i>Phascolion caupo</i> Hendrix 1975 in the Mediterranean Sea	41
2.1—Abstract	43
2.2—Introduction	43
2.3—Materials and methods	44
2.4—Results and discussion.....	44
2.5—Key to the genus <i>Phascolion</i> in the Mediterranean Sea.....	47
3. Soft-bottom Sipuncula from San Pedro del Pinatar (western Mediterranean): influence of anthropogenic impacts and sediment characteristics on their distribution	49
3.1—Abstract	51
3.2—Introduction	51
3.3—Material and methods.....	53
3.3.1 <i>Study area and sampling design</i>	53
3.3.2 <i>Laboratory analysis</i>	54
3.3.3 <i>Data processing</i>	55
3.4—Results	56
3.5—Discussion.....	60
4. Distribution of Sipuncula in the Gulf of Valencia and Cape Nao (western Mediterranean)	63
4.1—Abstract	65
4.2—Introduction	65
4.3—Material and methods.....	66
4.3.1 <i>Study area and sampling design</i>	66
4.3.2 <i>Laboratory analysis</i>	66
4.3.3 <i>Species identification</i>	67
4.3.4 <i>Statistical analysis</i>	67
4.4—Results	68
4.5—Discussion.....	70
4.6—Conclusions	76

5. Limiting factors on the distribution of shell/tube-dwelling sipunculans	79
5.1—Abstract	81
5.2—Introduction	81
5.3—Material and methods	84
5.3.1 <i>The study site</i>	84
5.3.2 <i>Experimental design and sampling procedure</i>	85
5.3.3 <i>Laboratory analysis and data processing</i>	86
5.4—Results	86
5.5—Discussion	89
5.6—Conclusions	94
6. Observations on the ecology and reproductive biology of <i>Aspidosiphon muelleri</i> Diesing 1851	95
6.1—Abstract	97
6.2—Introduction	97
6.3—Material and methods	99
6.3.1 <i>Study area and sampling design</i>	99
6.3.2 <i>Laboratory work and data process</i>	99
6.4—Results	100
6.4.1 <i>Abiotic factors</i>	100
6.4.2 <i>Biology of <i>Aspidosiphon muelleri</i></i>	102
6.5—Discussion	105
7. Discusión general	111
7.1—Distribución del phylum Sipuncula en el Mediterráneo español	113
7.2—Ecología de las especies estudiadas	115
7.2.1 <i>Relación animal-sedimento</i>	115
7.2.2 <i>Especies conchícolas/tubícolas</i>	118
7.2.3 <i>Aspidosiphon muelleri; la especie dominante</i>	120
7.3—Respuesta al estrés ambiental y su uso como especies bioindicadoras	121
7.3.1 <i>Influencia antropogénica sobre los poblamientos de sipuncúlidos</i>	121
7.3.2 <i>Uso de las especies estudiadas como bioindicadores</i>	122
Conclusiones / Conclusions	125
References	131



Resumen

Photo: *Aspidosiphon muelleri* Diesing 1851

Resumen

1. Introducción

Los sipuncúlidos integran un grupo de invertebrados marinos, protóstomos, celomados e insegmentados que presentan simetría bilateral y tienen categoría de phylum independiente (Hyman 1959). Este grupo está representado por aproximadamente 150 especies (Cutler 1994), por lo que se trata de un phylum con una baja diversidad. Su origen filogenético no es del todo conocido y aunque se les ha relacionado con los moluscos parece que Annelida es el grupo con el que tienen una mayor afinidad, e incluso algunos autores ya incluyen a los sipuncúlidos dentro del phylum Annelida, aun cuando la posición exacta que ocuparía dentro de este grupo no ha sido determinada.

Se trata de organismos que presentan un alto rango de tolerancia a la temperatura (-1.9°C – 29°C) y a la profundidad (0–7000 m), por lo que su distribución abarca todos los océanos del mundo y todo el rango batimétrico (Cutler 1975, 1977ab, 1994; Cutler & Cutler 1980, 1987b; Murina 1971, 1975, 1977, 1984), exceptuando zonas extremadamente salobres (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). Aunque muchas de las especies son consideradas cosmopolitas, recientes estudios sugieren altos niveles de diferenciación genética entre individuos de poblaciones distantes (Kawauchi & Giribet 2010, 2013; Schulze *et al.* 2012).

Dentro del Mediterráneo se han registrado 35 especies diferentes de sipuncúlidos hasta la fecha (Açik 2007, 2011; Coll *et al.* 2010), de las cuales ninguna es endémica del mar Mediterráneo, aunque recientemente se ha reportado en aguas de Ibiza (España) lo que

podría ser una nueva especie del género *Phascolion* (Müller *et al.* 2014). La presencia de endemismos de invertebrados pertenecientes a otros taxa es habitual en el Mediterráneo (Cutler 1994). En lo referente al Mediterráneo español y aguas adyacentes (incluyendo las Islas Baleares) y siguiendo el sistema de clasificación formulado por Gibbs & Cutler en 1987, el número de especies conocidas para esta zona geográfica se ve reducido a 21 (Cutler 1994; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1982, 1986, 1993a). La totalidad de estas 21 especies han sido registradas en fondos sedimentarios, aunque diez de ellas han sido también registradas en sustrato duro.

Los nichos ecológicos de los sipuncúlidos no están bien definidos, y los límites y preferencias respecto a los principales factores ambientales (e.g. temperatura, salinidad, oxígeno, pH, profundidad, tipo de sedimento) están lejos de ser conocidos para la mayoría de especies (Cutler 1994). A pesar de contar con un reducido número de especies ya hemos visto que los sipuncúlidos son animales con una distribución altamente cosmopolita. La gran excepción son las zonas salobres y mares de baja salinidad (Murina 1984), evidenciando que se trata de un filo exclusivamente marino, además de bentónico. En cuanto a la capacidad de osmoregulación de los sipuncúlidos se puede decir que se trata de especies osmoconformadoras, con escasa capacidad de regulación iónica durante un evento de aumento de la salinidad (Adolph 1936; Chew *et al.* 1994; Ferraris *et al.* 1994; Oglesby 1969, 1982).

Según Murina (1984) se pueden distinguir cuatro grupos ecológicos dentro del phylum: (1) Sipuncúlidos excavadores, que habitan los fondos blandos y los utilizan tanto para protegerse como para alimentarse. (2) Especies que viven protegidas dentro de conchas, tubos vacíos u otros refugios similares. Normalmente presentan una baja movilidad; recolectan detrito de la superficie del sedimento circundante con ayuda de su probóscide y de unos tentáculos bien desarrollados. Prefieren refugios bien irrigados como conchas agujereadas por moluscos predadores de la familia Naticidae. La densidad de estos sipuncúlidos podría estar limitada por la disponibilidad de refugios en el medio (Hylleberg 1975). (3) Filtradores; individuos con una gran corona tentacular dicotómica. También se alimentan de partículas de detritus, pero en este caso las recogen directamente en la columna de agua al quedar atrapadas por el mucus que segregan en la parte distal de la probóscide. (4) Sipuncúlidos semimóviles que habitan las grietas y refugios de los sustratos duros. Pueden ser capaces, hasta cierto punto, de horadar el sustrato duro mediante procesos físicos o la segregación de sustancias químicas desde glándulas en la epidermis.

La mayor parte de las especies de sipuncúlidos se alimentan de pequeñas partículas de materia orgánica. Muchas de estas especies viven en fondos blandos y obtienen gran parte de su comida a través de la ingesta de sedimento.

La mayoría de especies son dioicas y carecen de dimorfismo sexual, existiendo algunas excepciones. La fecundación es externa, dando lugar a una larva trocófora pelágica (Rice 1985). La larva trocófora de los sipuncúlidos es muy similar a la de moluscos y poliquetos; son todas lecitotróficas y su desarrollo dura entre dos

y diez días. En la etapa final del desarrollo de la larva trocófora se pueden dar dos situaciones dependiendo de la especie: La transformación directa por alargamiento en una forma juvenil o la metamorfosis hacia una larva pelagofera, exclusiva de sipuncúlidos. Puede ser tanto lecitotrófica como planctotrófica.

El posible efecto que las actividades de origen humano pudieran tener sobre los poblamientos de sipuncúlidos es totalmente desconocido. La ausencia de datos previos es casi total y los estudios son muy escasos y poco específicos.

Los objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes: El estudio y caracterización de los poblamientos de sipuncúlidos de fondos blandos presentes en las aguas litorales del Mediterráneo español, principalmente de las costas de la Comunidad Valenciana. El estudio de los procesos y variables que regulan estas poblaciones y su posible internación con los procesos de origen antropogénico que tiene lugar en estas zonas. Otro objetivo es el estudio y valoración de la idoneidad de este grupo taxonómico para su uso como bioindicador de estrés ambiental o impactos en el medio ambiente marino.

2. Primer registro del sipuncúlido *Phascolion caupo* Hendrix 1975 en el mar Mediterráneo

Especímenes del sipuncúlido *Phascolion caupo* Hendrix, 1975 han sido recolectados por vez primera dentro del mar Mediterráneo, lo que incrementa hasta 36 el número de especies conocidas para esta zona geográfica. Los individuos recolectados proceden de fondos sedimentarios de la costa de San Pedro del Pinatar (Mediterráneo occidental). Se han registrado un total de 30 individuos de esta especie, a profundidades desde 32.6 hasta

37.2 metros, principalmente en substrato arenoso con alta carga de limos y arcillas. El 80% de los individuos fueron encontrados habitando conchas de gasterópodo o tubos de poliqueto vacíos (65.7% dentro de conchas de gasterópodo; 11.4% en el interior de tubos del poliqueto serpúlido *Ditrupa arietina*; 2.9% en restos calcáreos).

Se trata de una especie relativamente reciente y de la que solo se conocen tres citas previas, si bien su distribución es mundial. Se ha reportado en la costa oeste del atlántico (USA) (Hendrix 1975); costa este del atlántico (bahía ibero-marroquí) (Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990) y en el océano indico (Saiz-Salinas 1993b).

Phascolion caupo tiene una morfología muy similar a *Phascolion strombus*, especie común en la costa Mediterránea, y es posible que la presencia de *P. caupo* haya sido pasada por alto al ser identificada erróneamente como *P. strombus*, debido a que la confusión entre ambas es fácil y a la falta de especialistas en la identificación de sipuncúlidos (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). La única forma de asegurar la identificación es la disección del animal y la observación de papilas dérmicas y ganchos en el microscopio. Mientras que en *P. strombus* podemos encontrar ganchos de base estrecha con forma de garra (tipo I según Cutler 1994), en *P. caupo* encontramos ganchos de base ancha y punta redondeada (tipo III).

3. Sipuncúlidos de fondos blandos de San Pedro del Pinatar (Mediterráneo occidental): influencia de los impactos antropogénicos y las características sedimentarias sobre su distribución.

Se analizó la distribución de los sipuncúlidos de fondos blandos de San Pedro del Pinatar (Mediterráneo occidental). Este

estudio se llevó a cabo entre diciembre de 2005 y junio de 2010, muestreando con periodicidad semestral (junio y diciembre). Se analizaron diversos parámetros físicos y químicos del sedimento (granulometría, contenido de materia orgánica, pH, salinidad de fondo y densidad de refugios). En esta zona convergen tres tipos de impactos de origen antropogénico: vertido de salmuera procedente de una planta desalinizadora, vertido de aguas residuales e instalaciones flotantes para el engorde de peces.

Un total de 795 sipuncúlidos fueron recolectados durante los diferentes muestreos realizados entre 2005 y 2010 (dos veces al año). Fueron identificadas ocho especies pertenecientes a 5 familias diferentes. *Aspidosiphon muelleri* fue la especie dominante (711 ind; 89,43%), seguida de *Phascolion caupo* (39 ind; 4,91%) y *Thysanocardia procera* (22 ind; 2,77%). El resto de especies presentes tuvieron una contribución inferior al 1% (*Onchnesoma steenstruppi steenstruppi*, *Phascolion strombus*, *Phascolosoma granulatum*, *Sipunculus nudus* y *Golfingia vulgaris vulgaris*). Un total de 11 especímenes (1,38%) no pudieron ser identificados debido a su pequeño tamaño o a las condiciones de deterioro que presentaban.

No se detectó ningún efecto directo de los posibles impactos en la zona. En el análisis multivariante (nMDS y CLUSTER) se obtuvieron tres grupos representativos con una similitud superior al 50%. El grupo I estuvo conformado únicamente por la estación más próxima al punto de vertido de la salmuera. A pesar de no encontrar ningún sipuncúlido en la zona de vertido de la salmuera hasta 2010, después de que un difusor fuera instalado en el emisario y la salinidad en el punto de vertido descendiera de forma drástica, es difícil establecer una

relación directa entre esta ausencia de sipuncúlidos y el vertido. La salmuera podría estar afectando a las poblaciones de sipuncúlidos, pero la ausencia de individuos en el punto de vertido previos a la implementación de la planta desalinizadora, así como la heterogeneidad de los fondos estudiados, no permiten que los resultados sean concluyentes. El grupo II formado en el análisis multivariante reunió a las estaciones próximas al vertido de aguas residuales y alguna más alejada. Estas estaciones se caracterizaron por la alta carga sedimentaria y por presentar un fondo fangoso. En el grupo III están representadas algunas de las estaciones cercanas a las instalaciones de engorde de peces. Estas estaciones se caracterizan por presentar una alta abundancia de sipuncúlidos, pero también por presentar una granulometría dominada por las fracciones más gruesas y una alta densidad de tubos del poliqueto *Ditrupa arietina*.

Las abundancias de sipuncúlidos de las especies dominantes (*A. muelleri* y *Phascolion caupo*) se correlacionaron con las estaciones con mayores porcentajes de arena media y gruesa. También se detectó una correlación significativa entre la abundancia del sipuncúlido tubícola *A. muelleri* y la abundancia de tubos vacíos del poliqueto serpúlido *Ditrupa arietina* (PEARSON; $P < 0.001$), usados como refugio por *A. muelleri*. Esta correlación no se observó con respecto a las conchas de gasterópodo, las cuales estuvieron presentes en la zona más fangosa.

Se puede concluir que las características del sedimento (granulometría y presencia de refugios) jugaron el papel principal en el control de la distribución de sipuncúlidos. Los impactos antropogénicos podrían estar afectando indirectamente su distribución, al cambiar las características del sedimento (e.g. el área cercana al vertido de aguas

residuales presentó un sedimento fangoso, en el que predominaron las fracciones finas, posiblemente como consecuencia de un enfangamiento producido por el vertido).

4. Distribución del phylum Sipuncula en el golfo de Valencia y Cabo de la Nao (Mediterráneo occidental)

Tradicionalmente el estudio del phylum Sipuncula no ha despertado mucho interés en la comunidad científica y ha sido escasamente estudiado, por lo que su distribución es poco conocida (Kędra & Włodarska-Kowalczyk 2008, Murina *et al.* 1999). Se conocen 10 especies para nuestra área de estudio, y su distribución parece estar ligada a las características del sedimento y la disponibilidad de refugio (Ferrero-Vicente *et al.* 2011, Hylleberg 1975). En el presente estudio se trata de describir la distribución, abundancia y diversidad de las especies de sipuncúlidos presentes en el área del golfo de Valencia y cabo de la Nao, así como valorar los factores ambientales que regulan su distribución. Con ayuda de una draga Van Veen (0.04 m²) se ha muestreado en 87 estaciones distribuidas a lo largo de 14 localidades. El muestreo se ha desarrollado de forma anual (en verano) desde 2004 a 2008. Las estaciones presentan una profundidad que osciló entre 12.1–30.2 m. Se usó el índice de correlación de Pearson para evaluar la correlación entre las especies más abundantes (N>15) y las características abióticas del sedimento. También se usaron técnicas multivariantes para detectar cambios en las poblaciones de sipuncúlidos entre las diferentes localidades y tiempos de muestreo así como para valorar el efecto de los factores abióticos sobre sus distribuciones.

Se registraron 972 sipuncúlidos de 9 especies diferentes: *Aspidosiphon muelleri*; *Golfingia vulgaris vulgaris*; *Onchnesoma*

steenstrupii steenstrupii; *Phascolion caupo*; *Phascolion strombus strombus*; *Phascolion tuberosum*; *Phascolosoma granulatum*; *Sipunculus nudus* y *Thysanocardia procera*. La densidad promedio fue de 18.66 ± 2.24 ind m^{-2} , siendo *A. muelleri* la especie dominante (13.78 ± 3.93 ind m^{-2}). La mayor abundancia se dio en el año 2004 (339 ind; 32.85 ± 8.40 ind m^{-2}), mientras que 2006 fue el año con la abundancia más baja (99 ind; 9.48 ± 2.44 ind m^{-2}). La especie con un rango de distribución más amplio fue *T. procera*, presente en el 92.85% de las localidades. Además esta especie se registro por primera vez en nuestra zona de estudio. También se trata del primer registro de *P. caupo*, lo que aumenta el número de sipuncúlidos conocidos hasta 12 especies en el golfo de Valencia y cabo de la Nao. Por otra parte, fue el segundo registro de *P. caupo* para el Mar Mediterráneo (Ferrero-Vicente *et al.* 2012). Los poblamientos de sipuncúlidos han mostrado una alta variabilidad interanual en abundancia y riqueza, incluso algunas de las especies aparecieron o desaparecieron de un año para otro. La composición de especies también mostró diferencias significativas, tanto entre los diferentes años estudiados como entre las diferentes localidades (ANOSIM; ambos $P=0.001$). Algunos factores ambientales presentaron una fuerte correlación con determinadas especies de sipuncúlidos, pero esto no explica la variabilidad interanual, ya que el sedimento fue estable durante los diferentes años de estudio. Otros factores tales como la dispersión larvaria, la disponibilidad refugio, factores hidrodinámicos o depredación podrían determinar la variabilidad natural en estas poblaciones. Mediante el procedimiento RELATE se obtuvieron relaciones significativas entre la composición de especies de los poblamientos de sipuncúlidos y algunos de los factores del

sedimento: materia orgánica ($P<0.01$), arena fina ($P<0.01$), arena media ($P<0.05$), arena gruesa ($P<0.01$) y grava ($P<0.01$).

Aspidosiphon muelleri fue la especie más abundante (720 ind), lo que es habitual para este tipo de hábitat con presencia de tubos y conchas vacías, los cuales utiliza para refugiarse (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). En el año 2004 se registró una densidad de 1675 ind m^{-2} en una de las localidades, lo que supone la mayor densidad de *A. muelleri* registrada hasta la fecha. Se trata de un fondo sedimentario dominado por sedimento grueso y grava, y con alta presencia de conchas de gasterópodos de pequeño tamaño y tubos vacíos de *Ditrupa arietina*, que son usadas por *A. muelleri*, *P. caupo* y *P. strombus* como refugio. La presencia de *A. muelleri* fue constante y su abundancia relativamente alta a lo largo de los cinco años de muestreo, pudiendo ser considerada como la especie de sipuncúlido dominante en los fondos sedimentarios de esta parte del Mediterráneo.

La baja distribución espacial mostrada por algunas de las especies, aquellas con abundancias más bajas, puede ser debido a que requieran un mayor esfuerzo de muestreo debido a su baja abundancia natural. Con un esfuerzo mayor podrían mostrar un rango de distribución más amplio.

En el plot MDS construido a partir de las abundancias de las diferentes especies de sipuncúlidos se observa un claro gradiente que va desde las estaciones con sedimento más fino hasta las que presentan el sedimento más grueso, posiblemente correlacionadas con una mayor presencia de refugios (Murina 1984). Las estaciones en las que predominó la fracción más fina del sedimento se caracterizan por la presencia de *G. vulgaris vulgaris* y *S. nudus*, mientras que al otro lado del

gradiente, en las estaciones con sedimento más grueso, predominan especies conchícolas, como son *A. muelleri* y *P. caupo*. El resto de especies no presentaron una tendencia hacia ningún tipo de sedimento determinado.

Se puede concluir que la abundancia y diversidad de sipuncúlidos para el área de estudio son similares a las de estudios previos para áreas cercanas. No obstante, las poblaciones de sipuncúlidos mostraron una alta variabilidad en abundancia y composición de especies entre los diferentes años así como entre las diferentes localidades estudiadas, si bien la variabilidad entre localidades puede en parte ser debida a la heterogeneidad de los fondos estudiados.

Se hace hincapié en la necesidad de identificar los sipuncúlidos a nivel de especie en los estudios de fauna macrobentónica para aumentar el conocimiento de la distribución de estas especies y los factores que regulan esta distribución.

5. Factores limitantes en la distribución de sipuncúlidos conchícolas/tubícolas

Los sipuncúlidos forman parte de la dieta de numerosas especies de peces y otros organismos. Esta exposición a la depredación fuerza a estos animales a buscar refugio, ya sea excavando galerías en el sedimento, debajo de rocas o en grietas, entre conglomerados de mejillón, rizoma de fanerógamas, rizoide de algas, en el interior de conchas vacías de gasterópodos o tubos de poliquetos serpulidos entre otros. Es bien conocido que la disponibilidad de refugio puede ser un factor limitante para el reclutamiento y supervivencia de muchos organismos en ecosistemas acuáticos (Beck 1995; Behrens 1987; Moran & Reaka 1998; Shulman 1984; Steele 1999). Uno de los

refugios más comunes en fondos blandos son las conchas de gasterópodo o tubos de poliqueto que estos organismos dejan al morir. Son numerosos los organismos que usan este recurso (cangrejos ermitaños, peces, tanaidáceos, poliquetos o sipuncúlidos). El caso de los cangrejos ermitaños es muy conocido y estudiado, sin embargo no se sabe a penas nada a cerca de en qué medida la disponibilidad de refugio está involucrada en la distribución de los sipuncúlidos que usan este recurso. Principalmente son especies de los géneros *Aspidosiphon* y *Phascolion*, los cuales muestran adaptaciones específicas que les ayudan a habitar en el interior de estas estructuras. Las especies del género *Aspidosiphon* presentan un escudo anal que funciona a modo de opérculo y protege el orificio expuesto al exterior. Las especies del género *Phascolion* presentan una densa agregación de papilas que también pueden funcionar a modo de opérculo, además presentan grandes papilas fijadoras en la mitad del tronco, que ayudan en la limpieza de estas estructuras y a anclarse al tubo para evitar la extracción (Cutler 1994; Hylleberg 1975).

Aspidosiphon muelleri es la especie dominante en la localidad de estudio y áreas circundantes (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). Se trata de una especie con amplio rango de distribución, y que puede ser encontrada en todo tipo de fondos y profundidades. Esta condición complica el estudio de los factores que determinan su distribución, ya que a menudo estos factores están mezclados, haciendo difícil una evaluación individual de los mismos (Bishop 2005). En fondos blandos es una especie frecuente, siempre que haya conchas o tubos vacíos donde guarecerse, lo que hace pensar en una posible dependencia de la densidad de refugios disponibles sobre su distribución. Sin embargo el rol de la disponibilidad de

refugios en la distribución de los sipuncúlidos no ha sido todavía evaluado de forma experimental para ninguna de las especies.

Para llevar a cabo este experimento se seleccionaron dos localidades (separadas 4km) en la costa de San Pedro del Pinatar (Mediterráneo español). Ambas localidades comparte similares rangos de temperatura, salinidad y profundidad (~35m). La localidad 1 (L1) presenta un sedimento dominado por arena gruesa, una alta disponibilidad de refugios (tubos de poliqueto) y una alta densidad de sipuncúlidos, siendo *A. muelleri* la especie dominante. Por el contrario, en la localidad 2 (L2), domina el sedimento fangoso, la densidad de refugios disponible (conchas de gasterópodo) es menor y la abundancia de sipuncúlidos es mucho menor (Ferrero-Vicente *et al.* 2011).

Se ha examinado la disponibilidad de refugio y la granulometría del sedimento como los factores explicativos de la distribución de los sipuncúlidos conchícolas y tubícolas. A tal propósito se han usado unidades artificiales de muestreo (ASUs): parcelas de plástico rellenas de sedimento con una granulometría y densidad de refugios conocida. Se procedió a la extracción de sedimento procedente de estas dos localidades (L1 y L2; fondo fangoso y fondo de arenas gruesas). El sedimento fue previamente defaunado (mediante secado al aire durante 90 días) y todos los refugios (conchas y tubos) retirados (Lu & Lu 2007; Wu & Shin 1997). Tanto el sedimento como los refugios se repartieron en los ASUs, dando lugar a 4 tipos diferentes; ASUs con sedimento fangoso y con refugios, fangoso sin refugios, arenoso con refugios y arenoso sin refugios). Las diferentes ASUs fueron repartidas en las dos localidades de procedencia, de esta forma tenemos tres

factores aislados para el estudio (Tipo de sedimento, presencia de refugios y localidad).

Seis meses después de su despliegue se recogieron los diferentes ASUs para su análisis. Se identificaron 88 especímenes de 4 especies diferentes: *Aspidosiphon muelleri* (57 ind; 69.5%), *Phascolion caupo* (3 ind; 3.53%), *Phascolion strombus strombus* (10 ind; 11.76%) y *Sipunculus nudus* (15 ind; 17.65%). Las tres primeras especies mencionadas son moradores habituales de conchas y tubos vacíos, y fueron encontradas en el interior de uno de estos refugios en el 100% de los casos. Por el contrario, *S. nudus* fue recolectada siempre libre en el sedimento.

Aspidosiphon muelleri fue significativamente más abundante en las ASUs en las cuales se habían añadido los refugios, independientemente de la granulometría del sedimento (MANN-WHITNEY; $P < 0.01$), llegando a valores de abundancia 10 veces más altos (46.62 ± 9.24 y 4.06 ± 2.77 ind m^{-2} respectivamente).

En cuanto al tipo de sedimento, no se encontró ninguna diferencia significativa, si bien las abundancias fueron mayores en el sedimento más grueso para las tres especies conchícolas, mientras que para *S. nudus* la abundancia fue más alta en el sedimento más fangoso. Mientras que la disponibilidad de refugio aparece como un factor determinante en la distribución de los sipuncúlidos conchícolas/tubícolas, las características sedimentarias no han resultado ser tan importantes. Wu & Shin (1997) sugirieron que muchas especies bentónicas pueden colonizar ambos tipos de sedimentos y que otros factores, a parte de la granulometría y contenido orgánico, podrían jugar un papel determinante en la colonización y distribución de estas especies. Así la disponibilidad de larvas/adultos sería un factor más

determinante que las características sedimentarias. En esta línea Snelgrove y Butman (1994) sugirieron que la relación animal-sedimento es muy variable y hay muchos más factores involucrados en la distribución de las comunidades macrobentónicas.

También se detectaron diferencias entre las dos localidades estudiadas. Sin embargo estas diferencias no están ligadas a las dos variables estudiadas (disponibilidad de refugio y granulometría), y tiene que ser explicadas por otros factores dependientes de la localidad (e.g. presencia previa de adultos en la zona, densidad de depredadores, factores hidrodinámicos y de sedimentación, presencia de materia particulada en la columna de agua...). La localidad 1 parece más apropiada para el reclutamiento y desarrollo de poblaciones de sipuncúlidos, ya que *A. muelleri* y *S. nudus* fueron más abundantes en esta localidad.

Los sipuncúlidos conchícolas eligieron de forma preferente los tubos de poliqueto (principalmente *A. muelleri*), mientras que los cangrejos ermitaños seleccionaron preferentemente las conchas de gasterópodo (χ^2 ; $P < 0.001$). Se detectó una fuerte correlación lineal entre el diámetro interno de los refugios y la anchura del tronco de *A. muelleri* (PEARSON; $r = 0.796$; $P < 0.001$). Para las otras dos especies conchícolas la tendencia es la misma, pero sin llegar a ser significativa debido a la escasez de individuos disponibles para el análisis. Los sipuncúlidos recolectados presentaron una talla que encaja mejor con los tamaños de los tubos de *Ditrupa arietina*, lo que los hace un refugio más ligero y apropiado para ser utilizado por *A. muelleri*, que como ya hemos visto, selecciona preferentemente estos tubos sobre las caracolas de gasterópodo, más grandes y pesadas. Además, un exceso de

anchura facilitaría la extracción por parte de los depredadores y aumentaría el gasto energético para mantener el interior libre de suciedad.

6. Ecología y biología reproductiva del sipuncúlido *Aspidosiphon muelleri* Diesing 1851

Aspidosiphon muelleri Diesing 1851 es la especie más extendida de la familia Aspidosiphonidae y presenta una distribución cosmopolita en aguas templadas y subtropicales. Ha sido reportada en fondos blandos, desde arenosos a fangoso, por todo el Mediterráneo, a menudo habitando conchas de gasterópodo o tubos de poliqueto vacíos (Açik 2008b; Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2013ab; Murina *et al.*, 1999; Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990). Es conocido que esta especie selecciona preferentemente los tubos del poliqueto *Ditrupa arietina* sobre las conchas de gasterópodo y su distribución puede estar limitada por la presencia de este recurso (Ferrero-Vicente *et al.* 2013b).

Con el objetivo de analizar la ecología y biología reproductiva de esta especie, un poblamiento de *Aspidosiphon muelleri*, localizado en la costa de San Pedro del Pinatar (SE España), se monitorizó mensualmente a lo largo de un año (Junio 2011–Mayo 2012). Se seleccionó esta localidad debido a que presenta una población de *A. muelleri* estable y con alta abundancia, así como características sedimentarias adecuadas para el estudio de la ecología de esta especie; el sedimento de esta localidad está dominado por arena fina ($43.8 \pm 2.17\%$) y arena media ($25.9 \pm 1.6\%$), con presencia de bioclastos, incluido conchas de gasterópodo y tubos de *Ditrupa arietina*. La profundidad osciló entre los 34.2 y 36.5 m. La presencia de refugios en el sedimento fue alta y constante a lo largo de

todo el periodo experimental, con una densidad mucho mayor de tubos que de conchas de gasterópodo.

Se recolectaron un total de 156 individuos, de los cuales 146 (93.6%) fueron identificados como *A. muelleri*. El ratio de sexos de esta población fue cercana a 1:1 (54% ♀ : 46% ♂), lo que es indicativo de una reproducción dioica (Rice 1989), a pesar de que no se detectó ningún tipo de dimorfismo sexual. Los oocitos fueron detectados en las hembras a partir de 4-5 mm de longitud de tronco; tamaño que puede ser alcanzado por un espécimen de *A. muelleri* en unos pocos meses (Ferrero-Vicente *et al.* 2013b).

La densidad de población aumento de forma notable durante el verano (Junio–Agosto). La fecha de desove se estimó de forma indirecta a partir del tamaño promedio de los oocitos y el porcentaje de hembras con presencia de oocitos en el celoma. Ambas variables presentaron una correlación significativa con la temperatura superficial del agua (PEARSON; $P=0.003$ y $P=0.001$ respectivamente). El tamaño de los oocitos también correlaciono de forma significativa con el nivel de irradiancia media (PEARSON; $P=0.044$).

El evento de desove tuvo lugar entre los meses de agosto y septiembre (cuando la temperatura del agua estaba cerca de su máximo anual) y pudo tener una duración de unas pocas semanas en estas aguas templadas. Es sabido que las estrategias reproductivas de los sipuncúlidos pueden variar dependiendo de las condiciones; especies que habitan áreas de marcada estacionalidad, como nuestra zona de estudio, presentarían un periodo reproductivo corto para aprovechar la ventana de condiciones óptimas para el desarrollo (Cutler 1994; Johnson *et al.* 2012; Rice 1967). Por otra parte, individuos que habitan zonas sin estacionalidad

marcada, como podrían ser aguas profundas y regiones polares y ecuatoriales, presentan periodos reproductivos que se pueden prolongar en el tiempo durante meses (Cutler 1994; Rice 1967, 2012). La abundancia de individuos descendió de forma drástica en septiembre, posiblemente como consecuencia del esfuerzo energético realizado en el periodo de desove.

Aspidosiphon muelleri usó como refugio preferentemente tubos de *D. arietina*, pero durante los meses de verano ocupó también conchas de gasterópodo, posiblemente debido a un aumento de la demanda de este recurso, ya que estos meses son los de mayor abundancia de *A. muelleri* y tanaidáceos, que también viven en estos tubos. Durante los meses de invierno la ocupación de conchas de gasterópodo por *A. muelleri* fue nula.

El número de lazos en forma espiral en el intestino fue correlacionado con la longitud del tronco (PEARSON; $P=0.011$), lo que indica que el intestino continua creciendo en longitud durante todo el periodo de crecimiento del animal.

Bivalvos de la especie *Epilepton clarkiae* (Clark 1852) fueron recolectados dentro de los tubos de poliqueto usados como refugio, cohabitando con especímenes de *A. muelleri*. La prevalencia fue del 11.64%. En menor medida también se encontraron foraminíferos anclados al cuerpo de algunos de los sipuncúlidos.

7. Discusión

Con el objetivo de caracterizar los poblamientos de sipuncúlidos de fondos blandos presentes en las aguas litorales del Mediterráneo español, principalmente de las costas de la Comunidad Valenciana se han tomado un total de 1830 muestras a lo largo de 9 años (2004–2012), en las cuales se han recolectado 2008 individuos pertenecientes a nueve especies diferentes,

que representan el 25% del total de las especies conocidas en el Mediterráneo. Se trata de una diversidad relativamente alta si tenemos en cuenta la baja diversidad de especies del phylum y que todos los muestreos se han realizado en sedimento blando y en aguas litorales. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha registrado una especie no reportada previamente para el Mediterráneo (*Phascolion caupo*), ampliando hasta 36 el número de especies conocidas para esta zona. Igualmente se obtuvieron nuevos registros en áreas más locales. Algunos de estos nuevos registros pertenecen a especies que se han revelado como frecuentes en la zona de estudio lo que evidencia de nuevo la necesidad de más estudios sobre este grupo.

En el mar Mediterráneo existe un alto número de especies endémicas, por ese motivo es un dato destacable el hecho de que hasta la fecha no se conoce ningún sipuncúlido endémico para el Mediterráneo (Boudouresque 2004; Coll *et al.* 2010; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). Es probable que la carencia de datos existente a nivel específico y los posibles errores en la identificación de especies —debido a la escasez de especialistas— hayan llevado a infravalorar la verdadera distribución de las especies y posiblemente se haya enmascarado lo que podrían ser nuevas especies endémicas para el Mediterráneo, como podría ser el caso ya comentado de una especie de *Phascolion* —todavía no descrita— que ha sido recientemente encontrada en Ibiza (Müller *et al.* 2014)

Hemos visto que el hecho de muestrear en un ambiente o hábitat concreto, o que el sedimento presente unas características físico-químicas determinadas, no implica la presencia de sipuncúlidos. Son animales que presentan una baja fidelidad. Echando un vistazo a todos estos registros previos, en los que las mismas especies son

reportadas en hábitats muy variados, parece claro que muchas especies tienen la capacidad de desarrollarse en diferentes ambientes, independientemente de una granulometría o características sedimentarias determinadas. A la hora de valorar un determinado tipo de sedimento como adecuado para el crecimiento de sipuncúlidos de fondos blandos debemos tener en cuenta la disponibilidad de refugio como un factor determinante para los poblamientos de especies conchícolas. En el caso de las tres especies conchícolas con presencia en este trabajo (*A. muelleri*, *P. caupo* y *P. strombus*) se ha demostrado una dependencia de este recurso, al menos en sedimento blando. También se ha evidenciado que la disponibilidad de refugio es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de poblaciones de estas especies conchícolas. Aun así, la sola presencia de conchas o tubos vacíos en el sedimento no garantiza per se el desarrollo de poblamientos de sipuncúlidos. Los resultados también prueban que la granulometría del sedimento no es un factor tan determinante para estas especies como a priori se podría pensar. También se ha demostrado que —incluso después de aislar factores como disponibilidad de refugio y granulometría— existen diferencias entre localidades relativamente cercanas. Estas diferencias entre localidades han de ser explicadas por otras variables (e.g. presencia previa de adultos, tasa de sedimentación o hidrodinamismo) (Snelgrove & Butman 1994; Snelgrove *et al.* 1999).

En este trabajo se han descrito tres especies que pueden ser catalogadas como conchícolas/tubícolas; *Aspidosiphon muelleri*, *Phascolion caupo* y *Phascolion strombus*. Es conocido que estas especies también pueden habitar otro tipo de refugios, como pueden ser grietas en las rocas, clúster de mejillones, rizoma de

fanerógamas, etc., pero en el caso de sedimentos blandos su presencia ha estado siempre ligada a la presencia de una concha o tubo vacío en el que vivir. Por tanto, podemos considerar estas especies como conchícolas/tubícolas estrictos para este determinado hábitat. A su vez un incremento en la densidad de conchas y tubos, en zonas inicialmente limitantes en este recurso, puede favorecer el desarrollo de las poblaciones de *A. muelleri*, alcanzando densidades hasta 10 veces más altas. También ha quedado demostrado que *A. muelleri* selecciona preferentemente los tubos sobre las conchas de gasterópodo; hemos visto como la densidad de *A. muelleri* se correlacionaba fuertemente con la densidad de tubos (PEARSON; $P < 0.001$). Es conocido que las poblaciones de *D. arietina* están aumentando de forma considerable en las costas del Mediterráneo francés y español (Grémare *et al.* 1998ab), lo que conlleva un aumento en el suministro de tubos vacíos para su uso como refugio por parte de otros organismos. Cabe la posibilidad de que este aumento notable de las poblaciones de *Ditrupa* en el Mediterráneo occidental haya ido acompañado de un aumento en la densidad de *A. muelleri*, que se ha revelado como el sipuncúlido más abundante en sedimentos blandos de esta zona del mar Mediterráneo. A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que la presencia de sipuncúlidos conchícolas en fondos sedimentarios está relacionada con la presencia de conchas y tubos vacíos, y no tanto con la granulometría del sedimento, que no parece ser un factor primordial para el desarrollo de poblaciones de estas especies. Otros factores que pueden explicar las diferencias encontradas entre las localidades podrían ser la presión por depredación o la presencia previa de adultos en la zona.

El uso de determinados organismos como indicadores de impacto o estrés ambiental está cada vez más extendido. Los invertebrados bentónicos se usan frecuentemente como indicadores de la salud de los ecosistemas acuáticos, ya que muchas especies son sensibles a la contaminación o cambios súbitos en el medio ambiente. Para la gestión ambiental resulta básico determinar si la comunidad está cambiando en el tiempo por motivos naturales o por causas antropogénicas (Gerhardt 2002). Para este propósito es fundamental que los organismos utilizados como indicadores puedan correlacionar con firmeza y coherencia (a través del espacio y el tiempo) con los niveles de las variables ambientales (Godsell *et al.* 2009). Los indicadores se eligen en base a diferentes criterios. Entre ellos la fácil recolección e identificación, sensibilidad a estrés ambiental y respuesta predecible son algunos de los criterios principales. Los sipuncúlidos, tal y como hemos discutido en capítulos anteriores, son un grupo poco conocido y estudiado. La respuesta de este phylum hacia diferentes estímulos o alteraciones en su medio ambiente es prácticamente desconocida, tanto a nivel de grupo como a nivel específico. A nivel específico no hay estudios de cómo los impactos externos pueden afectar a las poblaciones de las especies de sipuncúlidos. Se sabe que la mayor parte de las especies del phylum presentan amplios rangos de distribución, aunque su distribución a pequeña escala no es muy conocida. También sabemos que una especie con una alta distribución en nuestra área de estudio (*Thysanocardia procera*) no había sido reportada con anterioridad. No obstante, a partir de los diferentes registros aislados, se puede concluir que se trata de especies altamente cosmopolitas, que pueden soportar amplias diferencias de profundidad e incluso temperatura. Esta es

una característica deseable para un posible bioindicador, sin embargo este criterio ha de ser tomado con cautela ya que, como se ha comentado anteriormente, se pueden estar dando procesos de especiación o aclimatación entre poblaciones alejadas que podrían derivar en diferentes tolerancias frente a los factores ambientales (Kawauchi & Giribet 2010, 2013). En cuanto al criterio de fidelidad, no lo cumplen, ya que no presentan abundancias altas y la elección de un determinado hábitat no garantiza su presencia. Por lo general las abundancias son muy bajas y variables, a excepción de *A. muelleri*. Si bien ha habido tres especies con presencia constante a lo largo de los diferentes estudios que conforman esta tesis (*A. muelleri*, *P. strombus* y *T. procera*) sus abundancias han sido muy variables en el tiempo y en el espacio. El resto de especies han presentado abundancias también muy variables, desde la ausencia total hasta abundancias relativamente altas. Su alta variabilidad natural y la heterogeneidad del hábitat en el que viven muchas de las especies hace aún más difícil el aislamiento de los factores que afectan a su distribución. Otras características

deseables para un buen bioindicador son tener un buen conocimiento sobre la ecología y fisiología de las especies, así como presentar una posición relevante en el ecosistema, que pueda ser defendida a nivel social o político. Es obvio que el grupo Sipuncula no cumple estos requisitos; ya hemos visto que el desarrollo de su conocimiento no se puede catalogar de alto y su importancia biológica, social o política es escasa o nula. Tampoco resultan prácticos, ya que su identificación resulta muy laboriosa y difícil para no especialistas (requiere conocimientos específicos y en muchos casos la disección del espécimen). A la vista de los resultados obtenidos en cuanto a la zoogeografía de estas especies, su respuesta a cambios ambientales y la relación con el medio, se puede concluir que las especies de sipuncúlidos estudiadas no son útiles para su uso como especies bioindicadoras. Al menos en nuestra zona de estudio, ya que no cumplen con muchos de los requisitos primordiales y deseables para cualquier especie bioindicadora o centinela.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Introducción General

Photo: *Sipunculus nudus* (Linnaeus 1769)

1. Introducción General

Los sipuncúlidos constituyen un grupo de invertebrados exclusivamente marinos, protóstomos, celomados e insegmentados. Presentan simetría bilateral y tienen categoría de phylum independiente (Clark 1969; Gibbs & Cutler 1987; Hyman 1959; Stephen 1964; Stephen & Edmonds 1972).

La nomenclatura actual fue formulada por Stephen & Edmonds en 1972, pero durante las dos décadas posteriores se llevó a cabo un profundo trabajo de revisión (Cutler 1979, 1980, 1984, 1986; Cutler & Cutler 1981, 1982, 1985, 1987a, 1988, 1989, 1990; Cutler & Gibbs 1985; Edmonds 1980; Gibbs & Cutler 1987; Gibbs 1982, 1985, 1986; Gibbs *et al.* 1983; Hendrix 1975; Saiz-Salinas 1984a), culminado en 1994 con la publicación por parte de Edward B. Cutler

de un trabajo de referencia para el estudio de este grupo faunístico; *The Sipuncula: Their Systematics, Biology, and Evolution*. En este trabajo Cutler sintetiza casi toda la información conocida hasta la fecha sobre el phylum, incluyendo las revisiones llevadas a cabo por el mismo y por otros autores durante los 20 años anteriores, lo que hizo disminuir de forma considerable el número de especies, desde más de 300 hasta 150. La clasificación taxonómica utilizada en este trabajo se basa en la propuesta formulada por Gibbs & Cutler (1987), que propone una clasificación basada en dos clases: la clase Sipunculidea (2 órdenes y 4 familias) y la clase Phascolosomatidea (2 órdenes y 2 familias) (Fig. 1.1).

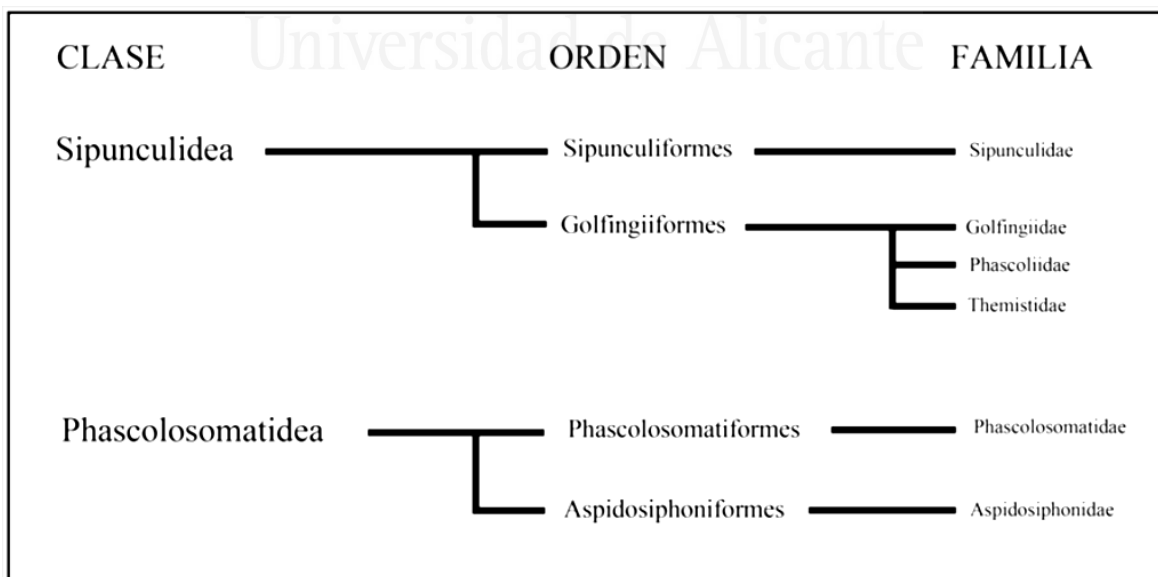


Fig. 1.1. Árbol filogenético representando las diferentes familias del phylum Sipuncula de acuerdo a la clasificación establecida por Gibbs & Cutler (1987).

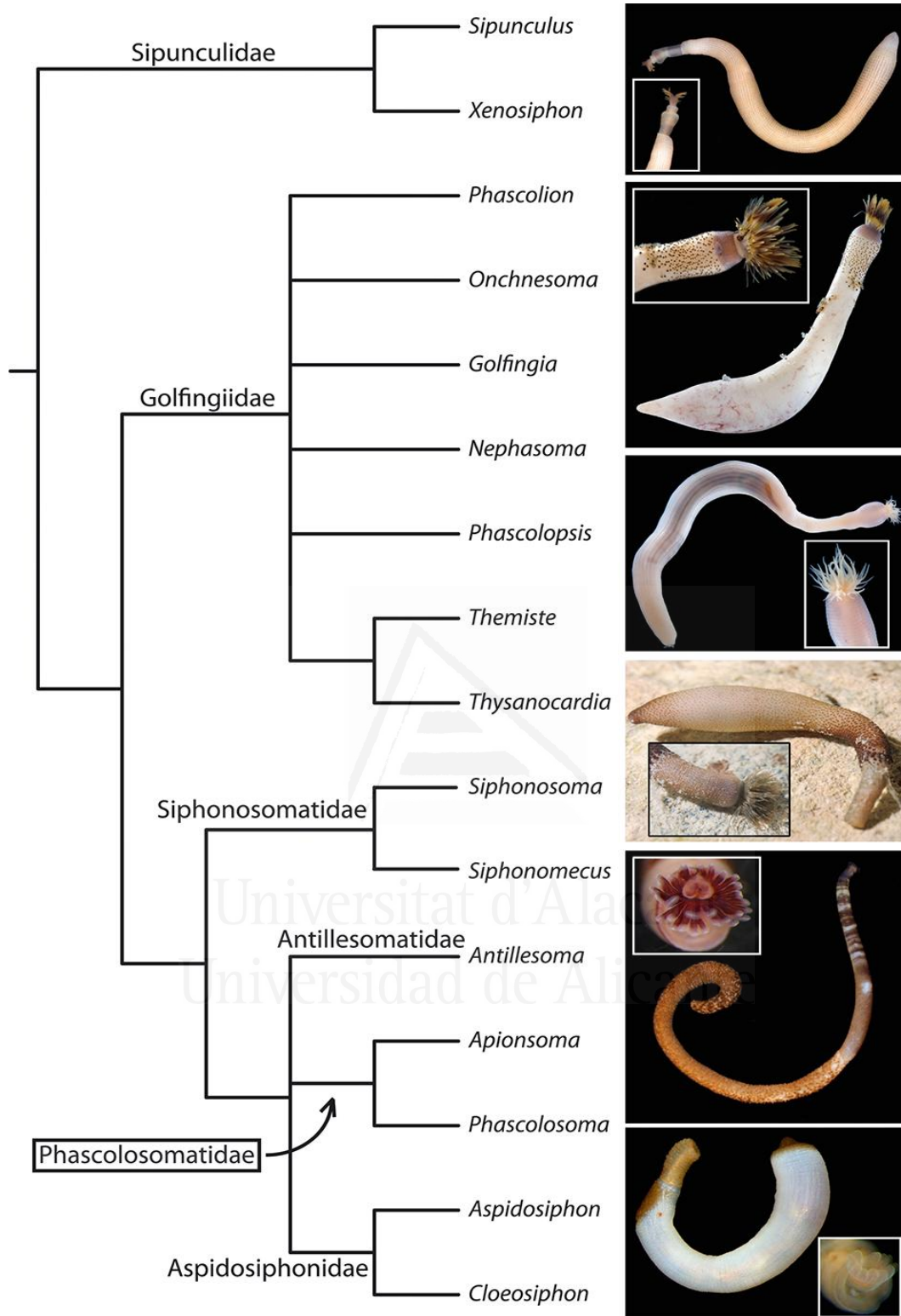


Fig. 1.2. Árbol filogenético representando las diferentes familias del phylum Sipuncula de acuerdo a la clasificación propuesta por Kawauchi *et al.* (2012). A la derecha, ejemplares vivos de las diferentes familias. De arriba abajo: *Sipunculus nudus*, *Themiste alutacea*, *Siphonosoma cumanense*, *Antillesoma antillarum*, *Phascolosoma nigrescens*, *Aspidosiphon fisheri*. (De Kawauchi *et al.* 2012).

Estudios genéticos muy recientes sugieren una nueva distribución de las familias de sipuncúlidos; la descripción de dos familias

nuevas (Siphonosomatidae y Antillesomatidae), y la eliminación del rango de familia para Themistidae y

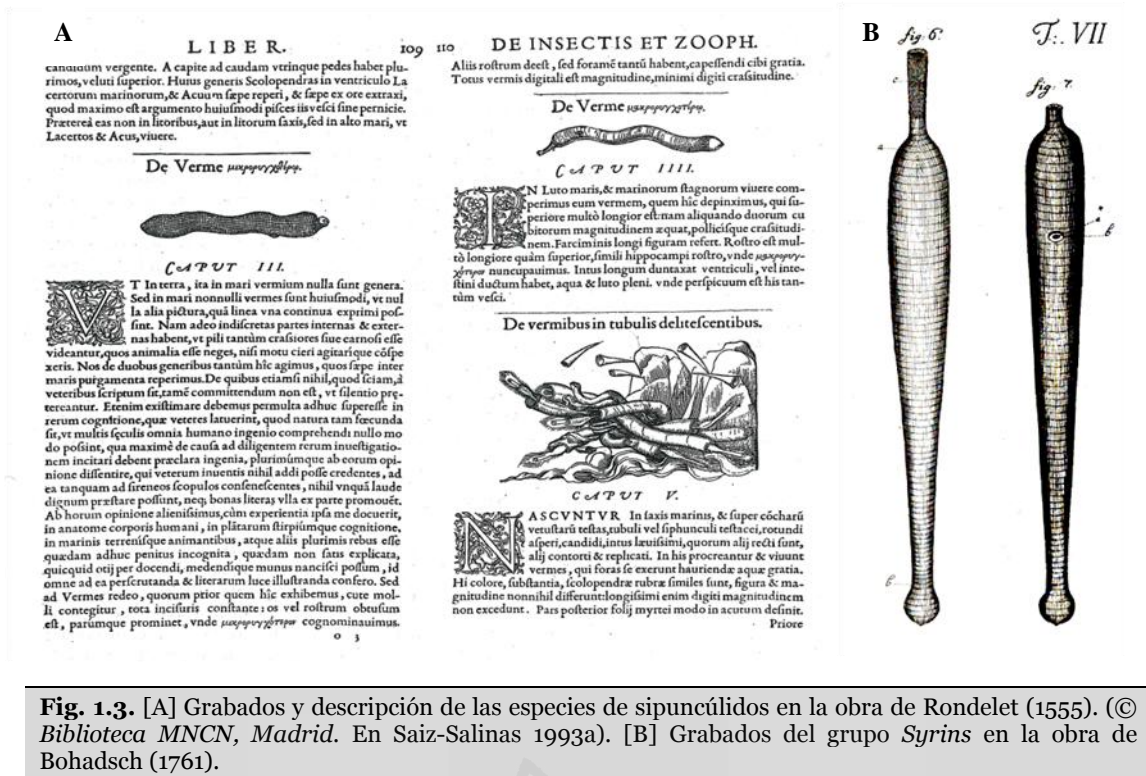


Fig. 1.3. [A] Grabados y descripción de las especies de sipunculidos en la obra de Rondelet (1555). (© Biblioteca MNCN, Madrid. En Saiz-Salinas 1993a). [B] Grabados del grupo *Syrinx* en la obra de Bohadsch (1761).

Phascolionidae, que pasarían a ser consideradas sinonimias de Golfingiidae (Kawauchi *et al.* 2012) (Fig. 1.2). También algunos géneros serían transferidos entre diferentes familias, como es el caso de *Phascolopsis*, que pasaría de Sipunculidae a Golfingiidae. Este trabajo abre las puertas a futuras reasignaciones de especies en diferentes géneros con el objetivo de formar grupos taxonómicos monofiléticos (Kawauchi *et al.* 2012).

1.1—Antecedentes históricos

El taxón *Sipuncula* ha tenido un desarrollo muy complejo, durante el cual ha sido clasificado como género, familia, orden, clase o phylum a lo largo de las diferentes épocas. De acuerdo a Saiz-Salinas (1993a) las primeras ilustraciones de sipunculidos aparecen a mediados del siglo XVI en la publicación *Universae aquatiliū Historiae pers altera, cum veris ipsorum Imaginibus* (Fig. 1.3 A), del médico y naturalista francés Guillaume Rondelet (Rondeletti 1555). Se trata de una obra muy

influyente en su época, en la que describió 244 especies del mar Mediterráneo. Entre ellas se encuentran dos especies de sipunculidos, probablemente *Sipunculus nudus* y *Golfingia vulgaris*, especies muy comunes en el litoral mediterráneo (Saiz-Salinas 1993a). Estas ilustraciones consistían en una serie de grabados con descripciones en latín. No volverán a aparecer en la literatura hasta pasados dos siglos. El botánico, farmacólogo y naturalista checo Johann Baptist Bohadsch los incluirá en un nuevo grupo dentro de *Zoophyte* llamado *Syrinx* (*De quibusdam animalibus marinis* 1761) (Fig. 1.3 B). Pocos años después, en 1766, el padre de la taxonomía moderna, el sueco Carl Nilsson Linnaeus fue el primero en emplear el nombre *Sipunculus*, otorgándoles el carácter de género. Los colocó dentro del orden *Vermes Intestina*, en la duodécima edición del *Systema Naturae*. A pesar de existir imprecisiones en las sinonimias de las dos especies descritas (*Sipunculus nudus* y *Sipunculus saccatus*) y de pasar

por alto algunas de las publicaciones previas como la obra original de Rondelet (Saiz-Salinas 1993a) la obra de Linnaeus fue enormemente influyente y se consideró una referencia en los años posteriores a su publicación. A lo largo de la segunda mitad del siglo XVIII aparecieron tres nuevas citas: Pallas (1774), Barbut (1783) y Martin (1786). Durante el siglo XIX fueron publicados muchos más trabajos sobre sipuncúlidos. En este periodo el debate sobre este grupo era muy intenso. A principios de siglo, Samuel Rafinesque (1814) propuso el nombre de familia Sipuncula para *Syrinx*, y la ubicó dentro de la clase Proctalia, la cual incluía los gusanos no segmentados con intestino completo. Poco después, uno de los naturalistas más influyentes de la época, el francés Lamarck (1816), los situó en sus *Radiaires Equinodermes*. En 1823 el italiano Stefano Delle Chiaje sugirió el nombre Sifunculacei como un único subgrupo dentro de los anélidos. Este nombre fue rápidamente sustituido por Blainville (1827), que incluyó a los priapúlidos dentro del grupo Sipunculida. Sería en 1847 cuando De Quatrefages introdujera el nombre que más tiempo iba a perdurar; Gephyrea (derivado del término griego γέφυρα = “puente”), bajo el razonamiento de que los componentes de este grupo representaban una transición entre los gusanos y las holoturias. Este término agrupaba a sipuncúlidos, equiúridos y priapúlidos, y se consideraba a los sipuncúlidos como equiúridos degradados (Saiz-Salinas 1984a). A finales del siglo XIX surgieron diversos nombres que agrupaban a los sipuncúlidos: Sipunculacea (Hatschek 1881); Podaxonia (Lankester 1885); Prosopygia (Lang 1888). Sedgwick (1898) propuso el nombre Sipunculoidea para el grupo, al que consideró un phylum independiente.

Todos estos nombres fueron escasamente aceptados, y se siguió utilizando Gephyrea durante toda la primera mitad del siglo XX, ya que era una manera fácil de presentar a tres grupos de afinidades bastante dispares, aunque de forma artificial (Cuenot 1922), pues no se consiguió cerrar la relación entre ellos (sipuncúlidos, priapúlidos y equiúridos). No fue hasta 1959 cuando la zoóloga norteamericana Henrietta Hyman desechó definitivamente el concepto de grupo *Gephyrea*, considerando por primera vez a los sipuncúlidos como phylum independiente y dándoles el nombre de *Sipunculida*. Sería ya en 1965 cuando A. Charles Stephen presentara la nomenclatura utilizada actualmente: Phylum Sipuncula. Esta propuesta fue reformulada por Stephen y Edmonds (1972).

1.2—Contribuciones recientes

Los trabajos publicados sobre sipuncúlidos han sido escasos en comparación con otros grupos de vermes marinos como puede ser la clase Polychaeta. Sipuncula ha sido un grupo taxonómico que históricamente ha recibido poca atención. En la actualidad apenas se publican unos 10-20 trabajos al año específicos sobre sipuncúlidos. Si nos fijamos en el número de publicaciones etiquetadas como "Sipuncula" en la base de datos *SciVerse Scopus* (Fig. 1.4), en la primera década del siglo XXI encontramos entre 8 y 25 trabajos anuales específicos sobre el phylum Sipuncula, mientras que los trabajos dedicados a la clase Polychaeta oscilan entre 200 y 429 trabajos para esta misma década. Esto se explica fácilmente si tenemos en cuenta que la abundancia de poliquetos es mucho mayor que la de sipuncúlidos. El número de especies de sipuncúlidos así como su abundancia suelen ser bajos, lo que ha propiciado un retraso

en el estudio de estos organismos en comparación al de otros taxones, sobre todo en lo referente a su ecología. Una gran parte de los escasos trabajos publicados se dedican al estudio de su fisiología (Fig. 1.5), esto es debido a que ciertas especies de sipuncúlidos son ideales como gusano celomado tipo para su estudio en laboratorio, debido a su fácil cultivo en acuario y su gran tamaño. Este es el caso de *Sipunculus nudus* Linnaeus 1766, que además presenta el aliciente de tratarse de una especie de interés comercial, como veremos más adelante en el apartado 1.8 de este capítulo.

1.3—Posición filogenética del phylum Sipuncula

Su posición filogenética es un tanto dudosa, y se trata de un debate aún abierto en la actualidad. Antes de los recientes estudios genéticos se discutía sobre una posible forma ancestral común a anélidos, moluscos y sipuncúlidos en la fase más primitiva del Paleozoico (Rice 1985; Cutler 1994). Los diferentes autores y estudios morfológicos proponían diferentes afinidades filogenéticas, no dejando claro las ramas que siguen a este posible ancestro

común. Algunos autores consideran la ausencia de metamería, tanto en adultos como en larvas de sipuncúlidos, como un carácter primitivo (Nielsen 1985), que sería previo a la radiación de los articulados (anélidos y artrópodos), lo que situaría a los sipuncúlidos como una derivación temprana de la rama molusco-anelidiana (Rice 1985). Posteriormente se incorporaría al debate la existencia de reminiscencias de segmentación en los estados larvarios de sipuncúlidos (Kristof *et al.* 2011; Wanninger *et al.* 2009). Algunos trabajos situaban a los sipuncúlidos más cercanos a equiúridos, anélidos o moluscos (Inglis 1985). Con estos últimos comparte características tales como la presencia en su desarrollo de la larva trocófora. Cabe destacar la existencia la clase Hyolitha (Marek 1963) (Fig. 1.6), grupo fósil del Paleozoico presuntamente afín a los moluscos, aunque aún no se ha conseguido cerrar esta relación. Estos fósiles presentan características de molusco tales como la presencia de una concha calcárea de forma cónica, protegida en su apertura por un opérculo. También presentan evidencias de un intestino en forma de U enrollado en bucles que recuerda a la morfología exclusiva del tubo

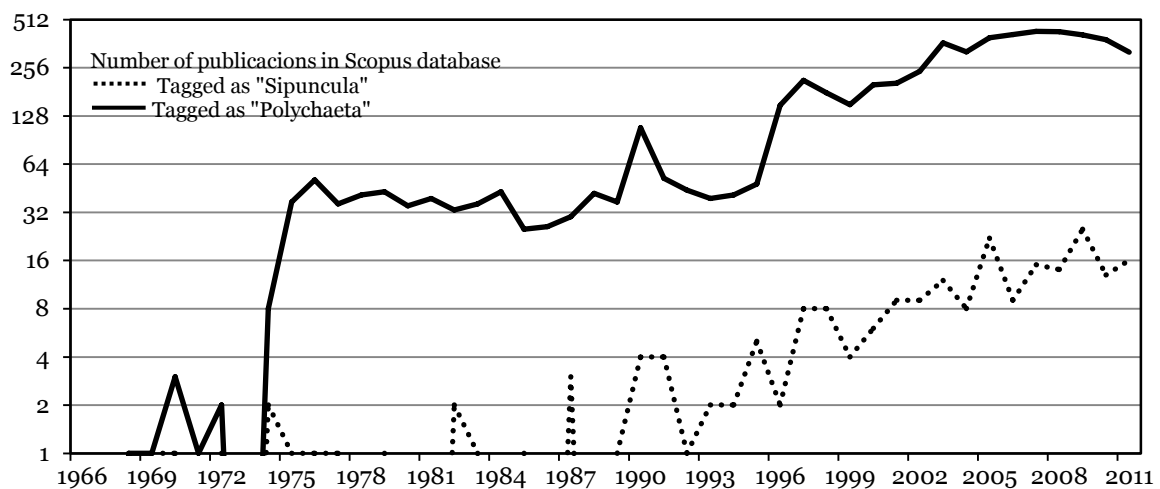


Fig. 1.4. Número de publicaciones específicas sobre sipuncúlidos y poliquetos (y etiquetadas como tal) en la base de datos de *SciVerse Scopus*.

digestivo del phylum Sipuncula (ver apartado 1.6), sugiriendo una relación entre ambos grupos (Runnegar *et al.* 1975).

A partir de los recientes estudios genéticos cada vez parece más evidente una relación estrecha entre anélidos y sipuncúlidos, rechazándose una posible relación con los moluscos (Boore & Staton 2002). En los últimos años se ha sugerido la inclusión de los phyla Echiura y Sipuncula, así como de la familia Siboglinidae (antiguamente Pogonophora y Vestimentifera) dentro del phylum Annelida (Dordel *et al.* 2010; Kristof *et al.* 2008, 2011; Shen *et al.* 2009; Struck *et al.* 2007, 2011; Wenninger *et al.* 2009), e incluso algunos autores comienzan a incluirlos como tal en algunos estudios (e.g. Helm *et al.* 2012; Kokot 2013; Riesgo *et al.* 2012). La familia Siboglinidae encajaría dentro del orden Sabellidae (Annelida), y Echiura dentro de la familia Capitellidae (Annelida), pero la posición que ocuparían los sipuncúlidos no está del todo clara. Aunque las nuevas evidencias genéticas apuntan en la dirección de incluir a los sipuncúlidos dentro del phylum Annelida en la presente tesis doctoral se ha mantenido el estatus de phylum para

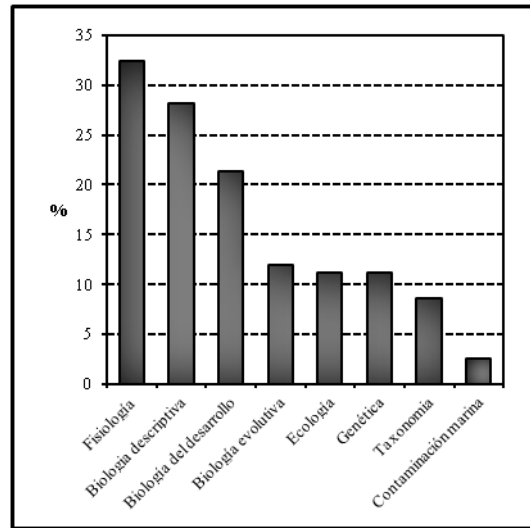


Fig. 1.5. Distribución por áreas de los trabajos etiquetados como "Sipuncula" en la base de datos de SciVerse Scopus.



Fig. 1.6. *Hyolithes cerops* del Cámbrico Medio (Fotografía tomada por M. A. Wilson)

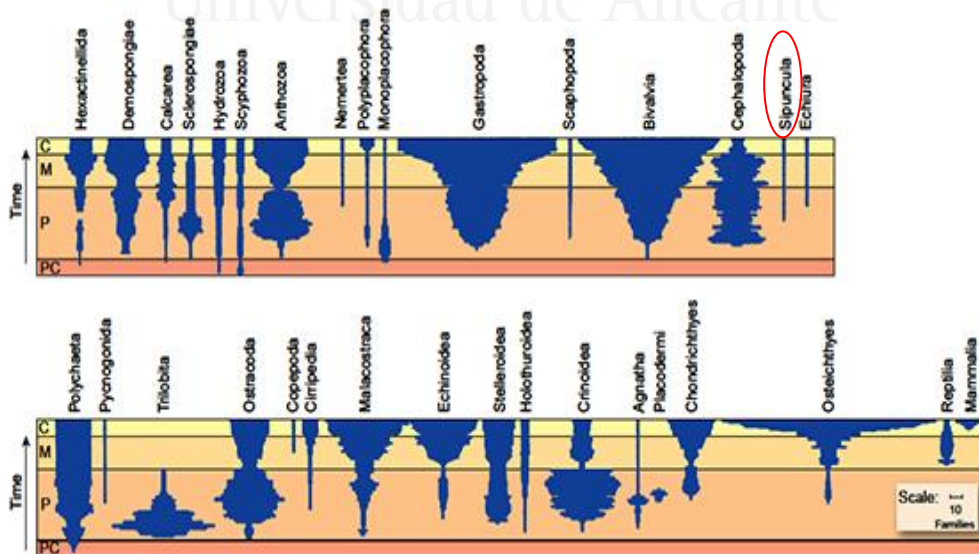


Fig. 1.7. Perfiles de diversidad taxonómica de los diferentes grupos animales en el registro fósil. La escala marca las diferentes eras: Precámbrico (PC), Paleozoico (P), Mesozoico (M), y Cenozoico (C). El número relativo de familias se indica con el ancho del perfil. (De Hickman 2008)

Sipuncula, a la espera de más estudios filogenéticos y de un compromiso mayor por parte de la comunidad científica.

1.4—Distribución del phylum Sipuncula

Los sipuncúlidos han sido un phylum con una diversidad históricamente baja, a raíz de su registro fósil (Hickman 2008) (Fig. 1.7). Presentan un alto rango de tolerancia a la temperatura (-1.9°C – 29°C) (Murina 1984) y a la profundidad (Cutler 1979; Murina 1973), por lo que su distribución abarca todos los océanos del mundo y todo el rango batimétrico (Cutler 1975, 1977ab, 1994; Cutler & Cutler 1980, 1987b; Murina 1971, 1975, 1977, 1984), exceptuando zonas extremadamente salobres (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). Algunas de las especies se consideran cosmopolitas,

aunque recientes estudios sugieren altos niveles de diferenciación genética entre individuos de poblaciones distantes (Kawauchi & Giribet 2010, 2013; Schulze *et al.* 2012). Cerca del 75 % de las especies se concentran en aguas poco profundas (<200 m), hallándose casi la mitad de todas las especies del filo incluidas en la zona eufótica de la plataforma continental (Murina 1984).

La mayoría tienen un comportamiento euribático; podemos encontrar sipuncúlidos desde la zona intermareal hasta profundidades abisales (Fig. 1.8) (Cutler 1973; Murina 1984), siendo numerosos los casos extremos en los que una misma especie ha sido registrada tanto en aguas litorales como en zonas abisales (Cutler 1973; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999), con diferencias batimétricas de hasta casi

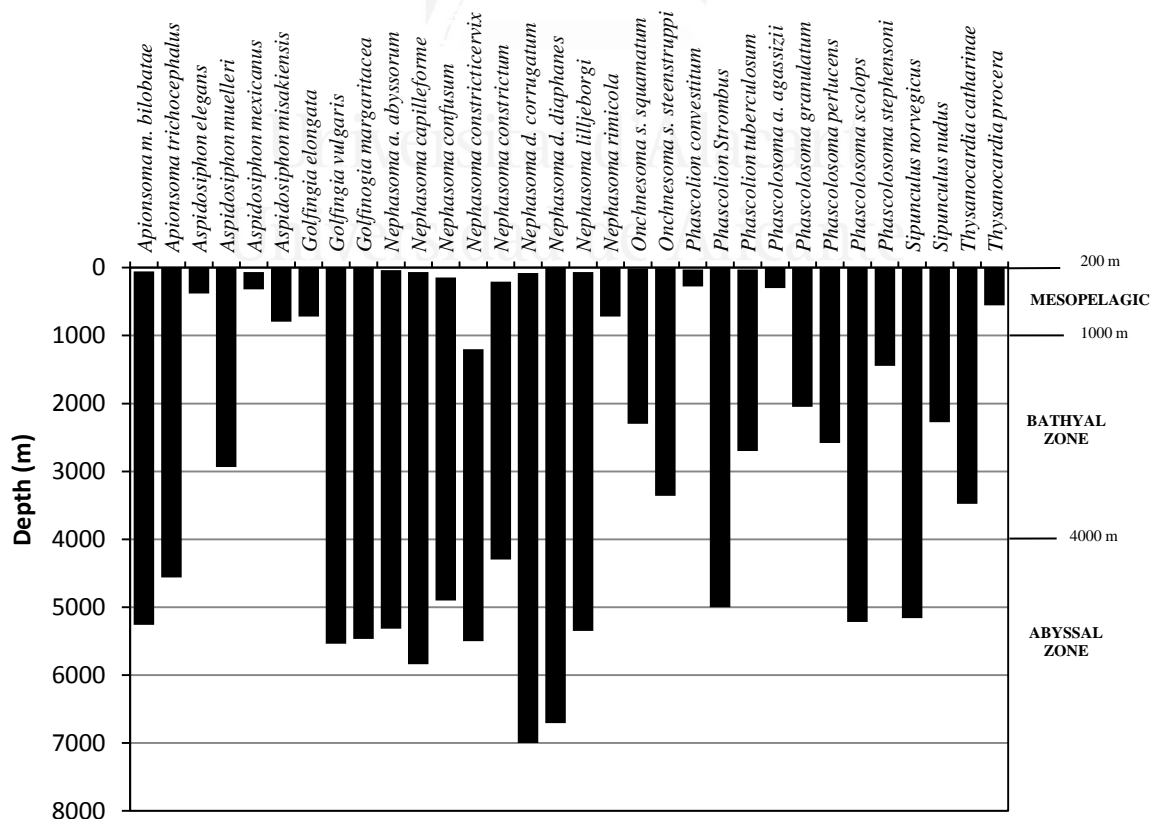


Fig. 1.8. Rango batimétrico de las especies y subespecies de sipuncúlidos con presencia en el mar Mediterráneo.

7000 metros entre la localización más superficial y la más profunda. El rango latitudinal de distribución abarca desde el ecuador hasta ambos polos geográficos (82°N–77°S) (Murina 1984), con algunas

especies viviendo en ambos polos (Murina 1975; Amor 1993).

La mayor parte de las especies se hallan confinadas en aguas tropicales (Fig. 1.9), llegando hasta el 73% del total en el caso de

Tab. 1.1. Sipunculídeos presentes en el Mediterráneo español y aguas adyacentes. (Basado en Saiz-Salinas 1986, 1993a; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999)

<p>Filo SIPUNCULA Sedgwick 1898</p> <p>Clase SIPUNCULIDEA Gibbs & Cutler 1987</p> <p>Orden SIPUNCULIFORMES Gibbs & Cutler 1987</p> <p> Familia SIPUNCULIDAE Rafinesque 1814</p> <p> Género <i>Sipunculus</i> Linnaeus 1767</p> <p> <i>Sipunculus (Sipunculus) norvegicus</i> Danielssen 1869</p> <p> <i>Sipunculus (Sipunculus) nudus</i> Linnaeus 1767</p> <p>Orden GOLFINGIIFORMES Gibbs & Cutler 1987</p> <p> Familia GOLFINGIIDAE Stephen & Edmonds 1972</p> <p> Género <i>Golfingia</i> Lankester 1885</p> <p> <i>Golfingia (Golfingia) elongata</i> (Keferstein 1862)</p> <p> <i>Golfingia (Golfingia) margaritacea</i> (Sars 1851)</p> <p> <i>Golfingia (Golfingia) vulgaris vulgaris</i> (Blainville 1827)</p> <p> Género <i>Nephasoma</i> Pergament 1946</p> <p> <i>Nephasoma capilleforme</i> (Murina 1973)</p> <p> <i>Nephasoma confusum</i> (Sluiter 1902)</p> <p> <i>Nephasoma constricticervix</i> (Cutler 1969)</p> <p> <i>Nephasoma constrictum</i> (Southern 1913)</p> <p> <i>Nephasoma diaphanes corrugatum</i> Cutler & Cutler 1986</p> <p> <i>Nephasoma diaphanes diaphanes</i> (Gerould 1913)</p> <p> <i>Nephasoma rimicola</i> (Gibbs 1973)</p> <p> Género <i>Thysanocardia</i> Fisher 1950</p> <p> <i>Thysanocardia procera</i> (Möbius 1875)</p> <p> Familia PHASCOLIIDAE Cutler & Gibbs 1985</p> <p> Género <i>Phascolion</i> Théel 1875</p> <p> <i>Phascolion (Phascolion) strombus strombus</i> (Montagu 1804)</p> <p> <i>Phascolion (Isomya) tuberculosum</i> Théel 1875</p> <p> Género <i>Onchnesoma</i> Koren & Danielssen 1875</p> <p> <i>Onchnesoma steenstruppi steenstruppi</i> Koren & Danielsen 1875</p> <p>Clase PHASCOLOSOMATIDEA Gibbs & Cutler 1987</p> <p>Orden PHASCOLOSOMATIFORMES Gibbs & Cutler 1987</p> <p> Familia PHASCOLOSOMATIDAE Stephen & Edmonds 1972</p> <p> Género <i>Phascolosoma</i> Leuckart 1828</p> <p> <i>Phascolosoma (Phascolosoma) granulatum</i> Leuckart 1828</p> <p> <i>Phascolosoma (Phascolosoma) stephensoni</i> (Stephen 1942)</p> <p> Género <i>Apionsoma</i> Sluiter 1902</p> <p> <i>Apionsoma murinae bilobatae</i> (Cutler 1969)</p> <p>Orden ASPIDOSIPHONIFORMES Gibbs & Cutler 1987</p> <p> Familia ASPIDOSIPHONIDAE De Quatrefages 1865</p> <p> Género <i>Aspidosiphon</i> Diesing 1851</p> <p> <i>Aspidosiphon (Aspidosiphon) misakiensis</i> Ikeda 1904</p> <p> <i>Aspidosiphon (Aspidosiphon) muelleri</i> Diesing 1851</p>

especies de aguas superficiales, y siendo el archipiélago malayo (sudeste asiático) el lugar donde podemos encontrar la mayor diversidad de especies (Murina 1975).

A pesar de que los datos analizados por Murina son previos a las grandes revisiones taxonómicas llevadas a cabo las décadas posteriores se puede considerar útil el patrón de distribución, tomando los datos con cautela y a falta de una revisión más actual sobre la zoogeografía global del phylum.

1.5—El Phylum Sipuncula en el Mediterráneo español

Hasta la realización de esta tesis se han registrado 35 especies diferentes de sipuncúlidos dentro del Mediterráneo (Açik 2007, 2011; Coll *et al.* 2010). Exceptuando la subespecie *Aspidosiphon (Aspidosiphon) muelleri kovalevskii* Murina 1964 (cuyo estatus taxonómico será rebatido en el capítulo 4; apartado 4.3.3) ninguna especie es endémica para el mar Mediterráneo; a pesar de la presencia de numerosos endemismos de invertebrados pertenecientes a otros taxa (Cutler 1994). La ausencia de endemismos es un hecho habitual dentro del phylum Sipuncula (Cutler 1994; Kędra & Murina 2007), lo que nos da una idea del carácter cosmopolita del grupo. La primera especie endémica para el Mediterráneo podría ser una nueva especie de *Phascolion* encontrada en Ibiza pero aún sin describir (Müller *et al.* 2014). En lo referente al Mediterráneo español y aguas adyacentes (incluyendo las Islas Baleares) y siguiendo el sistema de clasificación formulado por Gibbs & Cutler en 1987, el número de especies conocidas para esta zona geográfica se ve reducido a 21 (Tab. 1.1) (Basado en Cutler 1994; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1982, 1986, 1993a).

La totalidad de estas 21 especies han sido registradas en fondos blandos, aunque 10

de ellas (47.6%) han sido también registradas en sustrato duro.

1.6—Aspectos morfológicos

En este apartado se describe brevemente las principales características anatómicas del phylum, sobre todo las que cuentan con una mayor relevancia a nivel taxonómico. Su cuerpo se divide en dos secciones principales; el tronco, y el introverto o probóscide retráctil, cuya longitud puede abarcar desde la mitad hasta varias veces la longitud del tronco, acabando en una corona tentacular donde se encuentra la boca del animal (Fig. 1.10). Esta corona está más o menos desarrollada dependiendo del grupo taxonómico. A lo largo del introverto podemos encontrar ganchos quitinosos dispersos o formando anillos, sobre todo en su parte más distal. Estos ganchos son sumamente importantes como carácter taxonómico, al igual que las numerosas papilas (de diversas formas y tamaños) y otros cuerpos cutáneos que suelen poblar el tegumento de la mayoría de especies.

Algunos grupos pertenecientes al orden de los Aspidosiphoniformes presentan una estructura calcificada, en forma de escudo en la parte anterior del tronco, que funciona como el opérculo de un gasterópodo, protegiendo al individuo, que vive refugiado en grietas o conchas vacías. También aparece otra estructura en forma de escudo en la parte posterior del tronco; podría tener una función de anclaje o ayudar en la perforación en las especies excavadoras.

La anatomía interna de los sipuncúlidos se caracteriza por la disposición del tubo digestivo, en forma de U que se entrelaza de forma helicoidal formando bucles. Este tubo digestivo comienza en la parte más distal de la probóscide donde se encuentra la boca y termina en el ano situado cerca de la base del introverto. El tracto digestivo se encuentra fijado a la pared corporal por medio de unos filamentos musculares de

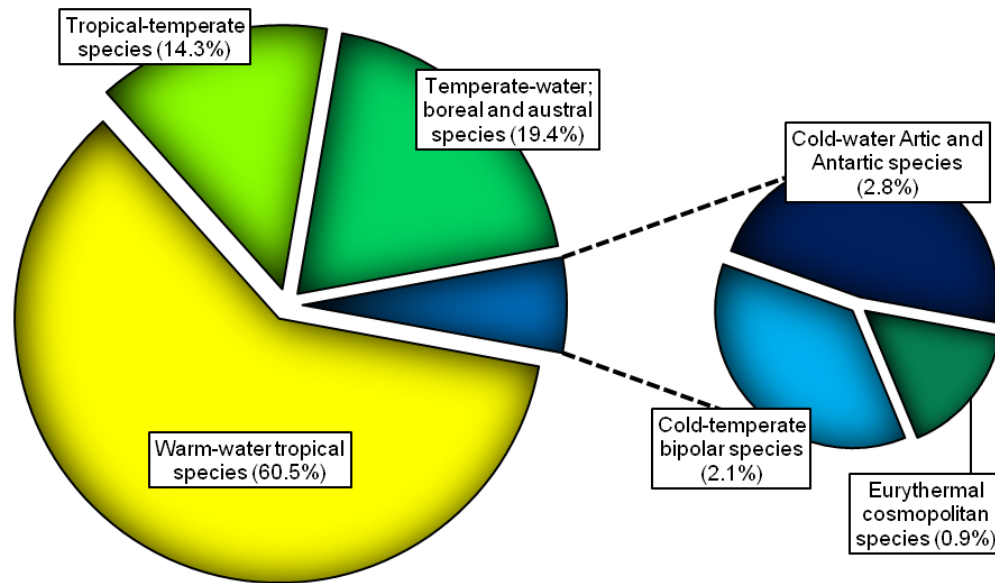


Fig. 1.9. Representación porcentual de las especies de sipuncúlidos de acuerdo a los diferentes grupos zoogeográficos (Basado en Murina 1975).

sujeción. Este tubo digestivo es exclusivo y distintivo para el filo. Presencia de 1–4 músculos retractores de la probóscide (carácter taxonómico), que se extienden desde la pared corporal hasta insertarse en el origen del esófago, detrás del ganglio cerebral. Puede haber uno (géneros *Phascolion* y *Onchnesoma*) o dos metanefridios, situados ventrolateralmente a la altura final del tronco, aunque es un carácter que puede resultar variable intraespecíficamente. El sistema nervioso consiste en un cordón subepidérmico que recorre la parte ventral del individuo partiendo de un ganglio cerebral bilobulado. El sistema nervioso periférico se basa en nervios laterales que parten de este cordón ventral de forma irregular.

1.7—Aspectos ecológicos

Los nichos ecológicos de los sipuncúlidos no están bien definidos, y los límites y preferencias de los principales factores ambientales como son la temperatura, salinidad, oxígeno, profundidad, tipo de sedimento, etc., están lejos de ser conocidos para la mayoría de especies (Cutler 1994). De un modo general se puede decir que los

sipuncúlidos ocupan la mayoría de los hábitats marinos: excavando o aprovechando galerías en sustratos duros como arrecifes coralinos o afloramientos rocosos, enterrados en sustratos blandos (desde fango hasta arenas gruesas o gravas), fondos coralígenos, fondos detríticos, entre los poros de roca volcánica, formando parte de la fauna asociada a fanerógamas, algas, esponjas o corales, refugiados en conchas vacías de moluscos o tubos de poliquetos, o casi cualquier sitio donde se encuentren protegidos (Adrianov & Maiorova 2010; Cutler 1994; Hyman 1959; Murina 1984; Singh *et al.* 2013).

A pesar de contar con un reducido número de especies ya hemos visto que los sipuncúlidos son especies con una distribución altamente cosmopolita, capaces de colonizar el mar de una forma extensiva, tanto en el rango horizontal como en el vertical. La gran excepción son las zonas salobres, evidenciando que se trata de un filo exclusivamente marino y bentónico, con un comportamiento estenohalino y que generalmente evita las bajas salinidades, siendo un factor

significativo a la hora de limitar su distribución geográfica (Murina 1984). Están ausentes en mares de baja salinidad (mar de Azov, mar Caspio o mar Báltico) o con presencia muy escasa (mar Negro, mar Blanco y mar de Siberia) (Murina 1984). Las especies estudiadas parecen ser osmoconformistas, con escasa capacidad de regulación iónica durante un evento de aumento de la salinidad (Adolph 1936; Chew *et al.* 1994; Ferraris *et al.* 1994; Oglesby 1969, 1982). Solo ciertas especies como *Siphonosoma australe* (Keferstein 1865), *Phascolosoma arcuatum* (Gray 1828), y *Phascolopsis gouldi* Pourtales 1851, han mostrado cierta resistencia hacia estos eventos, mostrándose capaces de regular su salinidad interna y de mantenerla diferente a la del medio (Chew *et al.* 1994; Green & Dunn 1976; Oglesby 1982; Peng & Ip 1994).

Según Murina (1984) podemos diferenciar cuatro grupos ecológicos dentro del phylum. Se pueden encontrar excepciones y hay especies que pueden formar parte de más de un grupo, pero de una forma general los grupos ecológicos son los siguientes: (1) Sipuncúlidos excavadores que habitan los fondos blandos y los utilizan tanto para protegerse como para alimentarse. Los gusanos ingieren el sedimento de forma indiscriminada y presentan un alto ratio entre el peso del contenido intestinal y el peso del animal. Podemos descubrir representantes de nueve géneros diferentes dentro de este grupo. En el grupo (2) se encuentran las especies que viven protegidas dentro de conchas, tubos vacíos u otros refugios similares. Los refugios más habituales suelen ser conchas de gasterópodos y tubos de poliquetos vacíos, pero pueden usar cualquier refugio disponible. Normalmente presentan una baja movilidad; recolectan detrito de la superficie del sedimento circundante con ayuda de su probóscide y de unos

tentáculos bien desarrollados. Prefieren refugios bien irrigados como conchas agujereadas por moluscos predadores de la familia Naticidae. La mayor parte de especies del género *Phascolion* pertenecen a este grupo, así como muchas especies del género *Aspidosiphon* y algunas del género *Golfingia*. La densidad de estos sipuncúlidos podría estar limitada por la disponibilidad de refugios en el medio. El tercer grupo ecológico (3) se caracteriza por la posesión de una gran corona tentacular dicotómica, lo que le permite un modo de alimentación diferente. También se alimentan de partículas de detritus, pero en este caso las recogen directamente en la columna de agua al quedar atrapadas por el mucus que segregan en la parte distal de la probóscide. Las especies del género *Themiste* y algunas de *Thysanocardia* forman parte de este grupo ecológico. El grupo (4) está integrado por sipuncúlidos semi-móviles que habitan las grietas y

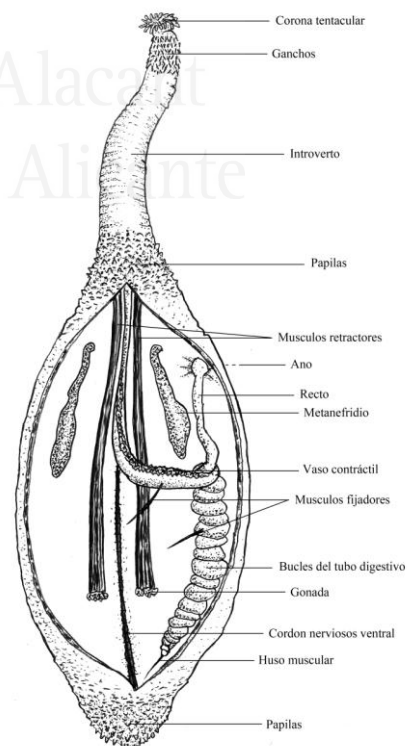


Fig. 1.10. Anatomía general de un sipuncúlido (Redibujado de Cutler 1994)

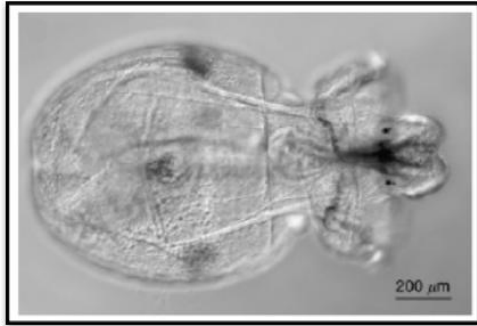


Fig. 1.11. Larva pelagosfera (De Radashevsky & Migotto 2006).

refugios de los sustratos duros. Pueden ser capaces, hasta cierto punto, de excavar en el sustrato duro mediante procesos físicos o la segregación de sustancias químicas desde glándulas en la epidermis. Atrapan el alimento circundante evaginando la probóscide y raspando las partículas de detrito del sustrato con la ayuda de los tentáculos y las filas de ganchos de la trompa. En este grupo se ven representadas principalmente las familias Aspidosiphonidae y Phascolosomatidae. A modo de excepción quedaría fuera de estos cuatro grupos la especie saprófaga *Phascolosoma saprophagicum* Gibbs 1987; descrita a partir de cientos de especímenes encontrados en el cráneo de una ballena a 880 metros de profundidad (Gibbs 1987).

La mayoría de especies son dioicas y carecen de dimorfismo sexual, aunque existen algunas excepciones, pudiéndose encontrar reproducción asexual por fisión; en *Sipunculus robustus* y *Aspidosiphon elegans* (Sundara-Rajulu & Krishnan 1969; Rice 1970), reproducción por partenogénesis (Pilger 1987) y una especie monoica; *Nephasoma minuta* (Paul 1910; Åkesson 1958; Gibbs 1975). La fecundación se produce de forma externa y dará lugar a una larva trocófora pelágica (Rice 1985). El ciclo biológico de los sipuncúlidos ha sido ampliamente estudiado por Rice (1966-1989). Como se ha apuntado anteriormente la mayoría de las especies son dioicas, y Rice describe tres tipos de desarrollo. Uno

directo en el que no existen fases pelágicas ni estadios ciliados, sino que se desarrolla directamente el juvenil. Los otros dos tipos los define como indirectos, y pueden incluir uno o dos estadios larvarios; larva trocófora y larva pelagosfera (Fig. 1.11). La larva trocófora de los sipuncúlidos es muy similar a la de moluscos y poliquetos, son todas lecitotróficas y su desarrollo dura entre dos y diez días. En la etapa final del desarrollo de la larva trocófora se pueden dar dos situaciones dependiendo de la especie: La transformación directa por alargamiento en una forma juvenil o la metamorfosis hacia una larva pelagosfera (Fig. 1.11). Esta forma larvaria es exclusiva de sipuncúlidos, y puede ser tanto lecitotrófica como planctotrófica.

1.8—Valor comercial

La única especie con valor comercial para nuestra zona de estudio es *Sipunculus nudus*. Se trata de uno de los cebos para pesca deportiva más caros y codiciados del Mediterráneo. Son conocidos como *tita* o *bibis*, vendiéndose siempre especímenes vivos, ya sea grandes ejemplares individualmente, o más pequeños en cajas preparadas para su conservación durante un periodo de 10–20 días (Fig. 1.12 y Fig. 1.13). Su éxito se debe a que es un cebo muy versátil y de gran resistencia, ya que su cutícula es bastante dura, y por lo tanto hay una alta probabilidad de que solo sea comido por piezas grandes (Núñez *et al.* 2010)

Cabe destacar el hecho de que durante el desarrollo de este estudio solo se han recolectado *S. nudus* juveniles y de pequeño tamaño, muy posiblemente porque los individuos adultos son de gran tamaño y teniendo en cuenta que pueden alcanzar los 32 cm de longitud y 2 cm de anchura (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999) pueden excavar galerías suficientemente profundas para escapar al alcance de la



Fig. 1.12. Ejemplar adulto de *Sipunculus nudus* recolectado en la costa asturiana (España). Fotografía de Bernardo Busto (CC).



Fig. 1.13. Caja de *Sipunculus nudus* preparados para su venta como cebo de pesca deportiva.

draga Van Veen. Aun así su presencia ha sido habitual durante los muestreos, lo cual es importante, ya que se trata de una especie amenazada en Andalucía (De la Rosa *et al.* 2008) y otras áreas del Mediterráneo español como el Mar Menor, debido a su excesiva recolección. Además de recolectarse, esta especie también se importa viva desde criaderos del sudeste asiático, principalmente vietnamitas (Núñez *et al.* 2011), y aunque no se ha investigado al respecto existe la posibilidad de que la genética de estas poblaciones asiáticas se haya mezclado con la de las poblaciones locales. En el mercado asiático se cultiva esta especie de forma masiva, ya que se trata de una especie muy apreciada dentro de la gastronomía local.

1.9—Justificación y objetivos

Esta tesis doctoral tiene como objetivo principal el estudio y caracterización de los poblamientos de sipuncúlidos de fondos blandos presentes en las aguas litorales de la cuenca Mediterránea occidental, principalmente de las costas de la Comunidad Valenciana, así como el estudio de los procesos y variables que regulan estas poblaciones y su posible internación con los procesos de origen antropogénico que tiene lugar en estas zonas. Esto también nos permitiría valorar la idoneidad de este grupo taxonómico para su uso como bioindicador de estrés ambiental o impactos en el medio ambiente marino.

El phylum Sipuncula ha sido históricamente pasado por alto (Kędra 2007; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999), y el número de estudios que se le han dedicado son escasos. Saiz-Salinas y colaboradores han estudiado de una forma generalista la distribución de los sipuncúlidos de la península ibérica y sus aguas adyacentes (Saiz-Salinas 1982, 1986, 1993a; Saiz-Salinas & Murina 1982; Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990). En esta tesis doctoral queremos ampliar estos conocimientos centrándonos en los fondos blandos de las zonas litorales del levante español. Nuestro objetivo es caracterizar de forma más detallada las especies que nos aparecen en esta zona costera, así como identificar las variables abióticas que van a determinar la abundancia y distribución de estas especies, (e.g. tipo de fondo, granulometría, pH, cantidad de materia orgánica, salinidad, disponibilidad de refugios en el sedimento).

Tomando la especie más abundante en fondos blandos para esta zona (*Aspidosiphon muelleri*) se plantea el estudio tanto de aspectos ecológicos como de su biología reproductiva y su ciclo de vida, como son la variación temporal de sus

poblaciones y las épocas reproductivas. También estudiamos la posible limitación que la disponibilidad de refugio puede tener sobre la distribución de este tipo de especies conchícolas y tubícolas y la ecología de estas especies (Hylleberg 1975).

Con respecto al estudio de los efectos de origen humano sobre los poblamientos de sipuncúlidos la ausencia de datos previos es casi total. Los estudios son muy escasos y generalistas, tratándose de citas aisladas en *checklists* de especies presentes en zonas de impacto antropogénico, pero con escaso valor estadístico a nivel específico. El sipuncúlido *Aspidosiphon muelleri* ha sido

introducido como especie sensible dentro del índice biótico AMBI (Borja et al. 2000; Borja & Muxika 2005), seguramente debido a su alta abundancia (comparado con otras especies de sipuncúlidos), lo que nos permite medir su respuesta ante alteraciones del medio. El estudio de los efectos de estos impactos sobre las poblaciones de sipuncúlidos y la valoración y evaluación de estas especies para su uso como bioindicadores de alteraciones en el medio, son otros de los objetivos principales de esta tesis doctoral.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



2. First record of the sipunculan worm
Phascolion caupo Hendrix 1975
in the Mediterranean Sea

Photo: *Phascolion caupo* Hendrix 1975



Published as:

FERRERO-VICENTE, L.M., LOYA-FERNÁNDEZ, A., MARCO-MÉNDEZ, C., MARTÍNEZ-GARCÍA, E., SAIZ-SALINAS, J.I. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2012) First record of the sipunculan worm *Phascolion (Phascolion) caupo* Hendrix, 1975 in the Mediterranean Sea. *Mediterranean Marine Science*, 13(1): 89–92.

2. First record of the sipunculan worm *Phascolion caupo* Hendrix 1975 in the Mediterranean Sea

2.1—Abstract

Specimens of the sipunculan worm *Phascolion caupo* Hendrix 1975 have been collected for the first time in the Mediterranean Sea, thus increasing the number of known sipunculan species up to 36 in this area. They were encountered on soft bottoms from the coast of San Pedro del Pinatar (western Mediterranean). Thirty specimens were collected at a depth ranging from 32.6 to 37.2 m, mainly in sandy substrata with high load of silt and clays. 80% of the individuals were found inhabiting empty shells of gastropods or empty tubes of serpulid polychaetes.

2.2—Introduction

To date, after recent contributions (Açik 2007, 2011), a total of 35 sipunculan species are known in the Mediterranean Sea. A detailed list can be consulted in Coll *et al.* (2010). Three of these species belong to the genus *Phascolion*: *Phascolion convestitum* (Sluiter 1902), *P.¹ tuberculosum* Théel 1875 and *P. strombus strombus* (Montagu 1804) (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Coll *et al.* 2010). In this work, it is reported an addition to the list of known species of sipunculan worms in the Mediterranean Sea. *Phascolion caupo* Hendrix 1975 (Fig. 2.1) is relatively a recent species, with only a few records around the world (Fig. 2.2). Originally, it was collected from shallow waters, among rhizomes and roots of the seagrass *Thalassia testudinum*, from the southeastern coast of the United States in the Western Atlantic (Hendrix 1975). Later, it was recorded in the eastern side of the

Atlantic Ocean, in the Ibero-Moroccan bay, at a depth ranging between 544–1378 m, in bottoms formed by fragments of mollusc shells (Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990). Three years later, it was recorded for the first time in the Indian Ocean (Saiz-Salinas 1993b).

Phascolion caupo shows a similar morphology to *P. strombus strombus*, a species widely recorded along the European Mediterranean shoreline (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). Probably the presence of *P. caupo* has been overlooked in the Mediterranean Sea due to the lack of specialists in the identification of sipunculan species (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). When identifying sipunculans of the genus *Phascolion*, the confusion between *P. caupo* and *P. strombus strombus* might be easy for marine biologists who are not habituated to their identification.

¹ Following the *Code of Zoological Nomenclature* (1999) (article 25 and recommendation 25A) ...if an abbreviation is used for any part of a binomen or a trinomen, the abbreviation should be unambiguous... In the present work *P.* is used for the genus *Phascolion* and *Pm.* for the genus *Phascolosoma*.



Fig. 2.1. Specimen of *Phascolion caupo* from San Pedro del Pinatar (western Mediterranean). Scale bar=1 mm.

Phascolion strombus strombus presents a high phenotypic plasticity (Cutler 1973), with variability between individuals in body shape, skin colour, body size or number and shape of papillae (Saiz-Salinas 1984). The objectives of this study are: (1) to report the presence of *P. caupo* in the Mediterranean Sea; and (2) to select reliable characters for the distinction of closely related species.

2.3—Materials and methods

Specimens of *Phascolion caupo* were collected near San Pedro del Pinatar (Spanish Mediterranean), at depths ranging from 32.6 to 37.2 m (Fig. 2.3). The sediment was a mixture of muddy sand, with different grain size and even gravel and coralline algae at location C1 (Tab. 1).

A total of 144 samples were collected every June from 2007 to 2010 by using a Van Veen grab with a surface area of 0.04 m². To separate the macrofauna from sediment, the samples were sieved through a 0.5 mm mesh screen. Afterwards, the macrofauna was fixed in 10% buffered formalin and preserved in 70% ethanol. Depth and sediment type were recorded at each station

(Buchanan 1984). Sipunculans were dissected to study their internal anatomy using a binocular microscope and fine scissors with a 3 mm blade (Moria MC19). Small structures with high taxonomic value, such as papillae and hooks, were observed under the microscope. To identify the species, we examined the introvert hooks, a distinctive characteristic between *P. caupo* and *P. strombus strombus* (Cutler 1994). *Phascolion strombus strombus* presented claw-like hooks (type I hooks) (Fig. 2.4A), while *P. caupo* presented scattered broad-based hooks, with the tip rounded (type III hooks) (Fig. 2.4B).

2.4—Results and discussion

A total of 30 specimens of *Phascolion caupo* were collected. Most of them inhabited inside a calcareous shelter (80.0%), such as gastropod empty shells (65.7%), *Ditrupa arietina* (Polychaeta: Serpulidae) empty tubes (11.4%) or calcareous debris (2.9%). It is well known that *P. caupo* is usually an empty shells dweller (Hendrix 1975; Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990; Saiz-Salinas 1993ab). In a few cases, sipunculans were found sharing their shelter with

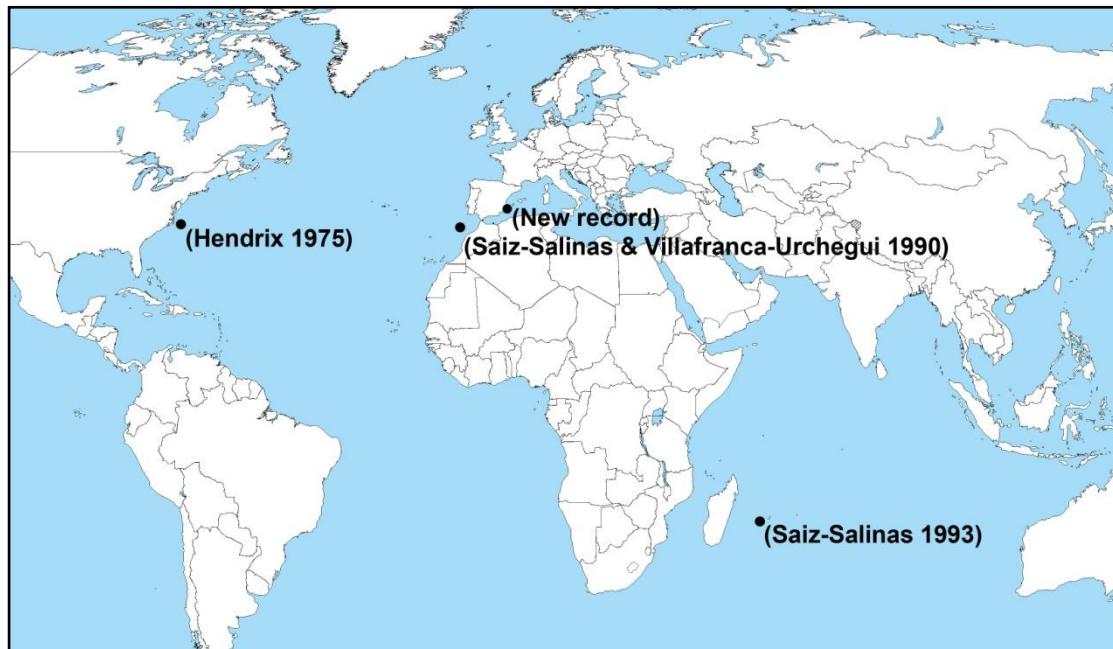


Fig. 2.2. Location of new and previous occurrences of *Phascolion caupo*.

polychaetes or bivalves. The average trunk length of the specimens was 3.27 ± 0.46 mm long (mean \pm SE), with a maximum size of 12 mm. The length of the introvert when fully everted was around 1-3 times longer than the trunk length. Lemon-shaped papillae (Fig. 2.4C) were present in the anterior and posterior part of the trunk,

and blister-shaped papillae (Fig. 2.4D) scattered along the trunk. A few cone-shaped holdfasts papillae (Fig. 2.4E) were found in the middle of the trunk. These papillae were difficult to find due to their low abundance and they were detected only in some of the specimens. Dissected individuals had the standard characters of the genus: the presence of one nephridium and two retractor muscles are partially fused. Both the ventral and the dorsal retractor muscles are attached at the same level, just at the posterior part of the trunk. The ventral retractor muscle showed a slight division at the base and was 3-6 times thinner than the dorsal one. This thinner ventral muscle was overlooked in the original description by Hendrix (1975).

Historically, the high plasticity of this genus led to the description of numerous species during the first half of the twentieth century, many of which were later synonymised through different revisions (Cutler & Cutler 1985; Gibbs 1985; Hendrix 1975), decreasing notably the number of species belonging to the genus *Phascolion*.

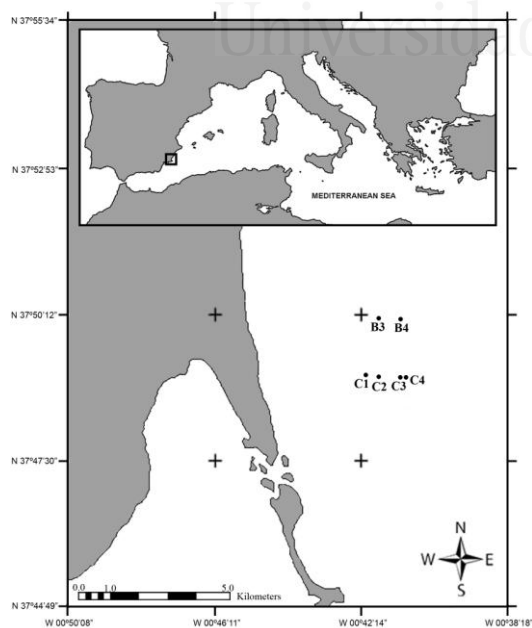


Fig. 2.3. Map of the study area showing the sampling stations.

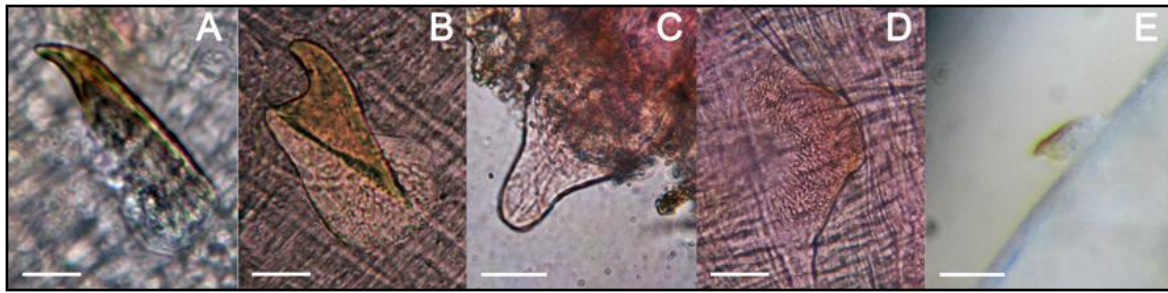


Fig. 2.4. [A] Claw-like hook from the introvert of *Phascolion strombus*. [B] Tip-rounded hook from the introvert of *Phascolion caupo*. [C] Lemon-shaped papilla from the anterior part of the trunk of *P. caupo*. [D] Blister-shaped papilla from the mid-trunk of *P. caupo*. [E] Holdfast papilla from mid-trunk of *P. caupo*. Scale bars: A,B=10 μ m; C=100 μ m; D,E=50 μ m.

Tab. 2.1. Data collection of the examined material, showing; year, station, latitude, longitude, depth (m), bottom substrate, shelter and trunk length (TL) for each specimen. Substrate=main fraction of the sediment.

Year	Station	Latitude	Longitude	Depth (m)	Substrate	Shelter	TL
2007	B3	N 37°49'54"	W 0°42'20"	33.7	Coarse sand	—	2.0
2007	C2	N 37°48'49"	W 0°42'21"	33.4	Medium sand	<i>D. arietina</i> tube	2.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	—	8.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	Gastropod shell	2.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	Gastropod shell	6.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	Gastropod shell	7.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	—	1.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	Gastropod shell	5.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	—	2.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	—	2.0
2007	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Coarse sand	Gastropod shell	1.5
2008	B4	N 37°49'53"	W 0°41'49"	37.2	Mud	Gastropod shell	1.0
2008	C1	N 37°48'51"	W 0°42'41"	32.6	Gravel	Gastropod shell	1.0
2008	C2	N 37°48'49"	W 0°42'21"	33.4	Medium sand	Gastropod shell	5.0
2008	C2	N 37°48'49"	W 0°42'21"	33.4	Medium sand	<i>D. arietina</i> tube	3.0
2008	C2	N 37°48'49"	W 0°42'21"	33.4	Medium sand	Gastropod shell	2.0
2008	C2	N 37°48'49"	W 0°42'21"	33.4	Medium sand	<i>D. arietina</i> tube	4.0
2008	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Fine sand	Calcareous debris	7.0
2008	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Fine sand	Gastropod shell	0.5
2008	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Fine sand	Gastropod shell	1.5
2008	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Fine sand	Gastropod shell	2.5
2008	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Fine sand	Gastropod shell	2.0
2008	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Fine sand	Gastropod shell	1.0
2008	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Fine sand	Gastropod shell	12.0
2008	C4	N 37°48'49"	W 0°41'47"	35.6	Medium sand	Gastropod shell	2.0
2008	C4	N 37°48'49"	W 0°41'47"	35.6	Medium sand	Gastropod shell	2.0
2008	C4	N 37°48'49"	W 0°41'47"	35.6	Medium sand	Gastropod shell	2.5
2008	C4	N 37°48'49"	W 0°41'47"	35.6	Medium sand	Gastropod shell	2.5
2008	C4	N 37°48'49"	W 0°41'47"	35.6	Medium sand	Gastropod shell	2.5
2008	C4	N 37°48'49"	W 0°41'47"	35.6	Medium sand	Gastropod shell	4.0
2008	C4	N 37°48'49"	W 0°41'47"	35.6	Medium sand	Gastropod shell	2.5
2010	C3	N 37°48'49"	W 0°41'50"	34.9	Medium sand	Gastropod shell	5.0

The species *P. caupo* was not described by Hendrix until 1975, making clear the anatomic differences between *P. caupo* and other species of the genus. It is likely that the presence of *P. caupo* in the Mediterranean Sea has been overlooked for

many years, possibly being misidentified as *P. strombus strombus*. Nonetheless, the possibility of a recent entrance of *P. caupo* to the Mediterranean Sea through the Strait of Gibraltar should be analysed by a genetic study of individuals from different Atlantic

and Mediterranean locations. Also, the genetic divergence should be studied, both

among varieties of different localities and different species of the genus *Phascolion*.

2.5—Key to the genus *Phascolion* in the Mediterranean Sea

1. Ventral retractor muscle much thinner than dorsal (less than one-half).2
Dorsal and ventral retractors of equal size; epidermal holdfast of trunk weakly proteinised or absent.....3
2. Claw-like hooks (type I) (Figure 2.2A).*P. strombus strombus*
Scattered broad-based hooks, with rounded tip (type III) (Figure 2.2.B) *P. caupo*
3. Large holdfast papillae without chitinised borders. *P. tuberculosum*
Holdfast papillae with weak borders of hardened proteins. *P. convestitum*



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



3. Soft-bottom Sipuncula from San Pedro del Pinatar (western Mediterranean): influence of anthropogenic impacts and sediment characteristics on their distribution

Photo: *Golfingia vulgaris* (de Blainville 1827)



Published as:

FERRERO-VICENTE, L.M., LOYA-FERNÁNDEZ, A., MARCO-MÉNDEZ, C., MARTÍNEZ-GARCÍA, E. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2011) Soft-bottom sipunculans from San Pedro del Pinatar (Western Mediterranean): influence of anthropogenic impacts and sediment characteristics on their distribution. *Animal Biodiversity and Conservation*, 34(1): 101–111.

3. Soft-bottom Sipuncula from San Pedro del Pinatar (western Mediterranean): influence of anthropogenic impacts and sediment characteristics on their distribution

3.1—Abstract

In the present study we analysed the distribution of soft bottom Sipuncula from San Pedro del Pinatar (western Mediterranean). Field work was carried out from December 2005 to June 2010, sampling with biannual periodicity (June and December). Physical and chemical parameters of the sediment were analysed (granulometry, organic matter content, pH, bottom salinity and shelter availability). Eight different species belonging to five families were identified, with *Aspidosiphon muelleri* being the dominant species (89.43% of the total abundance of sipunculans). Higher sipunculan abundances were correlated with stations of higher percentage of coarse sand, empty mollusc shells and empty tubes of the serpulid polychaete *Ditrupa arietina*, where some of the recorded species live.

Sediment characteristics played the main role driving the sipunculan distribution. Anthropogenic impacts could be affecting indirectly their distribution, changing the sediment characteristics.

3.2—Introduction

The phylum Sipuncula is composed of about 150 species and subspecies (Cutler 1994), all of them exclusively marine benthic organisms. Almost 75% of the sipunculan species are concentrated in shallow waters (< 200 m) and half of them are confined to the upper photic zone of the continental shelf (Murina 1984). The phylum Sipuncula has been overlooked and barely studied for many years. In the Mediterranean Sea, its distribution has been studied thoroughly from the nineties of the last Century (Açik *et al.* 2005; Açik 2007, 2008ab, 2009; Murina *et al.* 1999; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1993a). Most of these studies deal with the eastern Mediterranean and only Saiz-Salinas gives concise information about sipunculans in the western Mediterranean (Saiz-Salinas 1982, 1986,

1993a; Saiz-Salinas & Murina 1982; Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990).

Most sipunculan worms are deposit feeders and many of them live in soft substrata. Soft bottom sipunculans live buried inside the sediment and they obtain a substantial part of their food through the ingestion of surrounding sediment. Some species of sipunculans have been described as important bioturbators in soft sediments, playing a main role in benthic ecosystems (Kędra & Włodarska-Kowalczyk 2008; Murina 1984; Shields & Kędra 2009). It is well known that some of these species found a shelter inside empty shells of certain molluscs or empty polychaete tubes (Açik *et al.* 2005; Gibbs 1985; Murina *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1993a; Schulze 2005; Troncoso & Urgorri 1992; Troncoso *et al.* 2000; Wanninger *et al.* 2005), usually empty tubes of the serpulid *Ditrupa*

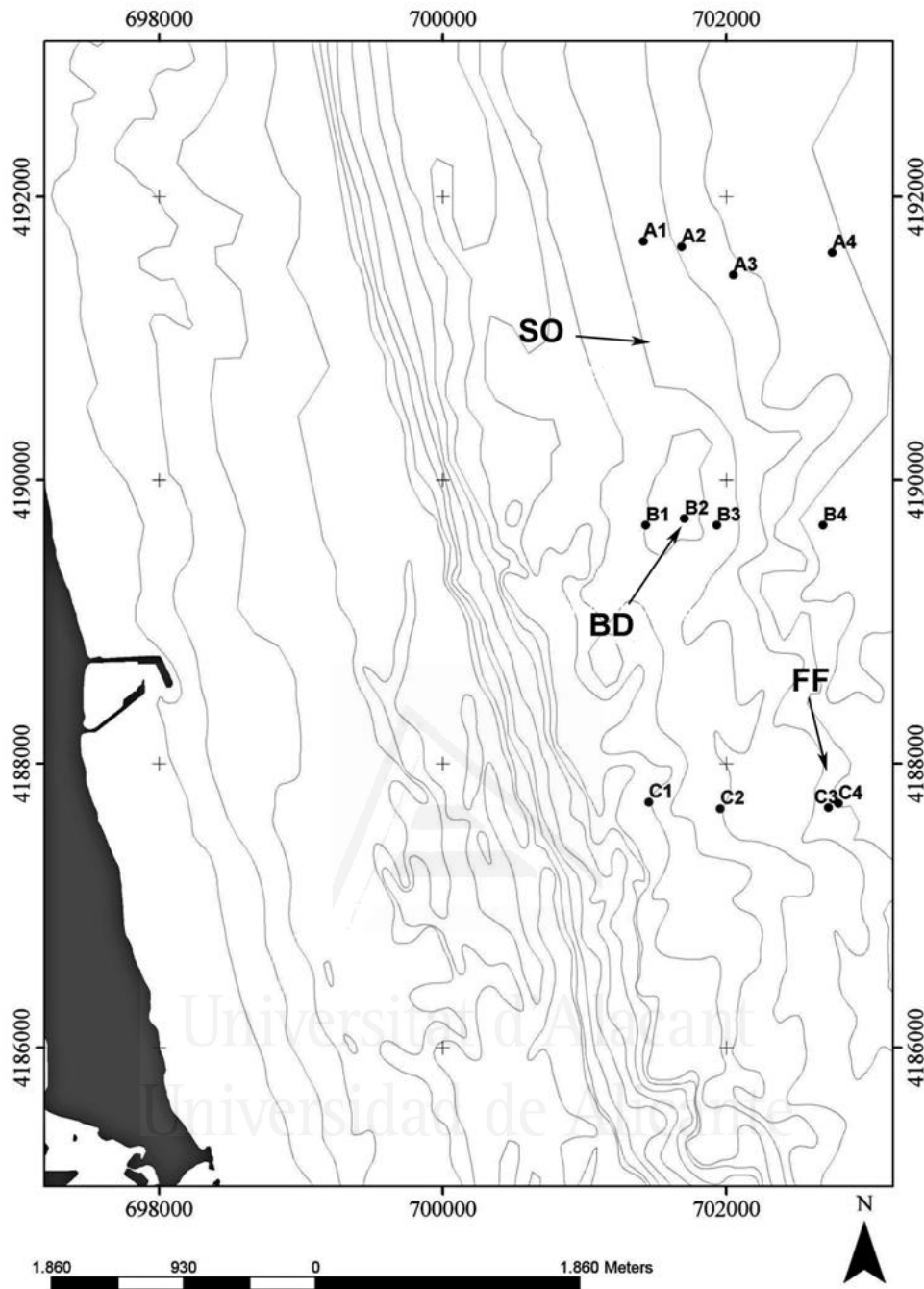


Fig. 3.1. Map of the study area showing the sampling stations. SO=sewage outfall; BD=brine discharge; FF=fish farm cages. (Adapted from Del-Pilar-Ruso *et al.* 2009).

arietina (Morton & Salvador 2009; Solís-Weiss 1982). Those facts promote a strong relation between sipunculans and characteristics of the sediment such as granulometry, pH, organic matter content or shelter availability. However, this relation is poorly understood.

It is assumed that low salinity can limit the geographical distribution of sipunculans,

with a total absence in brackish areas, such as Caspian Sea and Baltic Sea, and a very low species richness in White Sea and Siberian Sea (24 to 27 Psu) (Murina 1984, Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). However there are limited studies about the response of sipunculans to a salinity increase. Some species appears to be osmoconformers (Adolph 1936; Ferraris *et*

al. 1994; Oglesby 1982), but their long-term survival ability within these altered conditions is barely known.

Sediments around fish farm cages have been observed to be organic-enriched at about 1000 m from cages, resulting in the development of reducing and anoxic sediment (Mazzola *et al.* 1999; Sarà *et al.* 2004; Wu & Lam 1994). It is also well known that sewage outfalls, is considered one of the most common anthropogenic disturbances of marine benthic communities (Koop & Hutchings 1996; McIntyre 1995; Pearson & Rosenberg 1978). However, the effect of these disturbances over the soft-bottom sipunculan populations is still unknown.

The aim of this study is to analyse the distribution of sipunculan worms in the studied area and to assess the possible effect of abiotic factors of the sediment or anthropogenic impacts on their distribution.

3.3—Material and methods

3.3.1 Study area and sampling design

The study area is located near to San Pedro del Pinatar coastline (SE Spain, western Mediterranean). Different types of anthropogenic disturbances merge in this area: a sewage outfall, a brine discharge and

fish farm cages. We compared a grid of 12 stations covering the influence area of the three anthropogenic impacts (Fig. 3.1). The sampling was carried out twice a year (June and December) over a five-year period, from December 2005 to June 2010. Three parallel transects were established perpendicularly to the coastline (A, B and C) separated approximately 2 km from each other, and four stations were established along each transect (1, 2, 3 and 4), separated from 250 to 500 m according to depth. The distance between C3 and C4 was shorter due to sampling problems, since soft-sediment could not be found at the initial point for C3 and it had to be relocated. Four replicates for each station were taken using a Van Veen grab, covering a surface area of 0.04 m² for each sample.

The sewage outfall has been in place for decades and produces a flow of 5,000 m³ per day in winter and 20,000 m³ per day in summer, with wastewater secondary treatment (Del-Pilar-Ruso *et al.* 2009). The sewage discharge point is located between stations A1 and B1. The desalination plant began operations on January 2006 with a discharge of 80,000 m³ per day, but on October 2006 the production was doubled (160,000 m³) with the start up of a new plant. The discharge takes place on soft sediment through a shared outfall at 33 m depth, located matching with the B2

Tab. 3.1. Total abundance for each species (rows) and each station (columns). N=total individuals; RA=Relative abundance (%).

	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4	N	RA
<i>Aspidosiphon muelleri</i>	10	7	11	35	9	1	8	42	5	385	138	60	711	89.43
<i>Phascolion caupo</i>	0	0	0	2	0	0	3	1	1	5	21	6	39	4.91
<i>Thysanocardia procera</i>	0	1	2	4	4	0	1	4	0	2	1	3	22	2.77
<i>Onchnesoma steenstrupii steenstrupii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1	5	0.63
<i>Phascolion strombus strombus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3	0.38
<i>Phascolosoma granulatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0.25
<i>Sipunculus nudus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.13
<i>Golfingia vulgaris vulgaris</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.13
Unidentified	0	0	2	1	0	0	1	2	3	0	0	2	11	1.38
N	10	8	17	42	13	1	14	50	10	394	164	72	795	100
RA	1.26	1.00	2.14	5.28	1.64	0.13	1.76	6.29	1.26	49.56	20.63	9.06	100	—

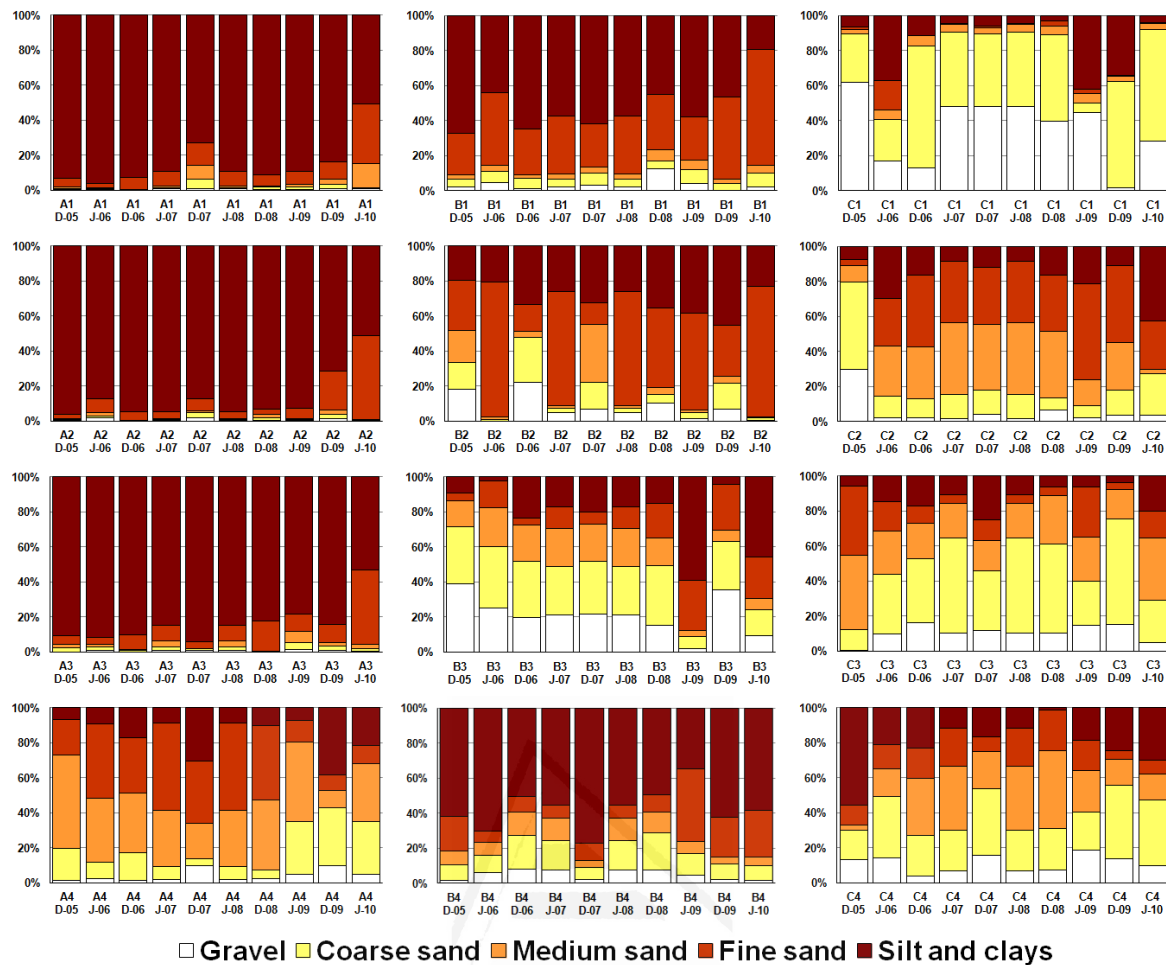


Fig. 3.2. Granulometric characteristics at each station from 2005 to 2010 (June and December).

station. The brine presents a high salinity, ranging between 60–68 ups. On March 2010, a diffuser was connected at the end of the pipeline, which reduced notably the concentration of brine 10 meters away from the discharge point (from 68 to 40 psu; Loya-Fernández *et al.* 2011). A complete description about how the brine plume flows along the sea bottom can be found in Fernández-Torquemada *et al.* (2009). Moreover, a detailed description of the near-field development of the brine discharge can be consulted in Loya-Fernández *et al.* (2012).

The fish farm complex has operated since 1998, with an annual production of 6,197 tons of blue fin tuna (*Thunnus thynnus*), sea bream (*Spaurus aurata*), meagre (*Argyrosomus regius*) and sea bass

(*Dicentrarchus labrax*) (Ruiz *et al.* 2010). Some of the fish farm cages are less than 200 m away from the stations C3 and C4.

3.3.2 Laboratory analysis

Three of the four samples were used for the faunistic analysis and — in June 2010— one of these samples was also used to count the total shelters available in each station. The samples used for the faunistic analysis were sieved through a 0.5 mm mesh screen to separate the macrofauna and fixed in 10% buffered formalin. Later the fauna was preserved in ethanol 70% and sorted in different taxa. Sipunculans were identified to the species level (Cutler 1994) through analysis of their internal and external anatomy using a binocular scope and observing typical structures with taxonomic value, such as presence and shape of hooks

Tab. 3.2. N=number of individuals; TL=trunk length average (mm) (mean±SE); MaxTL=maximum trunk length (mm); MinTL=minimum trunk length (mm); TW=trunk width (mm); Shelter=% individuals inhabiting some kind of shelter (empty shells and empty tubes among others).

	N	TL	MaxTL	MinTL	TW	Shelter (%)
<i>Aspidosiphon muelleri</i>	711	4.95±0.01	22.0	0.5	0.63±0.00	94.16
<i>Phascolion caupo</i>	39	3.29±0.44	12.0	0.5	0.74±0.11	81.82
<i>Thysanocardia procera</i>	22	3.87±0.57	11.0	1.0	0.87±0.13	0.00
<i>Onchnesoma steenstruppi steenstruppi</i>	5	1.50±0.22	2.0	1.0	0.60±0.10	0.00
<i>Phascolion strombus strombus</i>	3	1.50±0.29	2.0	1.0	0.10±0.00	66.67
<i>Phascolosoma granulatum</i>	2	3.00±1.41	4.0	2.0	0.75±0.35	0.00
<i>Sipunculus nudus</i>	1	13.00	—	—	3.00	0.00
<i>Golfingia vulgaris vulgaris</i>	1	1.50	—	—	0.50	0.00

and papillae, using a microscope. Length and thickness of trunk of each specimen were taken.

The fourth sample was used for the sediment characterization (granulometric analysis, pH and amount of organic matter). The pH of the sediment was measured in the surface layer immediately after collection, using a pH-meter Crisom with a sensor 52-00. A sub-sample of 10 g of the shallow layer of the sediment was separated to subsequently obtain the percentage of organic matter. We determined the organic matter content from the sub-samples as weight loss on ignition after 4 hr at 400°C inside the muffle furnace. The granulometric analysis was carried out following the methodology described by Buchanan (1984), sorting the samples in six categories: gravel, coarse sand, medium sand, fine sand and silt and clays. Depth and bottom salinity were recorded using a CTD sensor (RBR-XR-420/620).

Shelter availability was calculated from one of the samples used for the fauna analysis in June 2010. Shelter availability was calculated from three sub-samples by counting the shelters in each sub-sample to calculate average of shelters. Available shelters, capable to be used by sipunculans according to previous observations since 2005, were sorted within three categories according to its shape: spiral shape shells (gastropod shells such as *Turritella sp.*),

cylindrical shape (scaphopod shells and serpulid tubes), and undefined shape (pieces of shell or calcareous debris among others). We also sorted the shelters in three size classes: S1, S2 and S3, corresponding to the length ranges <3.5 mm, 3.5-7.0 mm and >7.0 mm respectively.

3.3.3 Data processing

Univariate and multivariate techniques were used to detect possible changes in the distribution of sipunculan species, and to define its possible relation both with the abiotic factors of the sediment and with the different anthropogenic impacts. Pearson product-moment correlation coefficient (r) was used to detect a possible linear correlation between abundance of sipunculans, species richness and abiotic factors of the sediment (granulometry, pH, organic matter content and salinity). Pearson coefficient was also used to detect a possible linear relation between shelter availability and sipunculan abundance.

Multivariate analysis is considered to be a sensitive tool for detecting changes in the structure of marine faunal community (Clarke & Warwick 1994, Warwick & Clarke 1991, 1994). The multivariate analysis of the data was carried out using the PRIMER-E v.6 statistical package. Sipunculan abundance was used to calculate the triangular similarity matrix, and Bray-Curtis similarity index was used for this purpose. Data were previously square root

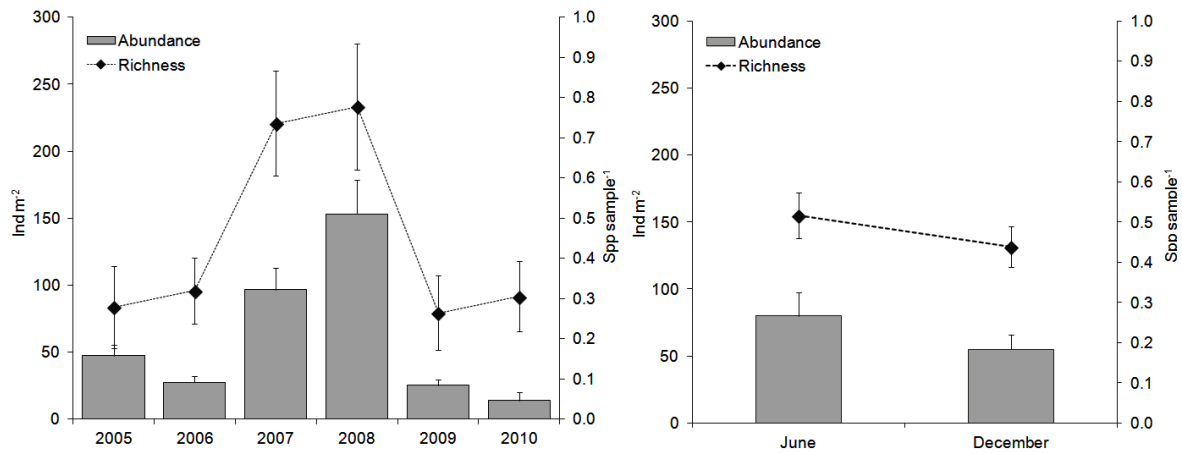


Fig. 3.3. Average Sipuncula abundance and species richness for the different years and sampling seasons.

transformed to weigh the contributions of common and rare species (Clarke & Warwick 1994). From this similarity matrix, non-metric multidimensional scaling techniques (nMDS) and cluster analyses were applied. Stations with a Bray-Curtis similarity index inferior to 50% were grouped, and similarity percentages procedure (SIMPER) was used to determine the relative contribution of each species to the dissimilarity between groups. A possible relation between abiotic factors of the sediment and the distribution of sipunculan populations was tested through the RELATE procedure.

3.4—Results

A total of 360 benthic samples, from December 2005 to June 2010, were collected for the fauna analysis. We analysed 795 specimens, finding 8 different species (Tab. 3.1), belonging to the families: Aspidosiphonidae (*Aspidosiphon muelleri*), Golfingiidae (*Golfingia vulgaris vulgaris* and *Thysanocardia procera*), Phascolionidae (*Onchnesoma steenstrupii steenstrupii*, *Phascolion caupo* and *P. strombus strombus*), Phascolosomatidae (*Phascolosoma granulatum*) and Sipunculidae (*Sipunculus nudus*).

The dominant species was *Aspidosiphon muelleri*, with 711 individuals (Relative

Abundance, RA= 89.43%). Eleven specimens (1.38%) could not be identified due to their small size or state of deterioration. According to the stations, higher abundances were found in C2, C3 and C4, with 49.56%, 20.63% and 9.06% of the total individuals respectively. On the other hand, lower contributions, with less than 2% of the individuals for each station, were recorded in B3 (1.76%), B1 (1.64%), C1 (1.26%), A1 (1.26%), A2 (1.00%) and B2 (0.13%). Four species inhabited empty mollusc shells, empty tubes of *Ditrupa arietina* or other less common shelters (calcareous debris or crevices in chunks of rock) (Tab. 3.2). The remaining species were found bare into the sediment.

With regard to sampling year, the highest sipunculan abundance and species richness were recorded on 2008 (153.29±25.55 ind m⁻² and 0.78±0.16 spp sample⁻¹), whereas the lowest correspond to 2010 (13.74±6.46 ind m⁻² and 0.31±0.09 spp sample⁻¹) (Fig. 3.3). Although differences were not significant (One-way ANOVA; N=180), sipunculan abundance and species richness were higher in June (79.93±17.59 ind m⁻² and 0.52±0.06 spp sample⁻¹) than in December (55.03±11.08 ind m⁻² and 0.44±0.05 spp sample⁻¹).

The granulometry of the sediment was heterogeneous among the different sites

studied (Fig. 3.2). High levels of silt and clays were detected at the stations close to the sewage discharge (A1, A2, A3 and B1). Despite the variation among different seasons and years, higher values of organic matter content were usually found in these stations.

In the southern stations (C1, C2, C3 and C4), the granulometric analysis showed lower values of the finest fraction, and a more equitable distribution of the grain size, with higher values of gravel and sand,

and decrease of silt and clays. A similar granulometric pattern was observed in B2, the brine discharge point. The bottom salinity records showed how the station B2 and, to a lesser extent B1 and B3, were affected by the brine discharge (Tab. 3.3), reaching maximum salinity values of 52.9 psu (Jun. 2008; B2). While the desalination plant was working (Dec. 2006 – Jun. 2010) the average salinities in B1, B2 and B3 were 38.4 ± 0.5 psu (mean \pm SE), 44.6 ± 1.5 psu and 43.2 ± 0.9 psu respectively, values over the

Tab. 3.3. Sampling data for the different stations. S&D=Station and depth; Y=Year; M=Month; OM=% Organic matter; BS=Bottom salinity (Psu)

S&D	Y	M	OM	pH	BS	S&D	Y	M	OM	pH	BS	S&D	Y	M	OM	pH	BS
A1	2005	Dec	9.10	6.98	37.5	B1	2005	Dec	18.43	7.29	37.5	C1	2005	Dec	4.94	7.5	38.0
33.5 m	2006	Jun	13.13	7.51	38.0	32.8 m	2006	Jun	11.06	7.29	38.0	32.6 m	2006	Jun	4.93	6.8	38.0
	2006	Dec	3.19	7.69	37.5		2006	Dec	2.98	7.88	37.5		2006	Dec	1.28	7.9	38.0
	2007	Jun	4.58	7.46	38.0		2007	Jun	8.95	7.43	37.5		2007	Jun	3.37	7.7	37.0
	2007	Dec	2.13	7.38	37.2		2007	Dec	2.27	7.76	37.2		2007	Dec	1.92	7.8	37.6
	2008	Jun	5.11	7.75	37.6		2008	Jun	7.80	7.80	38.1		2008	Jun	1.29	7.8	37.9
	2008	Dec	6.48	7.79	37.6		2008	Dec	4.39	7.65	38.3		2008	Dec	2.18	7.9	37.7
	2009	Jun	5.2	7.38	37.4		2009	Jun	2.16	7.27	39.4		2009	Jun	1.99	7.4	37.4
	2009	Dec	5.00	7.62	37.8		2009	Dec	3.23	7.39	41.6		2009	Dec	1.69	7.6	37.7
	2010	Jun	7.59	7.13	37.9		2010	Jun	8.38	7.19	37.7		2010	Jun	2.30	7.5	37.5
A2	2005	Dec	12.61	6.80	37.5	B2	2005	Dec	9.15	7.47	37.5	C2	2005	Dec	4.81	7.3	38.0
34.1 m	2006	Jun	7.35	7.54	37.5	33.6 m	2006	Jun	3.82	7.47	42.0	33.4 m	2006	Jun	9.67	7.4	37.5
	2006	Dec	3.52	7.71	37.5		2006	Dec	1.85	7.35	39.0		2006	Dec	1.77	7.7	38.0
	2007	Jun	13.23	7.39	37.0		2007	Jun	4.54	7.20	45.0		2007	Jun	1.27	7.8	37.0
	2007	Dec	3.52	7.59	37.2		2007	Dec	1.55	7.80	46.0		2007	Dec	1.79	7.6	37.6
	2008	Jun	10.58	7.66	37.2		2008	Jun	3.60	7.83	52.9		2008	Jun	1.84	7.7	37.7
	2008	Dec	5.46	7.66	37.4		2008	Dec	1.92	7.70	44.4		2008	Dec	1.92	7.8	37.7
	2009	Jun	5.92	7.22	37.3		2009	Jun	4.99	7.55	45.1		2009	Jun	1.01	7.7	37.4
	2009	Dec	4.26	7.46	37.8		2009	Dec	2.46	7.42	48.1		2009	Dec	1.54	7.7	37.7
	2010	Jun	8.20	7.14	37.8		2010	Jun	4.68	7.19	38.4		2010	Jun	2.86	7.6	37.6
A3	2005	Dec	6.47	7.04	37.5	B3	2005	Dec	3.91	7.12	37.5	C3	2005	Dec	1.89	7.4	38.0
35.6 m	2006	Jun	15.85	7.04	37.5	33.7 m	2006	Jun	14.50	7.63	50.0	34.9 m	2006	Jun	9.05	7.5	38.0
	2006	Dec	3.62	7.82	38.0		2006	Dec	1.62	7.65	41.5		2006	Dec	1.89	7.8	37.5
	2007	Jun	13.27	7.48	37.0		2007	Jun	2.56	7.52	42.0		2007	Jun	4.66	7.4	37.0
	2007	Dec	3.48	7.48	36.8		2007	Dec	1.99	7.45	41.4		2007	Dec	1.66	7.8	37.6
	2008	Jun	10.04	7.73	37.5		2008	Jun	2.37	7.60	47.5		2008	Jun	4.27	7.7	37.8
	2008	Dec	4.41	7.89	37.4		2008	Dec	1.62	7.80	43.1		2008	Dec	1.62	7.8	37.6
	2009	Jun	4.56	7.43	37.4		2009	Jun	1.55	7.40	41.3		2009	Jun	2.00	7.7	37.5
	2009	Dec	4.23	7.44	37.6		2009	Dec	2.15	7.77	43.4		2009	Dec	2.80	7.7	37.6
	2010	Jun	5.05	7.19	37.7		2010	Jun	4.70	7.23	38.2		2010	Jun	2.80	7.2	37.7
A4	2005	Dec	2.55	7.34	37.5	B4	2005	Dec	6.61	7.06	37.5	C4	2005	Dec	14.14	7.3	38.0
36.8 m	2006	Jun	6.97	7.70	37.5	37.2 m	2006	Jun	19.96	7.86	38.5	35.6 m	2006	Jun	6.59	7.6	37.5
	2006	Dec	1.72	7.85	37.5		2006	Dec	2.16	7.74	38.0		2006	Dec	1.87	7.8	37.5
	2007	Jun	1.41	7.80	37.0		2007	Jun	3.48	7.43	37.5		2007	Jun	2.95	7.5	37.0
	2007	Dec	3.29	7.84	36.8		2007	Dec	2.34	7.38	38.8		2007	Dec	1.29	7.7	37.6
	2008	Jun	0.98	7.77	37.8		2008	Jun	4.50	7.71	37.6		2008	Jun	3.41	7.7	37.7
	2008	Dec	2.26	7.71	37.5		2008	Dec	4.69	7.82	37.9		2008	Dec	1.60	7.7	37.6
	2009	Jun	0.95	7.83	37.4		2009	Jun	6.76	7.42	37.5		2009	Jun	2.45	7.6	37.4
	2009	Dec	3.09	7.71	38.7		2009	Dec	3.96	7.74	37.8		2009	Dec	1.94	7.5	37.8
	2010	Jun	4.82	7.28	38.1		2010	Jun	7.79	7.12	38.0		2010	Jun	3.42	7.5	37.8

Tab. 3.4. Pearson correlation coefficient (r) of the most abundant species vs. sediment characteristics. OM=%organic matter; D=depth; S=salinity; G=% gravel; CS=% coarse sand; MS=% medium sand; FS=% fine sand; SC=% silt and clays.

	OM	pH	D	S	G	CS	MS	FS	SC
<i>Aspidosiphon muelleri</i>	-0.200*	0.192*	-0.030	-0.131	-0.120	0.041	0.497***	0.170	-0.287***
<i>Phascolion caupo</i>	-0.100	0.054	-0.025	-0.057	0.012	0.262**	0.280***	-0.041	-0.245**
<i>Thysanocardia procera</i>	-0.071	0.127	0.214*	-0.116	-0.07	-0.039	-0.053	0.027	0.054

*($P<0.05$); **($P<0.01$); ***($P<0.001$).

Tab. 3.5. Pearson correlation coefficient (r) of the most abundant species vs. sediment characteristics. OM=%organic matter; D=depth; S=salinity; G=% gravel; CS=% coarse sand; MS=% medium sand; FS=% fine sand; SC=% silt and clays.

	Cylindrical shape			Spiral shape			Undefined shape		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
<i>A. muelleri muelleri</i>	0.593***	0.844***	0.802***	-0.042	-0.308	-0.268	-0.150	0.086	—

***($P<0.001$)

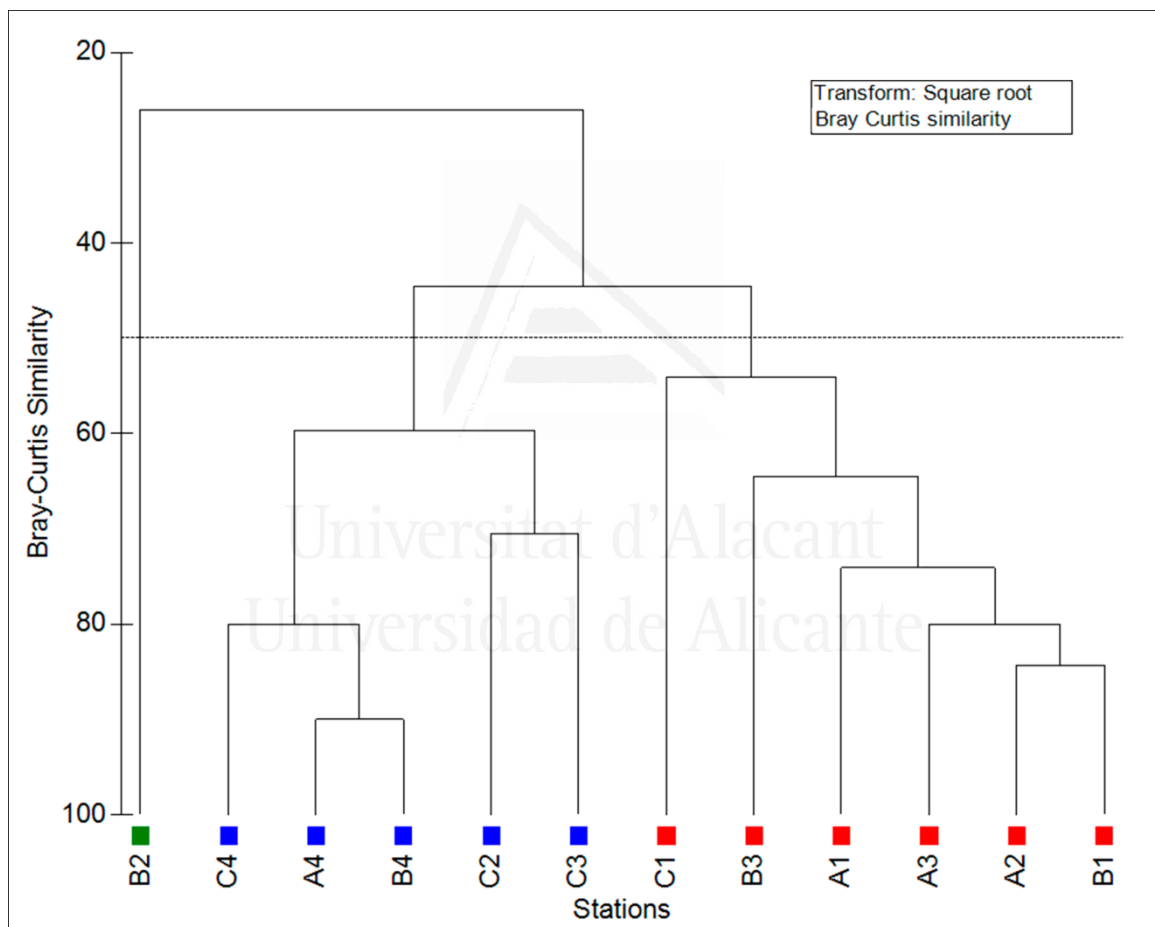


Fig. 3.4. Cluster using Bray-Curtis similarity indices from square root of average abundances of sipunculan species from 2005 to 2010. Stations with a Bray-Curtis similarity index higher than 50% were grouped.

natural salinity average of the environment.

Pearson’s correlation coefficient was used to analyse the correlation between the three most abundant species and several characteristics of the sediment (Tab. 3.4).

The number of specimens of the remaining species was too low (< 20 individuals) to evaluate a possible correlation. *Aspidosiphon muelleri* was positively correlated with the percentage of medium sands (PEARSON; $r=0.497$; $P=0.000$) and

pH (PEARSON; $r=0.192$; $P=0.018$), whereas it was negatively correlated with the percentage of organic matter (PEARSON; $r=-0.200$; $P=0.014$) and the percentage of silt and clays (PEARSON; $r=-0.287$; $P=0.001$). *Aspidosiphon muelleri* was also correlated to the shelter availability, showing a strong positive correlation with the three different sizes corresponding with the cylindrical shape (Tab. 3.5). *Phascolion caupo* showed a positive correlation, with the percentage of coarse sand (PEARSON; $r=0.262$; $P<0.01$) and the percentage of medium sand (PEARSON; $r=0.280$; $P<0.01$). *Thysanocardia procera* only showed significant correlation with the depth (PEARSON; $r=0.214$; $P<0.05$).

Stations with a Bray-Curtis similarity index over 50% were grouped (Fig. 3.4). The first group only consists of the B2 station (Fig. 3.5), which matches with the brine discharge point. The second group marked

(group 2) is made up of the closest stations to the sewage outfall; A1, A2, A3 and B1 (the muddiest stations, with a higher fraction of silt and clays) together with the stations B3 and C1. Group 3 is made up of the stations nearby to the fish farms cages (C2, C3 and C4) and the stations A4, and B4. In addition, these three stations of the transect-C also have the highest percentages in coarser fractions of the sediment. The ANOSIM test yielded significant differences between abundances of the sipunculan species from groups 2 and 3 ($P<0.01$).

The SIMPER analysis shows the contribution of sipunculan species to the similarity of each of the three groups formed from the CLUSTER analysis and to the dissimilarity between them (Tab. 3.6). When testing for a relation between abiotic factors of the sediment and the distribution of sipunculan populations RELATE procedure yielded significant differences for

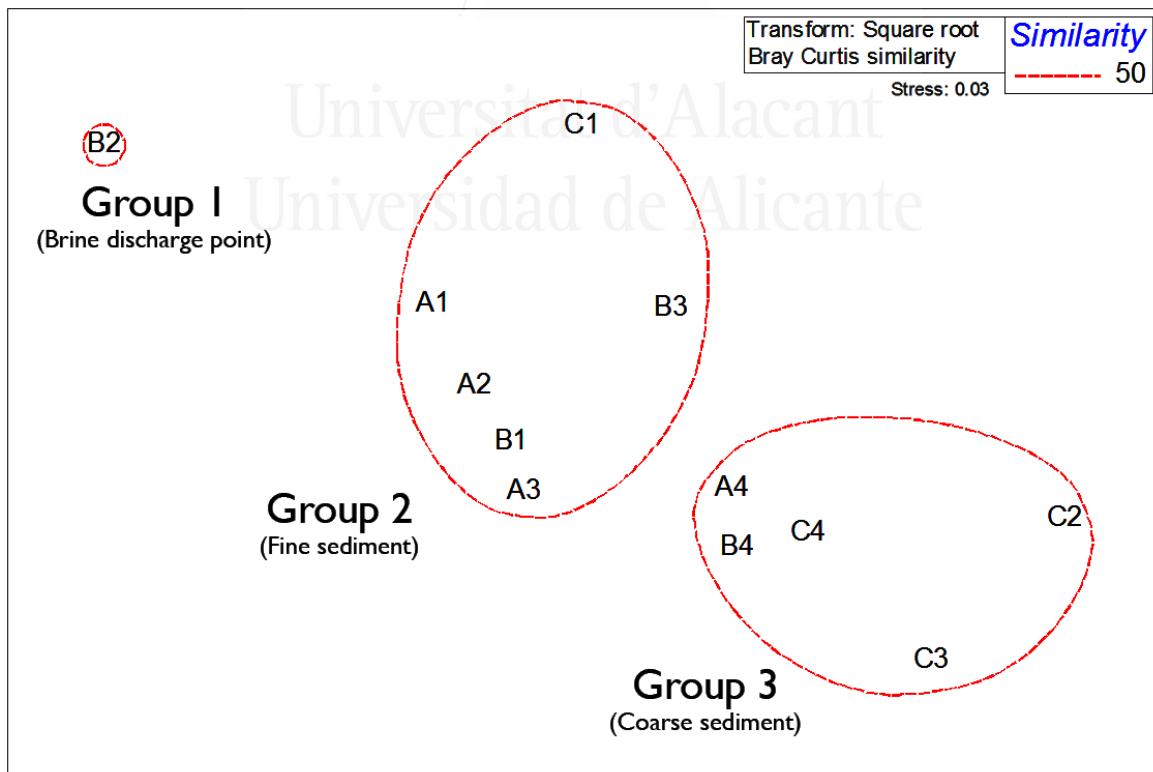


Fig. 3.5. MDS plot using Bray-Curtis similarity indices from square root of average abundances of sipunculan species from 2005 to 2010. Stations with a Bray-Curtis similarity index higher than 50% were grouped.

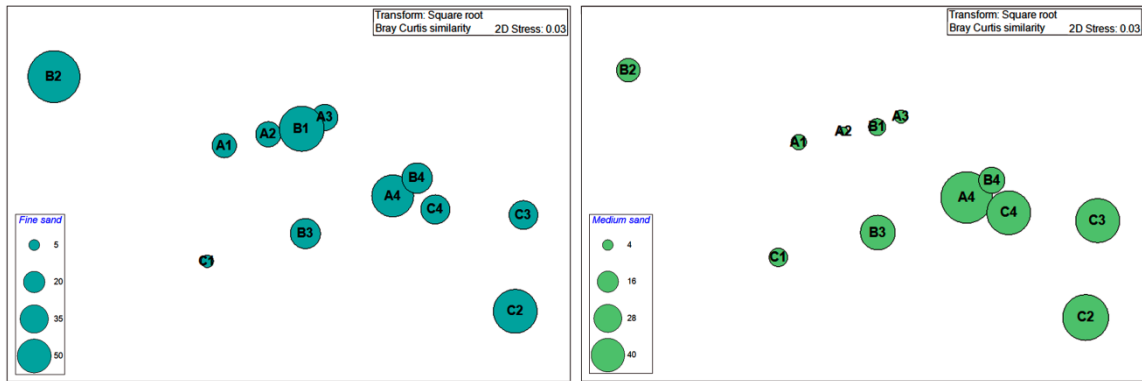


Fig. 3.6. MDS and bubble plots for fine and medium sand content. Using Bray-Curtis similarity indices from square root of average abundances of sipunculan species from 2005 to 2010.

medium sand and fine sand percentages (Tab. 3.7; Fig. 3.6).

3.5—Discussion

The Sipuncula have a worldwide distribution, inhabiting different habitats from shallow waters to the abyssal zone (Cutler 1965, 1977; Murina 1984). However, the sensibility of the phylum to environmental changes has barely been investigated and it is poorly understood, perhaps because there is a lack of specialists in sipunculan taxonomy throughout the world (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999) and their abundances are usually low, although in some occasions they can become dominant species (Klaoudatos *et al.* 2006, Solís-Weiss 1982). *Aspidosiphon muelleri* was the prevalent species at the studied sites. It was mainly found dwelling empty shells or tubes, and the shelter was rarely shared with another individual or another kind of organism, such as tanaids, bivalves or polychaetes. This behaviour had already been described (Gage 1968; Murina 1984; Solís-Weiss 1982). In our case, the shared shelter had always a cylindrical shape (almost always *Ditrupa arietina* tubes).

The Pearson correlation coefficient shows some correlation between sediment characteristics and abundance of sipunculan worms. An inverse correlation

between *A. muelleri*, *Phascolion caupo* and the content of fine sediment was detected. It was described by Solís-Weiss (1982) how the abundance of *A. muelleri* can decrease in muddy sediments. These two species also have a good positive correlation with the medium grain size sand. The strongest correlation was established to the availability of shelters with cylindrical shape, particularly with the size classes S2 and S3 (PEARSON; both $P < 0.001$), and there was no correlation with spiral shells. Probably the reason is that spiral shells, usually species from the genus *Turritella*, were found in abundance in the muddy stations. These merged factors make it difficult to be conclusive establishing a relation between abundance of sipunculans and shelter availability. However, on the basis of the occupancy rate of this resource by some sipunculans (Tab. 3.2), shelter availability appears to play a main role on the distribution of species dwelling these shells or tubes. On the other hand, species that usually do not inhabit empty shells, such as *Thysanocardia procera*, did not show any trend toward muddy sediments or toward a particular grain size. *Thysanocardia procera* has been recorded in different types of sediment and several different habitats, even parasiting the polychaete *Aphrodite aculeata* (Stephen & Edmonds 1972 In Saiz-Salinas 1993a).

The group II formed in the MDS includes the stations nearest to the sewage outfall (A1, A2, A3 and B1) and, a little more distant in the plot, the stations C1 and B3. These stations are characterized by their high sedimentation load and their muddy bottom, resulting in a decline in abundance of *Aspidosiphon muelleri*.

There are limited studies about the response of sipunculans to a salinity increase (Oglesby 1982), and lack of information about the effect that could have a sudden fluctuation in salinity, temporary or constant, over the survival of these animals and their behaviour.

Some species studied seem to be osmoconformers, with limited power of ion regulation, during an event of salinity change. (Adolph 1936; Chew *et al.* 1994; Ferraris *et al.* 1994; Oglesby 1982). Anyway, these studies are limited to few particular species and do not explain how a salinity change could influence over their behaviour or their long-term survival ability within these altered conditions. Only *Phascolosoma arcuatum* (Gray 1828) has been described as an active ion regulator with good response and resistance to sudden fluctuations in salinity (Chew *et al.* 1994), making it capable of survival in

Tab. 3.6. Summary of results from the SIMPER analysis. Species contributing to the similarity between different groups (90% cut-off). Av. Abund.=average abundance (ind m⁻²); Contrib.=percentage of contribution to the similarity; Cum.=percentage of cumulative contribution. AS=average similarity; AD=average dissimilarity.

	Av. Abund.		Av. Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%	
	Group 2	Group 3					
Group 1							
Less than 2 samples							
Group 2. AS=66.35							
<i>A. muelleri</i>	2.86		56.85	5.30	85.68	85.68	
<i>T. procera</i>	0.90		8.27	0.77	12.46	98.14	
Group 3. AS=67.89							
<i>A. muelleri</i>		10.30	46.07	5.33	67.86	67.86	
<i>T. procera</i>		1.63	9.79	1.89	14.42	82.28	
<i>P. caupo</i>		2.34	9.77	3.50	14.39	96.67	
Av. Abundance							
	Group 1	Group 2	Group 3	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
Groups 2 & 3 AD=55.42							
<i>A. muelleri</i>		2.86	10.30	33.11	2.56	59.74	59.74
<i>P. caupo</i>		0.46	2.34	9.44	1.73	17.04	76.78
<i>T. procera</i>		0.90	1.63	5.14	1.08	9.27	86.05
<i>P. strombus strombus</i>	0.00	0.60	2.80	1.08	5.05	91.10	
Groups 2 & 1. AD=63.53							
<i>A. muelleri</i>	1.00	2.86		33.82	3.29	53.23	53.23
<i>T. procera</i>	0.00	0.90		14.85	1.13	23.37	76.60
<i>P. caupo</i>	0.00	0.46		7.00	0.64	11.02	87.62
<i>P. granulatum</i>	0.00	0.17		3.18	0.41	5.01	92.63
Groups 3 & 1. AD=86.35							
<i>A. muelleri</i>	1.00		10.30	53.13	5.30	61.53	61.53
<i>P. caupo</i>	0.00		2.34	14.05	2.45	16.27	77.81
<i>T. procera</i>	0.00		1.63	11.87	1.77	13.75	91.55

Tab. 3.7. Summary of the RELATE results between similarity matrix of sipunculan abundances and the different abiotic factors.

	Rho	Significance level
Organic matter	0.068	0.259
pH	0.165	0.155
Eh	0.022	0.386
Depth	0.144	0.160
Bottom salinity	0.187	0.186
Gravel	0.193	0.167
Coarse sand	0.234	0.072
Medium sand	0.336	0.016
Fine sand	0.321	0.044
Silt and Clays	0.109	0.185

mangrove with freshwater inputs.

The nMDS separate the B2 station (the brine discharge point) far away from each other. Although we did not find any sipunculan into discharge area until 2010, after the diffuser was installed and the salinity concentrations near the discharge point dropped drastically, direct relation with the brine discharge is difficult to establish. Salinity could be affecting sipunculans assemblage but the absence of individuals at the discharge point before the implementation of the desalination plant, and the heterogeneity of the bottoms studied do not allow results to be conclusive. In addition, only one sipunculan appeared in June 2010, and its presence can be considered anecdotic. Although It is known from its distribution that sipunculans appear to require fully saline water and they are not found in brackish waters (Cutler 1994), additional studies are necessary, including field and laboratory experiments, to determine accurately the effect that salinity fluctuations could have on the sipunculan distribution.

The group III established by the nMDS procedure (stations C2, C3 and C4) is

characterized by its higher sipunculan abundance. These three stations are the closest to fish cages. A decrease in abundance of *Aspidosiphon muelleri* from fish farm bottoms has been reported (Klaoudatos *et al.* 2006) but muddy sites in fish farms are more likely to be identified as impacted, than coarse sediment ones (Papageorgiou *et al.* 2010). Stations C2, C3 and C4 are distinguished by their low percentage of silt and clays and high percentages of medium sand, which was the fraction best correlated with *A. muelleri* abundance. Also, this area presented the highest amount of scaphopod shells and *Ditrupa arietina* tubes.

The main factor explaining the distribution of sipunculans in San Pedro del Pinatar seems to be the abiotic characteristics of the bottom, especially the granulometry of the sediment and the presence of shells and tubes. It seems that anthropogenic impacts could be affecting indirectly by changing the sediment characteristics, as it is the probable case of sewage discharge that is increasing the silts and clays fraction of the closest stations.



4. Distribution of Sipuncula in the Gulf of Valencia and Cape Nao (western Mediterranean)

Photo: *Thysanocardia procera* (Möbius 1875)



Published as:

FERRERO-VICENTE, L.M., DE-LA-OSSA-CARRETERO, J.A., DEL-PILAR-RUSO, Y. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2013) Distribution of Sipuncula in the Gulf of Valencia and Cape Nao (western Mediterranean). *Zootaxa*, 3646 (3): 235–250.

4. Distribution of Sipuncula in the Gulf of Valencia and Cape Nao (western Mediterranean)

4.1—Abstract

The present study analyses the distribution and diversity of sipunculan species inhabiting soft substrata in the Gulf of Valencia and Cape Nao (western Mediterranean) in relation to the characteristics of the sediment. Eighty-seven stations in 14 localities were sampled annually from 2004 to 2008. Nine species were reported, with *Aspidosiphon muelleri* being the dominant species in the area and *Thysanocardia procera* the most widely distributed. Pearson correlation coefficient and multivariate analysis showed how sipunculan abundances of certain species were related to the sediment characteristics, especially grain size. The shell-dwelling species *A. muelleri* and *Phascolion caupo* were dominant in stations with high amount of coarse sand and gravel, while *Sipunculus (Sipunculus) nudus* appeared in stations dominated by fine sand with low organic content. *Phascolion caupo* and *T. procera* were reported for the first time in the study area. Moreover, it was the second record of *P. caupo* for the Mediterranean Sea.

4.2—Introduction

The Sipuncula is a small group of marine worms represented by 36 species in the Mediterranean Sea (Ferrero-Vicente *et al.* 2012). Traditionally, Mediterranean Sipuncula have aroused little interest and have been barely studied (Ferrero-Vicente *et al.* 2011; Kędra & Włodarska-Kowalczyk 2008, Murina *et al.* 1999). There has been much debate about the origin of the group and their taxonomic status, and some authors suggest including this taxonomic group within the phylum Annelida based on recent genetic studies (Dordel *et al.* 2010; Kristof *et al.* 2008, 2011; Shen *et al.* 2009; Struck *et al.* 2007, 2011). Moreover, genetic techniques seem to lead to a new classification for the sipunculan families (Kawauchi *et al.* 2012). However, sipunculan ecology has been scarcely studied and is little known. Due to the lack of taxonomic specialists on this group, species distributions are poorly understood

(Kędra & Włodarska-Kowalczyk 2008; Murina *et al.* 1999). This study delves into these aspects focusing on sipunculans inhabiting soft substrata in the shallow continental shelf of the Gulf of Valencia and Cape Nao (Spanish Mediterranean). There is hardly any previous information about sipunculan species living in this area although detailed studies have been conducted in nearby areas (Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2012), and, in a wider range, about sipunculans from Spanish coastal areas (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas, 1982, 1986, 1993a; Saiz-Salinas & Murina, 1982; Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi, 1988, 1990). In addition to this information, few isolated records can only be found, since species level for this phylum is seldom reached in general studies of macrobenthic fauna (Kędra & Murina, 2007).

Ten species of Sipuncula are known for the study area; *Aspidosiphon misakiensis*, *A.*

muelleri, *Golfingia elongata*, *G. vulgaris vulgaris*, *Onchnesoma steenstrupii steenstrupii*, *Phascolion tuberosum*, *P. strombus strombus*, *Phascolosoma granulatum*, *Pm. stephensoni* and *Sipunculus nudus* (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1986; Saiz-Salinas & Murina 1982). Moreover, nine different species have been described in previous studies close to this area, with *A. muelleri* being the most abundant species (89.06% of the total individuals). Distribution of certain species seems to be related to sediment characteristics and shelter availability in the case of the shell-dwelling species *A. muelleri*, *P. strombus strombus* and *P. caupo* (Ferrero-Vicente *et al.* 2011, Hylleberg 1975).

The aim of the present study is: (1) describing the distribution, diversity and abundance of sipunculan species from the Gulf of Valencia and Cape Nao; and (2) assessing environmental factors explaining this distribution.

4.3—Material and methods

4.3.1 Study area and sampling design

Sedimentary bottoms are the most extended benthic habitat in the Mediterranean Sea (Hofrichter 2002). The Gulf of Valencia expands from Ebro delta (40°42.30'N; 38°43.9'E) to Cape Nao (38°43.92'N; 0°14.09'E), covering a coastline of about 400 km (Fig. 4.1), mainly dominated by sandy sediment of diverse grain size and different organic matter load (Blázquez *et al.* 1996, De-la-Ossa-Carretero *et al.* 2010, Del-Pilar-Ruso *et al.* 2011). A total of 87 stations in 14 localities were sampled annually from 2004 to 2008 during the summer months of each year (supplementary data). The depth of the stations ranged between 12.1 and 30.2 meters. A Van Veen grab with a surface area

of 0.04 m² was used; this method is suitable to sampling small macrobenthic organisms with low mobility (Kingsford & Battershill, 1998) like sipunculan worms. Three replicates were taken at each station to characterise the macrofauna associated with the sediment (1302 total samples) and one additional sample was taken to analyse the sediment, yielding a total amount of 1736 samples.

4.3.2 Laboratory analysis

Samples used to characterise the faunal composition were sieved through a 0.5 mm mesh screen to separate the macrofauna and subsequently fixed in 10% buffered formalin. Afterwards, the fauna was preserved in 70% ethanol and sorted in different taxa. The additional sample used to characterise the sediment was sieved into the following five categories: gravel (>2.0

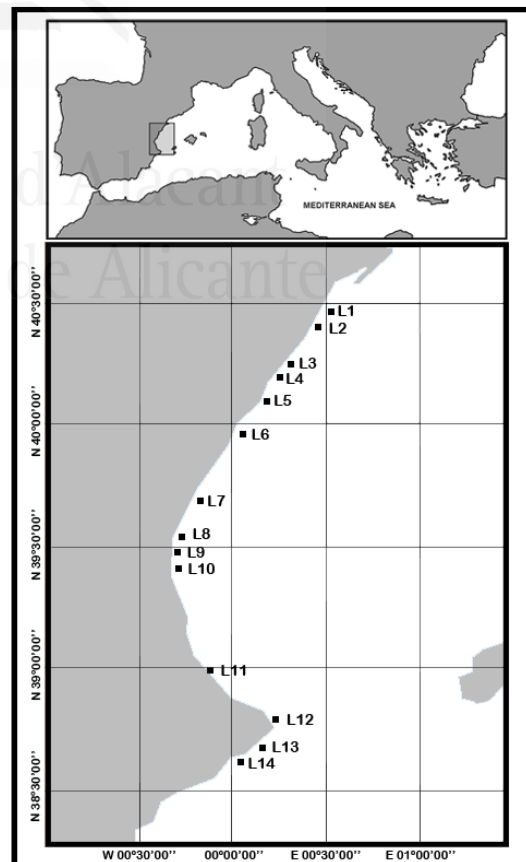


Fig. 4.1. Map showing the studied area and the different sampling localities.

mm), coarse sand (0.5–2.0 mm), medium sand (0.25–0.50 mm), fine sand (0.063–0.250 mm) and silt and clays (<0.063 mm) (Buchanan, 1984). Organic matter was determined from subsamples of 10 g dry weight as loss on ignition after 4 hrs at 500°C. Redox potential (Eh), pH and depth were also recorded for each station. A portable probe was used to measure Eh and pH in the surface layer of the sediment immediately after collection at the sea.

4.3.3 Species identification

Sipunculans were identified to the species level through analysis of their internal and external anatomy observing typical structures with taxonomic value (Cutler, 1994). Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999 reported the subspecies *Aspidosiphon muelleri kovalevskii* and *A. muelleri muelleri*. These subspecies were synonymised by Cutler & Cutler (1989), and distinguishing them is a complicated and imprecise process, since the main differentiating characteristics between them are not clearly recognisable and show variability between different populations. We could not find a clear distinction between different morphotypes, as described in Açıık *et al.* (2005). Following the taxonomy suggested by Cutler in 1994, we consider them as cospecific and we treat them together under the nomenclature *A.*

muelleri.

4.3.4 Statistical analysis

Univariate techniques were used to analyse the distribution of sipunculan species and to define their relation to abiotic factors of the sediment. Relative abundance (RA) of each species was calculated. Soyer's (1970) Frequency Index (F) was used to determine the species frequency in the study area and results were evaluated as constant ($F \geq 50\%$), common ($50\% > F \geq 25\%$) and rare ($F < 25\%$). Pearson product-moment correlation coefficient (r) was used to detect a possible linear correlation between most abundant sipunculan species (only species with $N > 15$) and abiotic factors of the sediment (granulometry, pH, Eh, organic matter and depth). The Bonferroni correction was applied to decrease the probability of committing type I error (Dunn 1961).

Multivariate analysis is considered a sensitive tool for detecting changes in the structure of marine faunal community (Clarke & Warwick 1994, Warwick & Clarke 1991, 1994). These techniques were mainly used to assess the influence of abiotic factors on the distribution of the different species and were carried out using the PRIMER-E v.6 statistical package. Abundance of sipunculan species was used to calculate the triangular similarity matrix;

Tab. 4.1. Abundance of sipunculan species for each sampling locality. RA=Relative abundance (%); F=Frequency of occurrence (%); T=Total individuals.

	RA	F	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	T
<i>A. muelleri</i>	74.07	11.83	8	2	2	0	13	312	0	112	62	177	0	10	16	6	720
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	1.65	0.84	0	0	1	0	0	8	1	1	0	2	0	0	3	0	16
<i>O. steenstrupii steenstrupii</i>	0.10	0.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. caupo</i>	10.60	5.07	4	1	0	0	1	39	9	21	20	5	0	2	0	1	103
<i>P. strombus strombus</i>	3.19	1.15	0	4	0	0	1	19	0	5	1	1	0	0	0	0	31
<i>P. tuberculosis</i>	1.03	0.61	0	0	0	0	0	2	0	4	4	0	0	0	0	0	10
<i>Pm. granulatum</i>	0.21	0.15	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>S. nudus</i>	4.73	2.76	4	1	11	23	2	0	2	0	0	0	0	3	0	0	46
<i>T. procera</i>	4.32	3.07	9	0	2	2	3	2	4	3	2	3	5	4	2	1	42
Unidentified	0.10	0.08	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
T			25	8	16	25	20	383	16	147	90	188	5	20	21	8	972

due to the lack of sipunculans from some stations, preventing us to use the Bray-Curtis similarity index, Euclidean distance was the coefficient chosen for this purpose. Data were previously $\text{Log}(X+1)$ transformed to weigh the contributions of common and rare species. It is known that $\text{Log}(X+1)$ for small abundances produces a less severe transformation than 4th root (Clarke & Warwick 1994). From this similarity matrix, nonmetric multidimensional scaling techniques (nMDS) were applied, and CLUSTER analysis was used to establish the main groups regarding their similarity; stations with a Euclidean distance lower than 4 were grouped. Similarity percentages procedure (SIMPER) was used to determine the percentage contribution of each species to the dissimilarity between different clusters from the similarity matrix. A possible relation between abiotic factors of the sediment and the distribution of the sipunculan species was also tested through the RELATE procedure. Finally, analysis of similarities test (ANOSIM) was carried out to detect possible variations in the distribution of sipunculan species between different years and localities.

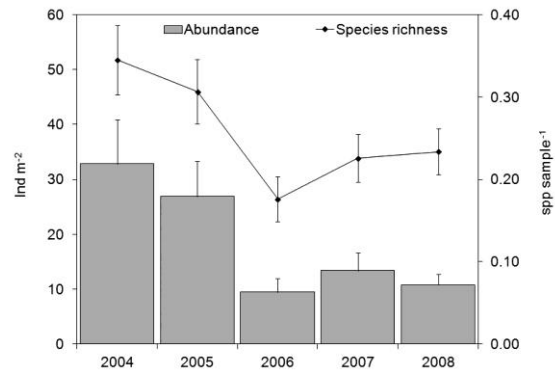


Fig. 4.2. Average abundance of sipunculans (mean±SE) and average species richness (spp sample⁻¹) for each sampling year.

4.4—Results

A total of 972 specimens were recorded, giving an average density of 18.66 ± 2.24 ind m⁻² (mean±SE). One specimen could not be identified due to its state of deterioration. Specimens identified revealed 4 different families: (Sipunculidae, Golfingiidae, Phascolionidae and Aspidosiphonidae), 7 genera and 9 species (Tab. 4.1): *Aspidosiphon muelleri*; *Golfingia vulgaris vulgaris*; *Onchnesoma steenstrupii steenstrupii*; *Phascolion caupo*; *P. strombus strombus*; *P. tuberculosum*; *Phascolosoma granulatum*; *Sipunculus nudus* and *Thysanocardia procera*. According to Soyer's (1970) frequency index

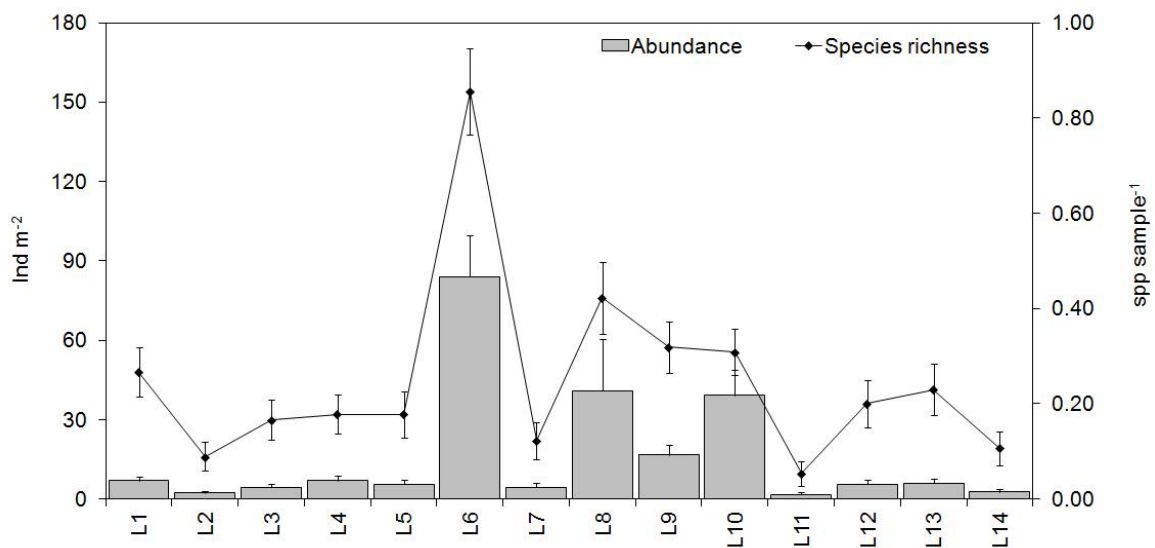


Fig. 4.3. Average abundance of sipunculans (mean±SE) and species richness (spp sample⁻¹) for each locality.

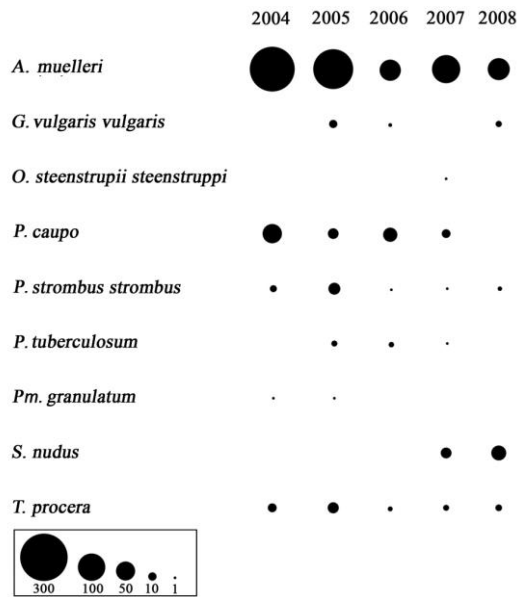


Fig. 4.4. Abundance of sipunculan species (total individuals) for each year of sampling.

(F), all the sipunculan species recorded in this study were categorised as Rare ($F < 25\%$). *Aspidosiphon muelleri* was the dominant species (13.78 ± 3.93 ind m^{-2} , maximum density of 1675 ind m^{-2} in L8/2004) and *O. steenstrupii steenstrupii* was the least common species, with only one specimen collected. The highest abundance of sipunculans was in the year 2004 (339 specimens; 32.85 ± 8.40 ind m^{-2}) (Fig. 4.2). By contrast, 2006 was the year with the lowest abundance (99 specimens; 9.48 ± 2.44 ind m^{-2}). Regarding different localities (Tab. 4.1; Fig. 4.3), the highest abundance and species richness correspond to the locality L6 (84.09 ± 15.57 ind m^{-2} ; 0.86 ± 0.09 spp sample $^{-1}$), whereas the lowest were at the locality L11 (1.67 ± 0.87 ind m^{-2} ; 0.05 ± 0.02 spp sample $^{-1}$), where only one species was collected (*T. procera*). Species with the largest distribution in the study area were; *T. procera* (present in the 92.85% of the localities), *A. muelleri* (78.50%) and *P. caupo* (71.42%). *Sipunculus nudus* (50.00%), *G. vulgaris vulgaris* (42.86%) and *P. strombus strombus* (42.86%) presented a moderate distribution, whereas species with a narrow distribution were *O. steenstrupii*

steenstrupii (7.14%), *Pm. granulatum* (14.29%) and *P. tuberculosum* (21.43%). Regarding the temporal distribution, only three species (*A. muelleri*, *P. strombus strombus* and *T. procera*) were recorded in all the sampling years (Fig. 4.4). The rest of species showed a high variability, appearing and disappearing from year to year. *Sipunculus nudus* was only recorded the last two years of study (2007–2008), being the second species in abundance for these years, whereas *P. caupo* had high abundances during 2004–2007 and it was absent on 2008.

Values of Pearson's r between species abundances and environmental factors were very variable, highlighting the different responses of each species to the sediment characteristics (Tab. 4.2). Significant relations were observed in the species: *Aspidosiphon muelleri* to organic matter, fine sand, coarse sand and gravel; in *Phascolion caupo* to Eh, fine sand, coarse sand and gravel; in *Thysanocardia procera* to fine sand; in *Golfingia vulgaris vulgaris* to organic matter; and in *Sipunculus nudus* to depth and organic matter. A significant collinearity between depth and organic matter was also detected (PEARSON; $r = 0.329$; $P < 0.001$).

The ANOSIM test detected significant differences in species composition between different years and localities (both $P = 0.001$). Moreover, the RELATE test yielded a significant relation between sipunculan distribution and some sediment characteristics: organic matter ($P < 0.01$), fine sand ($P < 0.01$), medium sand ($P < 0.05$), coarse sand ($P < 0.01$) and gravel ($P < 0.01$) (Tab. 4.3). On the basis of CLUSTER analysis and similarity index between different stations, five main groups were established (A, B, C, D, E), which were displayed in the MDS plot (Fig. 4.5). Group A is a heterogeneous group and it was split

in two subgroups, A1 and A2, due to its segregation and characteristics. While in A1 can be found stations dominated by fine sand, in A2 the stations mainly presented sediment of higher grain size. *Aspidosiphon muelleri* contributed with an 83.56% to the dissimilarity between A1 and A2 (Tab. 4.4), and its density was high in A2 (2.99 ind m⁻²), where sediment is dominated by the coarser fraction, while it did not appear in A1 (0.00 ind m⁻²), where the sediment is mainly fine sand. Group B have an average similarity of 78.10% and, like group A2, it is made up of stations with high presence of gravel in the sediment. These stations were dominated by the shell-dwelling species *A. muelleri* (4.03 ind m⁻²) and *Phascolion caupo* (2.80 ind m⁻²) (Fig. 4.6), accumulating the 99.7% of the total contribution to the similarity. Group C only consists of three stations, and it is a very heterogeneous group regarding the sediment. *Golfingia vulgaris vulgaris* (2.70 ind m⁻²) and *A. muelleri* (2.52 ind m⁻²) were the major species promoting the segregation of this group, yielding the higher contributions to the dissimilarity regarding to the other groups (Tab. 4.5). Groups D and E were only composed of one station. In the case of group D (L7-S4, 2006), the station was segregated due to the high presence of *P. caupo* (4.21 ind m⁻²) and *G. vulgaris vulgaris* (2.33 ind m⁻²). The sediment of this station was clearly dominated by gravel (73.49%). On the other

hand, the group E (L6-S1, 2005) is characterised by the presence of *P. caupo* (3.31 ind m⁻²), *P. strombus strombus* (4.53 ind m⁻²) and *Phascolosoma granulatum* (2.03 ind m⁻²) in a sediment dominated by fine sand (52.13%). The absence of the dominant species, *A. muelleri* in both stations (groups D and E) was also important when contributing to the dissimilarity between different groups.

4.5—Discussion

The sipunculan species collected and their abundances were similar to species inhabiting nearby areas (Ferrero-Vicente *et al.* 2012; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1993a). The nine species reported represent 25% of the total described species for the Mediterranean Sea and 70% of the species previously reported for this area (Coll *et al.* 2010; Ferrero-Vicente *et al.* 2011; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). *Nephasoma diaphanes diaphanes*, *Phascolosoma stephensoni* and *Aspidosiphon misakiensis* were the only species previously reported for this area which did not appear in this study. *Phascolion caupo* and *Thysanocardia procera* were new records for this area, increasing the number of known sipunculans up to 12 species in the Gulf of Valencia and Cape Nao. Moreover, it was the second record of *P. caupo* for the Mediterranean Sea (Ferrero-Vicente *et al.* 2012). These new records make evident the

Tab. 4.2. Pearson correlation between sipunculan species abundances (with N>15) and environmental factors. (Bonferroni correction was applied).

	<i>A. muelleri</i>	<i>P. caupo</i>	<i>P. strombus</i>	<i>T. procera</i>	<i>G. vulgaris</i>	<i>S. nudus</i>
Depth	0.046 ^{ns}	-0.012 ^{ns}	-0.004 ^{ns}	-0.032 ^{ns}	0.014 ^{ns}	-0.208 ^{***}
Organic matter	0.177 ^{**}	0.074 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.035 ^{ns}	0.176 ^{**}	-0.190 ^{***}
pH	0.018 ^{ns}	0.012 ^{ns}	-0.035 ^{ns}	-0.061 ^{ns}	-0.006 ^{ns}	0.079 ^{ns}
Eh	0.078 ^{ns}	0.167 ^{**}	-0.045 ^{ns}	-0.054 ^{ns}	-0.075 ^{ns}	-0.020 ^{ns}
Silt & Clays	-0.097 ^{ns}	-0.070 ^{ns}	-0.038 ^{ns}	-0.009 ^{ns}	-0.007 ^{ns}	-0.108 ^{ns}
Fine Sand	-0.309 ^{***}	-0.294 ^{***}	-0.039 ^{ns}	0.127 [*]	-0.073 ^{ns}	0.073 ^{ns}
Medium Sand	-0.028 ^{ns}	-0.014 ^{ns}	0.052 ^{ns}	-0.065 ^{ns}	0.012 ^{ns}	-0.002 ^{ns}
Coarse Sand	0.336 ^{***}	0.261 ^{***}	0.030 ^{ns}	-0.056 ^{ns}	0.063 ^{ns}	-0.061 ^{ns}
Gravel	0.325 ^{***}	0.344 ^{***}	0.020 ^{ns}	-0.121 ^{ns}	0.067 ^{ns}	-0.009 ^{ns}

ns=no significant difference; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$

Tab. 4.3. Summary of results from the RELATE test.

	Rho	sig.	
Depth	-0.065	99.6	ns
Organic matter	0.077	0.6	**
pH	0.048	6.2	ns
Eh	-0.001	48	ns
Silt & Clays	-0.119	100	ns
Fine Sand	0.22	0.1	**
Medium Sand	0.072	1.3	*
Coarse Sand	0.342	0.1	**
Gravel	0.357	0.1	**

ns=no significant difference; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

need for more studies in order to increase distribution and taxonomic knowledge of sipunculan species from the Spanish Mediterranean coast.

From the overview, most of the species have shown a high interannual variability, even disappearing in some years (Fig. 4.4). We found interannual changes in abundances, species richness and species composition.

These interannual changes in abundance and species richness of Sipuncula were also noted in Arctic fjords by Kędra & Włodarska-Kowalczyk (2008).

Environmental factors of the sediment presented a strong correlation with certain species of sipunculans, but it does not explain the interannual variability, since sediment was uniform during the different years of study. Other factors such as larval distribution, shelter availability, hydrodynamic factors or predation could be determining the natural variability in these sipunculan populations. It was not possible to analyse the results from species with a very low abundance. *Onchnesoma steenstrupii steenstrupii* and *Phascolosoma granulatum* appeared in an anecdotal way (one and two individuals respectively), thus allowing us to ratify their presence in the

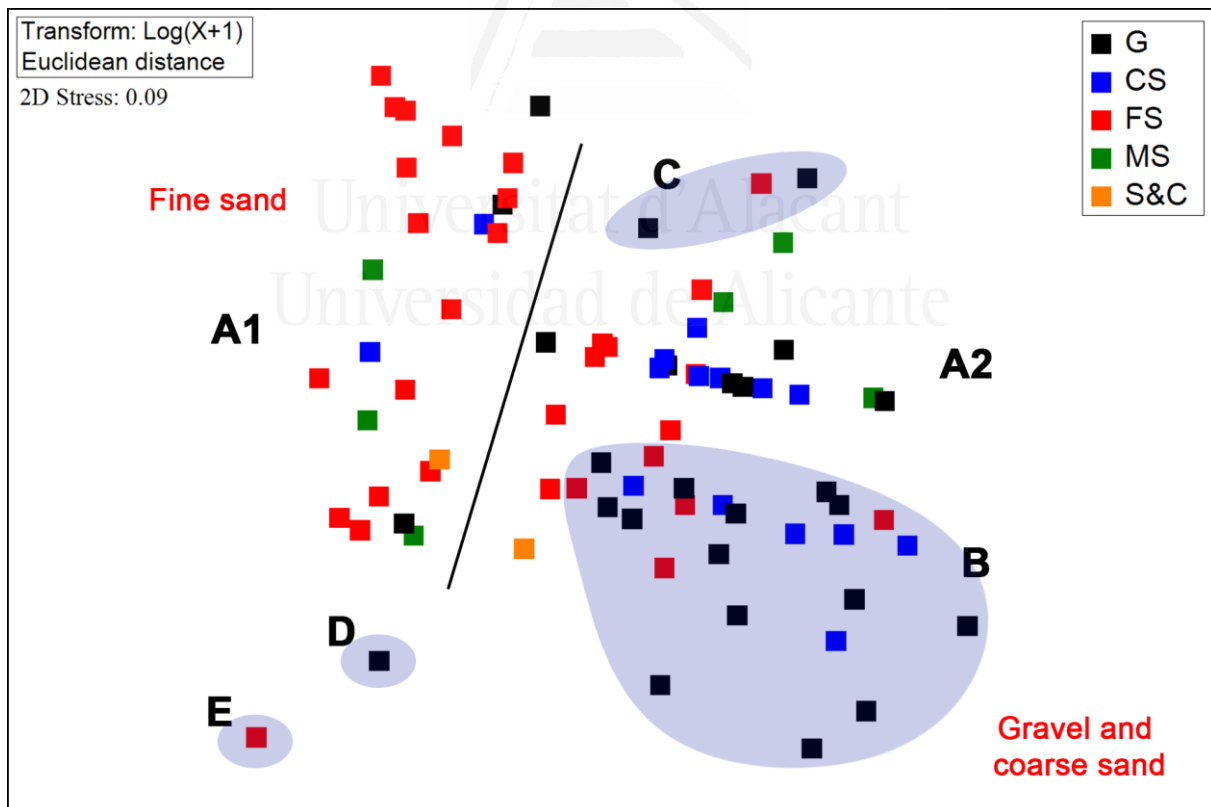


Fig. 4.5. MDS plot showing the segregation of the different groups from sipunculan species abundances (euclidean distance > 4). Color bar showing the dominating fraction of the sediment for each station (G=Gravel; CS=Coarse sand; MS=Medium sand; FS=Fine sand; S&C=Silt and clays). Labels represent the different groups established (A1-A2, B, C, D, E). Shadows overlapping the different groups. Line separating stations from subgroups A1 and A2.

studied area, but preventing us to assess their real distribution. Another species with very low abundances were *Phascolion tuberculosum* (10 ind) and *Golfingia vulgaris vulgaris* (16 ind).

In the case of *Aspidosiphon muelleri*, we are dealing with a widely recorded species along the Mediterranean Sea, which is capable of living in many different habitats, usually inhabiting empty calcareous shelters to keep them safe from predators (Ferrero-Vicente *et al.* 2011; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999, Saiz-Salinas 1986). A total of 720 specimens of *A. muelleri* were collected, being —by a considerable margin— the most abundant species recorded. This is usual for this type of habitat which contains empty shells or empty tubes of serpulid polychaeta where these sipunculans can be protected (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). A maximum density of 1675 ind m⁻² has been recorded (L8, 2004), which is a new maximum for this species (Saiz-Salinas 1993a). This density was reached in sediment dominated by gravel and with a high presence of empty shells from small gastropods and serpulid polychaete tubes. Although this species appeared in sediments with diverse granulometric characteristics, from samples dominated by coarse sediment to samples dominated by fine sediment, and with different amount of organic matter, mainly showed a trend to appear in samples with sediment dominated by coarse sands and gravel. Presence of *A. muelleri* was constant along the five years of sampling, with the maximum abundance on 2004 (Fig. 4.4). It also showed a wide distribution in the area, being reported in 78.57% of the localities. A previous study in the nearby area, carried out from 2005 to 2010, also showed *A. muelleri* as the dominant species (Ferrero-

Vicente *et al.* 2011), thus we might consider this species as dominant in soft substrata from the Spanish Mediterranean coastal areas.

Golfingia vulgaris vulgaris has been reported from all oceanic areas, being abundant in European waters (Saiz-Salinas 1984, 1993a). Only 16 specimens of *G. vulgaris vulgaris* were collected during the five years of sampling, making it difficult to establish any pattern on its distribution in the study area. According to Pearson correlations, *G. vulgaris vulgaris* did not show any particular affinity with a determined grain size or another abiotic factor excepting organic matter, showing a trend to appear in sediments with higher organic matter content. Presence of *G. vulgaris vulgaris* was not constant over years; no specimens were detected for sampling years 2004 and 2007 and its spatial distribution was moderate.

Despite the fact that *Onchnesoma steenstrupii steenstrupii* is a well-known species in the Mediterranean Sea (Murina *et al.* 1999), this is only its second record for our study area (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999), evidencing again the lack of previous studies on sipunculans. It can be an abundant species in the Mediterranean (Açik 2008b), and it has been reported as a dominant species in muddy and sandy substrata in Turkey (eastern Mediterranean), reaching a relative abundance of 61.5% in these substrata (Açik 2010). With regard to western Mediterranean, it was collected in coarse and medium sand (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). In our case, their presence is reduced to only one individual, found in fine sand (L12, 2007), thus preventing any assessment about its habitat preferences.

Tab. 4.4. Summary of the results from SIMPER analysis. Species contributing to the similarity between subgroups A1 and A2 (90% cut-off). Av. Abund.=average abundance (ind m⁻²); Contrib.=percentage of contribution to the similarity; Cum.=percentage of cumulative contribution. AS=average similarity; AD=average dissimilarity.

Species	Av.Abund.		Contrib.	Cum.
AS=3.18	Group A1			
<i>T. procera</i>	0.20		47.99	47.99
<i>S. nudus</i>	0.20		37.84	85.83
<i>P. caupo</i>	0.11		10.84	96.67
AS=71.60	Group A2			
<i>A. muelleri</i>		2.99	99.55	99.55
AD=99.53	Group A1	Group A2		
<i>A. muelleri</i>	0.00	2.99	83.56	83.56
<i>T. procera</i>	0.20	0.21	7.03	90.59

Phascolion caupo is a little known species, with only a few records around the world. This is the first record for our study area and the second for the Mediterranean Sea (Ferrero-Vicente *et al.* 2012). Despite such few records, *P. caupo* presents a cosmopolitan distribution, since it has been found in both coasts of the Atlantic Ocean (Hendrix 1975; Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990), in the Indian Ocean (Saiz-Salinas 1993b) and in the Mediterranean Sea (Ferrero-Vicente *et al.* 2012). Nonetheless, recent genetic studies call into question the cosmopolitan character of sipunculan worms (Schulze *et al.* 2012; Kawauchi *et al.* 2010), evidencing the need for more genetic studies to clarify taxonomic status of cosmopolitan species. *Phascolion caupo* has been the second species in abundance after *Aspidosiphon muelleri*. The maximum density was recorded in sediment dominated by gravel and with a high presence of shelters available to inhabit (L8, 2004). *Phascolion caupo* dwells in empty shells, which it may share with polychaetes or bivalves (Ferrero-Vicente *et al.* 2012; Hendrix 1975; Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990). This species has appeared in sediments with diverse granulometric characteristics but, according to the Pearson correlation coefficient, it shows a trend to appear in

sediments with a high fraction of coarse sand and gravel, moreover a reducing environment could affect them since they trend to disappear in sediments with low Eh. One specimen was collected at 14.1 meters depth (L2, 2004), the shallowest depth recorded for the species in the Mediterranean Sea. Abundance of this species was variable between different years, from 51 specimens in 2004 to 0 in 2008 and it showed a large spatial distribution, appearing in 71.42% of the localities.

Phascolion strombus strombus is a very common species, with a reported cosmopolitan distribution (Cutler 1994). Some authors have discussed its extreme phenotypic plasticity (Cutler 1973; Gerould 1913; Saiz-Salinas 1984). It usually inhabits a wide variety of shelters such as mollusc shells or polychaete tubes (Cutler 1994; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1993a); therefore shelter availability could be limiting its abundance (Hylleberg 1975). This species is commonly found in muddy and sandy bottoms (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999), but, in our case, Pearson correlation coefficient did not show any significant correlation between abundance of *P. strombus strombus* and abiotic factors of the sediment. The

abundance of *P. strombus strombus* was relatively low (F=1.15%), but it showed a high temporal stability, since its presence was recorded for all the sampling years. The maximum density was recorded in sediment dominated by fine sand and it had a moderate distribution (presence in 42.86% of the localities).

Phascolion tuberosum is a common species in the eastern north Atlantic, but only known from a few records in the Mediterranean Sea (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). It has been collected near our study area (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1993a) and three specimens were found in *Posidonia oceanica* beds in the eastern Mediterranean, showing a smaller size of the body, papillae and hooks than specimens previously reported (Açik 2008b). Like most of the species of the genus, *P. tuberosum* is a usual shell-dweller (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1993a). Only 10 specimens of *P. tuberosum* were collected in the sampling, preventing us from carrying out any specific statistical analysis. This species showed a low spatial distribution, probably conditioned by the low abundances recorded, and appeared in samples dominated by the fine-sand fraction of the sediment (4 specimens), medium sand (1 specimen), coarse sand (3 specimens) and gravel (2 specimens).

Phascolosoma granulatum is capable of living in different habitats including hard and soft substrata (Cutler 1994; Saiz-Salinas 1993a), being found more frequently in hard substrata. Two individuals were collected, one in fine sand and one in gravel. Specific statistical analyses were not done for this species due to the low abundance of individuals.

Sipunculus nudus is a widely studied species and a usual dweller of soft substrata

(Murina *et al.* 1999). It has a worldwide distribution, being the most common tropical-temperate species (Cutler 1973, 1994). However, this is only the second record for this species in the studied area (Saiz-Salinas & Murina 1982). As most of sipunculan species, *S. nudus* is a eurybathic species, nonetheless, it is usually found in the littoral zone (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1986, 1993a), with a maximum depth of 160 m in the Mediterranean. Forty six individuals have been collected in this study (F=2.76%, RA=4.73%), but it was only recorded in the last two years of sampling (2007 and 2008), being the second species in abundance during these years. Pearson correlation coefficient showed a high negative trend of *S. nudus* to organic matter content in the sediment. This factor could be important to explain the *S. nudus* distribution. Pearson correlation also yielded a strong relation between *S. nudus* abundance and depth, but assuming it is a eurybathic species (0–2275 m depth; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999) and given the narrow range of depth in our samples (12.1–30.2 m), we consider this result as a false positive, due to the collinearity between factors, since stations with the lower organic matter were in slightly shallower waters.

Individuals collected were, in general, of small size (only a few millimetres) compared to the usual size of this species (5–10 cm; Cutler 1994). In addition, they showed a translucent skin. All specimens collected were juveniles. It is suspected that mature specimens were capable of avoiding the Van Veen grab by burrowing deeper galleries. Likely the distribution and abundance of this species for this area are underestimated, due to difficulty of catching adult specimens with our sampling method.

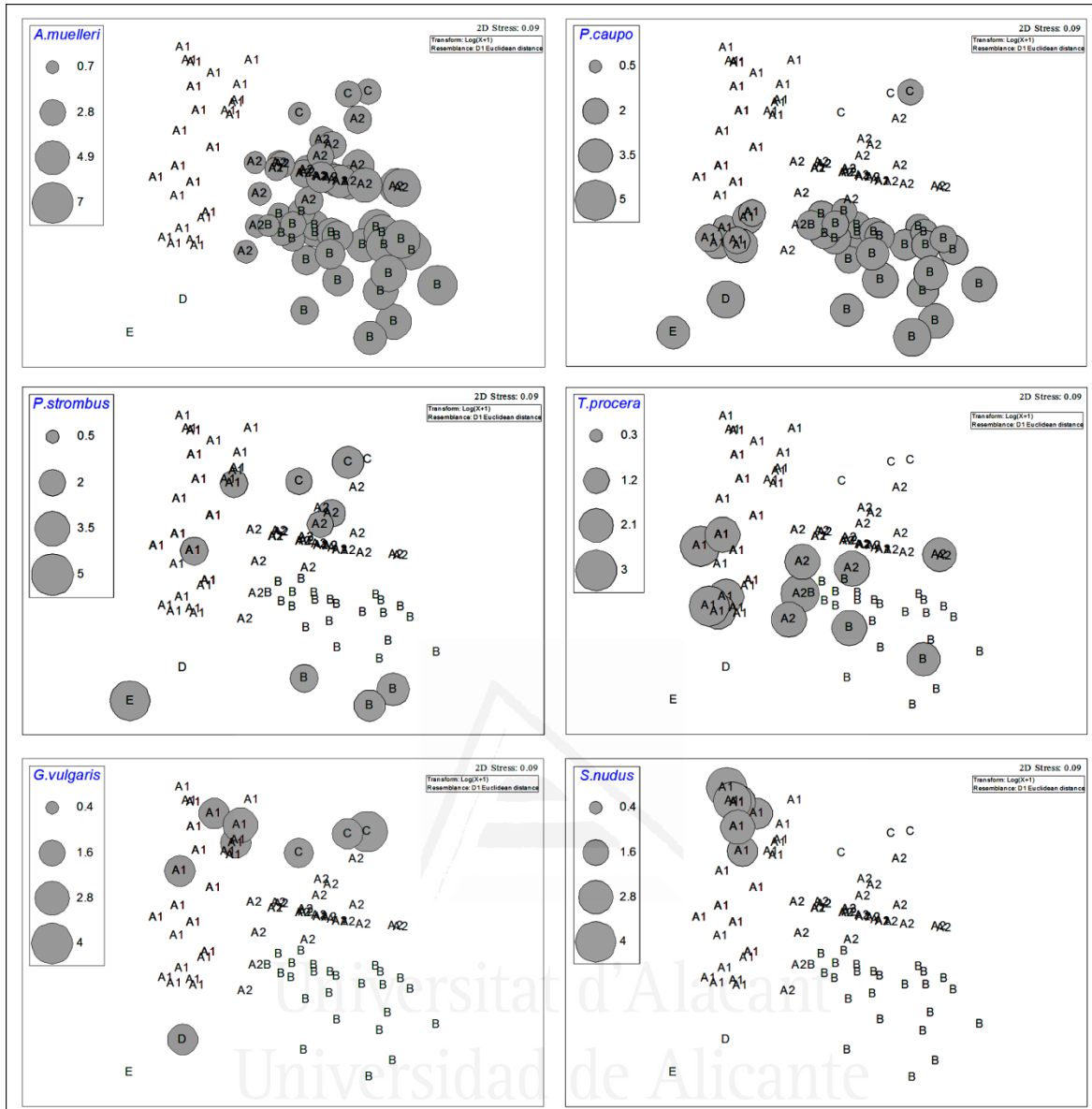


Fig. 4.6. Bubble plots showing the abundance of the main species for each station. Labels represent the different groups established (A1-A2, B, C, D, E).

This is the first record of *Thysanocardia procera* for the Gulf of Valencia. It seems to inhabit a great variety of substrata (Ferrero-Vicente *et al.* 2011; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999) and it usually does not use any kind of shelter within sediment. Forty-two individuals of *T. procera* were collected, being the fourth species in abundance. *T. procera* only showed a significant positive correlation with fine sand content, but it did not show significant trends to any other abiotic factor of the sediment, in concordance with previous studies in

nearby areas (Ferrero-Vicente *et al.* 2011), thus giving us an idea of their adaptation to several conditions and habitats. This species was even reported as a parasite of the polychaete *Aphrodite aculeata* (Stephen & Edmonds 1972). *Thysanocardia procera* showed a high interannual stability, being, together with *Aspidosiphon muelleri* and *Phascolion strombus strombus*, the only species reported for all the sampling years. Moreover, it showed the widest distribution of all species, being present in the 92.85% of the localities. Even being the first record

of *T. procera* for the study area, it showed the highest distribution of all species; thus demonstrating the lack of Sipuncula data in this area and showing the importance of continuing studying the zoogeography of the phylum and identifying to the species level.

The low spatial distribution registered in some species, ones with low abundances, is likely due to a low sampling effort, and with a higher effort, they might show a higher distribution range.

The results from our multivariate and RELATE analyses, (Tab. 4.3), suggest that organic matter, fine sand, medium sand, coarse sand and gravel content, are the best predictors of sipunculan distribution in this area. Fine sand, coarse sand and gravel are revealed as the most significant factors (RELATE; $P=0.001$). The MDS plot (Fig. 4.5) shows a clear gradient from stations with finer sediment to stations dominated by coarse sand and gravel. One side of this gradient is dominated by stations with high amount of fine sediment and high abundances of the species *Golfingia vulgaris vulgaris* and *Sipunculus nudus*. In the case of *S. nudus*, its presence is almost exclusive for this type of sediment and it only appeared in the samples with low organic matter content. In the case of *G. vulgaris vulgaris*, Pearson correlation coefficient yielded a positive trend according to organic matter content; however, it also appeared in samples with low amount of organic matter. Other species like *Phascolion strombus strombus* did not show any particular affinity, neither for a determinate grain size nor for another factor, and they were recorded in stations with very diverse characteristics. *Phascolion strombus strombus* might be expected to have a similar distribution to *P. caupo*, similar and related species, and both shell-dwelling species, but results did not

show a correlation between *P. strombus strombus* and gravel or coarse sand type of sediment that might be related with higher shelter availability. The other shell-dwelling species, (*P. caupo* and *A. muelleri*), did show high affinity to the coarser sediment fraction, and these usually were the dominant species in group B and subgroup A2 (stations with high content of coarse sand and gravel). The higher probability may be due to the higher presence of shelters in the coarser sediment. It is known the existence of dense aggregations of sipunculans in bottoms where shelters are available for these sipunculan species (Saiz-Salinas 2007) and it would be important studying how shelter availability could be limiting the distribution or abundance of shell-dwelling sipunculans. In the case of *P. caupo*, it did not appear in the subgroup A2 and it was the species preventing the grouping of all the stations dominated by the coarser fraction of the sediment.

4.6—Conclusions

The sipunculan abundances and diversity from the studied area were in concordance with previous studies for nearby areas. Nonetheless sipunculan populations showed a high variability in abundance and species composition from year to year. Most abundant sipunculan species showed their habitat preferences regarding to sediment. *Aspidosiphon muelleri* was the dominant species in soft sediments of the Spanish Mediterranean littoral, and *Phascolion caupo* appears for the second time in the Mediterranean, with a relative high abundance, indicating that it could have a wider distribution in the western Mediterranean. These two species (*P. caupo* and *A. muelleri*) appeared preferentially in stations dominated by the coarser fraction of the sediment (likely due to higher shelter availability), while *Golfingia vulgaris vulgaris* and *Sipunculus nudus* appeared

preferentially in fine-sand sediments. We emphasise the need to identify sipunculans

to the species level in studies of macrobenthic fauna.

Tab. 4.5. Summary of the results of SIMPER analysis. Species contributing to the similarity between different groups (90% cut-off). Av. Abund=average abundance (ind m⁻²); Contrib.=percentage of contribution to the similarity; Cum.=percentage of cumulative contribution. AS=average similarity; AD=average dissimilarity. Group D and E: Less than 2 samples in group

Species	Av.Abund	Contrib.	Cum.
AS=5.15			
<u>Group A</u>			
<i>A. muelleri</i>	0.48	64.08	64.08
<i>T. procera</i>	0.20	19.33	83.41
<i>S. nudus</i>	0.17	11.76	95.17
AS=78.10			
<u>Group B</u>			
<i>A. muelleri</i>	4.03	56.25	56.25
<i>P. caupo</i>	2.80	43.45	99.70
AS=67.06			
<u>Group C</u>			
<i>A. muelleri</i>	2.52	44.09	44.09
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	2.70	41.58	85.67
<i>P. strombus strombus</i>	1.63	14.33	100
Group D and E. Less than 2 samples in group			
AD=89.67			
<u>Group A</u>			
<i>A. muelleri</i>	0.48	50.57	50.57
<i>P. caupo</i>	0.09	38.51	89.09
<i>T. procera</i>	0.20	3.73	92.82
<u>Group B</u>			
<i>A. muelleri</i>	4.03	50.57	50.57
<i>P. caupo</i>	2.80	38.51	89.09
<i>T. procera</i>	0.16	3.73	92.82
AD=91.53			
<u>Group A</u>			
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	0.03	34.70	34.70
<i>A. muelleri</i>	0.48	30.15	64.85
<i>P. strombus strombus</i>	0.04	22.48	87.33
<i>P. caupo</i>	0.09	8.34	95.67
<u>Group C</u>			
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	2.70	34.70	34.70
<i>A. muelleri</i>	2.52	30.15	64.85
<i>P. strombus strombus</i>	1.63	22.48	87.33
<i>P. caupo</i>	0.68	8.34	95.67
AD=97.49			
<u>Group A</u>			
<i>P. caupo</i>	0.09	58.75	58.75
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	0.03	31.36	90.11
<u>Group D</u>			
<i>P. caupo</i>	4.21	58.75	58.75
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	2.23	31.36	90.11
AD=97.92			
<u>Group A</u>			
<i>P. strombus strombus</i>	0.04	42.80	42.80
<i>P. caupo</i>	0.09	30.78	73.58
<i>Pm. granulatum</i>	0.00	19.28	92.87
<u>Group E</u>			
<i>P. strombus strombus</i>	4.53	42.80	42.80
<i>P. caupo</i>	3.31	30.78	73.58
<i>Pm. granulatum</i>	2.03	19.28	92.87
AD=56.22			
<u>Group B</u>			
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	0.00	32.49	32.49
<i>P. caupo</i>	2.80	25.85	58.33
<i>P. strombus strombus</i>	0.30	19.92	78.25
<i>A. muelleri</i>	4.03	18.64	96.89
<u>Group C</u>			
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	2.70	32.49	32.49
<i>P. caupo</i>	0.68	25.85	58.33
<i>P. strombus strombus</i>	1.63	19.92	78.25
<i>A. muelleri</i>	2.52	18.64	96.89
AD=59.67			
<u>Group B</u>			
<i>A. muelleri</i>	4.03	48.02	48.02
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	0.00	27.70	75.72
<i>P. caupo</i>	2.80	18.37	94.09
<u>Group D</u>			
<i>A. muelleri</i>	0.00	48.02	48.02
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	2.23	27.70	75.72
<i>P. caupo</i>	4.21	18.37	94.09
AD=65.16			
<u>Group B</u>			
<i>P. strombus strombus</i>	0.30	38.73	38.73
<i>A. muelleri</i>	4.03	35.19	73.92
<i>Pm. granulatum</i>	0.08	17.77	91.69
<u>Group E</u>			
<i>P. strombus strombus</i>	4.53	38.73	38.73
<i>A. muelleri</i>	0.00	35.19	73.92
<i>Pm. granulatum</i>	2.03	17.77	91.69
AD=59.93			
<u>Group C</u>			
<i>P. caupo</i>	0.68	43.09	43.09
<i>A. muelleri</i>	2.52	29.91	73.00
<i>P. strombus strombus</i>	1.63	20.07	93.07
<u>Group D</u>			
<i>P. caupo</i>	4.21	43.09	43.09
<i>A. muelleri</i>	0.00	29.91	73.00
<i>P. strombus strombus</i>	0.00	20.07	93.07
AD=73.46			
<u>Group E</u>			
<i>P. strombus strombus</i>	4.53	22.55	22.55
<i>P. caupo</i>	3.31	20.99	43.54
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	0.00	20.94	64.48
<i>A. muelleri</i>	0.00	19.60	84.09
<i>Pm. granulatum</i>	2.03	15.91	100
<u>Group C</u>			
<i>P. strombus strombus</i>	1.63	22.55	22.55
<i>P. caupo</i>	0.68	20.99	43.54
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	2.70	20.94	64.48
<i>A. muelleri</i>	2.52	19.60	84.09
<i>Pm. granulatum</i>	0.00	15.91	100
AD=59.45			
<u>Group E</u>			
<i>P. strombus strombus</i>	4.53	46.75	46.75
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	0.00	23.02	69.77
<i>Pm. granulatum</i>	2.03	20.89	90.66
<u>Group D</u>			
<i>P. strombus strombus</i>	0.00	46.75	46.75
<i>G. vulgaris vulgaris</i>	2.23	23.02	69.77
<i>Pm. granulatum</i>	0.00	20.89	90.66



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



5. Limiting factors on the distribution of shell/tube-dwelling sipunculans

Photo: *Phascolion strombus strombus* (Montagu 1804)



Published as:

FERRERO-VICENTE, L.M., MARCO-MÉNDEZ, C., LOYA-FERNÁNDEZ, Á. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2013) Limiting factors on the distribution of shell/tube-dwelling sipunculans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 446: 345–354.

5. Limiting factors on the distribution of shell/tube-dwelling sipunculans

5.1—Abstract

Many sipunculan species use empty gastropod shells or polychaete tubes as a resource to keep them safe from predation. Nonetheless, little is known about the extent to which the availability of this resource is involved in the distribution of these species.

We examined shelter availability and sediment granulometry as factors to explain the distribution of shell-dwelling and/or tube-dwelling sipunculans. For this purpose, artificial sampling units with different sediment granulometry and different shelter availability were deployed at two localities. Four species have been reported, being three of them usually dwellers of vacant gastropod shells or polychaete tubes: *Aspidosiphon muelleri*, *Phascolion strombus strombus* and *Phascolion caupo*.

Shelter availability was the main factor explaining the distribution and abundance of shell/tube-dwelling sipunculans. Artificial sampling units (ASUs) in which shelter were added had an abundance of *A. muelleri* ten times higher than ASUs in which shelters were removed ($P < 0.01$). Moreover, sipunculans selected preferably as shelter *Ditrupa arietina* tubes over gastropod shells. A strong linear correlation between body width and shelter internal diameter was found for *A. muelleri* (PEARSON; $r = 0.796$, $P < 0.001$).

On the other hand, differences between localities were detected. However, these differences are not linked with the studied variables (shelter availability and granulometry), and have to be explained by other factors.

5.2—Introduction

Sipunculans are part of the diet of numerous species of fishes and many other organisms, including gastropods, crabs, anemones, cephalopods (Cutler 1994) or even amphipods (Vázquez-Luis *et al.* 2012). Its exposure to predation forces sipunculans to find a shelter, burrowing galleries into the sediment, living in crevices between or under rocks, tucked in the rhizome of seagrasses or algae rhizoids, inside mussel clusters or sponges, occupying discarded gastropod shells, polychaeta tubes or empty barnacles among other possible structures (Cutler 1994).

It is well known that shelter availability can be a limiting factor in aquatic ecosystems to

survival and recruitment of many organisms (Beck 1995; Behrems 1987; Moran & Reaka 1998; Shulman 1984; Steele 1999). Some of the most common shelters in soft bottoms are calcareous structures, such as empty gastropod shells or polychaete tubes among others. Diverse groups of organisms can be found within these shell-dwelling species; hermit crabs (Gherardi 1996), fishes (Stiassny & Meyer, 1999), tanaids (Holdich 1987), polychaetes (Hylleberg 1975) or sipunculans (Cutler 1994) among others. Numerous studies have been published on how shelter resources can influence the hermit crabs' populations; limiting its abundance, growth, survival and fecundity (Angel

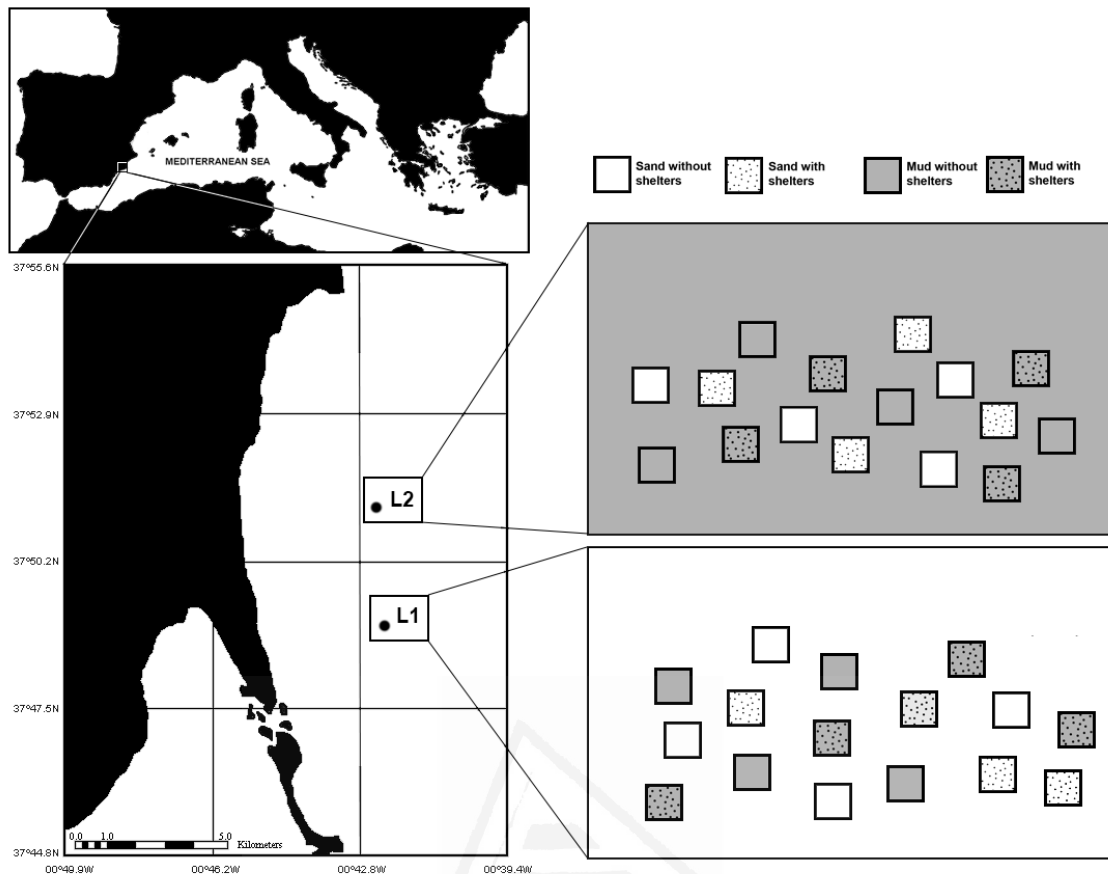


Fig. 5.1. Map showing the studied localities and deployment scheme of the artificial sampling units.

2000; Elwood *et al.* 1995; Fotheringham 1976, 1980; Kellogg 1976), and even inducing behavioural and morphological changes (Blackstone 1985; Rodrigues *et al.* 2002). Also known is the importance of shells supply for the benthic community structure in aquatic ecosystems (Gutiérrez *et al.* 2003; McLean 1983).

Much less known is the case of shell-dwelling and/or tube dwelling sipunculans. Many sipunculan species use gastropod shells or polychaeta tubes by way of shelter against predation, mainly species from the genera *Phascolion*, some *Aspidosiphon* and a few *Apionsoma* and *Nephasoma* (Cutler 1994).

It has been reported that shelter abundance could be an important factor for sipunculans inhabiting empty shells of gastropods or empty tubes of serpulid

polychaetes (Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2012; Hylleberg 1975; Saiz-Salinas 2007). Species of the genera *Aspidosiphon* and *Phascolion* are well adapted to live in discarded mollusc shells or similar structures. *Aspidosiphon* species have an anterior shield that works like an operculum plugging the opening of the hole to protect against predation and desiccation, and *Phascolion* species have a dense aggregation of papillae in the anterior part of the trunk that may function in a similar way (Cutler 1994). Hylleberg (1975) reported shelter availability as a limiting factor for the distribution of *Phascolion strombus strombus* in soft sediment, also detecting a relation between body weight and shelter size.

Aspidosiphon muelleri is the dominant species in the studied localities and nearby

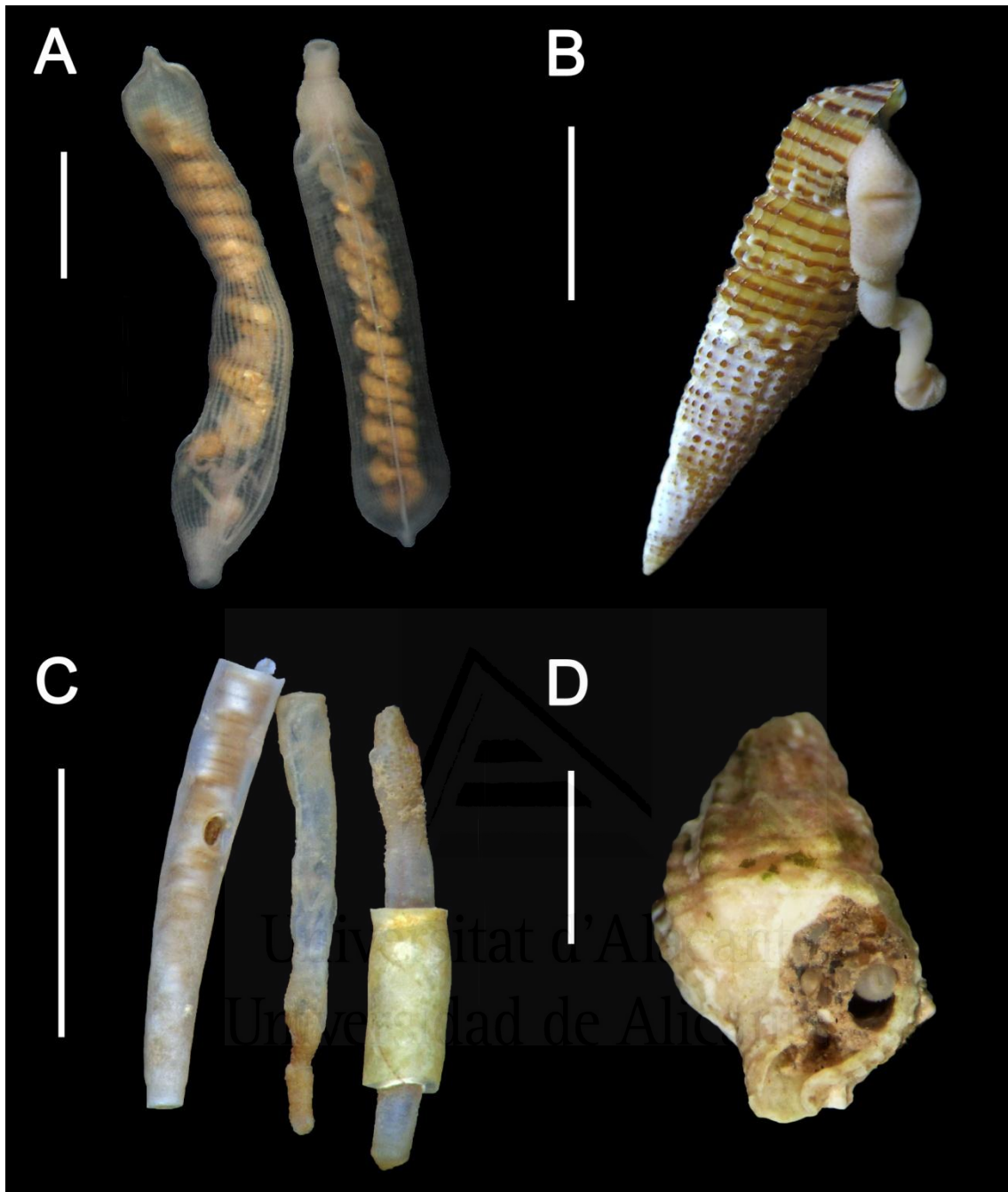


Fig. 5.2. Sipunculan species and shelters recorded. Scale bar of 5 mm for each species. [A] Specimens of *Sipunculus nudus*. [B] Specimen of *Phascolion strombus strombus* inside a gastropod shell. [C] Specimens of *Aspidosiphon muelleri* and *Ditrupa arietina* tubes. [D] Specimen of *Phascolion caupo* inside a gastropod shell. The orifice partially covered by sediment and mucus can be observed.

areas (Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2013a); it is a widespread, eurytopic and polymorphic species (Cutler & Cutler, 1989) living from shallow waters to 2934 m depth (Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). This eurytopic condition complicates considerably the study of the factors limiting its distribution. These factors are often mixed at the field,

making it difficult to assess the effects induced by the different factors individually (Bishop 2005). Although *A. muelleri* have been reported from several types of sediment, in some cases, it has shown a decreasing trend in muddy areas (Solís-Weiss 1982; Ferrero-Vicente *et al.* 2011).

Aspidosiphon muelleri often forms aggregates and their abundances are spatial and temporal patched. Factors involved in its distribution have been barely investigated. High densities of the serpulid *Ditrupa arietina* have been found in the western Mediterranean, matching with abnormal high densities of *A. muelleri* (reaching up 1675 ind m⁻²) (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). Almost all these sipunculans were encountered inhabiting empty tubes of *D. arietina* or gastropod shells; in the case of *A. muelleri*, 94.4% of the specimens were found inhabiting a shelter in previous studies (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). We are dealing with usually a shell/tube-dweller, therefore this species might have a close relationship with its shelter and specific requirements (size, shape, hardness) as usually happens with other shell-dwelling organisms (Kellogg 1976; Blackstone 1985, Angel 2000). This fact led us to think that abundance of *A. muelleri* might be limited by shelter availability. Nonetheless, the role of shelter availability for this and other sipunculan species has not been experimentally tested.

Gastropod shells are generally larger and heavier than *D. arietina* shells, overcoming the regular size of sipunculan species for this area, thus making them useable only for larger specimens (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). Although hermit crabs generally prefer larger gastropod shells (Morton & Britton 1995) and *Aspidosiphon muelleri* selects smaller gastropod shells or, preferably, empty tubes of *D. arietina* (Ferrero-Vicente *et al.* 2011), competition for these shelters between sipunculan worms and hermit crabs has been reported by Kellogg (1976).

For this experiment, we selected an area with heterogeneous granulometry, from sites dominated by fine sediment or mud to sites dominated by coarse sand or gravel

(Ferrero-Vicente *et al.* 2011). Even though sediment grain size plays an important role, there are many factors involved in the infaunal invertebrate distributions as important or more than sediment grain size (Snelgrove & Butman 1994; Wu & Shin 1997). Differences between localities are tested to evaluate changes in sipunculan populations promoted for any other possible variables not included in the sample design.

Our main objective was to evaluate shelter availability and sediment characteristics as limiting factors on the distribution of shell/tube-dwelling sipunculans.

5.3—Material and methods

5.3.1 The Study site

Two localities facing the coast of San Pedro del Pinatar (western Mediterranean) were chosen due to their suitable characteristics (Fig. 5.1). These localities are situated 4 km apart from each other and both share similar depth (~35 m), temperature and salinity (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). At the southern locality (L1) (N 37°48.8'; W 0°42.37'), the sediment presents a granulometry dominated by higher values of grain size, larger amount of available shelters (capable of being used by sipunculans) and higher abundance of sipunculans (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). Shelters in this area are mainly empty tubes of the serpulid worm *Ditrupa arietina* (Fig. 5.2C). The northern locality (L2) (N 37°51.0'; W 0°42.05') is dominated by fine sediment, the amount of shelters available is lower than in L1 and the abundance of sipunculans has been also lower (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). Shelters at this locality mainly come from empty shells of gastropods. *Ditrupa arietina* can be found at high densities within a wide variety of coarse sediments, whereas the transition of high densities to the absence of *D. arietina*

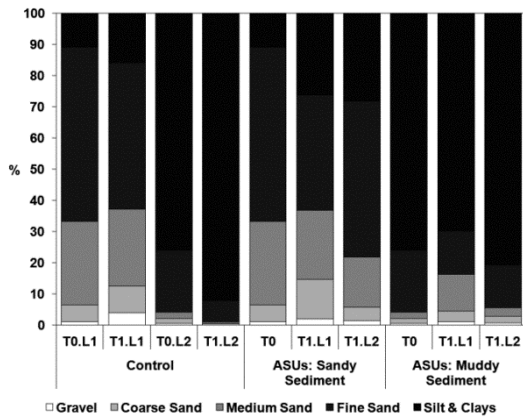


Fig. 5.3. Granulometry from the different localities and artificial sampling units. T0=Initial sampling; T1=six months after.

is very steep in the presence of increasing proportions of fines (Grémare *et al.* 1998).

5.3.2 Experimental design and sampling procedure

Benthic organisms are patchy in space and time, making it difficult to discern the individual effect of the analysed factors (Bishop 2005; Cortes *et al.* 2012). We use artificial sampling units (ASUs) as a way to reduce spatial variability among different sites, allowing ecological impacts to be more easily measured (Bologna & Heck 1999; Bishop 2005; Czerniawska-Kusza 2004; Snelgrove 1994). The first step was obtaining a great amount of sediment from both localities. This process was carried out directly by scuba divers, who gathered the sediment directly using a gardening spade. The sediment was taken carefully, to avoid penetrating more than 4 cm depth and it was kept in a big closed plastic box to lift it up to the boat. A subsample of sediment from both localities was taken to determine the granulometry.

It was sorted into the following six categories: gravel (>2.0 mm); coarse sand (0.5–2.0 mm); medium sand (0.25–0.5 mm); fine sand (0.063–0.25 mm); and silt and clays (<0.063 mm) (Buchanan 1984). Also, the amount of organic matter in the

sediment was determined from subsamples of 10 g dry weight as loss on ignition after 4 h at 500 °C in a muffle furnace.

The remaining sediment was defaunated and the shelters removed. The fauna was eliminated by air drying under sunlight for 90 days (May-July 2011) until the complete drying of the sediment was ensured. Later, it was checked to assure the total absence of living organisms (Adapted from Lu & Wu 2007; Wu & Shin 1997). Once the sediment was free of shelters and fauna, it was distributed into 36 artificial sampling units of 308 cm² (plastic trays of 22 cm length; 14 cm wide; 6 cm depth), 18 ASUs were filled in with sediment from locality L1 and another 18 from locality L2 (Fig. 5.1). Trays were filled in until covering 5 cm of thickness (1.54 L). All the shelters previously removed were sorted and analysed (density and size distribution of the shelters were calculated), and later, they were homogenised and equally distributed in half of the ASUs at both localities, obtaining finally 4 ASUs for each locality and sediment type (sandy sediment with shelters, sandy sediment without shelters, muddy sediment with shelters and muddy sediment without shelters) (Fig. 5.1). ASUs were deployed in August (2011) and removed six months later, in February (2012). One additional ASU was used for the sediment analysis.

At each locality, ten control samples were taken at the start of the experiment and another ten, six months after, when the ASUs were removed, to keep track of the natural variability in the sipunculan populations, shelter availability and sediment granulometry. They correspond to five samples for each location, four to the faunal analysis and one additional to study the sediment. These control samples consisted of cores with the same surface and depth as the plastic trays.

5.3.3 Laboratory analysis and data processing

Samples used to characterise the faunal composition and shelter availability (32 ASUs and 16 control cores) were carefully sieved on a 0.5 mm mesh to separate the macrofauna and they were later fixed in 10% buffered formalin. Afterwards, the fauna was preserved in 70% ethanol and sorted in different taxa.

Sipunculans were identified to the species level (Cutler 1994) through analysis of their internal and external anatomy, observing typical structures with taxonomic value. Length and width of sipunculans specimens and length and internal diameter of their shelters were logged.

In addition to sipunculans, species providing relevant ecological information were also recorded. This is the case of species of families inhabiting shelters, like Syllidae or Paguridae, species from the order Tanaidacea (mainly from the family Apeudidae), and organisms generating new shelters, like gastropod species or the serpulid *Ditrupa arietina*. The additional samples used to characterise the sediment were processed in the same way to samples previously used to characterise the initial granulometry and organic matter of the sediment.

Descriptive statistics was used to characterise the size distribution of the different sipunculan species and the two types of shelters present in the study area (polychaete tubes and gastropod shells). Pearson's chi-squared test (χ^2) was used to detect differences in occupancy rate between the different types of shelter used by sipunculans and hermit crabs.

Since normality and homogeneity of the variances for this data were not possible to accomplish even when transformed, nonparametric methods were used to

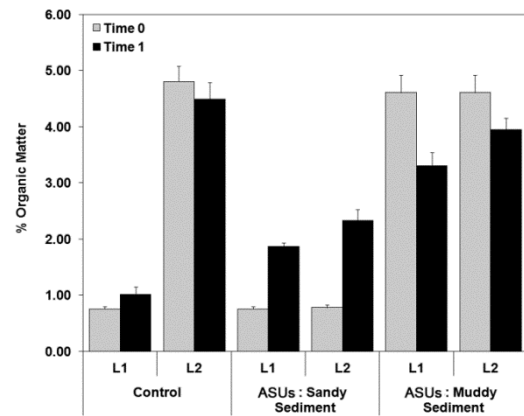


Fig. 5.4. Organic Matter (%) from the different localities and sampling units (Mean \pm SE). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (t-test, $N = 4$).

analyse the data. Mann–Whitney U was the statistical test chosen to detect differences in species abundances, shelter availability and shelter sizes between different treatments and between different times in the control samples.

To detect changes in natural communities during the experiment, Student's *t*-test was used to evaluate the changes in sipunculan species abundance in control samples before and after the deployment of experimental units.

Relative abundance (RA) of each species was calculated and Soyer's (1970) Frequency Index (F) was used to determine the species frequency in the study area. Results were evaluated as constant ($F \geq 50\%$), common ($50\% > F \geq 25\%$) and rare ($F < 25\%$). Pearson's product-moment correlation coefficient (*r*) was used to detect a possible correlation between the length and width of the shell/tube-dwelling sipunculans and the length and the internal diameter of their shelter.

5.4—Results

The fauna analysis reported 85 sipunculans from four different species (Tab. 5.1; Fig. 5.2); *Aspidosiphon muelleri* (57 specimens; Relative Abundance, RA = 69.5%; Frequency of occurrence, F = 45.83%),

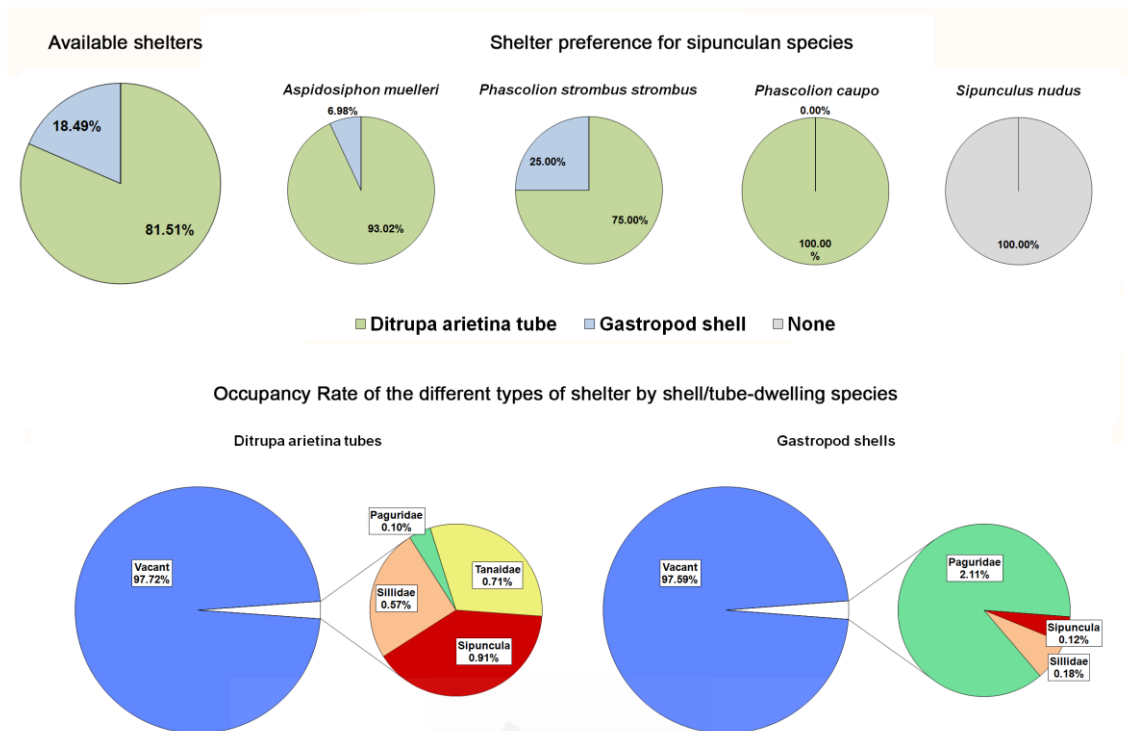


Fig. 5.5. Shelters used by different sipunculan species and other organisms inhabiting these shelters.

Phascolion caupo (three specimens; RA=3.53%; F=4.17%), *P. strombus strombus* (10 specimens; RA=11.76%; F=20.83%) and *Sipunculus nudus* (15 specimens; RA=17.65%; F=31.25%). According to Soyer's (1970) frequency index (F) *A. muelleri* and *S. nudus* were categorised as common species and *P. caupo* and *P. strombus* were categorised as rare species.

Sediment from the control samples from both localities kept a homogeneous granulometry between different sampling periods (Fig. 5.3). In the case of the artificial sampling units, fine fractions increased slightly in the ASUs with sandy sediment in both localities; whereas in the ASUs with muddy sediment, the fraction of medium sand in L1 were higher than in the initial sampling, but not in L2. Organic matter increased in L1 during the deployment of the experiment (Fig. 5.4). Moreover, organic matter also increased in

the ASUs filled with sand from both localities. On the other hand, organic matter decreased in the trays with muddy sediment located in L1 and L2.

The 18.49% of the available shelters in the ASUs corresponded to gastropod shells, and 81.51% were polychaete tubes (Fig. 5.5). Three of the sipunculan species (*Aspidosiphon muelleri*, *Phascolion caupo* and *P. strombus strombus*) were always recorded inhabiting some kind of shelter, while *Sipunculus nudus* were always found bare into the sediment. *Aspidosiphon muelleri*, *P. caupo* and *P. strombus strombus* were found more frequently inhabiting polychaeta tubes (in 93.02%, 100% and 75.00% of the cases respectively) than gastropod shells (6.98%, 0.00% and 25.00% respectively).

The 97.59% of the gastropod shells available as shelters were unoccupied. Hermit crabs were the main group using

these shelters (2.11% of total gastropod empty shells) and 0.12% were occupied by sipunculans. For empty tubes of *Ditrupa arietina*, 97.72% of the recorded shelters were vacant and Sipuncula was the main group inhabiting this type of shelter (0.91%). Pearson's χ^2 test yielded differences in occupancy rate for the different types of shelters used by sipunculans and hermit crabs. Sipunculans selected preferably *Ditrupa arietina* tubes whereas hermit crabs used gastropod shells ($P < 0.001$).

The average width of the three shell-dwelling sipunculan species (*A. muelleri*, *P. caupo* and *P. strombus strombus*) were very similar, matching with the average internal diameter of the *D. arietina* tubes (Fig. 5.6). However, the averaged internal diameter of the gastropod shells—measured at the operculum—was slightly larger. On the other hand, the averaged width and length of *S. nudus* were larger than the other sipunculan species.

A high natural variability was observed in sipunculan species composition between control samples from the initial sampling and control samples at the end of the experiment (Tab. 5.1). It should be noted the absence of *Phascolion caupo* at both sites and sampling times and a higher abundance of *Aspidosiphon muelleri* in L1 than in L2. Nonetheless, significant differences were not detected.

The serpulid polychaete *Ditrupa arietina* and the family Paguridae found in the ASUs were significantly more abundant in L1 than in L2 (MANN-WHITNEY; $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively) (Fig. 5.7). On the other hand, species from the order Tanaidacea were only present in L2 (MANN-WHITNEY; $P < 0.01$). Regarding sipunculan species, *A. muelleri* and *S. nudus* had higher abundance in L1 than in L2 (MANN-WHITNEY; both $P < 0.01$).

Abundance of individuals for the families Paguridae and Syllidae were higher in ASUs with shelters available than in ASUs with shelters removed (MANN-WHITNEY; both $P < 0.05$). *Aspidosiphon muelleri* was also significantly more abundant in ASUs with shelters available (MANN-WHITNEY; $P < 0.01$), reaching to values 10 times higher (42.62 ± 9.24 and 4.06 ± 2.77 ind m^{-2} respectively).

Although results were not significantly different, abundance of *A. muelleri* was higher in sandy sediment (28.41 ± 9.31 ind m^{-2} ; Mean \pm SE) than in muddy sediment (18.26 ± 7.24 ind m^{-2}). *Phascolion caupo* presented the same trend (4.06 ± 4.06 and 2.03 ± 2.03 ind m^{-2} respectively), while for *S. nudus* abundances were very similar (12.18 ± 5.03 and 10.15 ± 4.89 ind m^{-2} respectively).

Moreover, abundance of *P. strombus strombus* was higher in muddy sediment (14.21 ± 7.24 ind m^{-2}) than in sandy sediment (4.06 ± 2.77 ind m^{-2}). Other fauna

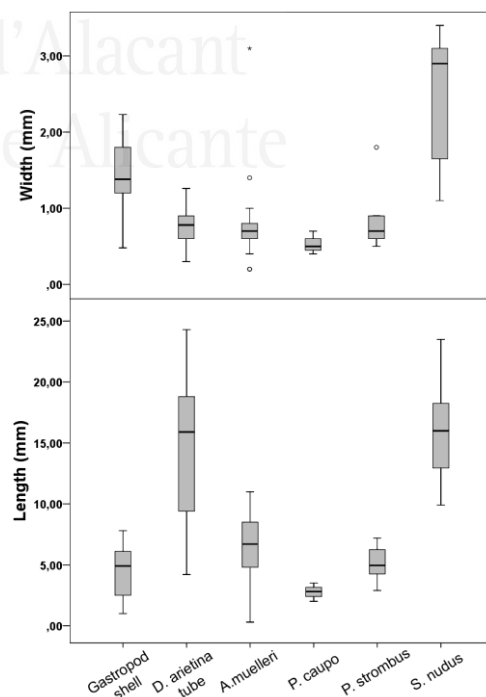


Fig. 5.6. Width and length averaged for the different sipunculan species and the two types of shelter studied.

related to shelter availability, such as gastropods, live specimens of the serpulid polychaete *D. arietina*, hermit crabs or syllids were more abundant in muddy sediments, while tanaid abundance was slightly higher in sandy sediment.

As might be expected, average length (mm) and number of empty tubes of *D. arietina* and empty gastropod shells —recorded in the ASUs six months after the deployment— were higher in samples in which shelters had been added than in samples in which shelters had been removed (MANN WHITNEY; $P < 0.01$) (Fig. 5.8). Moreover, number of *D. arietina* tubes was higher in sandy sediment than in muddy sediment (MANN WHITNEY; $P < 0.01$).

A significant linear correlation was detected between the body width of *Aspidosiphon muelleri* and the internal diameter of the tube used as shelter (Fig. 5.9) (PEARSON; $N=41$; $r=0.796$; $P < 0.001$). The same trend is observed for *Phascolion strombus strombus*, but results were not significant due to the low number of specimens of this species, (PEARSON; $N=6$, $r=0.680$). A significant relation between the body length of *A. muelleri* and the length of its shelter by a quadratic regression (PEARSON; $N=41$; $r=0.597$; $P < 0.001$) was also detected.

5.5—Discussion

Two localities with different sediment granulometry and shelter availability have been studied. Sipunculan abundance in the control samples, as well as in previous studies (Ferrero-Vicente *et al.* 2011), was higher in L1 —the locality with a higher shelter availability and coarser sediment— than in L2.

The purpose of using ASUs was separating the factors to analyse them individually (Bishop 2005; Czerniawska-Kusza 2004). On the basis of this study, shelter availability appears as the main factor controlling the recruitment of shell/tube-dwelling sipunculans, as well as other shell/tube-dwelling organisms.

Aspidosiphon muelleri, *Phascolion caupo* and *Phascolion strombus strombus* have behaved as strict shell-dwellers for the studied area, since they were collected inhabiting some of these shelters in 100% of cases. Although previous studies in this area reported *P. caupo* inhabiting a shelter for 80% of the specimens (Ferrero-Vicente *et al.* 2012), 94.17% in the case of *A. muelleri* and 66.67% in *P. strombus strombus* (Ferrero-Vicente *et al.* 2011), it might be due to the fact that some individuals left the shelter during the fixation process. Likely near 100% of individuals from these species

Table 5.1. Average abundance of sipunculans (Mean±SE) in the different type of samples (Control; ASU=Artificial Sampling Unit). T=time (0=initial deployment; 1=six months after); ST=sediment type; S=shelter availability (Y= Yes; N= No).

Type	Time	L	ST	S	<i>A. muelleri</i>	<i>P. caupo</i>	<i>P. strombus strombus</i>	<i>S. nudus</i>
Control	0	L1	Sand	Y	5.25 ± 1.93	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Control	0	L2	Mud	Y	0.25 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.26
Control	1	L1	Sand	Y	3.00 ± 0.71	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.25	0.25 ± 0.25
Control	1	L2	Mud	Y	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.29
ASU	1	L1	Sand	Y	2.50 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.25	0.75 ± 0.48
ASU	1	L1	Sand	N	0.25 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.75 ± 0.25
ASU	1	L1	Mud	Y	2.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.50 ± 0.65	0.50 ± 0.29
ASU	1	L1	Mud	N	0.25 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.50
ASU	1	L2	Sand	Y	0.75 ± 0.25	0.50 ± 0.50	0.25 ± 0.25	0.00 ± 0.00
ASU	1	L2	Sand	N	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ASU	1	L2	Mud	Y	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ASU	1	L2	Mud	N	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.25	0.25 ± 0.25

live inside a shelter, as we have noticed in the present study. At least in the studied habitats (sandy and muddy sediment), in which these discarded shells and tubes are the only resource available capable of being used by sipunculans as protection against

predation.

Most shelters available in the samples remained without being used by any organism, 97.59% in the case of the gastropod shells and 97.72% in the case of

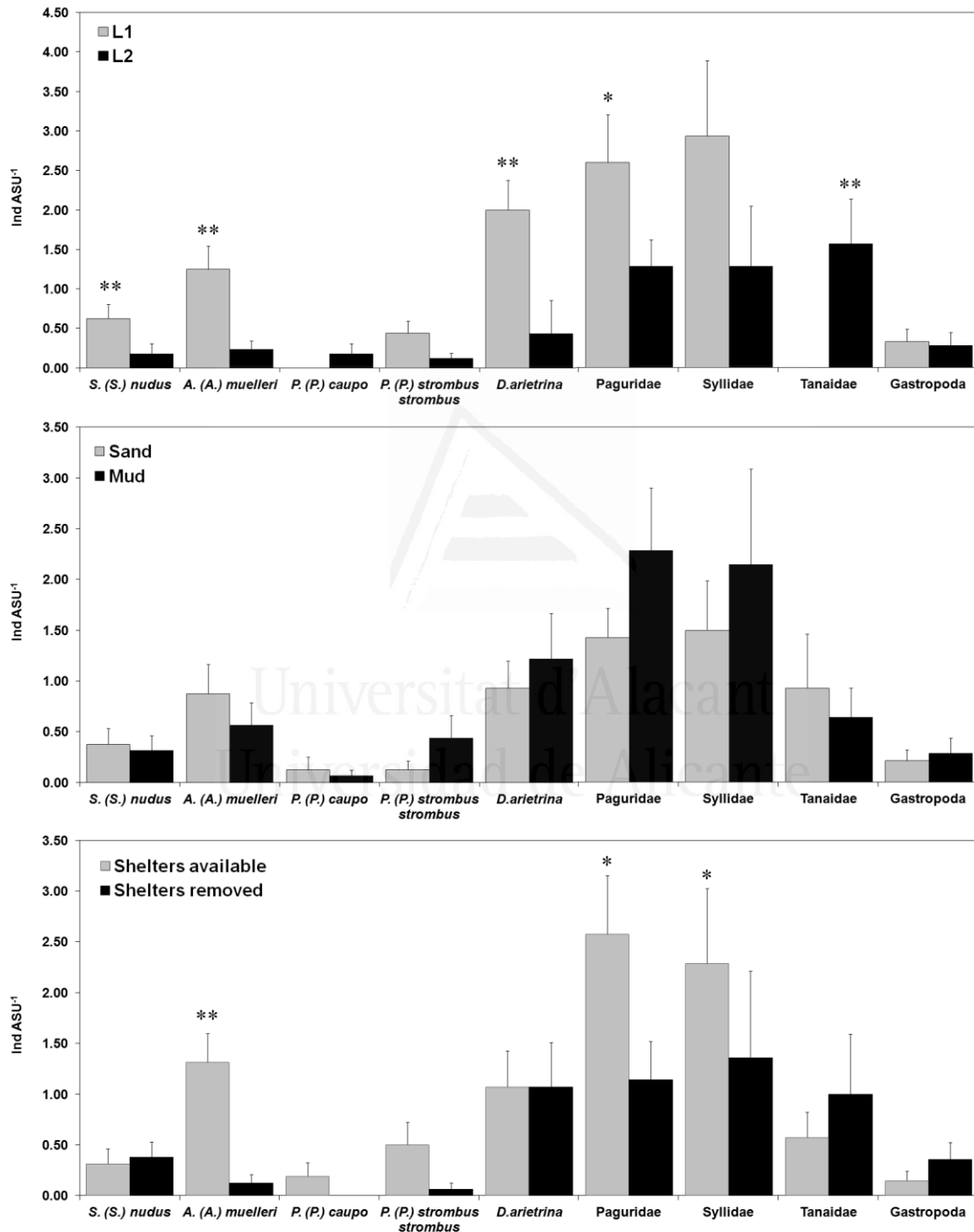


Fig. 5.7. Abundance of sipunculan species and taxonomic groups of interest (ind m⁻²; Mean ±SE) from the different treatments (locality, sediment type and shelter availability). **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 (MANN-WHITNEY; N=16).

tubes of polychaete. This fact contrasts with the 90% occupancy by *Phascolion strombus strombus* reported by Hylleberg in the coast of Sweden (1975), where the supply of shells was clearly a limiting resource in the distribution of the species for this area. In our case, many of these shelters could not be available for use due to them being buried in the sediment, or could be directly rejected by sipunculans, because they are filled with sediment or have an unsuitable size for their specific requirements. Even so, the low ratio of occupancy suggests that the number of shelters might not be the only factor involved in the proliferation of sipunculan populations in our study area, although their presence is critical to allow their development, as indicated by the fact that shell-dwelling species (*Aspidosiphon muelleri*, *P. strombus strombus* and *P. caupo*) were always reported inhabiting a shelter. Moreover, the density of *A. muelleri* was significantly higher in samples in which shelters were added, reaching values 10 times higher.

Some individuals of shell/tube-dwelling sipunculans have been found in samples in which shelters were not added, but they all were always found inside a tube or a shell. Both average size of polychaete tubes and gastropod shells were higher in the case of samples with shelters available. This might be because smaller shelters are more likely to be overlooked when removing the shelters of the sediment, remaining in the samples considered as without shelters. Furthermore, the supply of new shelters from the growing populations of *Ditrupa arietina* and Gastropoda in the ASUs has to borne in mind. High densities of *D. arietina* (living specimens) were recorded in the samples, with a significantly higher recruitment in samples from the locality L1.

Sipunculan species recorded have a small size and they seem to occupy the whole

width of the shelter they inhabit. This fact makes polychaete tubes a more appropriate shelter for sipunculans, since the sipunculan width range is similar to the diameter of these tubes, being also lighter than gastropod shells. The correlation between sipunculan width and the internal diameter of the tube was strong in the case of *Aspidosiphon muelleri*. In the case of *Phascolion caupo* and *Phascolion strombus strombus*, the low number of individuals does not allow obtaining significant results, although the same trend is observed in *P. strombus strombus*. Hylleberg (1975) observed experimentally how *P. strombus strombus* left the tube after a short time when the diameter of the tube was bigger than the contracted animal. It is likely that this excess width could facilitate the extraction of the animal by predators, preventing the fixation to the shelter by the holdfast papillae even when the animal increases its coelomic pressure. Moreover, it also causes an increased maintenance effort to keeping clean the inside of the shelter. With regard to the tube length, and using a quadratic regression model, a significant relation with body length of *A. muelleri* was found. Large variations can be found in the length of the tube of similar length specimens. While small specimens (<5 mm) of *A. muelleri* seem to have a length close or slightly smaller than the shelter length, larger individuals of approximately 5-10 mm of body length can occupy polychaete tubes ranging from 6 to 24 mm. It is likely the active selection of a suitable tube length of the shelter —by adults of *A. muelleri*— does not go further than ensuring that the whole sipunculan body fits inside the shelter. They wait until the tube is completely occupied before deciding to move to a larger one, where their mobility could decrease. This behaviour was described by Hylleberg (1975), showing as *P. strombus strombus*

left its shelter just when all available space of the shelter—in a contracted state of the animal— was occupied for its body.

Unlike hermit crabs, which selected actively gastropod shells, shell/tube-dwelling sipunculans selected preferably *Ditrupa arietina* tubes. In the case of gastropod shells, which present a wider orifice, *P.*

strombus strombus and *P. caupo* covered the orifice of the shelter with sediment and mucus, leaving only a suitable opening for evagination of the introvert (Fig. 5.2D). *Aspidosiphon muelleri* did not show this ability, as using large gastropod shells with wide apertures might be a worse choice for them. Moreover, this behaviour may

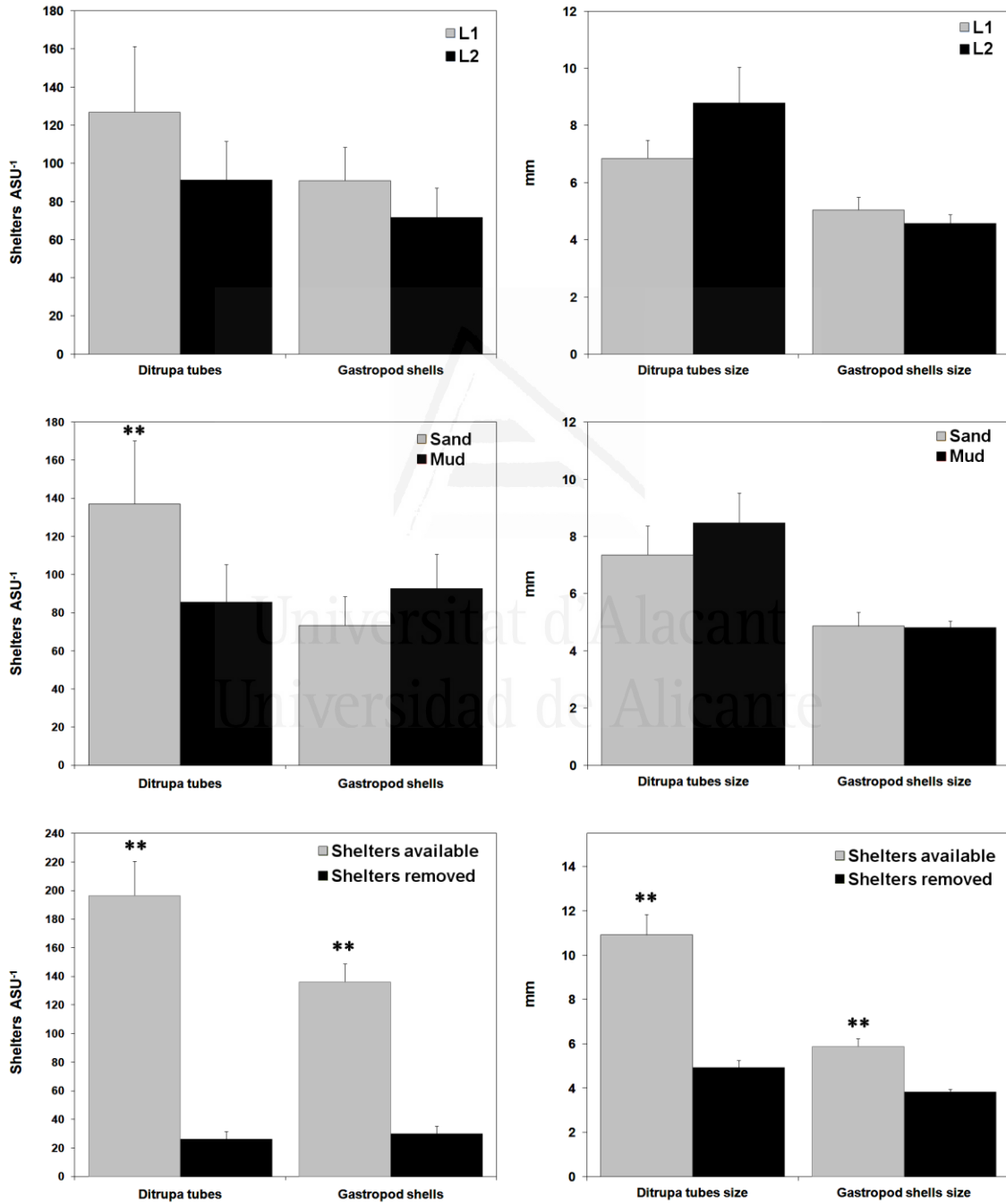


Fig. 5.8. Density (shelters m⁻²; Mean ±SE) and size (mm) of the shelters from the different treatments (locality, sediment type and shelter availability). **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 (MANN-WHITNEY; N=16)

suppose a higher energetic cost to these species.

On the basis of this work, it is difficult to assess the competition for this resource between different species or taxonomic groups. Syllidae and Tanaidacea seem to prefer tubes to gastropod shells, particularly species from the order Tanaidacea, which had no presence in gastropod shells. These two families could be competing for the shelters, since it is likely sipunculans lack the ability to remove these animals from their shelters and vice versa. To the contrary of sipunculans, mostly of Syllidae species inhabited shelters filled in with sediment. Probably they are only occupying shelters buried into the sediment. Polychaetes had been reported sharing a shelter with different sipunculan species many times, being *Aspidosiphon muelleri* one of the species presenting this relation (Cutler 1994; Ferrero-Vicente *et al.* 2011). Instead, hermit crabs had a shelter occupancy 21 times higher for the gastropod shells than *Ditrupa arietina* tubes (2.11% versus 0.10%), matching with the preference noted by Morton and Briton (1995). Kellogg (1976) made an experiment to analyse the ability of the hermit crab *Pagurus longicarpus* to extract a sipunculan from its shelter, concluding that it is very unlikely to happen in the field, and considering shells occupied by sipunculans as unavailable for hermit crabs. Under these facts and in our case of study, a direct physical confrontation to occupy a determinate shelter seems unlikely.

Whereas the shelter availability appears as a significant factor on the distribution of shell/tube-dwelling sipunculans, the sediment granulometry did not turn out to be of such importance. Significant differences regarding the sediment type, neither in sipunculan abundances nor in the other taxonomic groups analysed, were

found. Wu and Shin (1997) suggested that many of the benthic species can colonise both sediment types and that factors other than sediment particle size and organic content may play a significant role in determining colonisation of these species; the availability and abundance of benthic larvae/adults may be more important than sediment characteristics in determining benthic settlement. They also observed an increase in faunal similarity between mud and sand over the study period (three-seven months), implying that the importance of sediment characteristics to benthic colonisation decreased with exposure time. Snelgrove and Butman (1994) also suggested that animal-sediment relationships are much more variable than traditionally purported, and there are many factors involved in the infaunal invertebrate distributions as important or more than sediment grain size.

Shell-dwelling species showed different responses: abundance of *Aspidosiphon muelleri* was larger in ASUs of sandy sediment than in ASUs of muddy sediment; *Phascolion caupo* had similar abundances in both types of sediment; and *Phascolion strombus strombus* showed the opposite trend, with abundance three times higher in muddy sediment than in sandy sediment. Despite these diverse trends, no significant results were concluded for any of the sipunculan species regarding to the sediment type, therefore, shelter availability seems to be the major factor involved in the distribution of this species according to the results obtained.

With regard to the different localities studied, results show differences in abundance for most of the species studied (Fig. 5.7). Locality 1 seems to be more appropriate for the recruitment and development of sipunculan populations, since *Sipunculus nudus* and *Aspidosiphon*

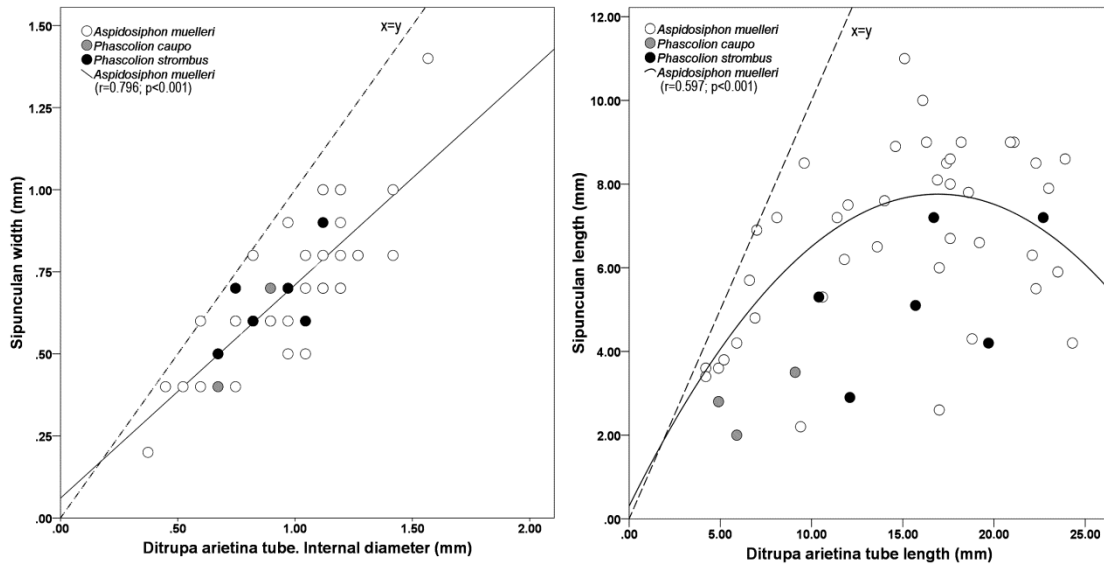


Fig. 5.9. Correlation equations between sipunculan body size and shelter size.

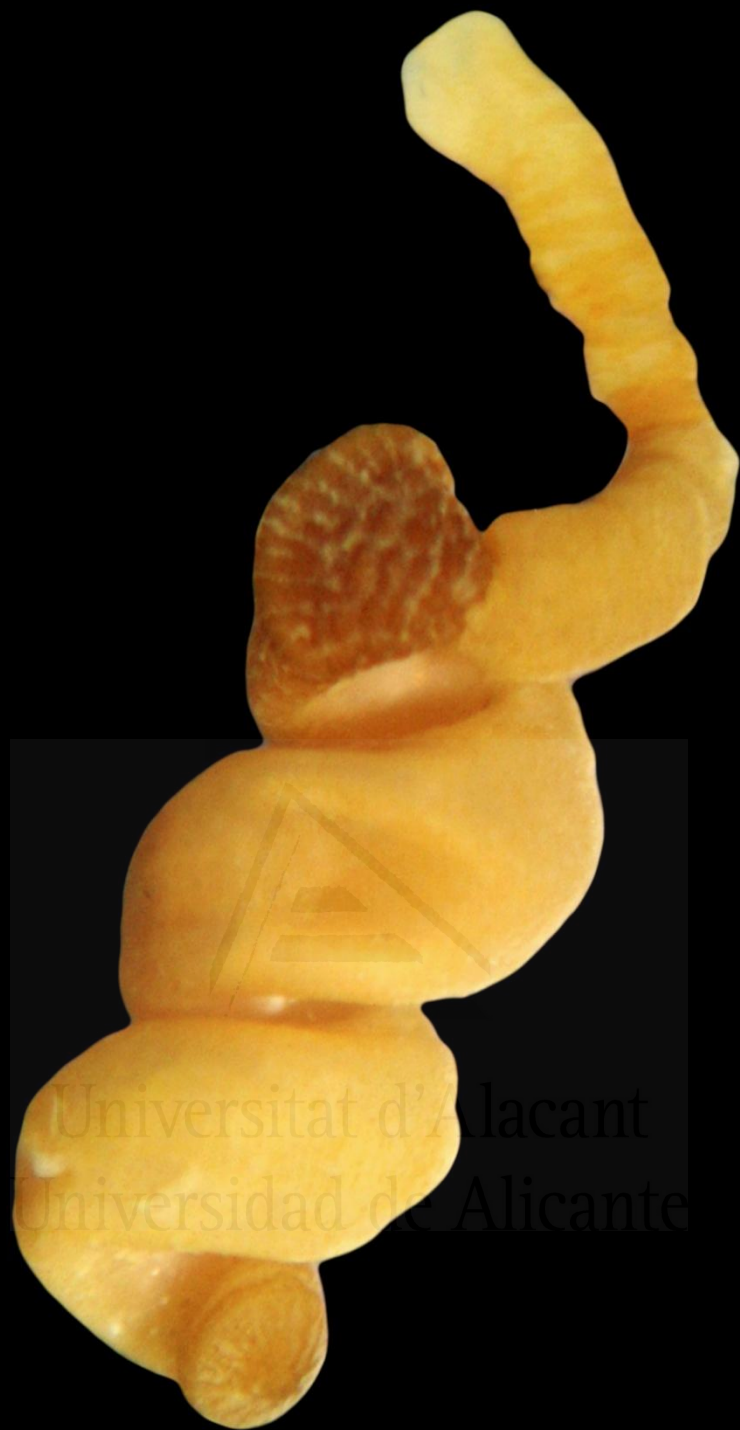
muelleri were significantly more abundant at this locality. Recruitment of *Ditrupa arietina* and species from the family Paguridae were also higher in L1. Differences in sipunculan recruitment were expected, since its abundance was larger in L1 for previous studies in this area (Ferrero-Vicente *et al.* 2011). It is known that macrobenthic fauna shows a high spatio-temporal variation in soft substrata (Cortes *et al.* 2012). Inasmuch as we have used artificial sampling units to isolate the factors evaluated in this work, sediment granulometry and shelter availability can be discarded as the factors inducing these differences between localities, since samples were equivalent. These differences might be explained by larval/adults availability since other factors that have been hypothesised to produce differences in sipunculan abundance, such as hydrodynamics, biological interactions,

food particles diversity, or primary production in the water column among others (Snelgrove 1994; Snelgrove & Butman 1994; Wu & Shin 1997) are not expected to change between close localities.

5.6—Conclusions

Shelter availability was the main factor explaining the distribution of shell-dwelling and/or tube-dwelling sipunculans, whereas significant differences were not detected in sipunculan abundance between samples with different granulometry. Therefore, shelter availability can be considered as a potential limiting resource for those sipunculan species that usually use a shell or tube as shelter.

On the other hand, shell/tube-dwelling sipunculans seem to prefer *Ditrupa arietina* tubes over gastropod shells; likely because of tube size and shape fitting better with the sipunculan specific requirements.



**6. Observations on the ecology
and reproductive biology of
Aspidosiphon muelleri Diesing 1851**

Photo: *Aspidosiphon muelleri* Diesing 1851



Published as:

FERRERO-VICENTE, L.M., MARCO-MÉNDEZ, C., LOYA-FERNÁNDEZ, Á. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2014) Observations on the ecology and reproductive biology of the sipunculan worm *Aspidosiphon muelleri* in temperate waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315414000812>

6. Observations on the ecology and reproductive biology of *Aspidosiphon muelleri* Diesing 1851

6.1—Abstract

A population of the sipunculan worm *Aspidosiphon muelleri* Diesing 1851, located in temperate waters of the western Mediterranean Sea, was monitored monthly for a year. Some aspects related to its ecology and reproductive biology are shown in the present work.

Sex ratio for this population was close to 1:1 (54% females vs. 46% males), thus indicating a dioecious reproduction, although a lack of sexual dimorphism. Oocytes were detected in females from 4–5 mm; this size might be reached by *A. muelleri* in few months. The population density increased notably during the summer (June–August). Spawning event date was indirectly estimated from the average size of the oocytes and the percentage of females with presence of free oocytes in the coelom. Both variables were significantly correlated to shallow water temperature (PEARSON; $P=0.003$ & $P=0.001$ respectively). Oocyte size was also significantly correlated to average irradiance level (PEARSON; $P=0.044$). Spawning took place between August and September (when the water temperature is getting close to its annual maximum) and may last only a few weeks in these temperate waters. Abundance of *A. muelleri* decreased drastically in September, likely as a consequence of the spawning event effort.

Bivalves of the species *Epilepton clarkiae* (Clark 1852) were collected together with specimens of *A. muelleri* inhabiting inside the polychaete tubes used as shelters by the sipunculans, with a prevalence of 11.64%. In a less extent some Foraminifera were also reported attached to the body of the sipunculans.

6.2—Introduction

Aspidosiphon muelleri Diesing 1851 is the most widespread species of the family Aspidosiphonidae and presents a cosmopolitan distribution in temperate to subtropical waters. *Aspidosiphon muelleri* is also the most eurytopic member of the genus and lives in a wide variety of temperatures and depths, being more abundant in littoral waters (Cutler 1994, Murina 1975). In the Mediterranean Sea, it is the predominant littoral sipunculan species in the western basin, and it is common in both soft and hard substrata (Açık 2008b, 2011; Açık *et al.* 2005; Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2013ab; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999;

Papazacharias *et al.* 1998; Saiz-Salinas 1993a).

Aspidosiphon muelleri has been reported from many different habitats and associations within the Mediterranean Sea; associated with the algae *Padina sp.* and *Cystoseira crinite* Duby 1830, associated with sponges (Açık *et al.* 2005; Koukouras *et al.* 1985), as associated infauna of the echiuran *Bonellia viridis* Rolando 1821 (Schembri & Jaccarini 1978), in bare rock, inside the rhizome of the seagrass *Posidonia oceanica* and on coralligenous substrata (*Cladocora caespitosa* (Linnaeus 1767) and *Pinna nobilis* Linnaeus 1758) (Açık 2008b; Açık *et al.* 2005). Drilling activity has been observed in individuals

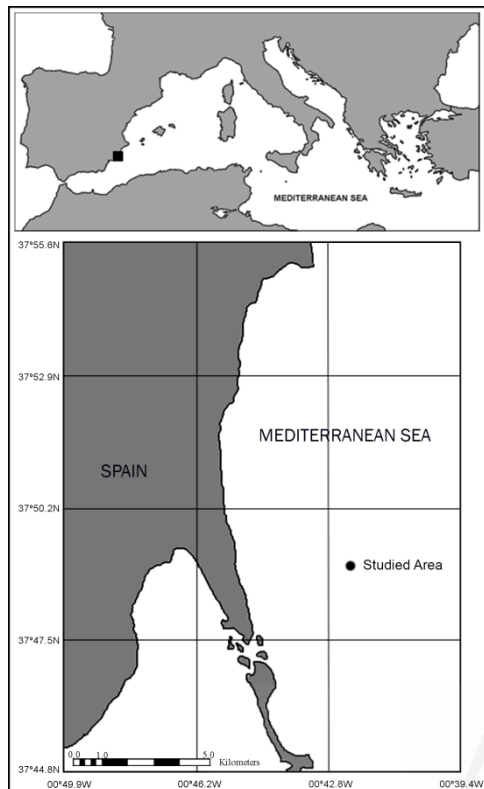


Fig. 6.1. Map showing the location of the studied population of *Aspidosiphon muelleri*.

inhabiting chalk rock from the coast of Israel, even if the drilling mechanism is unknown (Por 1975). *Aspidosiphon muelleri* has also been reported in soft substrata, from sandy to muddy bottoms along the Mediterranean Sea, often inhabiting gastropod shells or polychaete tubes (Açik 2008b; Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2013ab; Murina *et al.* 1999; Klaoudatos *et al.* 2006; Papazacharias *et al.* 1998; Saiz-Salinas 1986, 1993a; Saiz-Salinas & Villafranca-Urchequi 1990; Somaschini *et al.* 1998). It is known that *A.*

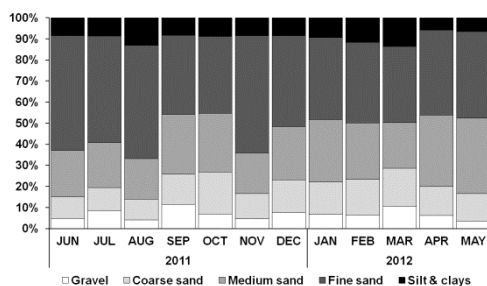


Fig. 6.2. Granulometry in the studied area for each month.

muelleri prefers to use empty tubes of the serpulid polychaete *Ditrupa arietina* (Müller 1776) as a shelter in soft sediment, and its abundance could be limited by the availability of this particular resource (Ferrero-Vicente *et al.* 2013b). *Ditrupa arietina* is a widespread endobenthic species, common in the Mediterranean where it achieves high densities. Although *D. arietina* is considered temporal fauna in altered sediment (Picard 1965), there is evidence that its abundance has increased in some areas of the western Mediterranean (Bolam & Fernandes 2002; Grémare *et al.* 1998ab; Morton & Harper 2009; Labruno *et al.* 2007), showing seasonal peaks of abundance in May-June (Sardá *et al.* 1999). *Ditrupa arietina* lives for approximately 2 years, and after its death (presumably predated by a prosobranch naticid), its tube becomes available for secondary colonization by *A. muelleri* (Morton & Salvador 2009; Morton & Harper 2009).

Although external signs of sexual dimorphism are lacking, sipunculans are typically dioecious, but cases of hermaphroditic species have been reported (Cutler & Cutler 1986; Gibbs 1975). Gametes first develop in the coelomic fluid, before being taken up into the nephridia. They are stored for a short time in the nephridia, and finally released by way of nephridiopores after a short period of storage. Fertilization is external in all cases (Cutler 1994; Maiorova & Adrianov 2005, 2007; Rice 1975a, 1989). Asexual reproduction is known to occur within the genus *Aspidosiphon* (Rice 1970), in *Aspidosiphon elegans* (Chamisso & Eysenhardt 1821), which is considered to be an alien species in the Mediterranean Sea (Açik 2008b). Nonetheless, this reproductive ability has not been reported in *A. muelleri*, and little is known about the reproductive cycle of this species. Most of sipunculan species with a well-known life

cycle show abbreviated development, omitting some stage of the Sipuncula development (trochophore stage, pelagosphera stage, or having a lecithotrophic pelagosphera) (Rice 1976). Species with a known life cycle are *Apionsoma misakianum* (Ikeda 1904) (Rice 1981), *Nephasoma pellucidum* (Keferstein 1865) (Schulze & Rice 2009), *Phascolion strombus strombus* (Montagu 1804) (Åkesson 1958; Wanninger *et al.* 2005), *Phascolion cryptum* Hendrix 1975 (Rice 1975b), *Phascolosoma turnerae* Rice 1985 (Rice *et al.* 2012), *Siphonosoma cumanense* (Keferstein 1867) (Rice 1988), *Themiste pyroides* (Chamberlin 1919) (Adrianov *et al.* 2011; Rice 1967), *Themiste lageniformis* Baird 1868 (Pilger 1987), *Themiste alutacea* (Grube 1858) (Rice 1975b) and *Thysanocardia nigra* (Ikeda 1904) (Adrianov & Maiorova 2010; Rice 1967).

However, to our knowledge, the genus *Aspidosiphon* presents a larval development with two pelagic stages: trochophore and planktotrophic pelagosphera larvae. This pelagosphera larva increases notably in size during its long period in the water (1–6 months) before its metamorphosis to a vermiform juvenile, which could make possible an interoceanic communication between different populations. (Cutler 1994; Scheltema & Hall 1975). Although planktotrophic pelagosphera larvae of many Aspidosiphonidae have been collected in plankton tows, their complete life cycles are still unknown (Rice 1981; Hall & Scheltema 1975).

The aim of the present study is to describe some aspects related to the reproductive biology and ecology of *Aspidosiphon muelleri* in temperate waters.

6.3—Material and methods

6.3.1 Study area and sampling design

The study area is located near the shoreline of San Pedro del Pinatar (SE Spain) (Fig. 6.1). Samples were randomly taken around the coordinates 37°48.85'N; 0°42.37'W (always keeping less than 50 meters away from this point). The area of study was selected due to its suitable features for the study of *Aspidosiphon muelleri*. On one hand, the sipunculan assemblages at this bottom are well characterized, being *A. muelleri* an abundant species in this area (Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2013a), thus ensuring the presence of individuals which is irregular in many areas of the western Mediterranean Sea (Ferrero-Vicente *et al.* 2013a). On the other hand, there is a high density of empty tubes and shells available to be used as shelter by *A. muelleri*, which allows the assessment of some aspects of the ecology of *A. muelleri* related with these resources (Cutler & Cutler 1989; Saiz-Salinas 1993a; Ferrero-Vicente *et al.* 2013ab).

Eleven monthly samples were taken from June 2011 to May 2012 using a Van Veen grab (0.028 m²) for a total of 132 samples. One of these samples was assigned to sediment analysis (granulometry, organic matter, pH, and Eh). The ten remaining samples were sieved (500 µm) and used to study the ecology and reproductive biology of *A. muelleri*. Depth, temperature and bottom salinity were also measured using a CTD sensor (RBR -XR-420/620).

6.3.2 Laboratory work and data process

Redox potential (Eh) and pH were measured in the samples designated to the sediment analysis immediately after collection. Organic matter content was measured from a 30 g subsample, taken

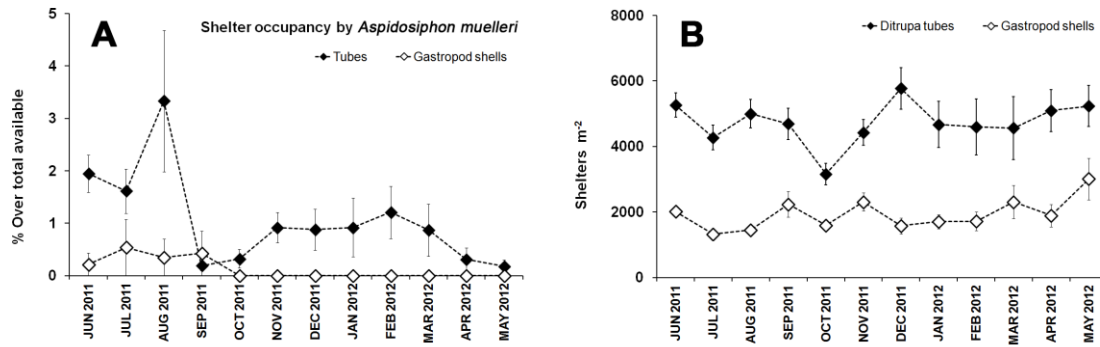


Fig. 6.3. [A] Ratio of shelter occupancy by *Aspidosiphon muelleri* for each month; [B] Shelters density in the area for each month.

from the shallow layer of the sediment (0–5 cm), through weight loss on ignition after 4 hr at 500°C inside a muffle furnace. The granulometric analysis was carried out following the methodology described by Buchanan (1984), sorting the samples in five categories: gravel, coarse sand, medium sand, fine sand and silt and clays.

Ten replicates from every month were used for the fauna analysis (120 samples). Samples were sieved through a 500 µm mesh screen to separate the macrofauna and then fixed in 10% buffered formalin. Afterward, the fauna was preserved in 70% ethanol and sorted into different taxa. Abundances of other ecologically related species were also monitored and grouped into shelter suppliers (gastropods and *Ditrupa arietina*) or shelter dwellers (hermit crabs, polychaetes and tanaids). Sipunculans were identified to the species level (Cutler, 1994) through analysis of their internal and external anatomy using a binocular scope and identifying characteristics of taxonomically-relevant structures. Length and trunk thickness of each specimen and shelter were logged. Specimens of *A. muelleri* were dissected; gender was determined when it was possible, and oocytes present in the coelom were photographed and their size measured by image analysis techniques. We used 50

oocytes of each female specimen to calculate its average size in every month.

Shelter availability (shelters m⁻²) was calculated for every one of the samples used for the fauna analysis. Shelters usually habited by sipunculans (according to previous observations since 2005) were sorted into empty tubes of *D. arietina* and empty shells of gastropods.

Univariate techniques and descriptive statistics were used to analyze the population dynamics of *A. muelleri* and its reproductive behavior, moreover to define its possible relation with the abiotic factors of the environment. Relation between specimen size and shelter size was evaluated (Pearson's *r* correlation) as well as relation between reproductive variables (% females with presence of free oocytes in the coelom and oocytes average size) and possible trigger factors for reproductive activity (surface/bottom temperature and irradiance).

6.4—Results

6.4.1 Abiotic factors

Granulometry of the sediment was homogeneous throughout the studied period (Fig. 6.2). Sediment in the area is dominated by fine sand (43.8 ± 2.17%) and medium sands (25.9 ± 1.6%), with a presence of bioclasts, including gastropod

shells and serpulid polychaete tubes. Depth ranged from 34.2 to 36.5 m. Presence of shelters in the sediment was high and constant for the whole study period, with a greater density of tubes than gastropod shells (Fig. 6.3B). Average shelter densities were 4725 ± 174 tubes m^{-2} and 1934 ± 99 gastropod shells m^{-2} , respectively. Tubes represented 70.9% of the total shelters available, while gastropod shells represented the remaining 29.1%. Organic matter content ranged between 0.76–1.95% (Fig. 6.4F), and the redox potential (Eh) was also variable, but lower values were recorded during the warmer months (Fig.

6.4D). Eh values were negative throughout the year, which shows the reductive environment of this sediment.

Water temperature varied seasonally, following previous months' irradiance level (Fig. 6.4A and 6.4E). Seabed temperature fluctuated annually, reaching the interannual peak (24.5 °C) in October 2011 and the interannual low in March 2012 (13.46 °C). There is a clear stratification in the water column that synchronizes with the months of maximum irradiance and weather stability, and there may be as much as 6.8 °C difference detectable between

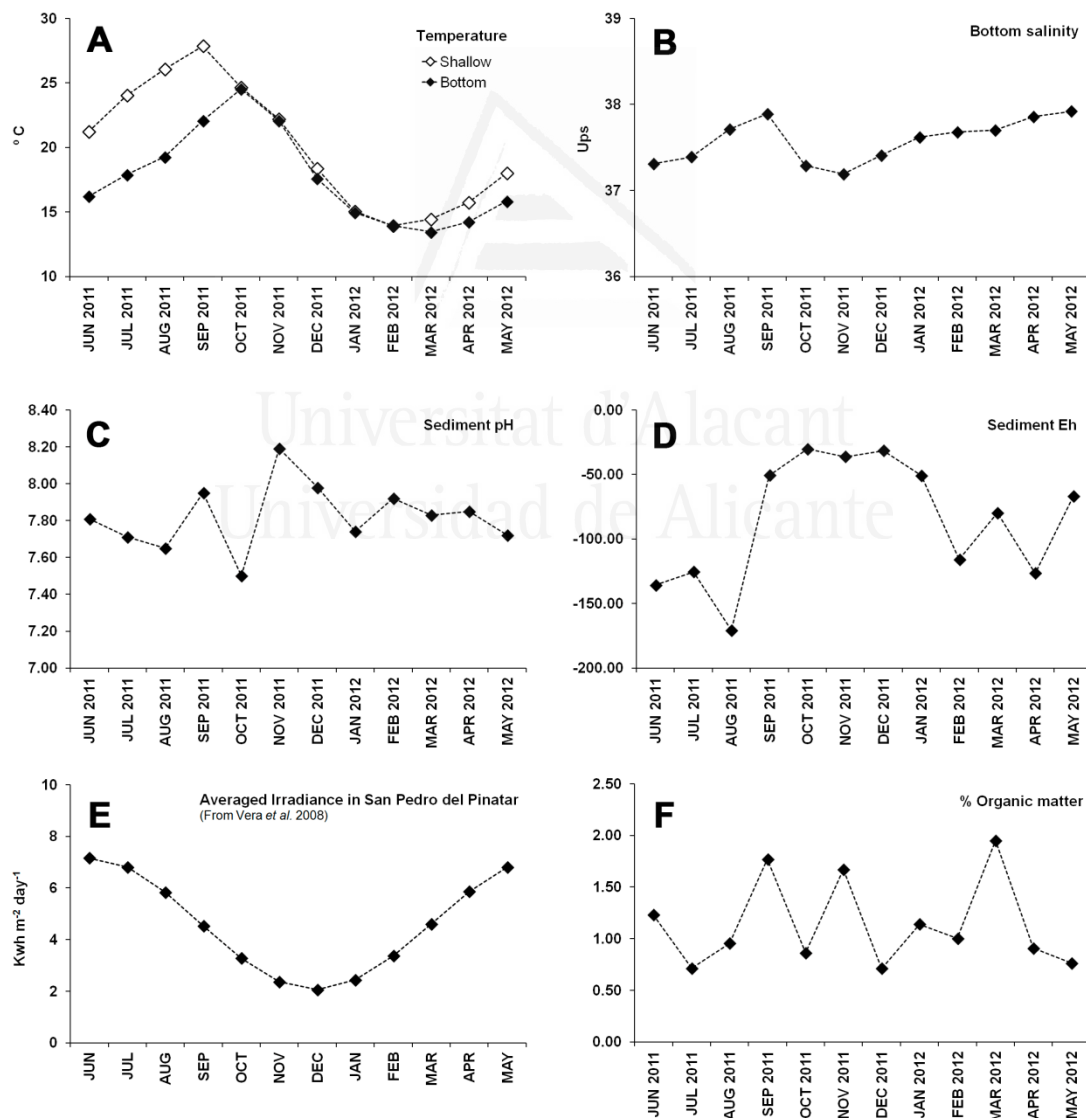


Fig. 6.4. Charts from the different parameters measured at the studied area for each month.

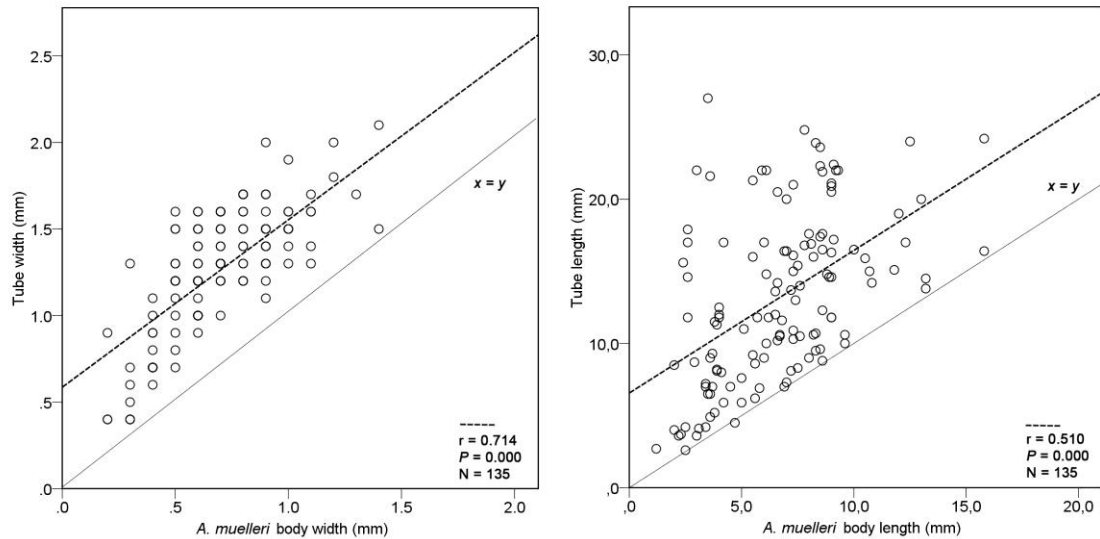


Fig. 6.5. Dispersion charts showing the correlations between sipunculan body size and shelter size.

surface temperature and bottom temperature in August 2011. The bottom salinity ranged from 37.2–37.9 psu, with a slight drop in October 2011, at the beginning of autumn (Fig. 6.4B).

6.4.2 Biology of *Aspidosiphon muelleri*

A total of 156 sipunculans were collected, with *Aspidosiphon muelleri* being the dominant species (146 specimens, 93.6% of the total). All specimens were dissected to analyze their external and internal anatomy. The remaining individuals corresponded to *Thysanocardia procera* (Möbius 1875) (2 specimens, 1.3%), *Sipunculus nudus* Linnaeus, 1766 (1 specimen, 0.6%), *Phascolion strombus strombus* (1 specimen, 0.6%) and 6 unidentified specimens (3.9%). *Aspidosiphon muelleri* sexual identification was possible in 72 of the cases, of which 54.2% were females whereas 45.8% were males. Sexual dimorphism was not detected and sexual identification was only possible through the observation of gametocytes in the coelom. In some cases, gametocytes were present in small specimens (3.7 mm

and greater). Sipunculans were found inhabiting *Ditrupa arietina* tubes in 95% of the cases, gastropod shells in 3.6% of the cases, and into bare substratum in the remaining 1.4% of cases. A significant correlation was detected between the sipunculan body width and tube width (PEARSON; $r=0.707$; $P=0.000$) and between sipunculan body length and tube length (PEARSON; $r=0.478$; $P=0.000$) (Fig. 6.5). In all cases, tube length was longer than the body length of the animal, which means that the animal was always totally covered by the tube. Abundance of *A. muelleri* was not significantly related to shelter abundance (PEARSON; $P=0.684$) and yielded an average density of 46.5 ± 6.0 individuals m^{-2} for the whole study period, with an average body length of 6.6 ± 0.2 mm (Mean \pm SE), and average body width of 0.7 ± 0.0 mm.

Skin color was highly variable, but generally dull white, turning orange in some specimens. Anal and caudal shields displayed a darker tonality, usually dark orange. Juvenile specimens usually exhibited a translucent skin. Both types of hooks (uni and bidentate) were present in

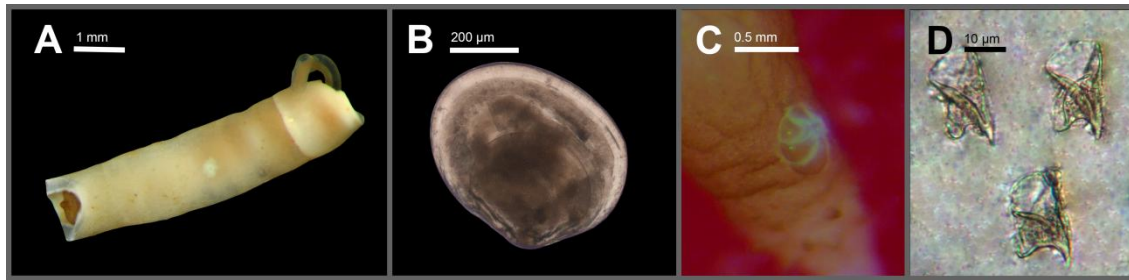


Fig. 6.6. [A] Specimen of *Aspidosiphon muelleri* inside of a *Ditrupa arietina* tube; [B] Specimen of *Epilepton clarkiae* collected inside a *D. arietina* tube inhabited by *A. muelleri*; [C] Foraminifer species attached to the anal shield of *A. muelleri*; [D] Unidentate pyramidal-shaped hooks from the introvert of *A. muelleri*.

the introvert (Fig. 6.6D). Individuals presented two elongate nephridia, as long as 20–60% of the trunk length (36.7 ± 2.0 %). The number of intestine coils was significantly correlated with the length of the body (PEARSON; $r=0.582$; $P=0.011$) and ranged between 12 and 21 coils.

Maximum abundances of *A. muelleri* occurred in the summer period, with a peak in August (135.7 ± 37.9 ind m^{-2} ; Mean \pm SE). After this month the population decreased drastically, with a posterior slight recovery during the winter months (Fig. 6.7A). *Ditrupa* tubes occupancy rate by *Aspidosiphon muelleri* was also higher in the summer months, with a peak in August (3.33 ± 1.34 %) matching with the maximum abundance of sipunculans (Fig. 6.3A). Gastropod shells were only used as a shelter in the summer period, when the maximum demand occurred. The rest of the months the occupancy rate for gastropod shells decreased to 0%.

Gametocytes development takes place on the retractor muscle base and is eventually released into the coelomic fluid. Reproductive activity occurred mainly during the summer, beginning in May and extending through October, with a maximum peak in August (Fig. 6.8). Both, the oocyte size and the percentage of females with free oocytes in the coelom, reached their maximum during that month.

Average oocyte size was significantly related to shallow water temperature (PEARSON; $r=0.808$; $P=0.001$) as well as to irradiance (PEARSON; $r=0.589$; $P=0.044$). Percentage of females with free oocytes was also related to shallow water temperature (PEARSON; $r=0.776$; $P=0.003$) and showed a non significant relation to irradiance (PEARSON; $r=0.562$; $P=0.057$).

Oocytes presented an asymmetric-ovoid shape, with a pointed pole in most of the cases (Fig. 6.9). Oocytes started to grow in May and August —just prior to spawning— and they had an average size of 118 ± 23 μm along its longer axis.

Although density of coelomocytes was not measured, a remarkable increase in abundance was observed in October, matching the final stage of the spawning event.

Sampling occurred once a month, and gametes into the nephridia (presumably where they would be hours before being released to the seawater) were not observed.

In regard to shelter supplier organisms (*Ditrupa*, Gastropoda and Scaphopoda), population density of *D. arietina* reached its maximum in the month of June, then slowly descended until March when it began to increase again. Abundance of *D. arietina* was much higher than abundances

of Gastropoda or Scaphopoda (Fig. 6.7B, 6.7C and 6.7E). Gastropoda tripled its population during the month of November (43.6 ± 18.5 ind m^{-2}), and the rest of the year remained a stable population ($\sim 7-10$ ind m^{-2}); scaphopod abundance was low and generally higher in the summer

months, reaching a maximum of 14.3 ± 5.8 ind m^{-2} in May 2012.

Regarding other shell-dwelling organisms (not Sipuncula), tanaid abundance increased notably, with its population reaching 200.0 ± 40.5 ind m^{-2} in August

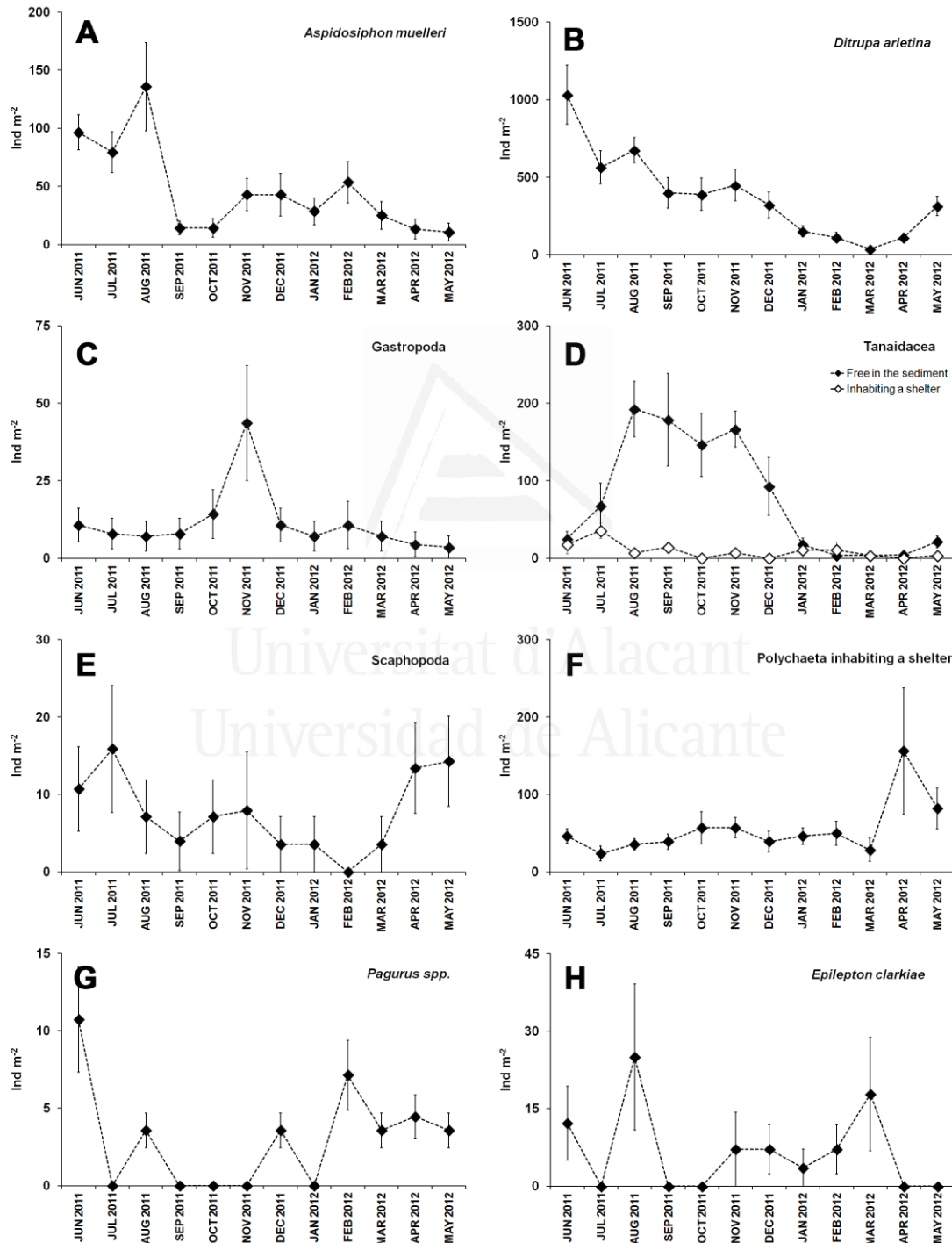


Fig. 6.7. Abundances of the different species and taxonomic groups recorded for each month (mean \pm SE).

2011. Tanaid abundance was high during the summer and autumn months, although the number of individuals tube-dwellers did not increase in relation with total individuals during this period (Fig. 6.7D). Hermit crabs did not yield a high density of individuals and abundance was variable, but more stable from February to June (Fig. 6.7G). Its maximum abundance was 10.7 ± 3.4 ind m^{-2} in the month of June 2011. Polychaete presence (mainly Syllidae) inside the tubes was high throughout the year, with a peak in April 2012, reaching a maximum density of 156.2 ± 81.5 ind m^{-2} (Fig. 6.7F). The presence of the commensal bivalve *Epilepton clarkiae* (Clark 1852) living together with *Aspidosiphon muelleri* and sharing the *Ditrupa arietina* tube was constant throughout the year (Fig. 6.7H). Bivalves were found in the tubes with a prevalence of 11.64%; 1 bivalve (7.53% of the cases), 2 bivalves (3.42%) and even 3 bivalves (0.69%) were found in the same tube attached to the body of the sipunculans. Bivalves were not found in any gastropod shell inhabited by *A. muelleri*. Foraminifers were also encountered inside some of the tubes attached to the body of the sipunculans (Fig. 6.6C).

6.5—Discussion

Aspidosiphon muelleri is a common species within the macrobenthic fauna of soft bottoms from the western Mediterranean, being often a highly abundant species (Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2013ab; Saiz-Salinas 1986). Densities of 1675 ind m^{-2} , the maximum known for this species (Ferrero-Vicente *et al.* 2013a) have been recorded in

this area. The area of study was selected due to its known high abundance of *A. muelleri*. The averaged abundance of individuals (46.5 ± 6.0 ind m^{-2}) was higher than recorded in other nearby areas of the western Mediterranean (13.78 ± 3.93 ind m^{-2} in Ferrero-Vicente *et al.* 2013a), whereas the relative abundance—93.6% of the total sipunculans collected were *A. muelleri*—was similar than other studies from the area: 89.06% and 74.07% (Ferrero-Vicente *et al.* 2011, 2013a).

Sex ratio was close to 1:1 (54.2% females vs. 45.8% males), which fits with a dioecious reproduction typical in Sipuncula (Rice 1989). Nonetheless not all sipunculans present this pattern, and biased sex ratios are not uncommon in some species; Rice *et al.* (2012) recorded a 74.0% of females for *Phascolosoma turnerae* (a deep-sea wood-dwelling sipunculan), and Pilger (1987) recorded 96% females and 4% males of the parthenogenic species *Themiste lageniformis*. Many other species presents sex ratios in which females outnumber the males (Pilger 1987). Even asexual reproduction has also been described for one species of the genus, *Aspidosiphon elegans* (Rice 1970).

Gametocytes were observed in specimens from 3.7 mm, and 4–5 mm appears to be the approximate size for the gametocytes development in this population of *A. muelleri*. This size could be reached by *A. muelleri* in few months, since growth from larval fixation to adult size (even more than 10 mm) could take less than 6 months (Ferrero-Vicente *et al.* 2013b).

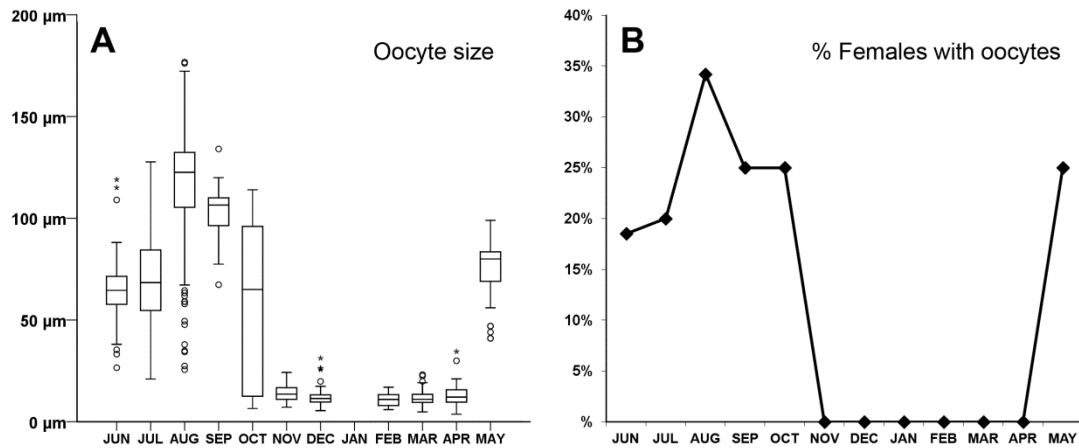


Fig. 6.8. [A] Averaged oocytes size in each month; [B] Percentage of females with presence of free oocytes in the coelom.

According to Ferrero-Vicente *et al.* (2013b), approximately 82 % of the available shelters in this area correspond to *Ditrupa* tubes whereas 18% are gastropod shells. This work also suggests a shelter limitation for this species (getting abundances 10 times higher by adding shelters in the sediment) and a preference of *A. muelleri* to use tubes as shelter instead of snails. Shelter partitioning in the present work was similar; approximately 71 % of available shelters were tubes and 29 % were gastropod shells. Shelter preference of tubes over gastropod shells fit also well with the present results, since 95% of individuals inhabited a tube and only 3.6% a snail. The remaining 1.4% of individuals was encountered bare into the sediment, but they presumably left the shelter in the fixation process. A linear relation between shelter abundance and sipunculan abundance was not detected due to high shelter availability throughout the whole study period (Fig. 6.3B), thus indicating that shelter availability is not driving the maximum density of *A. muelleri* in this area. However, there may be some limitation during the summer, matching the maximum population density. At this point, sipunculans start to use gastropod shells as resource in spite of their preference for

using tubes, and it might be that *Ditrupa* tubes are not so easy to find at that point of the year, probably due to the higher demand of this resource by tanaids and *A. muelleri*. After reproduction, when population density decreased drastically, sipunculans used preferably tubes as shelter. Correlation between body and shelter size was strong, and it is known that *A. muelleri* left its shelter just when all available space of the shelter—in a contracted state of the animal—is occupied for its body, ensuring that the animal can always be covered by the tube (Ferrero-Vicente *et al.* 2013b). This preference for *Ditrupa* tubes was not found for other shell/tube-dwelling species of similar size from the western Mediterranean (*Phascolion caupo* and *P. strombus strombus*) (Ferrero-Vicente *et al.* 2012, 2013b).

Internal anatomy did not yield differences with regard to other specimens from other areas (Açik *et al.* 2005, Açik 2011; Cutler 1994; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas 1993a), but specimens showed plasticity in some characters (e.g. skin took different tonalities from translucent skin in juvenile specimens to white or dark orange skin in adult specimens). Presence of unidentate and bidentate hooks, with

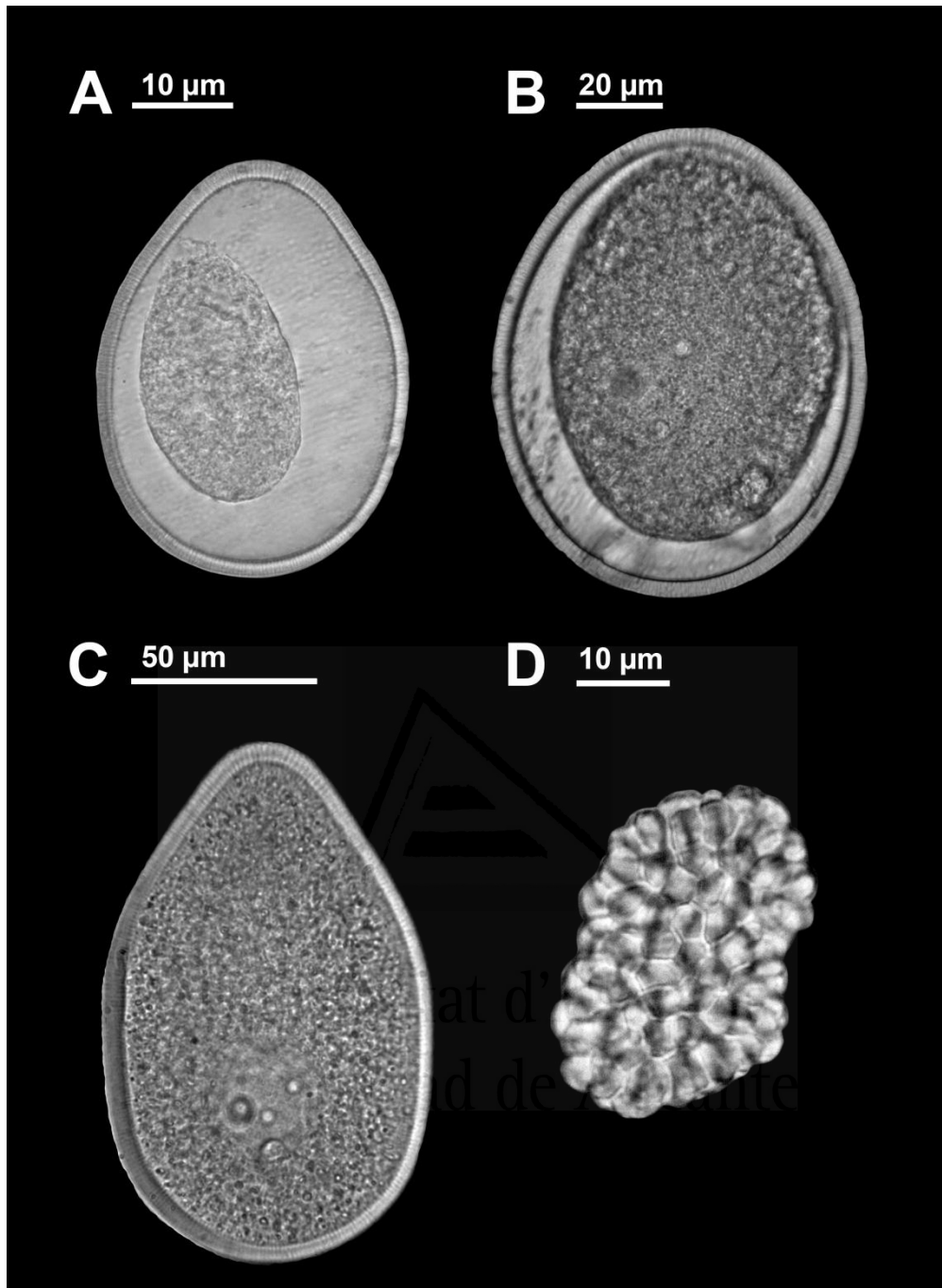


Fig. 6.9. [A–C] Ovoid-shaped coelomic oocytes of different size; [D] Coelomic sperm plates. The abnormal appearance of the cytoplasm, pulled away from the overlying egg envelope (A and B), could be an artefact due to fixation process.

pyramidal shape in the proximal part of the introvert was also noted. Some specimens presented pointed spines in the anal shield, in the grooves close to the introvert. This characteristic was not discriminative since different degrees of spine length and edge shape were detected, from almost flat to very pointed spines.

The number of intestine coils was significantly correlated with the length of the body (PEARSON; $r=0.582$; $P=0.011$), which indicates that intestine grows in length as long as the animal keeps growing.

Sediment in the area had a negative redox potential, ranging from -30.2 mV to -170.8 mV, which indicates a reducing

environment. This condition does not seem to be relevant for this species, likely due to the fact that *A. muelleri* lives in the shallowest and most oxygenated layer of the sediment, protected from predation by its shelter.

In temperate waters, marine invertebrates usually exhibit a two- or three- month peak in reproductive activity during the summer or early fall (depending on latitude) (Cutler 1994; Ying *et al.* 2009). In the case of *A. muelleri*, the highest density of individuals occurred during months of July and August, and then decreased drastically in September. This increase in population density coincides with the development of oocytes, which increase its size along these months. Female oocytes average size in its longer axis ($118\pm 23\ \mu\text{m}$) was similar to logged by Açık (2008b) for this species ($117.5\text{--}145\ \mu\text{m}$).

Trigger factors for reproduction in sipunculans are poorly understood, but in our case the development of the gametocytes and spawning event might be stimulated by an increase in irradiation and water temperature, as usual in many marine invertebrates from temperate waters. The first females with presence of oocytes appeared in the month of May (following the increase in water temperature). We can indirectly estimate spawning took place between the months of August and September (just before the annual maximum temperature) because the percentage of females with oocytes and oocyte size both reached their maximum in August. This spawning event may last a few weeks, but it has been observed in other species that in colder waters at high latitude as well as in equatorial waters, spawning may be extended for several months (Amor 1993; Adrianov & Maiorova 2010; Cutler 1994; Rice 1975b). Moreover a higher water temperature induces a higher larval

survival, but on the other hand, this might mean a shorter larval stage, which implies a lesser dispersion (O'Connor *et al.* 2007).

It is known that macro invertebrates present seasonal life cycles in order to take advantage of optimal environmental conditions or avoid unfavourable conditions (Johnson *et al.* 2012). Fluctuations in sipunculan spawning period is also known to occur due to differences in their conditions of habitation, showing an extended spawning period in a more stable situation (Rice 1967). This fact led us to think that different *A. muelleri* populations can exhibit different reproductive strategies for different areas, and they could have different spawning timing in areas with a less pronounced seasonality, like high latitude or equatorial areas.

It is known that life span can be long for some species (e.g. >20 years in *Phascolosoma turnerae* Rice *et al.* 2012). In our case, the dramatic decrease in abundance of individuals from August to September suggest that many adult individuals might die after the spawning, maybe as a consequence of this event. Although the abundance in September was low, the percentage of females with oocytes was still high. In October, the oocyte size was smaller and highly variable; a high presence of coelomocytes was observed during this period, and likely their function is the phagocytosis of the oocytes, which were not expelled to the sea water after the spawning (Amor 1993, Adrianov & Maiorova 2010).

As with many others sedentary groups, sipunculans attract a variety of associated fauna. Some small bivalves with a known association to sipunculans are *Kurtiella bidentata* (Montagu 1803), reported together with *Golfingia vulgaris* (de Blainville 1827) (Gibbs 1977), *Montacuta phascolionis* Dautzenberg & Fischer 1925,

and *Pythinella cuneata* (Verrill & Bush 1898) together with *Phascolion strombus* (Gage 1968, 1979; Troncoso & Urgorri 1992). To our knowledge, previous data about commensalism between bivalves and *Aspidosiphon muelleri* is limited to the relation with the bivalve *Jousseaumiella concharum* Knudsen 1944 (Saiz-Salinas 1993a). This is the first report of *Epilepton clarkiae* associated with *A. muelleri* although it is not the first record of this bivalve in association with a sipunculan, since it was reported together with *Golfingia vulgaris* inside the burrows, which this sipunculan digs in the sediment (Gibbs 1977), but other associations have been found with *Phascolion strombus*

(Troncoso & Urgorri 1992) and *Golfingia elongata* (McMillan 1968). The collected specimens of *E. clarkiae* were juveniles, and an adult specimen might not be able to inhabit the tube since its regular size is bigger than the tube diameter. The fact that *E. clarkiae* was not found in the gastropod shells inhabited by *A. muelleri* is probably due to the low number of sipunculans recorded inside gastropod shells. This commensal relationship might play an important role in the distribution of *E. clarkiae* since any individual living bare into the sediment, or even inside a shelter not occupied by *A. muelleri*, were not found.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



7. Discusión General

Photo: *Onchnesoma steenstrupii steenstrupii* Koren & Danielssen 1876

7. Discusión general

7.1—Distribución del phylum Sipuncula en el Mediterráneo español

El número total de especies de sipuncúlidos con presencia en el mar Mediterráneo es de 36, incluyendo algunas aportaciones recientes (Açik 2007, 2011; Coll *et al.* 2010; Ferrero-Vicente *et al.* 2012). Estas 36 especies representan el 22% del total de especies descritas para este grupo. La mayor diversidad se da en la cuenca occidental, con presencia de 31 especies (86%), mientras que en la cuenca oriental se han reportado 24 especies diferentes (66%).

Se conoce su zoogeografía a escala regional, en determinados áreas y hábitats (e.g. Açik 2011; Cutler *et al.* 1992; Kędra & Murina 2007). Sin embargo, la última revisión sobre su distribución global se realizó hace más de 30 años (Murina 1984). También Cutler (1994) recopiló toda la información disponible hasta esa fecha, pero es una mera compilación de datos sin carácter analítico acerca de su distribución global. Cabe destacar el trabajo de revisión de Pancucci-Papadopoulou *et al.* (1999) para la zoogeografía del phylum en el Mediterráneo. Aun así, incluso en zonas altamente estudiadas como puede ser el Mediterráneo, siguen siendo poco conocidas sus distribuciones, sobre todo en aguas profundas (Coll *et al.* 2010; Saiz *et al.* 2014).

Un objetivo fundamental de esta tesis doctoral ha sido el estudio y caracterización de los poblamientos de sipuncúlidos de

fondos blandos presentes en las aguas litorales del Mediterráneo español, principalmente de las costas de la Comunidad Valenciana. A tal efecto se han tomado un total de 1830 muestras a lo largo de 9 años (2004–2012), en las cuales se han recolectado 2008 individuos pertenecientes a nueve especies diferentes (Tab. 7.1). Se trata de una alta diversidad si tenemos en cuenta que todos los muestreos se han realizado en sedimento blando y en aguas litorales. Las nueve especies reportadas representan el 25% del total de las especies conocidas para todo el mar Mediterráneo. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha registrado una especie no reportada previamente para el Mediterráneo (*Phascolion caupo*) (capítulo 2). Igualmente, en otros capítulos se obtuvieron nuevos registros en áreas más locales. Algunos de estos nuevos registros pertenecen a especies que se han revelado como frecuentes en la zona de estudio lo que evidencia de nuevo la necesidad de más estudios sobre este grupo. Este es el caso de *Thysanocardia procera*, que a pesar de que ha sido citada por vez primera en nuestro área de estudio, tanto en el golfo de Valencia como en aguas de la costa de Alicante, su presencia ha sido constante y común a lo largo del tiempo y para todo el área de muestreo.

No hemos detectado ningún tipo de patrón latitudinal en su distribución, lo cual es lógico teniendo en cuenta la amplia distribución global de las especies estudiadas y el estrecho margen latitudinal de nuestra zona de estudio, que ha oscilado

entre los 40°42.3'N y los 37°49.0'N (2°53.3'). En cuanto a su distribución vertical, se ha ampliado el rango batimétrico para algunas especies. *Phascolion tuberosum* ha sido recolectada a solo 4 m de profundidad, siendo el registro más somero para esta especie hasta la fecha. También se trata del registro más somero de *T. procera* en el Mediterráneo (12 m), y el rango de distribución vertical de *P. caupo* es también nuevo para el Mediterráneo, al tratarse de una nueva cita para este área (15–37 m).

En el mar Mediterráneo existe un alto número de especies endémicas (29% según

Boudouresque 2004; 20% según Coll *et al.* 2010), siendo especialmente alto el número de casos en el Mediterráneo occidental (Boudouresque 2004), por ese motivo es un dato destacable el hecho de que hasta la fecha no se conoce ningún sipuncúlido endémico para el Mediterráneo (Boudouresque 2004; Coll *et al.* 2010; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999). Esta ausencia de endemismos puede ser debida a que presentan una amplia distribución geográfica y una alta plasticidad fenotípica. También se trata de un grupo con una baja diversidad de especies, tanto en la actualidad como a nivel histórico, a raíz de

Tab. 7.1. Abundancias totales para las diferentes especies de sipuncúlidos presentes en los estudios que han dado lugar a la elaboración de esta tesis doctoral. Ordenación taxonómica basada en la propuesta de Kawauchi *et al.* 2011. Rangos de profundidad obtenidos de: Açik 2008, 2010; Hendrix 1975; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Saiz-Salinas y Villafranca-Urchequi 1990. *Nuevos límites batimétricos registrados durante el desarrollo de este trabajo.

	Ind. totales	Rango de profundidad (m)			
		Mediterráneo		Global	
		Min	Max	Min	Max
Clase SIPUNCULIDEA					
Orden SIPUNCULIFORMES					
Familia SIPUNCULIDAE					
<i>Sipunculus nudus</i>	63 (3.14%)	5	160	0	2275
Orden GOLFINGIIFORMES					
Familia GOLFINGIIDAE					
<i>Golfingia vulgaris vulgaris</i>	17 (0.85%)	0	1900	0	5540
<i>Thysanocardia procera</i>	66 (3.29%)	12*	555	2	555
<i>Phascolion caupo</i>	145 (7.22%)	15*	37*	Litoral	1378
<i>Phascolion strombus strombus</i>	45 (2.24%)	0	1000	0	5000
<i>Phascolion tuberosum</i>	10 (0.50%)	4*	875	4*	2700
<i>Onchnesoma steenstrupi steenstrupi</i>	6 (0.30%)	0	1376	0	3362
Clase PHASCOLOSOMATIDEA					
Orden PHASCOLOSOMATIFORMES					
Familia PHASCOLOSOMATIDAE					
<i>Phascolosoma granulum</i>	4 (0.20%)	0	230	0	2050
Orden ASPIDOSIPHONIFORMES					
Familia ASPIDOSIPHONIDAE					
<i>Aspidosiphon muelleri</i>	1634 (81.37%)	0	1262	0	2934
No identificados	18 (0.90%)				

su registro fósil (Hickman *et al.* 2008). Aun así la falta de estudios específicos y de especialistas en la taxonomía de este grupo también puede ser un factor relevante, ya que en muchos trabajos o no se identifican a nivel de especie o, incluso, se dan casos de identificaciones erróneas. Es sabido que la especie *Phascolion strombus* es a menudo utilizada como cajón de sastre para numerosas especies del género *Phascolion* presentes en la fauna europea, debido a la alta plasticidad fenotípica de esta especie y a la dificultad para discernir entre las diferentes especies de este género para los no especialistas (Saiz-Salinas 1993a). Es evidente que esta carencia de datos a nivel específico y los posibles errores en la identificación de especies han llevado a infravalorar la verdadera distribución de las especies, y a su vez, la falta de especialistas y de esfuerzo en la identificación quizá también haya dificultado la descripción de lo que podrían ser nuevas especies endémicas para el Mediterráneo. A su vez, nuevos estudios genéticos podrían conllevar la descripción de nuevas especies, ya que recientemente se ha descubierto que poblaciones lejanas de sipuncúlidos presentan una alta diferenciación genética (Kawauchi & Giribet 2010, 2013), por lo que podríamos estar hablando de nuevas especies crípticas como resultado de un proceso reciente de diferenciación. El Mediterráneo, como mar relativamente aislado, tiene el potencial para presentar poblaciones genéticamente diferenciadas de estas especies supuestamente cosmopolitas, ya sean especies recientes o poblaciones en proceso de diferenciación. Como ejemplo cabría destacar que recientemente Müller *et al.* (2014) han encontrado en las costas de Ibiza (Mediterráneo occidental) especímenes del género *Phascolion* que comparten características morfológicas

tanto con la especie *P. caupo* como con la especie *P. strombus*. No se ha podido realizar una identificación inequívoca de estos especímenes, por lo que podría llevar a la descripción de una nueva especie. En este supuesto se trataría de la primera especie de sipuncúlido endémica para el mar Mediterráneo.

7.2—Ecología de las especies estudiadas

7.2.1 Relación animal-sedimento

La relación de estos animales con el sedimento en el que viven ha sido escasamente estudiada. Diferentes especies han sido citadas en diferentes tipos de sedimentos y granulometrías, o incluso las mismas especies son reportadas tanto en sustrato sedimentario como rocoso (Cutler 1994). Pongamos como ejemplo el caso de la especie más abundante en nuestra zona de estudio; *A. muelleri* ha sido recolectada en fondos detriticos, sedimentos fangosos y arenosos, y también en fondos duros, asociado a las algas *Padina* sp. y *Cystoseria* sp., asociado a esponjas o en grietas excavadas en roca caliza (Bourcier 1976; Cutler 1994; Koukouras *et al.* 1985; Pancucci-Papadopoulou *et al.* 1999; Por 1975). Como ya hemos comentado, el hecho de muestrear en un ambiente o hábitat concreto, o que el sedimento presente unas características físico-químicas determinadas, no implica la presencia de sipuncúlidos. Echando un vistazo a todos estos registros previos, en los que las mismas especies son reportadas en hábitats muy variados, parece claro que muchas especies tienen la capacidad de desarrollarse en diferentes ambientes, independientemente de una granulometría o características sedimentarias más o menos óptimas para su desarrollo.

Se sabe que distintas especies de varios géneros de sipuncúlidos tienen una gran capacidad horadora en los arrecifes coralinos, y han sido descritos como importantes horadores de corales del género *Porites*, tanto a nivel fósil como en la actualidad (Birkeland, 1997; Klein *et al.* 1991). Sin embargo su importancia como horador no está del todo clara, debido a la variabilidad de su abundancia entre los diferentes arrecifes (Macintyre 1984 *in* Birkeland 1997). Esta es la misma variabilidad que nos hemos encontrado a nivel de especies de fondos sedimentarios para nuestra zona de estudio. En fondos sedimentarios su significancia a nivel ecológico tampoco es bien conocida, si bien se presume como no demasiado importante a la vista de su escasa abundancia. En aguas profundas se desconoce aún más su distribución y su influencia en el ecosistema, aunque se sabe que pueden adquirir un papel importante en determinadas áreas, debido a su acción de bioturbación del sedimento. Este es el caso de la especie de aguas profundas *Nephasoma lilljeborgi* (Danielssen & Koren, 1880), que podría tener una influencia significativa en la ecología y geoquímica de los mares del norte de Europa mediante la excavación de galerías profundas que provocan la subducción de la materia orgánica (Shields & Kędra 2009). A la vista de los datos obtenidos no parece que las especies representadas en este estudio puedan tener un papel similar de carácter significativo, debido principalmente a la escasa densidad de estas especies, pero también al pequeño tamaño de las mismas. *Aspidosiphon muelleri* se ha clasificado como una especie con actividad biodifusora y modificadora de la superficie del sedimento (Queiros *et al.* 2013), lo que le confiere la capacidad de

alterar las propiedades abióticas del fondo marino. En nuestros trabajos se trata también de la única especie con densidades relativamente altas como para jugar un papel destacable en la bioturbación del sedimento. Sin embargo, utiliza conchas para refugiarse, no excava galerías profundas y su tamaño es relativamente pequeño (el tamaño máximo registrado fue escasamente superior a los 20 mm). Su distribución es muy heterogénea como para tener un efecto significativo en el sedimento a nivel global. Su importancia en la bioturbación del sedimento a nivel local debe por tanto ser estudiada con mayor detalle, para tener una valoración más precisa de su actividad bioturbadora y su posible influencia en la dinámica sedimentaria.

A la hora de valorar un determinado tipo de sedimento como adecuado para su utilización por parte de los sipuncúlidos de fondos blandos debemos tener en cuenta la disponibilidad de refugio como un factor determinante, al menos para las especies conchícolas. En el caso de las tres especies conchícolas presentes en este trabajo (*A. muelleri*, *P. caupo* y *P. strombus*) se ha demostrado una dependencia de este recurso, al menos en los sedimentos estudiados. Se sabe que en sustrato rocoso pueden refugiarse en grietas, rizoma, conglomerado de mejillón, etc. También se ha visto que la disponibilidad de refugio es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de poblaciones de estas especies conchícolas (ver capítulo 5). Aun así la sola presencia de conchas o tubos vacíos en el sedimento no garantiza *per se* el desarrollo de poblamientos de sipuncúlidos. Los resultados también prueban que la granulometría del sedimento no es un factor determinante para estas especies, como a priori se podría pensar. También se

ha demostrado que —incluso después de aislar factores como disponibilidad de refugio y granulometría— existen diferencias entre localidades relativamente cercanas. Estas diferencias entre localidades que han de ser explicadas por otras variables que no han sido analizadas en este trabajo (e.g. presencia previa de adultos, factores hidrodinámicos o de sedimentación...) (Snelgrove & Butman 1994, Snelgrove *et al.* 1999). Igualmente la disponibilidad de alimento en forma de partículas también podría ser un factor determinante, ya que la inmensa mayoría de sipuncúlidos se alimentan mediante la ingesta de partículas orgánicas presentes en el sedimento, ya sea detritus, material fecal, microorganismos o incluso pequeños invertebrados (Cutler 1994; Murina 1984).

Dejando aparte estas especies conchícolas (cuya ecología se discute más ampliamente en el apartado 7.2.2) el resto de especies han demostrado escasa o nula relación con las diferentes variables ambientales estudiadas. En el caso de algunas de ellas (*O. steenstrupi*, *P. tuberculosum* o *P. granulatum*) las abundancias no han sido lo suficientemente altas para poder detectar alguna relación. En cuanto al resto de especies apenas podemos hablar de una tendencia de *G. vulgaris* a aparecer en sedimentos con un alto contenido en materia orgánica. Por tanto, la distribución de estas especies, al igual que pasa con la distribución de las especies conchícolas, no parece ligada a un determinado tipo de sedimento o granulometría, sino que se ve afectada por otras variables. En el caso de los sustratos sedimentarios, la granulometría del sedimento ha sido tradicionalmente considerada como el factor principal a la hora de determinar los poblamientos biológicos que lo habitan, si bien existen otros factores que influyen en

la distribución y composición de las biocenosis bentónicas (e.g. hidrodinamismo, batimetría, variación de la salinidad, debida a las lluvias, al aporte fluvial o a la evaporación, nivel de irradiancia, turbidez...) (Templado *et al.* 2012). De acuerdo con Snelgrove & Butman (1994) podría haber otros factores tanto o más determinantes que el tamaño de grano a la hora de explicar la alta variabilidad y la complejidad de las poblaciones de estos fondos sedimentarios (e.g. comunidad microbiana, suministro de alimento, dinámica sedimentaria, interacciones tróficas, suministro de larvas, flujo de partículas...). Esta teoría parece encajar en el caso del phylum Sipuncula, y definitivamente el tamaño de grano no es ni el único ni el principal factor involucrado en su distribución. Los factores implicados en su distribución pueden ser muy variables y diferentes para cada especie. También existe la posibilidad de sinergia entre los diferentes factores.

Durante el muestreo realizado en el golfo de Valencia y cabo de la Nao, de 2004 a 2008, se detectó una relación entre las especies *A. muelleri*, *S. nudus* y *G. vulgaris* y la cantidad de materia orgánica en el sedimento. Fue una relación positiva en el caso de *G. vulgaris* (PEARSON; $r=0.176$; $P<0.01$) y *A. muelleri* (PEARSON; $r=0.177$; $P<0.01$) y negativa para el caso de *S. nudus* (PEARSON; $r=-0.190$; $P<0.001$). Sin embargo esta relación no se volvió a detectar en ninguno de los muestreos llevados a cabo en otras localidades. En el caso de *A. muelleri* incluso se ha detectado el patrón inverso, mostrando una relación negativa con la cantidad de materia orgánica presente en el sedimento en la localidad de San Pedro del Pinatar (PEARSON; $r=-0.200$; $P<0.05$). En el caso de las especies conchícolas en ocasiones se

ha detectado una relación directa entre las fracciones más gruesas del sedimento y una mayor abundancia, pero este aumento en densidad parece ser respuesta a una mayor abundancia de refugios y conchas vacías en este tipo de sedimentos (Murina, 1984). En el momento en el que se han aislado los factores de forma individualizada, mediante el uso de unidades artificiales de muestreo (capítulo 6), se ha comprobado (para *A. muelleri*, *S. nudus*, *P. strombus* y *P. caupo*) que esta relación con la granulometría no es tan determinante como a priori cabría esperar, y la verdadera diferencia se da entre diferentes localidades y en el caso de las especies conchícolas está determinada principalmente por la disponibilidad de este recurso.

Por lo tanto la respuesta de cada especie en cada lugar determinado puede ser única y compleja, y a lo largo de los estudios realizados para esta tesis doctoral no se han detectado patrones claros en su distribución. La relación animal-sedimento no aparece de forma clara a la vista de los resultados obtenidos para las diferentes especies y variables estudiadas.

7.2.2 Especies conchícolas/tubícolas

La ecología de los cangrejos ermitaños ha sido tradicionalmente muy estudiada, publicándose decenas de artículos todos los años acerca de la relación de estas especies con la concha en que habitan. Sin embargo, en el caso de los sipuncúlidos, los estudios son muy escasos y normalmente se limitan a que ciertas especies han sido encontradas ocasionalmente dentro de conchas de gasterópodo o tubos de poliqueto. La relación entre el sipuncúlido y su refugio puede que no sea tan estrecha, ya que la movilidad de los cangrejos ermitaños es mucho mayor, y por lo tanto sus



Fig.7.1. Tubos de *Ditrupa arietina* y conchas de gasterópodos usados como refugio por los diferentes sipuncúlidos tubícolas/conchícolas.

requerimientos —en cuanto a talla y peso del refugio— serán también mayores. Es sabido que las especies conchícolas de sipuncúlidos presentan baja movilidad (Murina 1984), pero sí que pueden tener requerimientos específicos en cuanto a tallas o preferencias por una forma determinada, como hemos visto en el capítulo 5. Estas especies tienden a aparecer en sedimento más grueso de las zonas litorales, donde la disponibilidad de tubos y conchas puede ser mayor (Murina 1984). En este trabajo se han escrito tres especies que pueden ser catalogadas como conchícolas o tubícolas; *Aspidosiphon muelleri*, *Phascolion caupo* y *Phascolion strombus*. Es conocido que estas especies también pueden habitar otro tipo de refugios, como pueden ser grietas en las rocas, clúster de mejillones, rizoma de fanerógamas, etc., pero en el caso de sedimentos blandos su presencia ha estado siempre ligada a la presencia de una concha o tubo vacío en el que vivir (Fig. 7.1). Por tanto, podemos considerar estas especies como conchícolas o tubícolas estrictos para este determinado hábitat.

El elevado número de especímenes de *A. muelleri* recolectados nos ha permitido analizar más detenidamente como afecta la

disponibilidad y características de este recurso a su distribución. Ha quedado claro que un incremento en la densidad de conchas y tubos, en zonas inicialmente limitantes en este recurso, puede favorecer el desarrollo de las poblaciones de *A. muelleri*, alcanzando densidades hasta 10 veces más altas (ver Capítulo 5). También ha quedado demostrado que *A. muelleri* selecciona preferentemente tubos sobre las conchas de gasterópodo; hemos visto como la densidad de *A. muelleri* se correlacionaba fuertemente con la densidad de tubos (PEARSON; $P < 0.001$) mientras que esta correlación no se detectó para las conchas (ver Capítulo 3). Se evidencia este comportamiento en el capítulo 5, en el que se aprecia una selección activa de tubos sobre conchas de gasterópodos, al contrario de lo que ocurre para los cangrejos ermitaños, que prefirieron las conchas con forma de caracola de los gasterópodos. Esta segregación suaviza la competencia directa por este recurso entre *A. muelleri* y los cangrejos ermitaños, sin embargo son numerosos los tanaidáceos encontrados en el interior de estos tubos y —en este caso— sí que puede existir esta competencia directa. En el capítulo 6 de esta tesis se aprecia como el uso de conchas de gasterópodo por parte de *A. muelleri* se ve incrementado durante los meses estivales, coincidiendo con una mayor demanda por este recurso, ya que no solo la abundancia de *A. muelleri* es mucho mayor en estos meses, si no que los tanaidáceos (principalmente *Apseudes* spp) incrementan sus poblaciones de forma notable y también usan estos tubos vacíos como recurso. Posiblemente este considerable incremento en la competencia por los tubos disponibles empuja a *A. muelleri* a usar conchas a pesar de su preferencia por los tubos.

Sabemos que las poblaciones de *D. arietina* están aumentando de forma considerable en las costas del Mediterráneo francés y español (Grémare *et al.* 1998ab), lo que conlleva un aumento en el suministro de tubos vacíos para su posible uso como refugio por parte de otros organismos. Cabría la posibilidad de que este aumento notable de las poblaciones de *Ditrupa* en el Mediterráneo occidental haya ido acompañado por un aumento en la abundancia de *A. muelleri*, que se ha revelado como el sipuncúlido más común en sedimentos blandos de esta zona del mar Mediterráneo. No hay datos previos para estas zonas, pero las densidades de *A. muelleri* han sido relativamente altas; los 1675 ind m⁻² registrados en 2004 es la densidad más alta registrada hasta la fecha para esta especie. Estas altas densidades registradas en algunas zonas con fuerte presencia de tubos hacen pensar que efectivamente el incremento en las poblaciones de *Ditrupa* puede favorecer un incremento en las poblaciones de *A. muelleri*.

Poco se conoce acerca de la importancia trófica de los sipuncúlidos, más allá de que pueden adquirir cierta relevancia como fuente de alimento para eslabones superiores de la cadena trófica. A raíz de los escasos datos disponibles a este respecto no se puede decir que sean presa habitual de numerosos organismos. Su importancia como fuente de alimento para otras especies es poco conocida, y las ocasiones en las que aparecen en estudios sobre dieta de peces son escasas. Cuando aparecen en contenidos estomacales dentro de nuestra zona de estudio suele ser como presa ocasional (e.g. Jaramillo-Londoño *et al.* 2011) y los casos en que puede tomar relevancia como parte importante de la dieta son muy escasos incluso a nivel global

(e.g. Moreno *et al.* 2009). Es posible que sean depredados con mayor facilidad por moluscos o incluso pequeños crustáceos que podrían tener una mayor capacidad de manipulación de estas presas, pero no se conocen datos al respecto. Una presión por depredación más alta puede fortalecer esta relación de dependencia entre la disponibilidad de refugio y la abundancia de sipuncúlidos. En sedimento blando las especies con mayor capacidad de supervivencia podrían ser las que habitan las conchas y tubos vacíos, ya que este es el refugio dominante en este tipo de hábitat. La mayor abundancia de las especies conchícolas en nuestra zona de estudio podría ser el resultado de una alta presión por los predadores aunque no disponemos de datos al respecto. A su vez, las diferencias entre localidades observadas en este estudio (después de aislar artificialmente los factores granulometría y disponibilidad de refugio) podrían en parte ser explicadas por una diferente presión por depredación, entre otros factores.

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que la presencia de sipuncúlidos conchícolas en fondos sedimentarios está relacionada con la presencia de conchas y tubos vacíos, y no tanto con la granulometría del sedimento, que no parece ser un factor primordial para el desarrollo de poblaciones de estas especies. Otros factores que pueden explicar las diferencias encontradas entre las localidades podrían ser la presión por depredación o la presencia previa de adultos en la zona.

7.2.3 *Aspidosiphon muelleri*; la especie dominante

Como suele ser habitual para las diferentes especies del phylum, las abundancias han sido por lo general bajas en comparación

con otros grupos, generalmente mucho más abundantes, como pueden ser poliquetos o anfipodos. La excepción sería *Aspidosiphon muelleri*, que ha sido una especie común en los fondos con presencia de conchas o tubos donde poder refugiarse. Su relación ecológica con el refugio que habita ha sido suficientemente discutida en el apartado previo así como en el capítulo 5 de esta tesis doctoral, dedicado en exclusividad a este tema.

Es una especie muy común en el Mediterráneo. Incluso en el Mediterráneo oriental puede ser una especie muy abundante e incluso dominante en aguas poco profundas, tanto en sedimentos blandos como en substrato rocoso o entre el rizoma de posidonia (Açik 2005, 2008). Como ya hemos comentado, es posible que el incremento en las poblaciones de *D. arietina* en aguas del mar Mediterráneo occidental este indirectamente provocando un aumento de las poblaciones de *A. muelleri*, al aumentar la disponibilidad de tubos vacíos en el sedimento.

En nuestra área de estudio ha estado presente en todos los muestreos realizados, siempre con la abundancia más alta de todas las especies. Los 1634 especímenes de *A. muelleri* recolectados durante la realización de esta tesis doctoral suponen el 81.37% del total de sipuncúlidos registrados, por lo que ha sido la especie más relevante. Estas densidades han sido puntualmente muy altas, llegando a alcanzar los 1675 ind m⁻², la densidad más alta registrada hasta la fecha para esta especie. Estas densidades se producen en zonas donde la disponibilidad de refugio es muy alta, y no existe ningún tipo de limitación para acceder a este recurso. En estas condiciones *A. muelleri* podría adquirir cierta relevancia en el ecosistema

ya que; (1) con estas densidades podría tener un rol importante a nivel local en la bioturbación del sedimento, y (2) ha sido reportado como parte de la dieta de peces (e.g. Artüz 2003; Vassilopoulou & Papaconstantinou 1993), pudiendo ser en un recurso importante a nivel local.

A nivel reproductivo ha desarrollado una reproducción sexual dioica (típica en Sipuncula), aunque no ha exhibido ningún tipo de dimorfismo sexual.

No se dispone de datos previos, para poder comparar los resultados obtenidos para nuestra zona con las posibles variaciones en la ecología reproductiva para otras zonas de estudio. Es evidente que en nuestro caso la actividad reproductiva se concentra en los meses de más calor, para aprovechar la ventana de condiciones óptimas, y no se extiende mucho en el tiempo (Johnson *et al.* 2012). Esto concuerda con datos previos para especies que viven en hábitats con cambios estacionales y contrasta con los datos obtenidos para especies procedentes de aguas sin estacionalidad marcada, como podrían ser los polos, el ecuador o ecosistemas de aguas profundas. En estos sistemas la actividad se extiende a lo largo de casi todo el año, ya que esta ventana de condiciones óptimas es prácticamente inexistente o muy dilatada. Se sabe que una misma especie puede presentar fluctuaciones en su actividad reproductiva al habitar en estas condiciones diferentes (Rice 1967). Para el caso de *A. muelleri* no disponemos de datos para localidades sin estacionalidad, pero es probable que su periodo reproductivo se viera extendido. La diferenciación en la dinámica reproductiva de las diferentes poblaciones, en caso de haberla, podría ayudar a la diferenciación de especies y a la aparición de especies crípticas en poblaciones asiladas o en mares

relativamente cerrados como puede ser el Mediterráneo, aunque también se sabe que las larvas de sipuncúlidos podrían tener la capacidad de comunicar poblaciones muy distantes, incluso de forma interoceánica (Cutler 1994; Rice 1981; Scheltema & Hall 1975).

Se sabe que algunas especies de sipuncúlidos tienen esperanzas de vida largas, de hasta más de 20 años en el caso del sipuncúlido de aguas profundas *Phascolosoma turnerae* (Rice 2012). En el caso de *A. muelleri* hemos detectado una alta mortalidad en el mes de Octubre, justo después de la actividad reproductiva. Esta mortalidad podría estar asociada con la actividad reproductiva y con un ciclo de vida más corto, que podría extenderse no más allá de 1–2 años puesto que, por los resultados obtenidos, hemos visto que adquieren el tamaño y la capacidad reproductiva a los pocos meses de la fijación de las larvas. Esta mortalidad podría también estar ligada a otros factores estacionales o locales que no conocemos, como podría ser la presión por depredación sobre sus poblaciones.

7.3—Respuesta al estrés ambiental y su uso como especies bioindicadoras

7.3.1 Influencia antropogénica sobre los poblamientos de sipuncúlidos

Ya hemos comentado en la introducción general el impacto que la recolección incontrolada de *Sipunculus nudus* para su uso como cebo de pesca está teniendo en algunas zonas del sur de España. Caso aparte es el posible efecto que otros impactos de origen humano puedan tener sobre sus poblamientos. En el capítulo 3 de esta tesis doctoral se trató de evaluar el

efecto de un vertido de salmuera con una alta concentración salina sobre el poblamiento de sipuncúlidos, así como el posible efecto negativo de las jaulas de cultivo de peces presentes en la zona de estudio. Si bien la ausencia de sipuncúlidos en el punto de vertido de salmuera (en el muestreo previo al inicio del funcionamiento de la planta desalinizadora) hace muy difícil establecer una relación directa entre el vertido y la ausencia de sipuncúlidos, los datos parecen apuntar en esta dirección, ya que el punto de vertido es el único lugar en el que no se registró ningún sipuncúlido a lo largo de los cinco años de seguimiento. También el hecho de que los sipuncúlidos eviten vivir en zonas salobres, que suelen presentar altas fluctuaciones de salinidad, nos indica un comportamiento estenohalino de estas especies y una escasa o nula capacidad de osmoregulación. Tampoco se pudo determinar ningún efecto negativo de las jaulas de cultivo de peces sobre las poblaciones de sipuncúlidos. La alta variabilidad natural de las especies, así como, la heterogeneidad de los fondos donde suelen vivir y el desconocimiento de los factores físico-químicos que regulan su distribución espacial, hacen muy difícil la detección de posibles efectos que la alteración del medio puede tener sobre sus poblaciones. A tal punto se puede recomendar la combinación de estudios de campo de carácter manipulativo y estudios experimentales en mesocosmos, para poder conocer la tolerancia de las diferentes especies ante aumentos de salinidad producidos por vertidos de desalinizadoras y los efectos que estos vertidos pueden tener sobre la fisiología de estas especies.

En estudios previos para esta zona (Ferrero-Vicente 2006) se analizó el posible efecto que los vertidos de aguas residuales

urbanas podrían tener sobre las poblaciones de sipuncúlidos. No se encontró ninguna relación directa entre los vertidos y la riqueza o abundancia de especies, siendo la granulometría del sedimento el factor determinante para explicar la distribución de estas poblaciones. Sin embargo es posible que estos vertidos estén jugando un papel indirecto al modificar sustancialmente la granulometría del fondo, incrementando las fracciones más finas del sedimento en las zonas próximas a estos vertidos. Los mismos resultados se obtuvieron durante la realización de esta tesis doctoral (resultados no publicados). Al analizar algunas poblaciones de sipuncúlidos próximas a zonas de vertidos de aguas residuales no se encontró ninguna diferencia con respecto a otras áreas con granulometría y condiciones similares.

7.3.2 Uso de las especies estudiadas como bioindicadores

El uso de determinados organismos como indicadores de impacto o estrés ambiental está cada vez más extendido, y se estudian anualmente decenas de nuevas especies candidatas a convertirse en bioindicadoras o centinelas (e.g. Koch *et al.* 2014; Lee *et al.* 2014, Shue *et al.* 2014). Los invertebrados bentónicos se usan frecuentemente como indicadores de la salud de los ecosistemas acuáticos, ya que muchas especies son sensibles a la contaminación o cambios súbitos en el medio ambiente. Para la gestión ambiental resulta básico determinar si la comunidad está cambiando en el tiempo por motivos naturales o por causas antropogénicas (Gerhardt 2002). Para este propósito es fundamental que los organismos utilizados como indicadores se puedan correlacionar con firmeza y coherencia (a través del espacio y el tiempo) con los niveles de las variables ambientales

Tab. 7.2. Criterio a la hora de elegir un organismo bioindicador e idoneidad de las especies de sipuncúlidos a tal propósito: √ = cumplen el criterio; X = no cumplen el criterio; ? = desconocido o escasamente conocido. Adaptado de Gerhardt (2002).

Distribución

√ — Amplia, cosmopolita, útil para comparaciones globales

Características ecológicas

X/? — Fidelidad

— Alta abundancia y difusión en determinados ambientes

X — Especificidad

— Movilidad restringida, sitios específicos

— Baja variabilidad genética y ecológica

√ — Posición definida en el sistema trófico

√ — Estrategia alimenticia definida. (e.g. no omnívoros)

X — Ratio metabólico constante

√ — Ciclo generacional medio-largo

√ — Posición definida en un compartimento del ecosistema

X — Alto conocimiento sobre la ecología, fisiología y distribución de las especies

X — Posición en el ecosistema ecológicamente relevante

X/? — Sensibilidad

— Sensibilidad a contaminantes específicos

Representatividad

X — La respuesta del bioindicador debe ser representativa de la respuesta de otros taxa o incluso del ecosistema

Practicidad

√/? — Facilidad de muestreo y almacenamiento

X — Fácil identificación taxonómica para no especialistas

? — Resistencia a la manipulación

√/? — Fácil cultivo en laboratorio

X — Bajo coste y baja necesidad de mano de obra

Relevancia Social

X — Relevancia a nivel político o de gestión (e.g. gestión del agua)

X — Importancia económica como recurso

X — Importancia para la agricultura o el medio ambiente

Centinela (Criterios adicionales)

? — El organismo no se ve afectado por el contaminante

? — El organismo debe acumular y concentrar la toxina a niveles medibles por encima de los del medio.

(Godsell *et al.* 2009). Los indicadores se eligen en base a diferentes criterios. Entre ellos la fácil recolección e identificación, sensibilidad a estrés ambiental y respuesta predecible son algunos de los criterios principales (Tab. 7.2).

Los sipuncúlidos, tal y como hemos discutido en capítulos anteriores, son un grupo poco conocido y estudiado. La

respuesta de este phylum hacia diferentes estímulos o alteraciones en su medio ambiente es prácticamente desconocida, tanto a nivel de grupo como a nivel específico. A nivel específico no hay estudios sobre cómo los impactos externos pueden afectar a las poblaciones de las especies de sipuncúlidos, tan solo *A. muelleri* ha sido clasificada como especie sensible a alteraciones dentro de un estudio

multiespecífico (Borja *et al.* 2000). Sin embargo, su respuesta a nivel individual no es clara y, como hemos visto en otros apartados de esta tesis, su presencia en fondos blandos puede estar determinada por factores altamente variables tales como la presencia o densidad de conchas o tubos vacíos que pueda utilizar como refugio.

Se conoce que la mayor parte de especies del phylum presentan amplios rangos de distribución, y —como hemos visto en la primera sección de este capítulo— su distribución específica a pequeña escala no ha sido muy estudiada. También hemos visto que una especie con una alta distribución en nuestra área de estudio (*T. procera*) no había sido reportada con anterioridad. No obstante, a partir de los diferentes registros aislados, se puede concluir que se trata de especies con distribuciones altamente cosmopolitas, que pueden soportar amplias diferencias de profundidad e incluso temperatura. Esta es una característica deseable para un posible bioindicador, sin embargo este criterio ha de ser tomado con cautela ya que, como se ha comentado anteriormente, se pueden estar dando procesos de especiación o aclimatación entre poblaciones alejadas que podrían derivar en diferentes tolerancia frente a factores ambientales (Kawauchi & Giribet 2010, 2013). En cuanto al criterio de fidelidad no lo cumplen ya que la elección de un determinado hábitat no garantiza su presencia (ver 7.2.1). Por lo general las abundancias son muy bajas y variables, a excepción de *A. muelleri*. Si bien ha habido tres especies con presencia constante a lo largo de los diferentes estudios que conforman esta tesis (*A. muelleri*, *P.*

strombus y *T. procera*) sus abundancias han sido muy variables en el tiempo y en el espacio. El resto de especies han presentado abundancias también muy variables, desde la ausencia total hasta abundancias relativamente altas, como es el caso de *S. nudus* o *P. caupo*. Su alta variabilidad natural y la heterogeneidad del hábitat en el que viven muchas de las especies hace aún más difícil el aislamiento de los factores que afectan a su distribución.

Otras características ecológicas deseables para un buen bioindicador son tener un buen conocimiento sobre la ecología, fisiología y distribución de las especies, así como presentar una posición relevante en el ecosistema, que pueda ser defendida a nivel social o político. Es obvio que el grupo Sipuncula no cumple estos requisitos; ya hemos visto que el desarrollo de su conocimiento no se puede catalogar como alto y su importancia biológica, social o política es escasa o nula. Tampoco resultan prácticos, ya que su identificación resulta muy laboriosa y difícil para no especialistas (requiere conocimientos específicos y en muchos casos la disección del espécimen).

A la vista de los resultados obtenidos en cuanto a la zoogeografía de estas especies, su respuesta a cambios ambientales y la relación con el medio (ver 7.2.1) se puede concluir que las especies de sipuncúlidos estudiadas no son útiles para su uso como especies bioindicadoras, al menos en nuestra zona de estudio, ya que no cumplen con muchos de los requisitos primordiales y deseables para cualquier especie bioindicadora o centinela (Tab. 7.2).



Conlusiones / Conclusions

Photo: *Aspidosiphon muelleri* and *Ditrupa arietina* tube

CONCLUSIONES

- 1.** El conocimiento taxonómico del phylum ha de ser ampliado. Hay pocos trabajos con identificaciones a nivel de especie y sus áreas de distribución conocidas están muy disgregadas.
- 2.** Existe una alta variabilidad morfológica entre individuos de la misma especie, sobretodo en el caso del género *Phascolion*. Es necesario un amplio estudio comparativo y de revisión para poder discernir con claridad las diferentes especies o morfotipos.
- 3.** La abundancia de sipuncúlidos en el área estudiada es baja para la mayor parte de las especies, lo que concuerda con lo encontrado en otras áreas.
- 4.** La riqueza de especies de sipuncúlidos en los fondos blandos de la cuenca mediterránea occidental es relativamente alta. En este trabajo se han reportado el 25% del total de especies conocidas para el Mediterráneo.
- 5.** *Aspidosiphon muelleri* es la especie dominante en fondos blandos del mediterráneo occidental, con más del 80% de la abundancia total. Se trata de una especie común con un amplio rango de distribución.
- 6.** *Phascolion caupo* ha sido registrada por primera vez en el mar Mediterráneo. Se trata de una especie con una amplia distribución y la segunda en abundancia para la zona estudiada.
- 7.** La disponibilidad de refugios es un elemento necesario y limitante para el desarrollo de poblaciones de sipuncúlidos conchícolas en fondos blandos. En este grupo podemos incluir a tres de las especies estudiadas: *Aspidosiphon muelleri*, *Phascolion caupo* y *P. strombus strombus*.
- 8.** Las especies conchícolas/tubícolas (*Aspidosiphon muelleri*, *Phascolion caupo* y *P. strombus strombus*) son normalmente dominantes en los sedimentos más gruesos, que están relacionados con una mayor presencia de tubos y conchas vacías.
- 9.** *Aspidosiphon muelleri* muestra preferencia por utilizar como refugio los tubos de poliquetos sobre las conchas de gasterópodo cuando ambos están disponibles. Selecciona un tubo adecuado a su volumen que cambiará eventualmente al aumentar de tamaño.
- 10.** Los poblamientos de sipuncúlidos presentan una alta variabilidad natural, tanto en el tiempo como en el espacio. Estas diferencias no siempre están ligadas a las variables estudiadas y han de ser explicadas por otros factores más allá de las características sedimentarias o la disponibilidad de refugio.
- 11.** La actividad reproductiva de *Aspidosiphon muelleri* se correlaciona con la irradiancia media y la temperatura del agua. La puesta tiene lugar entre Agosto y Septiembre, prolongándose durante unas pocas semanas, y coincidiendo con la temperatura máxima anual del agua.
- 12.** No fue detectado ningún efecto directo de los impactos humanos estudiados sobre las poblaciones de sipuncúlidos. Sin embargo, se podría provocar un efecto indirecto al alterar las propiedades sedimentarias de los fondos afectados.
- 13.** Los sipuncúlidos no parecen ser buenos candidatos para su uso como organismos indicadores de alteraciones en el medio ambiente.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CONCLUSIONS

- 1.** Taxonomic knowledge of the phylum should be expanded. Very few studies identify to species level, and their known distribution ranges are very scattered.
- 2.** There is a high morphological variability between individuals of the same species, especially in the case of the genus *Phascolion*. A comprehensive review and comparative studies are necessary to discern between different species and morphotypes.
- 3.** Sipunculan abundance in the study area is low for most of the species, which is consistent with the abundance recorded in other areas.
- 4.** Sipunculan species richness in soft bottoms of the western Mediterranean basin is relatively high. In this paper we have reported 25% of total known species for the Mediterranean.
- 5.** *Aspidosiphon muelleri* is the dominant species in soft bottoms from the western Mediterranean, with over 80% of the total abundance. It is a common species with a wide distribution rank.
- 6.** *Phascolion caupo* was recorded for the first time in the Mediterranean Sea. It is a widely distributed species and the second in abundance for the studied area.
- 7.** The availability of shelters is a limiting and necessary element to the development of shell-dwelling sipunculan populations in soft bottoms. In this group we can include three of the species studied: *Aspidosiphon muelleri*, *Phascolion caupo* and *P. strombus strombus*.
- 8.** The shell/tube-dwelling species (*Aspidosiphon muelleri*, *Phascolion strombus strombus* and *P. caupo*) are dominant in the coarser sediments, which are usually linked to a higher presence of tubes and empty shells.
- 9.** *Aspidosiphon muelleri* prefers *Ditrupa arietina* tubes over gastropod shells when both choices are available. The sipunculan selects a tube suitable for its volume, and moves to another when its size increases.
- 10.** Sipunculan populations have high natural variability, both in time and in space. These differences are not always related to the studied variables and must be explained by other factors beyond the sedimentary characteristics or the shelter availability.
- 11.** The reproductive activity of *Aspidosiphon muelleri* correlates with the average irradiance and water temperature. Spawning takes place between August and September, lasting only for a few weeks, matching with the annual maximum in water temperature.
- 12.** No direct effects of human activities on the sipunculan populations studied were detected. However, they could cause an indirect effect by altering the sediment properties.
- 13.** Sipunculans do not appear to be good indicators of an altered or affected environment.

- AÇIK, S. (2007) Observations on the population characteristics of *Apionsoma (Apionsoma) misakianum* (Sipuncula: Phascolosomatidae), a new species for the Mediterranean fauna. *Scientia Marina*, 71(3): 571–577.
- AÇIK, S. (2008a) Occurrence of the alien species *Aspidosiphon (Aspidosiphon) elegans* (Sipuncula) on the Levantine and Aegean coasts of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 32(4): 443–448.
- AÇIK, S. (2008b) Sipunculans along the Aegean coast of Turkey. *Zootaxa*, 1852: 21–36.
- AÇIK, S. (2009) Soft-bottom sipunculans in Izmir Bay (Aegean Sea, eastern Mediterranean). *Zootaxa*, 2136: 40–48.
- AÇIK, S. (2010) Sipunculan Fauna in the Fethiye-Göcek Specially Protected Area (Turkey, Eastern Mediterranean). *Mediterranean Marine Science*, 11(1): 105–116.
- AÇIK, S. (2011) Sipuncula from the southern coast of Turkey (eastern Mediterranean), with a new report for the Mediterranean Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, 52(3): 313–329.
- AÇIK, S., MURINA, G.V., ÇINAR, M.E. & ERGEN, Z. (2005) Sipunculans from the coast of northern Cyprus (eastern Mediterranean Sea). *Zootaxa*, 1077: 1–23.
- ADOLPH, E.F. (1936) Differential permeability to water and osmotic exchanges in the marine worm *Phascolosoma*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 9(1): 117–135.
- ADRIANOV, A.V. & MAIOROVA, A.S. (2010) Reproduction and Development of Common Species of Peanut Worms (Sipuncula) from the Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 36(1): 1–15.
- ADRIANOV, A.V., MAIOROVA, A.S. & MALAKHOV, V.V. (2011) Embryonic and larval development of the peanut worm *Phascolosoma agassizii* (Keferstein 1867) from the Sea of Japan (Sipuncula: Phascolosomatidea). *Invertebrate Reproduction & Development*, 55(1): 22–29.
- ÅKESSON, B. (1958) A study of the nervous system of the sipunculoidea, with some remarks on the development of the two species *Phascolion strombi* Montagu and *Golfingia minuta* Keferstein. *Undersökningar över Oresund*, Lund, Sweden, (38): 249 pp.
- AMOR, A. (1993) Reproductive cycle of *Golfingia margaritacea*, a bipolar sipunculan, in subantarctic water. *Marine Biology*, 117: 409–414.
- ANGEL, J.E. (2000) Effects of shell fit on the biology of the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 243(2): 169–184.
- ARTÜZ, M.L. (2003) Feeding accustomation of the ballan wrasse in the Sea of Marmara *Labrus bergylta* Ascanius 1767. *Hidrobiologica*, 2: 17–19.
- BARBUT, J. (1783) The genera *Vermium* exemplified by various specimens of the animals contained in the orders of the *Intestina* et *Mollusca* Linnaei. J. Sewell. London. I-xx + 101 pp.
- BECK, M.W. (1995) Size-specific shelter limitation in stone crabs: a test of the demographic bottleneck hypothesis. *Ecology*, 76(3): 968–980.
- BEHRENTS, K.C. (1987) The influence of shelter availability on recruitment and early juvenile survivorship of *Lythrypnus dalli* Gilbert (Pisces: Gobiidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 107(1): 45–59.
- BIRKELAND, C. (1997) Life and death of coral reefs. Chapman & Hall, New York, 536 pp.
- BISHOP, M.J. (2005) Artificial sampling units: a tool for increasing the sensitivity of tests for impact in soft sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 107: 203–220.
- BLACKSTONE, N.W. (1985). The effects of shell size and shape on growth and form in the hermit crab *Pagurus longicarpus*. *The Biological Bulletin*, 168(1): 75–90.
- BLAINVILLE, H.M.D. (1827) Siponcle. In: *Dictionnaire des sciences naturelles, dans lequel on traite méthodiquement des différents êtres de la nature, considérés soit en eux-mêmes, d'après l'état actuel de nos connaissances, soit relativement à l'utilité qu'en peuvent retirer la médecine, l'agriculture, le commerce et les arts. Suivi d'une biographie des plus célèbres naturalists*, vol. 49. Plusieurs Professeurs du Jardin du Roi et des principales Ecoles de Paris. Levrault. Paris: 305–313.
- BLÁZQUEZ, A., FUMANAL, M. & OLMO, J. (1996) Rasgos sedimentológicos de la plataforma interna valenciana (Tramo Oliva-La Vila Joiosa) y su relación con la geomorfología continental. *Cadernos do Laboratorio Xeolóxico de Laxe*, 21: 671–683.
- BOHADSCH, J.B. (1761) De quibusdam animalibus marinis, eorumque proprietatibus, orbi litterario vel nondum vel minus notis. Vol.1 C.C. Walther. Dresdae, 169 pp.
- BOLAM, S.G. & FERNANDES, T.F. (2002) Dense aggregations of tube-building polychaetes: response to small-scale disturbances. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269(2), 197–222.

- BOLOGNA, P.A.X. & HECK, K.L. (1999) Macrofaunal associations with seagrass epiphytes. Relative importance of trophic and structural characteristics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 242: 21–39.
- BOORE, J.L. & STATON, J.L. (2002) The mitochondrial genome of the Sipunculid *Phascolopsis gouldii* supports its association with Annelida rather than Mollusca. *Molecular biology and evolution*, 19(2): 127–137.
- BORJA, A. & MUXIKA, I. (2005) Guidelines for the use of AMBI (AZTI's Marine Biotic Index) in the assessment of the benthic ecological quality. *Marine Pollution Bulletin*, 50(7): 787–799.
- BORJA, A., FRANCO, J. & PÉREZ, V. (2000) A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*, 40(12): 1100–1114.
- BOUDOURESQUE, C.F. (2004). Marine biodiversity in the Mediterranean; status of species, populations and communities. *Scientific Reports of Port-Cros national Park*, Fr. 20: 97–146.
- BOURCIER, M. (1976) Économie benthique d' une baie Méditerranéenne largement ouverte et des Regions voisines en fonction des influences naturelles et humaines. Doctorat thesis a l'Universite d' Aix – Marseille, 161 pp.
- BUCHANAN, J.B. (1984) Sediment analysis, p. 41–46. In: Holme, N.A. & A.D. McIntyre, *Methods for the Study of Marine Benthos*, 2nd edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 387 pp.
- CHEW, S.F., PENG, K.W., LOW, W.P. & IP, Y.K. (1994) Differences in the responses between tissues of the body wall and the internal organs of *Phascolosoma arcuatum* (Sipuncula) to changes in salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology – A Physiology*, 107(1): 141–147.
- CLARK, L.B. (1969) Systematics and phylogeny: Annelida, Echiura and Sipuncula. In: *Chemical zoology*. M. Frorkin & B.T. Scheer, eds., London: Academic Press, 1–62.
- CLARKE, K.R. & WARWICK, R.M. (1994) Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory, 144 pp.
- COLL, M., PIRODDI, C., STEENBEEK, J., KASCHNER, K., LASRAM, F.B.R. *et al.* (2010) The biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, patterns, and threats. *PLoS One*, 5(8), e11842.
- CORTÉS, F.A., SOLANO, O.D. & RUIZ-LÓPEZ, J.A. (2012) Spatio-temporal variation of soft-bottom macrobenthic fauna and relation to environmental factors in Gorgona Natural National Park, Colombian Pacific. *Boletín de investigaciones marinas y costeras*, 41(2): 323–353.
- CUENOT, L. (1922) Sipunculien, Echiuriens, Priapulien. *Faune de France, Paris*, 4: 1–30.
- CUTLER, E.B. (1965) Sipunculids of Madagascar. Extrait des Cahiers ORSTOM. *Océanographie*, 3(4): 51–63.
- CUTLER, E.B. (1973) Sipuncula of the Western North Atlantic. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 152(3): 103–204.
- CUTLER, E.B. (1975) Distribution of non-tropical Atlantic Ocean Sipuncula. In: M.E. RICE & M. TODORAVIC, eds, *Proceedings of the International Symposium on the Biology of Sipuncula and Echiura*. Belgrade: Naucno Delo Press; Naucno Delo Press, 25–33.
- CUTLER, E.B. (1977a) The bathyal and abyssal Sipuncula. *Galathea Report*, 14: 135–156.
- CUTLER, E.B. (1977b) Marine flora and fauna of the Northeastern United States. Sipuncula. NOAA Technical Reports NMFS Circular, 403: 1–7.
- CUTLER, E.B. (1979) A reconsideration of the sipunculan taxa *Fisherana* Stephen, *Mitosiphon* Fisher and *Apionsoma* Sluiter. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 65(4): 367–384.
- CUTLER, E.B. (1980) A cladistic analysis of sipunculan higher taxa: an exercise in futility? *American Zoologist*, 20(4): 821.
- CUTLER, E.B. (1984) Proposed conservation of *Siphonosoma cumanense* (Keferstein, 1867) over *S. edule* (Pallas, 1774) (Sipuncula). *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 41(1): 62–64.
- CUTLER, E.B. (1986) The family Sipunculidae (Sipuncula): Body wall structure and phylogenetic relationships. *Bulletin of Marine Science*, 38(2): 488–497.
- CUTLER, E.B. (1994) The Sipuncula : their systematics, biology, and evolution. Ithaca, New York, Cornell University Press, 453 pp.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1980) Deep water Sipuncula from the Gulf of Gascogne. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 60: 449–459.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1981) A reconsideration of Sipuncula named by I. Ikeda and H. Sato. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 26: 51–93.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1982) A revision of the genus *Siphonosoma* (Sipuncula).

- Proceedings of the Biological Society of Washington*, 95(4): 748–762.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1985) A revision of the genera *Sipunculus* and *Xenosiphon* (Sipuncula). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 85(3): 219–246.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1986) A revision of the genus *Nephasoma* (Sipuncula: Golfingiidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 99: 547–573.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1987a) A revision of the genus *Golfingia* (Sipuncula: Golfingiidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 100(4): 735–761.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1987b) Deep-water Sipuncula from the Eastern Atlantic Ocean. *Sarsia*, 72: 71–89.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1988) A revision of the genus *Themiste* (Sipuncula). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 101(4): 741–766.
- CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1989) A revision of the genus *Aspidosiphon* (Sipuncula). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 102: 826–865.
- CUTLER, E.B. & GIBBS, P.E. (1985) A phylogenetic analysis of higher taxa in the phylum Sipuncula. *Systematic zoology*, 34: 162–173.
- CUTLER, N.J., CUTLER, E.B., & VARGAS, J.A. (1992). Peanut worms (Phylum Sipuncula) from Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 40(1): 158–1543.
- CUTLER, N.J. & CUTLER, E.B. (1990) Revision of the genus *Phascolosoma* (Sipuncula: phascolosomatidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 103(3): 691–730.
- CZERNIAWSKA-KUSZA, I. (2004) Use of Artificial Substrates for Sampling Benthic Macro-invertebrates in the Assessment of Water Quality of Large Lowland Rivers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(5): 579–584.
- DE-LA-ROSA J, SAIZ J.I. & MORENO D. (2008) *Sipunculus nudus* Linnaeus, 1767 Tita. In: BAREA JM, BALLESTEROS E, MORENO D, editors. Libro Rojo de los Invertebrados de Andalucía. Sevilla: Junta de Andalucía, 639–642.
- DE-LA-OSSA-CARRETERO, J.A., DAUVIN, J.C., DEL-PILAR-RUSO, Y., GIMÉNEZ-CASALDUERO, F. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2010) Inventory of benthic amphipods from fine sand community of the Iberian Peninsula east coast (Spain), western Mediterranean, with new records. *Marine Biodiversity Records*, 3(119): 1–10.
- DELLE CHIAJE, S. (1823) Memorie sulla storia e notomia degli animali senza vertebre del Regno di Napoli. Vol. 1. Naples: Fratelli Fernandes, 184 pp.
- DEL-PILAR-RUSO, Y., DE-LA-OSSA-CARRETERO, J.A., GIMÉNEZ-CASALDUERO, F. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2011) Polychaeta distribution pattern on the Valencian Community coast, Spanish Mediterranean. *Ciencias Marinas*, 37(3): 261–270.
- DEL-PILAR-RUSO, Y., DE-LA-OSSA-CARRETERO, J.A., LOYA-FERNÁNDEZ, A., FERRERO-VICENTE, L.M., GIMÉNEZ-CASALDUERO, F. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2009) Assessment of soft-bottom Polychaeta assemblage affected by a spatial confluence of impacts: sewage and brine discharges. *Marine Pollution Bulletin*, 58: 765–786.
- DORDEL, J., FISSE, F., PURSCHKE, G. & STRUCK, T.H. (2010) Phylogenetic position of Sipuncula derived from multi-gene and phylogenomic data and its implication for the evolution of segmentation. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48(3): 197–207.
- DUNN, O.J. (1961) Multiple Comparisons Among Means. *Journal of the American Statistical Association*, 56: 52–64.
- EDMONDS, S.J. (1980) A revision of the systematics of Australian sipunculans (Sipuncula). *Records of the South Australian Museum*, 18: 1–74.
- ELWOOD, R., MARKS, N. & DICK, J. (1995) Consequences of shell-species preferences for female reproductive success in the hermit crab *Pagurus bernhardus*. *Marine Biology*, 123(3): 431–434.
- FERNÁNDEZ-TORQUEMADA, Y., GÓNZALEZ-CORREA, J.M., LOYA, A., FERRERO, L.M., DÍAZ-VALDÉS, M. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2009) Dispersion of brine discharge from seawater reverse osmosis desalination plants. *Desalination and Water Treatment*, 5: 137–145.
- FERRARIS, J.D., FAUCHALD, K. & KENSLEY, B. (1994) Physiological responses to fluctuation in temperature or salinity in invertebrates. Adaptations of *Alpheus viridari* (Decapoda, Crustacea), *Terebellides pawa* (Polychaeta) and *Golfingia cylindrata* (Sipunculida) to the mangrove habitat. *Marine Biology*, 120: 397–405.
- FERRERO-VICENTE, L.M. (2006). Influencia de los vertidos de aguas residuales tratadas y de las

- características del sedimento sobre los sipunculidos del litoral valenciano. Memoria D.E.A. (Diploma de Estudios Avanzados), Universidad de Alicante, 71 pp.
- FERRERO-VICENTE, L.M., DEL-PILAR-RUSO, Y., DE-LA-OSSA-CARRETERO, J.A. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2013a) Distribution of Sipuncula in the Gulf of Valencia and Cape Nao (western Mediterranean). *Zootaxa*, 3646(3): 235–250.
- FERRERO-VICENTE, L.M., LOYA-FERNÁNDEZ, A., MARCO-MÉNDEZ, C., MARTÍNEZ-GARCÍA, E. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2011) Soft-bottom sipunculans from San Pedro del Pinatar (Western Mediterranean): influence of anthropogenic impacts and sediment characteristics on their distribution. *Animal Biodiversity and Conservation*, 34(1): 101–111.
- FERRERO-VICENTE, L.M., LOYA-FERNÁNDEZ, A., MARCO-MÉNDEZ, C., MARTÍNEZ-GARCÍA, E., SAIZ-SALINAS, J.I. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2012) First record of the sipunculan worm *Phascolion (Phascolion) caupo* Hendrix, 1975 in the Mediterranean Sea. *Mediterranean Marine Science*, 13(1): 89–92.
- FERRERO-VICENTE, L.M., MARCO-MÉNDEZ, C., LOYA-FERNÁNDEZ, A. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2013b) Limiting factors on the distribution of shell/tube-dwelling sipunculans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 446, 345–354.
- FOTHERINGHAM, N. (1976) Population consequences of shell utilization by hermit crabs. *Ecology* 57(3): 570–578.
- FOTHERINGHAM, N. (1980) Effects of shell utilization on reproductive patterns in tropical hermit crabs. *Marine Biology* 55(4): 287–293.
- GAGE, J. (1968) The mode of life of *Mysella cuneata*, a bivalve ‘commensal’ with *Phascolion strombi* (Sipunculoidea). *Canadian Journal of Zoology*, 46(5): 919–934.
- GAGE, J. (1979) Mode of life and behaviour of *Montacuta phascolionis*, a bivalve commensal with the sipunculan *Phascolion strombi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(03): 635–657.
- GERHARDT, A. (2002). Bioindicator species and their use in biomonitoring. *Environmental Monitoring I. EOLSS*.
- GEROULD, J.H. (1913) The sipunculids of the eastern Coast of North America. *Proceedings of the United States National Museum*, 44: 373–437.
- GHERARDI, F. (1996) Gastropod shells or polychaete tubes? The hermit crab *Discorsopagurus schmitti*'s housing dilemma. *Ecoscience* 3(2): 154–164.
- GIBBS, P.E. & CUTLER, E.B. (1987) A classification of the phylum Sipuncula. *Bulletin of the British Museum natural History (Zoology)* 52(1): 43–58.
- GIBBS, P.E. (1975) Gametogenesis and spawning in a hermaphroditic population of *Golfingia minuta* (Sipuncula). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 55: 69–82.
- GIBBS, P.E. (1977) British sipunculans. Synopses of the British Fauna N°12, *The Linnean Society of London*, 1–35.
- GIBBS, P.E. (1982) The synonymy of the *Golfingia* species assigned to the *Abyssorum* section (Sipuncula). *Sarsia*, 67: 119–122.
- GIBBS, P.E. (1985) On the genus *Phascolion* with particular reference to the north-east Atlantic species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 65: 311–323.
- GIBBS, P.E. (1986) The taxonomy of some little-known Sipuncula from the North-East Atlantic region including new records. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66: 335–341.
- GIBBS, P.E. (1987) A new species of *Phascolosoma* (Sipuncula) associated with a decaying whale skull trawled at 880 m depth in the South-west Pacific. *New Zealand Journal of Zoology*, 14: 135–137.
- GIBBS, P.E., CUTLER, E.B. & CUTLER, N.J. (1983) A review of the genus *Thysanocardia* Fisher (Sipuncula). *Zoologica Scripta*, 12(4): 295–304.
- GOODSELL, P.J., UNDERWOOD, A.J. & CHAPMAN, M.G. (2009). Evidence necessary for taxa to be reliable indicators of environmental conditions or impacts. *Marine Pollution Bulletin*, 58(3): 323–331.
- GREEN, J.P. & DUNN, D.F. (1977) Osmotic and ionic balance in the mangrove sipunculid, *Phascolosoma arcuatum*. *Marine Research in Indonesia*, 18: 61 pp.
- GRÉMARE, A., AMOUROUX, J. M. & VÉTION, G. (1998a). Long-term comparison of macrobenthos within the soft bottoms of the Bay of Banyuls-sur-mer (northwestern Mediterranean Sea). *Journal of Sea Research*, 40(3): 281–302.
- GRÉMARE, A., SARDÁ, R., MEDERNACH, L., JORDANA, E., PINEDO, S., AMOUROUX, J.M., MARTIN, D., NOZAIS, C. & CHARLES, F. (1998b) On the dramatic increase of *Ditrupa arientina* O.F. Müller (Annelida: Polychaeta) along both the French and the Spanish Catalan

- coasts. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 47: 447–457.
- GUTIÉRREZ, J.L., JONES, C.G., STRAYER, D.L. & IRIBARNE, O.O. (2003) Molluscs as ecosystem engineers: the role of shell production in aquatic habitats. *Oikos*, 101(1): 79–90.
- HALL, J.R. & SCHELTEMA, R.S. (1975) Comparative morphology of open-ocean Pelagospaera. In: M.E. Rice & M. Todorović (eds). *Proceedings of the International Symposium on the Biology of the Sipuncula and Echiura*, Belgrade: Naučno Delo Press, 183–197.
- HATSCHKE, B. (1881) Entwicklungsgeschichte von Echiurus und die systematische Stellung der Echiuridae. *Arbeiten der Zoologischen Institut der Universität Wien*, 3: 45–79.
- HELM, C., BERNHART, S.H., SIEDERDISSEN, C. H.Z., NICKEL, B. & BLEIDORN, C. (2012). Deep sequencing of small RNAs confirms an annelid affinity of Myzostomida. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(1): 198–203.
- HENDRIX, G.Y. (1975) A review of the genus Phascolion (Sipuncula) with the descriptions of two new species from the Western Atlantic. In: M.E. RICE and M. TODOROVIC, eds, *Proceedings of the international symposium on the biology of the Sipuncula and Echiura*. Belgrade: Naučno Delo Press; Naučno Delo Press, 117–140.
- HICKMAN, C.P., ROBERTS, L.S. & LARSON, A. (2008). Integrated principles of zoology. 14th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 910 pp.
- HOFRICHTER, R. (2002) El mar Mediterráneo: Fauna, flora, ecología. *Ed. Omega*, 849 pp.
- HOLDICH, D. (1987) The tubicolous habit amongst the Tanaidacea (Crustacea, Peracarida) with particular reference to deep-sea species. *Zoologica Scripta*, 16(3): 223–233.
- HYLLEBERG, J. (1975) On the ecology of the sipunculan *Phascolion strombi* (Montagu). In: M.E. RICE & M. TODOROVIC, eds, *Proceedings of the international symposium on the biology of the Sipuncula and Echiura*. Belgrade: Naučno Delo Press; Naučno Delo Press, 241–250.
- HYMAN, L. H. (1959) *The Invertebrates, Smaller Coelomate Groups*. McGraw-Hill, New York, 783 pp.
- ICZN—International Commission on Zoological Nomenclature (1999) In: WDL Ride, HG Cogger, C Dupuis, O Kraus, A Minelli, FC Thompson, PK Tubbs (eds). *International Code of Zoological Nomenclature*, ICZN, 306 pp.
- INGLIS, W.G. (1985) Evolutionary waves: patterns in the origins of animal phyla. *Australian Journal of Zoology*, 33: 153–178.
- JARAMILLO-LONDOÑO, A.M., CANTOS, G., PORRAS-CASTELLÓ, R. & BENDITO-DURÀ, V. (2011). Composición de la dieta y estrategia alimentaria de cinco especies de peces bentónicos de la costa de Cullera (España). *Mediterránea. Serie de Estudios Biológicos*. Época II, n. especial 2011.
- JOHNSON, R.C., CARREIRO, M.M., JIN, H.S. & JACK, J.D. (2012) Within-year temporal variation and life-cycle seasonality affect stream macroinvertebrate community structure and biotic metrics. *Ecological Indicators*, 13(1), 206–214.
- KAWAUCHI, G.Y. & GIRIBET, G. (2013) *Sipunculus nudus* Linnaeus, 1766 (Sipuncula): cosmopolitan or a group of pseudo-cryptic species? An integrated molecular and morphological approach. *Marine Ecology*, 1–14.
- KAWAUCHI, G.Y. & GIRIBET, G. (2010) Are there true cosmopolitan sipunculan worms? A genetic variation study within Phascolosoma perlucens (Sipuncula, Phascolosomatidae). *Marine Biology*, 157(7): 1417–1431.
- KAWAUCHI, G.Y., SHARMA, P.P. & GIRIBET, G. (2012) Sipunculan phylogeny based on six genes, with a new classification and the descriptions of two new families. *Zoologica Scripta*, 41(2): 186–210.
- KĘDRA, M. & MURINA, G.V. (2007) The sipunculan fauna of Svalbard. *Polar Research*, 26(1): 37–47.
- KĘDRA, M. & WŁODARSKA-KOWALCZUK, M. (2008) Distribution and diversity of sipunculan fauna in high Arctic fjords (west Svalbard). *Polar Biology*, 31: 1181–1190.
- KELLOGG, C.W. (1976) Gastropod shells: A potentially limiting resource for hermit crabs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 22(1): 101–111.
- KINGSFORD, M. & BATTERSHILL, C. (1998) *Studying Marine Temperate Environments: A Handbook for Ecologists*. Canterbury University Press, Christchurch, New Zealand, 335 pp.
- KLAUDATOS, S.D., KLAUDATOS, D.S., SMITH, J., BOGDANOS, K. & PAPAGEORGIOU, E. (2006) Assessment of site specific benthic impact of floating cage farming in the eastern Hios island, Eastern Aegean Sea, Greece. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 338: 96–111.
- KLEIN, R., MOKADY, O. & LOYA, Y. (1991) Bioerosion in ancient and contemporary corals of the genus Porites: Patterns and palaeoenvironmental implications. *Marine ecology progress series*, 77(2): 245–251

- KOCH, E., ALTAMIRANO, J.C., COVACI, A., LANA, N.B. & CIOCCO, N. F. (2014). Should apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae) be used as bioindicator for BDE-209?. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(1), 761–765.
- KOCOT, K.M. (2013). Recent Advances and Unanswered Questions in Deep Molluscan Phylogenetics. *American Malacological Bulletin*, 31(1): 195–208.
- KOOP, K. & HUTCHINGS, P. (1996) Disposal of sewage to the ocean: a sustainable solution? *Marine Pollution Bulletin*, 33: 121–123.
- KOUKOURAS, A., VOULTSIADOU-KOUKOURA, E., CHINTIROGLOU, H. & DOUNAS, C. (1985) Benthic bionomy of the North Aegean Sea. III. A comparison of the macrobenthic animal assemblages associated with seven sponge species. *Cahiers de Biologie marine*, 26: 301–319.
- KRISTOF, A., WOLLESEN, T. & WANNINGER, A. (2008) Segmental mode of neural patterning in sipuncula. *Current biology : CB*, 18(15): 1129–1132.
- KRISTOF, A., WOLLESEN, T., MAIOROVA, A.S. & WANNINGER, A. (2011) Cellular and muscular growth patterns during sipunculan development. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 316(3): 227–240.
- LABRUNE, C., GRÉMARE, A., GUIZIEN, K. & AMOUROUX, J.M. (2007) Long-term comparison of soft bottom macrobenthos in the Bay of Banyuls-sur-Mer (north-western Mediterranean Sea): a reappraisal. *Journal of Sea Research*, 58(2): 125–143.
- LAMARK, J.B. (1816) *Historie Naturelle des animaux sans vertèbres*, vol. 3: radiaires, vers, insectes. J.B. Baillière, Paris, 770 pp.
- LANG, A. (1888) *Lehrbuch der vergleichenden Anatomie zum Gebrauche bei vergleichenden anatomischen und aologischen Vorlesungen*. Neunte gänzlich umgearbeitete Auflage con E.O. Schmidt's Handbuch der vergleichenden Anatomie. Vol. I. Jena, 290 pp.
- LANKESTER, E.R. (1885) *Golfingia macintoshi*, a new sipunculid from the coast of Scotland. *Transactions of the Linnean Society of London, Zoology*, 11(2): 469–473.
- LEE, H.C., LU, P.N., HUANG, H.L., CHU, C., LI, H.P. & TSAI, H.J. (2014). Zebrafish Transgenic Line huORFZ Is an Effective Living Bioindicator for Detecting Environmental Toxicants. *PloS one*, 9(3): e90160.
- LINNAEUS, C. (1766) *System naturae*, 12th edition.
- LOYA-FERNÁNDEZ, Á., FERRERO-VICENTE, L.M., MARCO-MÉNDEZ, C., MARTÍNEZ-GARCÍA, E., ZUBCOFF, J. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2011) Comparing four mixing zone models with brine discharge measurements from a reverse osmosis desalination plant in Spain. *Desalination*, 286: 217–224.
- LU, L. & WU, R. (2007) Seasonal effects on recolonization of macrobenthos in defaunated sediment: A series of field experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 351(1): 199–210.
- MAIOROVA, A.S. & ADRIANOV, A.V. (2005) The first finding of spermatozeugmata in sipunculids (Sipuncula), animals with external fertilization. *Doklady Biological Sciences*, 402(1): 214–216.
- MAIOROVA, A.S. & ADRIANOV, A.V. (2007) Ultrastructural observations on spermiogenesis in the peanut worm, *Themiste pyroides* (Chamberlin, 1920) (Sipuncula; Sipunculidea). *Invertebrate Reproduction & Development*, 50(4): 173–180.
- MAREK, L. (1963) New knowledge on the morphology of Hyolithes. *Sborník geologických věd, řada Paleontologie*, 1: 53–72.
- MARTIN, M. (1786) *Observations on Marine Vermes, Insects, etc.* R. Trewman, Exeter, 26 pp.
- MAXMEN, A.B., KING, B.F., CUTLER, E.B. & GIRIBET, G. (2003) Evolutionary relationships within the protostome phylum Sipuncula: a molecular analysis of ribosomal genes and histone H3 sequence data. *Molecular phylogenetics and evolution*, 27(3): 489–503.
- MAZZOLA, A., MIRTO, S. & DANOVARO, R. (1999) Initial Fish-Farm Impact on Meiofaunal Assemblages in Coastal Sediments of the Western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 38(12): 1126–1133.
- McINTYRE, A.D. (1995) Human impact on the oceans: the 1990s and beyond. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 147–151.
- McLEAN, R. (1983) Gastropod shells: a dynamic resource that helps shape benthic community structure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 69(2): 151–174.
- McMILLAN (1968) *British Shells*. Frederick Warne & Co. Ltd., London, 196 pp.
- MORAN, D.P. & REAKA, M.L. (1988) Bioerosion and availability of shelter for benthic reel organisms. *Marine Ecology Progress Series*, 44: 249–263.
- MORENO, F., ACEVEDO, K., GRIJALBA-BENDECK, M., POLO-SILVA, C. & ACERO, A. (2009). Espectro trófico de la raya eléctrica *Narcine bancroftii* (Griffith & Smith 1834)

- (Elasmobranchii, Narcinidae) en playa Salguero, Santa Marta, Caribe Colombiano. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4):413–422.
- MORTON, B. & BRITTON, J. (1995) Partitioning of shell resources by *Aspidosiphon muelleri* (Sipuncula) and *Anapagurus laevis* (Crustacea) in the Azores. *Açoreana Supplement*, 66–67.
- MORTON, B. & HARPER, E.M. (2009) Drilling predation upon *Ditrupa arietina* (polychaeta: serpulidae) from the mid-atlantic açores, portugal. *Açoreana Suplemento*, (6): 157–165.
- MORTON, B. & SALVADOR, A. (2009) The biology of the zoning subtidal polychaetes *Ditrupa arietina* (Serpulidae) in the Açores, Portugal, with a description of the life history of its tube. *Açoreana*, Suplemento, (6): 145–156.
- MÜLLER, C.H.G., HYLLEBERG, J. & MICHALIK, P. (2014) Complex epidermal organs of Phascolion (Sipuncula): insights into the evolution of bimodal secretory cells in annelids. *Acta Zoologica*, In Press.
- MURINA, V.V. (1971) Geographical distribution of marine worms of the phylum Sipuncula in the world ocean. *Zoologicheskii Zhurnal*, 50: 184–192.
- MURINA, V.V. (1973) New species of Pacific Ocean sipunculids. *Zoologicheskii Zhurnal*, 52: 942–945.
- MURINA, V.V. (1975) Ways of evolution and phylogeny of the phylum Sipuncula. *Zoologicheskii Zhurnal*, 54: 1747–1758.
- MURINA, V.V. (1977) Marine worms of the Arctic and boreal waters of Europe. Works on the fauna of the USSR. Leningrad: Academii Nauk SSSR, 283 pp.
- MURINA, V.V. (1984) Ecology of Sipuncula. *Marine Ecology Progress Series*, 17: 1–7.
- MURINA, G.V., PANCUCCI-PAPADOPOULOU, M.A. & ZENETOS, A. (1999) The phylum Sipuncula in the eastern Mediterranean: composition, ecology, zoogeography. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 79: 821–830.
- NIELSEN, C. (1985) Animal phylogeny in the light of the trochaea theory. *Biological Journal of the Linnean Society*, 25(3): 243–299.
- NÚÑEZ, J., NÚÑEZ, L. & MAGGIO, Y. (2011). Invertebrados que se comercializan en canarias como cebo vivo para la pesca deportiva. Consejo de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias, 40 pp.
- O'CONNOR, M.I., BRUNO, J.F., GAINES, S.D., HALPERN, B.S., LESTER, S.E., KINLAN, B.P. & WEISS, J.M. (2007) Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4): 1266–1271.
- OGLESBY, L. (1969) Some osmotic responses of the sipunculid worm *Themiste dyscritum*. *Comparative biochemistry and physiology*, 26(1): 155–177
- OGLESBY, L. (1982) Salt and water balance in the sipunculan *Phascolopsis gouldi*, is any animal a simple osmometer? *Comparative biochemistry and physiology*, 71a: 363–368. .
- PALLAS, P.S. (1774) Lumbricus. In *Spicilegia Zoologica*. Berlin, Lange, 1–15.
- PANCUCCI-PAPADOPOULOU, M.A., MURINA, V.V. & ZENETOS, A. (1999) *The Phylum Sipuncula in the Mediterranean Sea*. Athens: National Center for Marine Research, 109 pp.
- PAPAGEORGIOU, N., KALANTZI, I. & KARAKASSIS, I. (2010) Effects of fish farming on the biological and geochemical properties of muddy and sandy sediments in the Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*, 69: 326–336.
- PAPAZACHARIAS, A., KOUKOURAS, A., KEVREKIDIS, T. & VOULTSIADOU, E. (1998) Infra-and Circalittoral Soft Substratum Macrofaunal Assemblages of Kavala Gulf (Aegean Sea). *International review of hydrobiology*, 83(5-6) : 461–477.
- PAUL, G. (1910) Über *Petalostoma minutum* Keferstein und verwandte Arten einigen Bemerkungen zur Anatomie von *Onchnesoma steenstrupii*. *Jahrbucher Abtheilung fur anatomie*, 29: 1–50.
- PEARSON, T.H. & ROSENBERG, R. (1978) Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 16: 229–311.
- PENG, W. & IP, K. (1994) Is the Coelomic Plasma of *Phascolosoma arcuatum* (Sipuncula) Hyperosmotic and Hypoionic in Chloride to the External Environment? *Zoological science*, 11(6): 879–882.
- PICARD J. (1965) Recherches qualitatives sur les biocoenoses marines des substrats meubles dragables de la région marseillaise. *Bulletin des recherches et travaux de la station marine d'Endoume*, 52 (36),1–160.
- PILGER, J.F. (1987) Reproductive biology and development of *Themiste lageniformis*, a parthenogenic sipunculan. *Bulletin of Marine Science*, 41(1): 59–67.
- POR, F.D. (1975) Boring species of *Aspidosiphon* (Sipuncula) on the coasts of Israel. In. M.E. Rice

- & M. Todorović (eds). *Proceedings of the International Symposium on the Biology of the Sipuncula and Echiura, Belgrade: Naucno Delo Press*, 301–304.
- QUATREFAGES, A. (1847) Etudes sur les types inférieurs de l'embranchement des annelés. Mémoire sur l'échiure de Gaertner (*Echiurus Gaertnerii* NOB.). *Annales des Sciences naturelles comprenant la zoologie, la botanique, l'anatomie et la physiologie comparées de deux règnes, et l'histoire des corps organisés fossiles, 6ème. sér.*, 7: 307–343.
- QUEIRÓS, A.M., BIRCHENOUGH, S.N., BREMNER, J., GODBOLD, J.A., PARKER, R.E., ROMERO-RAMIREZ, A., ... & WIDDICOMBE, S. (2013). A bioturbation classification of European marine infaunal invertebrates. *Ecology and evolution*, 3(11): 3958–3985.
- RADASHEVSKY, V.I. & MIGOTTO, A.E. (2006) Photoreceptive organs in larvae of Spionidae (Annelida) and Sipuncula. *Journal of zoology*, 268(4): 335–340.
- RAFINESQUE, C.S. (1814) *Précis des découvertes somiologiques ou zoologiques et botaniques*. Palerme: Royale Typographie Militaire, 55 pp.
- RICE, M.E. (1966) Reproductive biology and development of Sipuncula. (Doctoral dissertation, University of Washington), 322 pp.
- RICE, M.E. (1967) A comparative study of the development of *Phascolosoma agassizii*, *Golfingia pugettensis*, and *Themiste pyroides* with a discussion of developmental patterns in the Sipuncula. *Ophelia*, 4(2): 143–171.
- RICE, M.E. (1970) Asexual reproduction in a sipunculan worm. *Science*, 167: 1618–1620.
- RICE, M.E. (1975a) Giese A.C., Pearse J.S. *Reproduction of marine invertebrates. Sipuncula*. New York: Academic Press, 127 pp.
- RICE, M.E. (1975b) Observation of the development of six species of Caribbean Sipuncula with a review of development in the phylum. In: ME Rice and M. Todorović, eds. *Proceedings of the International Symposium on the Biology of the Sipuncula and Echiura, Belgrade: Naucno Delo Press*, 141–160.
- RICE, M.E. (1976) Larval development and metamorphosis in Sipuncula. *American Zoologist*, 16(3): 563–571.
- RICE, M.E. (1981) Larvae adrift: patterns and problems in life histories of sipunculans. *American Zoologist*, 21(3): 605–619.
- RICE, M.E. (1985) Sipuncula: developmental evidence for phylogenetic inference. In: S.C. MORRIS, J.D. GEORGE, R. GIBSON & H.M. PLATT, eds, *The origins and relationships of lower invertebrates*. Oxford University Press, Oxford, 274–296.
- RICE, M.E. (1988) Observations on development and metamorphosis of *Siphonosoma cumanense* with comparative remarks on *Sipunculus nudus* (Sipuncula, Sipunculidae). *Bulletin of marine science*, 42(1): 1–15.
- RICE, M.E. (1989) Comparative observations of gametes, fertilization, and maturation in sipunculans. In: RYL, J.S. and P.A. TYLER, eds, *Reproduction, genetics and distributions of marine invertebrates. 23rd European marine biology symposium*. Fredensborg, Olsen & Olsen, 167–182.
- RICE, M.E., REICHARDT, H.F., PIRAINO, J. & YOUNG, C.M. (2012) Reproduction, development, growth, and the length of larval life of *Phascolosoma turnerae*, a wood-dwelling deep-sea sipunculan. *Invertebrate Biology*, 131(3): 204–215.
- RIESGO, A., ANDRADE, S.C., SHARMA, P.P., NOVO, M., PÉREZ-PORRO, A.R., VAHTERA, V. ... & GIRIBET, G. (2012). Comparative description of ten transcriptomes of newly sequenced invertebrates and efficiency estimation of genomic sampling in non-model taxa. *Frontiers in zoology*, 9(1): 1–24.
- RODRIGUES, L.J., DUNHAM, D.W. & COATES, K.A. (2002) The effect of shelter type on uropod symmetry in *Calcinus verrilli* (Anomura: Diogenidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 22(2): 298–303.
- RONDELETTI, G. (1555) *Universae aqualitium Historiae pers altera, cum veris ipsorum Imaginibus*. M. Bonhome, Lugduni, 242 pp.
- RUIZ, J.M., MARCO-MÉNDEZ, C. & SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2010) Remote influence of offshore fish farm waste on Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows. *Marine Environmental Research*, 69(3): 118–126.
- RUNNEGAR, B., POJETA, J., MORRIS, N.J., TAYLOR, J.D., TAYLOR, M.E. & MCCLUNG, G. (1975) Biology of the Hyolitha. *Lethaia*, 8(2): 181–191.
- SAIZ, J.I., CARTES, J.E., MAMOURIDIS, V., MECO, A. & PANCUCCI-PAPADOPOULOU, M.A. (2014). New records of *Phascolosoma turnerae* (Sipuncula: Phascolosomatidae) from the Balearic Basin, Mediterranean Sea. *Marine Biodiversity Records*, 7: e16.
- SAIZ-SALINAS, J.I. & MURINA, G. (1982) Lista de especies de sipunculidos de las costas ibéricas y de mares adyacentes, *Actas II Simposio Ibérico Estudios Bentos Marino, III 1982*, 203–212.

- SAIZ-SALINAS, J.I. & VILAFRANCA-URCHEGUI, L. (1988) Gusanos sipuncúlidos (Sipuncula) de las zonas adyacentes al estrecho de Gibraltar. *Biología Ambiental Congreso Mundial Vasco*, 2: 57–63.
- SAIZ-SALINAS, J.I. & VILAFRANCA-URCHEGUI, L. (1990) Sipuncula from the Alboran Sea and Ibero-Moroccan Bay. *Journal of Natural History*, 24(5): 1143–1177.
- SAIZ-SALINAS, J.I. (1982) Nuevos datos sobre los sipuncúlidos de costas españolas y de mares adyacentes. *Actas del Primer Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino*, 3: 193–201.
- SAIZ-SALINAS, J.I. (1984) Los tipos de Sipuncúlidos de De Quatrefages del Museo de Paris. Universidad del País Vasco, Bilbao, 258 pp.
- SAIZ-SALINAS, J.I. (1986) Los gusanos sipuncúlidos (Sipuncula) de los fondos litorales y circalitorales de las costas de la Península Ibérica, Islas Baleares, Canarias y mares adyacentes. *Monografías del Instituto Español de Oceanografía*, 84 pp.
- SAIZ-SALINAS, J.I. (1993a) Sipuncula. In: *Fauna Ibérica*, vol. 4. RAMOS, M.A. et al. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid, 200 pp.
- SAIZ-SALINAS, J.I. (1993b) Sipuncula from Réunion Island (Indian Ocean). *Journal of Natural History*, 27: 535–555.
- SAIZ-SALINAS, J.I. (2007) Sipunculans and echiurans from the deep Angola Basin. *Journal of Natural History*, 41: 45–48.
- SARÁ, G., SCILIPOTI, D., MAZZOLA, A. & MODICA, A. (2004) Effects of fish farming waste to sedimentary and particulate organic matter in a southern Mediterranean area (Gulf of Castellammare, Sicily): a multiple stable isotope study ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). *Aquaculture*, 234: 199–213.
- SARDÁ, R., PINEDO, S. & MARTIN, D. (1999) Seasonal dynamics of macroinfaunal key species inhabiting shallow soft-bottoms in the Bay of Blanes (NW Mediterranean). *Acta Oecologica*, 20(4): 315–326.
- SHELTEMA, R.S. & HALL, J.R. (1975) The dispersal of pelagosphaera larvae by ocean currents and the geographical distribution of sipunculans. In: M.E. Rice & M. Todorović (eds). *Proceedings of the International Symposium on the Biology of the Sipuncula and Echiura*, Belgrade: Naucno Delo Pres, 103–116.
- SCHEMBRI, P.J. & JACCARINI, V. (1978) Some aspects of the ecology of the echiuran worm *Bonellia viridis* and associated infauna. *Marine Biology*, 47(1): 55–61.
- SCHULZE, A. (2005) Sipuncula (Peanut Worms) from Bocas del Toro, Panama. *Caribbean Journal of Science*, 41(3): 523–527.
- SCHULZE, A. & RICE, M.E. (2009) *Nephasoma pellucidum*: a model species for sipunculan development?. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences*, 38: 209–217.
- SCHULZE, A., CUTLER, E.B. & GIRIBET, G. (2005) Reconstructing the phylogeny of the Sipuncula. *Hydrobiologia*, 535(1): 277–296.
- SCHULZE, A., CUTLER, E.B. & GIRIBET, G. (2007) Phylogeny of sipunculan worms: A combined analysis of four gene regions and morphology. *Molecular phylogenetics and evolution*, 42(1): 171–192.
- SCHULZE, A., MAIOROVA, A., TIMM, L.E. & RICE, M.E. (2012) Sipunculan Larvae and “Cosmopolitan” Species. *Integrative and comparative biology*, 52(4): 497–510.
- SEDGWICK, A. (1898) Sipunculoidea (Gephyrea, Achaeta). In *A student's textbook of Zoology*. London: Swan Sonnenschein, I: 534–539.
- SHEN, X., MA, X., REN, J. & ZHAO, F. (2009) A close phylogenetic relationship between Sipuncula and Annelida evidenced from the complete mitochondrial genome sequence of *Phascolosoma esculenta*. *BMC genomics*, 10: 136–148.
- SHIELDS, M.A. & KĘDRA, M. (2009) A deep burrowing sipunculan of ecological and geochemical importance. *Deep-Sea Research I*, 56: 2057–2064.
- SHUE, M.F., CHEN, W.D., SU, C.C. & LU, M.C. (2014). Heavy Metals in Bivalve Mollusks Collected From Da-Peng Bay Lagoon in South-Southwestern Taiwan. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77(4): 214–222.
- SHULMAN, M.J. (1984) Resource limitation and recruitment patterns in a coral reef fish assemblage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 74(1): 85–109.
- SINGH, G.G., MARKEL, R.W., MARTONE, R.G., SALOMON, A.K., HARLEY, C.D.G. & CHAN, K.M.A. (2013) Sea Otters Homogenize Mussel Beds and Reduce Habitat Provisioning in a Rocky Intertidal Ecosystem. *PLoS ONE* 8(5): e65435.
- SNELGROVE, P.V.R. (1994) Hydrodynamic enhancement of invertebrate larval settlement in microdepositional environments: colonization tray experiments in a muddy habitat. *Journal of*

- Experimental Marine Biology and Ecology*, 176: 149–166.
- SNELGROVE, P.V.R. & BUTMAN, C.A. (1994) Animal-sediment relationships revisited: cause versus effect. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, 32: 111–177.
- SNELGROVE, P., GRANT, J. & PILDITCH, C.A. (1999). Habitat selection and adult-larvae interactions in settling larvae of soft-shell clam *Mya arenaria*. *Marine Ecology Progress Series*, 182: 149–159.
- SOLÍS-WEISS, V. (1982) Estudio de las poblaciones macrobénticas en áreas contaminadas de la bahía de Marsella, Francia. *Anuario Instituto. Ciencias del Mar y Limnología. UNAM.*, 9(1): 1–18.
- SOMASCHINI, A., MARTINI, N., GRAVINA, M.F., BELLUSCIO, A., CORSI, F. & ARDIZZONE, G.D. (1998) Characterization and cartography of some Mediterranean soft-bottom benthic communities (Ligurian Sea, Italy). *Scientia Marina*, 62(1-2): 27–36.
- SOYER, J. (1970) Bionomie benthique du plateau continental de la cote catalana Française. III: Les peuplements de Copepodes Harpacticoides (Crustacea). *Vie Milieu*, 21: 377–511.
- STEELE, M.A. (1999) Effects of shelter and predators on reef fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 233(1): 65–79.
- STEPHEN, A.C. & EDMONDS, S.J. (1972) The phyla Sipuncula and Echiura. Trustees British Museum (Nat. Hist.). Publication N° 717, London, 528 pp.
- STEPHEN, A.C. (1964) A revision of the classification of the phylum Sipuncula. *Annals and Magazine of Natural History*, 7(13): 457–462.
- STIASSNY, M.L.J. & MEYER, A. (1999) Cichlids of the African Rift Lakes. *Scientific American*, February, 64–69.
- STRUCK, T.H., PAUL, C., HILL, N., HARTMANN, S., HÖSEL, C., KUBE, M., LIEB, B., MEYER, A., TIEDEMANN, R., PURSCHKE, G. & BLEIDORN, C. (2011) Phylogenomic analyses unravel annelid evolution. *Nature*, 471(7336): 95–98.
- STRUCK, T.H., SCHULT, N., KUSEN, T., HICKMAN, E., BLEIDORN, C., MCHUGH, D. & HALANYCH, K.M. (2007) Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. *BMC evolutionary biology*, 7(1): 57.
- SUNDARA-RAJULU, G.S. & KRISHNAN, N. (1969) Occurrence of Asexual Reproduction by Budding in Sipunculida. *Nature*, 223: 186–187.
- TEMPLADO, J., BALLESTEROS, E., GALPARSORO, I., BORJA, Á., SERRANO, A., MARTÍN, L. & BRITO, A. (2012). Inventario español de hábitats y especies marinos (Guía Interpretativa). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España, Madrid, 229 pp.
- TRONCOSO, J.S. & URGORRI, V. (1992) Asociación de *Tellimya phascolionis* (Dautzenberg et Fischer, 1925) (Bivalvia, Montacutidae) con el sipuncúlido *Phascolion strombi* (Montagu, 1804) en la Ría de Ares y Betanzos (Galicia, NO de España). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)*, 88(1-4): 189–194.
- TRONCOSO, N., MOREIRA, J. & TRONCOSO, J.S. (2000) *Tellimya phascolionis* (Dautzenberg & Fischer, 1925) (Bivalvia, Montacutidae) and other fauna associated with the sipunculid *Phascolion strombi* (Montagu, 1804) in the Ría de Aldán (Galicia, NW Península Ibérica). *Argonauta*, XIV(1): 59–66.
- VASSILOPOULOU, V. & PAPAConstantinou, C. (1993). Feeding habits of red mullet (*Mullus barbatus*) in a gulf in western Greece. *Fisheries research*, 16(1): 69–83.
- VÁZQUEZ-LUIS, M., SÁNCHEZ-JEREZ, P. & BAYLE-SEMPERE, J.T. (2012) Does the invasion of *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* affect the feeding habits of amphipods (Crustacea: Amphipoda)? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(1): 87–94.
- VERA-GARCÍA, F., GARCÍA-CASCALES, J.R. & HERNÁNDEZ-GUILLÉN, Z. (2008). Atlas de irradiación solar y temperatura ambiente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Universidad Politécnica de Cartagena y Agencia de Gestión de la Energía de la Región de Murcia (ARGEM), Cartagena, 136 pp.
- WANNINGER, A., KOOP, D., BROMHAM, L., NOONAN, E. & DEGNAN, B.M. (2005) Nervous and muscle system development in *Phascolion strombus* (Sipuncula). *Development, Genes and Evolution*, 215: 509–518.
- WANNINGER, A., KRISTOF, A. & BRINKMANN, N. (2009) Sipunculans and segmentation. *Communicative and Integrative Biology*, 2(1): 56–59.
- WARWICK, R. & CLARKE, K. (1991) A comparison of some methods for analysing changes in benthic community structure. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 71: 225–244.
- WARWICK, R. & CLARKE, K. (1994) Relearning the ABC: taxonomic changes and abundance/

- biomass relationships in disturbed benthic communities. *Marine Biology*, 118: 739–744.
- WU, R.S.S. & LAM, K.S. (1994) Impact of marine fish farming on water quality and bottom sediment: A case study in the sub-tropical environment. *Marine Environmental Research*, 38(2): 115–145.
- WU, R.S.S. & SHIN, P.K.S. (1997) Sediment characteristics and colonization of soft-bottom benthos: a field manipulation experiment. *Marine Biology*, 128: 475–487.
- YING, X.P., DAHMS, H.U., LIU, X.M., WU, H.X., ZHANG, Y.P., CHEN, C. & YANG, W.X. (2009) Development of germ cells and reproductive biology in the sipunculid *Phascolosoma esculenta*. *Aquaculture Research*, 40(3): 305314.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante