

**JACUMAR**  
**JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

**INFORME FINAL**

**Título: Nutrición y alimentación de paralarvas subadultos de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).**

## 1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

**TITULO: Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).**

### DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: Benjamín García García.

Organismo/ Centro: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y alimentario. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia.

Correo electrónico: benjamin.garcia@carm.es

### Comunidades Autónomas participantes

C.A. de Andalucía.

Responsable en la Comunidad Autónoma: Daniel Acosta Camacho.

Grupo de Investigación: IFAPA centro "Agua del Pino"

Investigador responsable: José Luís Muñoz Pérez.

C.A. de Asturias.

Responsable en la Comunidad Autónoma: José Francisco Carrasco Fidalgo.

Grupo de Investigación: CEP.

Investigador responsable: Carmen Rodríguez Rodríguez.

C.A. de Baleares.

Responsable en la Comunidad Autónoma: José María Valencia Cruz

Grupo de Investigación: LIMIA.

Investigador responsable: José María Valencia Cruz.

C.A. de Canarias.

Responsable en la Comunidad Autónoma: María Soledad Izquierdo López.

Grupo de Investigación: ICCM y IEO de Tenerife.

Investigador responsable: Juan Socorro Cruz.

C.A. de Cataluña.

Responsable en la Comunidad Autónoma: Martí Sans Pairutó.

Grupo de Investigación: IRTA.

Investigador responsable: Alicia Estévez García.

C.A. de Galicia.

Responsable en la Comunidad Autónoma: Fátima Linares Cuerpo

Grupo de Investigación: IEO de Vigo y CIMA.

Investigador responsable: José Iglesias Estévez.

-C.A. de Murcia.

Responsable en la Comunidad Autónoma: Benjamín García García.

Grupo de Investigación: IMIDA.

Investigador responsable: Jesús Cerezo Valverde.

-C.A. de Valencia.

Responsable en la Comunidad Autónoma: Miquel Lull Part.

Grupo de Investigación: UPV y IA de Torre la Sal (CSIC).

Investigador responsable: Ana Tomás Vidal.

**NOTA:**

Por distintos motivos las CCAA de Andalucía, Canarias y Valencia has solicitado prorroga sin presupuesto para el año 2013, por lo que el Plan Nacional de NUTRIPULPO no se ha podido cerrar. En la presente memoria se hace referencia sólo a aquellas que lo han finalizado y que presentan los informes finales extensos en los anexos correspondientes. El año próximo, una vez que dichas CCAA hayan finalizado se presentará el Informe Final completo.

## 2.- RESULTADOS TECNICOS PARCIALES DEL PLAN NACIONAL

### 1. SUBPROYECTO PARALARVAS.

Línea 1.1. Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables

1.2. Sistema de cultivo de paralarvas utilizando un mesocosmos.

1.3. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas Artemia enriquecida con fitoplancton y enriquecedores.

1.4. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presa Artemia y dietas inertes.

1.5. Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidáceos cultivados y zoeas de crustáceos vivas o congeladas.

### 2. SUBPROYECTO SUBADULTOS.

2.1. Requerimientos nutritivos del pulpo de roca.

2.2. Optimización de los formatos de pienso para el pulpo de roca.

Estructura: líneas de investigación y coordinación.

Coordinador	Coordinador	Participantes
OPTIPUPO	Benjamín García García	
SP1. Paralarvas.		
L1. Reproductores		
L2. Mesocosmos.	Javier Roo (ICCM)	CAN y BAL.
L3. Enriquecedores.	Juan Socorro Cruz (ICCM)	AST, BAL, CAN, CAT, GAL y VAL.
L4. Dietas inertes.	Alicia Estévez (IRTA)	CAN y CAT.
L5. Zooplancton	José Iglesias Estevez (IEO)	AST, BAL, CAN, CAT y GAL.
SP2. Subadultos		
L6. Requerimientos	Jesús Cerezo Valverde (IMIDA)	AST, CAN, CAT y MUR.
L7. Pienso	Benjamín García García (IMIDA)	AND, AST, CAN, CAT y MUR.

## **C.A. DE ASTURIAS.**

### **2.1. OBJETIVOS INICIALES**

#### Subproyecto Paralarvas

- 1.1. Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables
- 1.3. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas Artemia salina enriquecida con fitoplancton y enriquecedores comerciales
  - 1.3.1. Engorde de Artemia salina a tallas adaptadas a la paralarva
  - 1.3.2. Enriquecimiento de Artemia
  - 1.3.3. Cultivo de paralarvas
  - 1.3.5. Análisis bioquímico de Artemia enriquecida y paralarvas
- 1.5. Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidáceos cultivados y zoeas de crustáceos vivas o congeladas
  - 1.5.1. Obtención de zoeas de decápodos
  - 1.5.2. Obtención de zooplancton del medio natural
  - 1.5.3. Otras dietas vivas alternativas
  - 1.5.4. Cultivo de paralarvas

#### Subproyecto de juveniles

### 2.1 Requerimientos nutritivos del pulpo de roca

### **2.3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.**

#### 1.1. Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables

**Material y Métodos:** Los progenitores de las pesquerías locales, se distribuyeron en tanques con refugios. Se alimentaron con Lirio (*Micromesistius poutassou*), Sardina (*Sardina pilchardus*), cangrejos vivos (*Carcinus maenas*) y mejillones vivos (*Mytilus edulis*).

**Resultados y Discusión:** Se estabularon 21 hembras y 8 machos, con pesos entre 1.000g y 2.7000g. Algunas hembras venían fecundadas del mar y la mayoría realizaron la puesta. Las hembras con puesta pueden adoptar otras puestas y alcanzar la eclosión de los huevos. El desarrollo embrionario osciló entre 30 y 74 días, con temperaturas de 14 a 20°C. La talla /peso de las paralarvas fue de 1,6mm-3,6mm/0,28mg-0,65mg.

- 1.3. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas Artemia salina enriquecida con fitoplancton y enriquecedores comerciales
  - 1.3.1. Engorde de Artemia salina a tallas adaptadas a la paralarva

**Material y Métodos:** Se utilizó la Artemia EG INVE, Bélgica y se cultivó en tanques de 50 L a 28°C . Las microalgas utilizadas fueron T. suecicca e I. galbana para una densidad de 35 artemias /mL

**Resultados y Discusión:** El crecimiento alcanzado a día 3 y 7 de cultivo fue de 1,10mm/0,06mg y 1,82mm/0,10mg, con una supervivencia del 92% y 33%, respectivamente.

### 1.3.2. Enriquecimiento de Artemia

**Material y Métodos:** Se utilizaron diferentes concentraciones de harina de krill, Nannochloropsis oculata (No) y Rhodomonas sp. (Rh)). A los 3 días y con talla de 300 µm se enriqueció a una densidad de 3 art/mL y 26°C., durante 24 horas.

**Resultados y Discusión:** Los mejores resultados se obtuvieron con la harina de krill, a 0,3 g/L y 0,4 g/L, Nannochloropsis oculata, a 5x10<sup>6</sup> cels/mL y Rhodomonas sp. a 0,5x10<sup>6</sup> cels/mL.

### 1.3.3. Cultivo de paralarvas

**Material y Métodos:** Sistema de cultivo semiabierto de tanques parabólicos de 30 L. La entrada de agua favorecía la circulación vertical de larvas y alimento. Fotoperiodo natural y densidad de 20 individuos/L. Se utilizó Artemia enriquecida con Selco y harina de krill.

**Resultados y Discusión:** En ninguno de los 2 casos se llegó a superar los 10 días de cultivo.

### 1.3.5. Análisis bioquímico de Artemia enriquecida y paralarvas

**Material y Métodos:** Se analizaron Artemia sin enriquecer y enriquecida con Selco, Ori Green, Harina de Krill, N. oculata) y Rhodomonas sp. y paralarvas recién eclosionadas y alimentadas con Artemia enriquecida con los distintos enriquecedores.

**Resultados y Discusión:** Los enriquecedores de Artemia que más aportan en cuanto a ácidos grasos son las microalgas Nannochloropsis oculata y Rhodomonas sp. y Selco. Su uso aporta un contenido en ácidos grasos similar al de las paralarvas recién eclosionadas.

## 1.5. Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidáceos cultivados y zoeas de crustáceos vivas o congeladas

### 1.5.1. Obtención de zoeas de decápodos

**Material y Métodos:** Se estabularon hembras de centollo (Maja squinado) ovadas de 1kg en un tanque de 250 L y se alimentaron con Lirio congelado (Micromesistius poutassou) y mejillones vivos (Mytilus edulis). Las zoeas se congelaron para su uso como dieta inerte.

**Resultados y Discusión:** Llegaron a realizar 6 puestas, con un periodo de desarrollo embrionario de 32 a 74 días y una talla media de la zoea de 2,40mmx1,18mm.

### 1.5.2. Obtención de zooplancton del medio natural

**Material y Métodos:** Se acondicionó un tanque circular de 7000 L. para mantener un bloom natural de fitoplancton y zooplancton mediante bombeo y tamizado de agua de la ría.

**Resultados:** Se descartó su uso por los resultados negativos.

#### 1.5.3. Otras dietas vivas alternativas

**Material y Métodos:** Se hizo la inducción a la puesta de 20 erizos *Paracentrotus lividus* por inyección de 5,0 ml de KCl 0,5 N a través de la membrana peristomial. Los huevos fecundados se mantuvieron a 18 °C durante 48 horas.

**Resultados:** Las larvas de erizo obtenidas se congelaron y se utilizaron como alimento para paralarvas de pulpo en los primeros días del cultivo, en las experiencias del año 2011.

#### 1.5.4. Cultivo de paralarvas

**Material y Métodos:** Se utilizaron 4 sistemas de cultivo:

**Sistema 1:** Circuito semiabierto de tanques parabólicos de fibra de color blanco, con un aporte de agua de 0,4 L/minuto y circulación vertical de las larvas y del alimento.

**Sistema 2:** Tanques troncocónicos de 200 L con tamiz de 300 µm. Circuito cerrado con recirculación por inyección de aire. Renovación parcial diaria y total cada 10 días.

El alimento utilizado en ambos casos fue *Artemia* cultivada con *T.suecicca* y *Ph. tricornutum* y enriquecida con Selco, Ori Green y *N. oculata*, Zoeas de centollo congeladas y larvas de erizo congeladas. El fotoperiodo fue natural y la densidad del cultivo fue de 20 paralarvas/L, en un volumen total de 30L a 20°C-22°C y 32‰-34‰.

**Sistema 3:** El sistema 2 modificado con un efecto de giro del agua dentro del tamiz para la resuspensión del alimento inerte, a base de *Artemia* enriquecida con Selco y zoeas congeladas, a la que se añadió un complemento de *Artemia* enriquecida con Rh (0,5x10<sup>6</sup> cels/mL) o con No (5x10<sup>6</sup> cels/mL) y krill deshidratado.

**Sistema 4:** Tanque de 1000 L con 3 tamices de 300 µm y sus réplicas, delimitando un volumen de 17,5 L, en circuito abierto, en donde se valoró la adición de zoeas congeladas y krill deshidratado como complemento de la *Artemia* con Selco

Se calculó la tasa Daily growth index  $DGI = [(PSf_{1/3} - P_{Si1/3}) / (Tf - Ti)] \times 100$

**Resultados y Discusión:** Los mejores resultados se obtienen en los tanques troncocónicos con tamiz, eliminando el sistema de giro por sus efectos negativos sobre las paralarvas. El cultivo finaliza a los 58 días con una talla media de 6,23mm y 5,05mg, muy inferior a los valores obtenidos por Villanueva et al. en 2002 y por Carrasco et al. en 2005.

La tasa de crecimiento diario (DGI) aumenta hasta el día 15, luego disminuye hasta que finaliza el cultivo. A día 50 de cultivo, la longitud de sus brazos representa el 43,40 % de la longitud total. El aporte de las larvas de erizo, zoeas

de centollo congeladas y krill deshidratado no repercute en un mayor crecimiento, aunque se observó una buena aceptación de los mismos.

## 2.1 Requerimientos nutritivos del pulpo de roca

Objetivos: Conocer los requerimientos de proteína y aminoácidos, de lípidos totales, clases de lípidos y ácidos grasos, y de minerales específicos en el pulpo de roca.

Material y Métodos: La experiencia se realizó en verano con una temperatura y salinidad media de 20,0°C y 33,9‰, con 18 ejemplares machos, en una piscina de 35 m<sup>3</sup> compartimentada y con refugios. Se ensayó un pienso desarrollado por el IMIDA de Murcia con dieta natural, como control. Se utilizaron 3 lotes de 3 ejemplares en ambas dietas. Circuito abierto y renovación de 20 m<sup>3</sup>/hora.

La dieta natural consistió en Lirio (*Micromesistius poutassou*), Sardina (*Sardina pilchardus*), cangrejos vivos (*Carcinus maenas*) y mejillones vivos (*Mytilus edulis*). Los ingredientes del pienso eran huevina, gelatina, almidón de patata y aminoácidos. La pauta de alimentación fue de 5 días a la semana, para evitar el rechazo a la monodieta del pienso y retirada de los restos del pienso para calcular el alimento no ingerido, mediante un factor de conversión para eliminar el error por absorción de agua.

$$Y = 1,3677X + 4,1604 \quad X = Y - 4,1604/1,3677 \quad R^2 = 0,9961$$

Se determinó:

$$G (\%) = [(\text{Ln peso medio final} - \text{Ln peso medio inicial}) / \text{días de cultivo}] \times 100$$

$$\Delta P (\text{g/día}) = (\text{Peso medio final} - \text{Peso medio inicial}) / \text{días de cultivo}$$

$$IC = [\text{Peso alimento ingerido} / (\text{Peso final} - \text{Peso inicial})]$$

Resultados y Discusión: Los pulpos con pienso eran reticentes a aceptarlo, teniendo que facilitarles el contacto para asegurarnos que lo comían. En algunos casos era rechazado después de morderlo.

En uno de los 3 lotes se produce un rechazo total al pienso, muriendo los 3 ejemplares por inanición. El ( $\Delta P$ ) pasa de 0,43 g/día a 5,37 g/día en el segundo mes y una G de 0,004% a 0,69%, es decir que los demás lotes mejoran y no se observa un efecto de rechazo por la monodieta del pienso.

Con la dieta natural, el ( $\Delta P$ ) pasa de 14,097 g/día a 23,653 g/día y una (G) de 1,153 %. A 1,467 %. El crecimiento es inferior al obtenido en otras experiencias realizadas en el Centro, probablemente debido a la pauta de los 2 días de ayuno y límite en el alimento.

La mortalidad se concentra en el segundo mes, siendo la misma para ambas dietas (44,44 %). Esta mortalidad estaría claramente relacionada con la pauta de ayuno y la calidad del pienso lo que fomentó inanición, competencia y canibalismo en todos los lotes, teniendo en cuenta que la densidad de estabulación fue baja

Conclusiones



- La relación entre temperatura y duración del desarrollo embrionario nos permite escalonar las eclosiones y así asegurarnos un stock constante de paralarvas.
- Las hembras con puesta son capaces de adoptar otra y llevar a cabo la eclosión de los huevos de ambas puestas.
- El empleo de Artemia enriquecida con productos comerciales y las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Rhodomonas* sp. y zoeas de centollo congeladas, mejoran la supervivencia y crecimiento de las paralarvas aunque no satisface los requerimientos nutricionales mínimos para superar la fase planctónica.
- El diseño de sistemas de cultivo de fácil mantenimiento y que favorezcan la suspensión en el agua de alimento inerte, simplificaría los cultivos auxiliares y por tanto los cultivos de paralarvas.
- Los piensos testados ofrecieron una mejora en cuanto a su aceptabilidad por parte del pulpo, sin embargo no aportaron los requerimientos nutritivos suficientes para llevar a cabo un óptimo proceso de engorde.

## **C.A. DE BALEARES.**

### **2.1. OBJETIVOS INICIALES**

Subproyecto paralarvas.

- 1.1 Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables.
- 1.2. Sistema de cultivo de paralarvas utilizando sistemas semi-extensivos, también llamados mesocosmos
- 1.3. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas Artemia engordada y posteriormente enriquecida con fitoplancton y enriquecedores.
- 1.4. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como Artemia y dietas inertes.
- 1.5. Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidaceos cultivados y zoeas de crustáceos vivas o congeladas.
- 1.6. Análisis bioquímicos de las presas y las paralarvas producidas por los distintos sistemas de cultivo: Lípidos (clases de lípidos y ácidos grasos), proteínas, aminoácidos y carbohidratos.

### **2.2. OBJETIVOS REALIZADOS**

- 1.1 Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables.
- 1.2. Sistema de cultivo de paralarvas utilizando sistemas semi-extensivos, también llamados mesocosmos
- 1.3. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas Artemia engordada y posteriormente enriquecida con fitoplancton y enriquecedores.

### **2.3. METODOLOGÍA**

1.1. Obtención de reproductores: Pesca de juveniles con embarcación de arrastre profesional, pesca a mano (buceo en apnea), captura con trampas (nasas).

Aclimatación en tanques: relación 1:3 macho/hembra, luz tenue y refugios. Los tanques han operado en circuito abierto. Alimentación de reproductores con alimento congelado: crustáceos, cefalópodos y pescado.

Las hembras con puesta se trasladaron a tanques individuales y se dejó de alimentarlas.

1.2. Generación de una cadena trófica mediante la fertilización del tanque rellenado con agua cruda. Una vez generado el mesocosmos se controla la presencia de amonio y nitratos y se siembran paralarvas a baja densidad (2 paralarvas/l). Se controla la disponibilidad de presas, añadiendo artemia o alimento congelado cuando estas disminuyan.

1.3. Engorde y enriquecimiento de artemia. Se adapta el protocolo propuesto a las instalaciones del LIMIA. Se realizan los enriquecimientos usando fitoplancton y emulsiones comerciales.

Los cultivos intensivos se realizan en las condiciones propuestas: 15-20 paralarvas/litro, alimentación a una densidad de 0,5 metanauplius de 5 días de Artemia, en tanques por triplicado, con fotoperiodos 12h luz/12 horas oscuridad.

## 2.4. RESULTADOS

1.1. La obtención de reproductores y su aclimatación se ha realizado sin ninguna dificultad.

Sólo hemos obtenido puesta en los meses de verano, 10 entre los dos años, aunque sólo han eclosionado 6 puestas. Las eclosiones han sido muy variables en número. Las diferencias se han debido a las muertes prematuras de las madres. El valor medio de las eclosiones ha sido de  $193.351 \pm 136.710$  paralarvas (si se eliminan las puestas en las que la madre murió antes de finalizar la misma, el valor medio sube a  $280.942 \pm 106.412$  paralarvas).

1.2. El año 2011 se procedió a realizar una experiencia de cultivo semiextensivo en mesocosmos en  $40 \text{ m}^3$ , mientras que en 2012 se realizaron varios cultivos en mesocosmos de  $40 \text{ m}^3$  y  $5 \text{ m}^3$ . En todas las ocasiones, el día 7 se dejaron de observar paralarvas.

1.3. Se ha adaptado el protocolo de engorde de artemia a las instalaciones del LIMIA, en tanques de 200 l y a baja densidad que proporcionó suficiente artemia para realizar las tareas de cultivo de paralarvas.

Para el enriquecimiento se han usado dos enriquecedores comerciales, Red pepper de Bernaqua y OriGreen de Skretting. El resto de enriquecimientos previstos no se han realizado debido a la finalización prematura del proyecto.

1.4. Durante los dos años del proyecto se han realizado diferentes pruebas de cultivo.

El año 2011 se trabajó con distintos volúmenes de tanque (400 l y 1000 l). La mortalidad fue del 100% a día 15, excepto en dos tanques de 1000 l, en los que

se consiguió que algunas paralarvas llegasen a día 31 (tanque de pared azul) y 43 (tanque de pared negra).

Durante el año 2012 se realizaron dos experiencias: la primera, en 6 tanques de 200 l, con dos triplicados a 21°C y 24-26°C. No se han obtenido resultados concluyentes, con una mortalidad del 100% al día 18. La segunda prueba se llevo a cabo en 6 tanques de 1000 l, la mitad de ellos con aporte de fitoplancton (aguas verdes). En este caso se observa una mayor supervivencia y un mayor tamaño en el caso del cultivo en aguas verdes. Se han conseguido mantener paralarvas hasta los 46 días de edad, con una supervivencia en uno de los tanques del 0,5%. Se produjo una mortalidad repentina al añadir artemia congelada como alimento.

1.5. No se realiza por la finalización prematura del proyecto.

1.6. Se recogieron las muestras según el protocolo establecido. Todas las muestras del año 2011 se han destruido. Del año 2012 se conservan muestras de día 0, 15 y 46. No está previsto realizar el análisis por falta de disponibilidad económica, a expensas de que algún grupo esté interesado en realizarlas.

## 2.5. CONCLUSIONES

- Se ha conseguido la aclimatación y la obtención de puestas viables.
- No se han obtenido resultados en las experiencias de cultivo en mesocosmos.
- Se ha conseguido una supervivencia post-eclosión de hasta 45 días (supervivencia 0,05% en 2011 y 0,5% en 2012) en los cultivos con artemia enriquecida como alimento.

## C.A. DE CATALUÑA.

### 2.1. OBJETIVOS INICIALES

El IRTA participó en los dos subproyectos, a continuación se enumeran los objetivos indicados en el proyecto:

#### 1. Subproyecto paralarvas

1.1. Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables

1.2 Cultivo intensivo de paralarvas utilizando Artemia enriquecida con fitoplancton y enriquecedores

1.4. Cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presa Artemia y dietas inertes

1.5 Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidáceos cultivos y zoeas de crustáceos vivas o congeladas

#### 2. Subproyecto subadultos

2.1 Requerimientos nutritivos del pulpo de roca. Tarea 2.1.3 Requerimientos de diferentes clases lipídicas: colesterol y fosfolípidos. Tarea 2.1.5 Evaluación de las distintas relaciones DHA-EPA-ARA

2.2. Optimización de los formatos de pienso para el pulpo de roca. Tarea 2.2. Textura y estabilidad de los piensos mediante extractos enzimáticos. Tarea 2.2.7 Utilización de distintas harinas comerciales

## 2.2. OBJETIVOS REALIZADOS

Objetivo 1.1 Totalmente alcanzado, dado que tanto en el año 2011 como en 2012 se consiguió mantener los reproductores en condiciones controladas de luz y temperatura a fin de obtener puestas en distintos periodos del año, en el caso del año 2011 se obtuvieron puestas en primavera, verano y otoño con las que se realizaron los experimentos de cultivo larvario

Objetivo 1.2 (1.3.) Se realizaron dos experimentos en primavera y otoño de 2011 de alimentación de las paralarvas con Artemia enriquecida con microalgas o productos comerciales analizándose la composición en ácidos grasos de la Artemia. Los experimentos llevados a cabo en primavera no dieron resultados positivos dada la mala calidad inicial de las larvas pero sí los del otoño donde se obtuvieron juveniles suplementando la Artemia enriquecida con zooplancton capturado (misidáceos de los géneros hemimysis y Siriella) y zoeas de centolla congeladas (ver informe de 2011).

Objetivo 1.4 No realizado

Objetivo 1.5 Alcanzado en parte, junto con el objetivo 1.2

Objetivo 2.1 No realizado

Objetivo 2.2 En el año 2011 se realizaron 2 experiencias (primavera, piensos codificados como HP/K y 3HP/K y otoño piensos codificados como MR y CR) de uso de saborizantes-atractivos en el pienso de engorde de pulpo. Los ensayos se realizaron en colaboración con la C.A. de Valencia que suministró los piensos. Los subadultos (peso inicial de 850-950 g) ingirieron el pienso pero el crecimiento fue bajo. En el año 2012 se ensayaron piensos extrusionados a los que se había incluido distintos atrayentes y aglomerantes (piensos FMS y 3FMS en primavera y piensos 45CP y 50CP en Otoño), en ambos casos los crecimientos también han sido muy bajos en relación al tanque control alimentado con dieta húmeda (ver informes 2011 y 2012)

## 2.3. METODOLOGÍA

1.- Paralarvas.- Para el cultivo larvario de paralarvas de primavera de 2011 se utilizaron cubiletes de malla de 30 litros situados en tanques de 1500 litros con una densidad de 10 paralarvas/litro (2700 larvas por cubilete). El enriquecimiento de los metanauplios de Artemia se realizó bien con enriquecedores comerciales (Easy Selco –INVE-, algamac –Aqua fauna- Multigain –BioMar-) o con mezclas de microalgas (Rhodomonas lens y Isochrysis galbana) durante 2 a 6 h. Para el cultivo de paralarvas del otoño de 2011 se usaron directamente tanques de 1500 litros con una densidad larvaria de 3,3 larvas/l (5000 larvas/tanque). En ambos casos la densidad de metanauplios suministrada a las paralarvas fue de 0,3NA/ml aumentando a 0,4 NA/ml a partir del día 7. A partir del día 23 se suministraron metanauplios de Artemia de 5 días de edad junto con zoeas de centolla congeladas, a partir del día 70 se suministraron adultos de Artemia y misidáceos.

El crecimiento de las paralarvas se evaluaba periódicamente mediante el peso seco (secado en estufa a 60°C durante 24 h hasta alcanzar peso constante), la supervivencia mediante recuento del número de individuos en los tanques. La composición en ácidos grasos de los enriquecedores y de la Artemia enriquecida mediante extracción de los lípidos con cloroformo:metanol, transmetilación con metanol-sulfúrico y determinación del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía gas-líquido

2.- Subadultos.- En todos los experimentos de engorde de subadultos con piensos se utilizaron tanques de fibra de vidrio divididos cada uno de ellos en seis compartimentos, ubicándose un ejemplar en cada compartimento (6 individuos por tratamiento). El crecimiento se estimaba pesando cada individuo al cabo de 2 o 4 semanas de alimentación con los piensos extrusionados estimándose la tasa de crecimiento específica (TEC o SGR), ingesta y tasa de conversión del alimento.

## 2.4. RESULTADOS

1.- Paralarvas.- En el experimento de cultivo larvario llevado a cabo en el otoño de 2011 se consiguió producir 25 juveniles de 100 días de edad, con una supervivencia del 0,5%. La mayor mortalidad se produjo en los primeros 70 días de vida (un 90%), con un crecimiento que se ajusta a la curva  $y = 288e^{0.0314 \text{edad}}$  tal como se muestra en el informe del año 2011.

2.- Subadultos.- De los 4 experimentos llevados a cabo (2 en 2011 y 2 en 2012) usando distintos tipos de harinas, atractantes y saborizantes en todos los casos los crecimientos fueron muy bajos, aunque los subadultos ingerían y utilizaban los piensos suministrados, las tasas de crecimiento estándar (TEC) de los piensos experimentales nunca superaron el 0,47% día<sup>-1</sup> mientras que las obtenidas con dieta fresca (cangrejo y pescado) siempre estuvieron en torno a 1,7-2,2% día<sup>-1</sup>

## 2.5. CONCLUSIONES

1.- Es imprescindible estabular y alimentar los reproductores en las condiciones más óptimas antes de la puesta para así obtener larvas de buena calidad.

2.- La pérdida de peso de las paralarvas la primera semana de vida indica una deficiente calidad de las mismas, al igual que la deficiente o nula captura de presas por parte de las larvas los primeros días de cultivo

3.- Los cambios de tamaño (nauplio a metanauplio y luego a adulto) y de tipo (artemia, zoeas de centolla, misidáceos) de presas vivas ha de hacerse en el momento oportuno, ya que ello conlleva mantener el crecimiento y la supervivencia de las paralarvas

4.- es necesario poner refugios cuando ocurre la metamorfosis, pero también es necesario mantener una buena higiene de los tanques

5.- Los crecimientos de ejemplares adultos obtenidos con dietas extrusionadas son muy bajos (tasa de crecimiento del 0,4% día<sup>-1</sup>) en comparación con los alimentados con dieta fresca (1.7 a 2.2% día<sup>-1</sup>). Sin embargo el pienso es ingerido y con las distintas formulaciones se pueden sacar algunas conclusiones para una mejora de los piensos en el futuro: Usar un 45% de proteína (en forme

de harina de pescado y calamar), usar esencia de calamar como attractante proporcionan tasas de crecimiento ligeramente mayores.

## **C.A. DE GALICIA.**

### **2.1. OBJETIVOS INICIALES**

#### **1. Paralarvas.**

##### **1.1. Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables**

**1.5 Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidáceos cultivados y zoeas de crustáceos vivas o congeladas**

##### **1.5.1. Captación de zooplancton del medio natural**

##### **1.5.2. Utilización de zooplancton producido en afloramientos artificiales**

##### **1.5.4. Desarrollar cultivos de paralarvas con diferente tipo de dietas:**

- Artemia y zoeas de crustáceos
- Artemia y zooplancton del m. natural y del bloom exterior.
- Artemia con enriquecedor elaborado por el ICCM.

**1.5.5. Averiguar el perfil nutricional de zoeas de diversos crustáceos estabulados en el vivero de la empresa Remagro S.L.**

### **2.2. OBJETIVOS REALIZADOS**

Se han podido realizar todos los objetivos planteados. En lo que se refiere al objetivo 5 (1.5.5), se ha realizado el perfil nutricional de diversas zoeas de crustáceos aunque éstos no han podido ser estabulados en la empresa Remagro al producirse el cierre del vivero por razones comerciales. No se ha podido comprobar el efecto de las diferentes zoeas en la alimentación de las paralarvas al carecer de financiación el proyecto para el año 2013 y lo mismo ocurre respecto al objetivo (1.5. 4) en lo referido al enriquecedor elaborado por el ICCM.

### **2.3. METODOLOGÍA**

Se describe en relación con cada objetivo.

**1.1. Los reproductores de pulpo se han estabulado en el CO del IEO en Vigo, siguiendo la metodología estándar para conseguir puestas y paralarvas viables que fueron cultivadas en 2011 y 2012.**

**1.5.1. Se realizó un by-pass a la salida del depósito principal de la empresa donde se colocó un filtro especial (UNIK® wheelfilter). Se realizaron captaciones de 24 horas recogiendo fracciones >200 µm y 200-1000 µm que eran fijadas con formol al 4%.**

**1.5.2. Aprovechando la experiencia e infraestructura de la empresa, se formaban afloramientos artificiales de fitoplancton y se dejaban unos días hasta que aparecían poblaciones zooplanctónicas. Las muestras tomadas del afloramiento**

artificial se filtraban entre 25 y 2000  $\mu\text{m}$  y posteriormente se realizaba un análisis cualitativo y cuantitativo de las mismas.

1.5.4. El cultivo de paralarvas se realizó en tanques de 1000 L siguiendo la metodología de cultivo estandarizada por los investigadores del proyecto. Las presas utilizadas fueron Artemia y zoeas de Maja. Se estableció un stock de reproductores de *Maja brachydactyla* para producir las zoeas necesarias. También se ensayó un enriquecedor de Artemia elaborado por el ICCM producido por el equipo participante del ICCM

1.5.5. La metodología se detalla convenientemente en la memoria del proyecto.

## 2.4. RESULTADOS

### Obtención de zoeas

En los meses de Mayo y Junio de 2012, se dispusieron hembras ovadas de *Maja brachydactyla*, procedentes de cetáceas del área de Vigo, en tanques redondos de 1000 L provistos de circuito abierto y se realizó un control del desarrollo embrionario de las puestas, siguiendo el mismo protocolo utilizado en el año 2011. Las hembras eran separadas en función del estado embrionario de las mismas en 3 tanques. Así, en el tanque 1 se estabularon las hembras en estado I y las correspondientes al estadio final (estado III) en el último de los tanques, con el fin de obtener un aporte continuo de zoeas. Una vez completadas las puestas se procedió a la renovación de los stocks de centollas.

Crecimiento de centollas nacidas en cautividad:

De los 18 ejemplares estabulados, cinco hembras han realizado ya la muda terminal y tres hembras ya presentan huevos en estado I. En el momento en que se produzca la eclosión de las zoeas, se habrá completado por primera vez el ciclo de esta especie bajo condiciones de cultivo y se procederá a la publicación de este importante proceso de cultivo.

Al no financiar JACUMAR este proyecto el próximo año 2013, todos los ejemplares fueron trasladados desde la empresa REMAGRO S.L. hasta las instalaciones de la Planta de Cultivo del IEO de Vigo.

### Obtención de zooplancton

En las captaciones realizadas (véanse anexos 2 y 3) se corroboró finalmente que, a pesar de que los organismos de zooplancton existentes poseían unas características bioquímicas óptimas para el cultivo larvario del pulpo, su escasez tanto en el agua de la toma principal como en los afloramientos exteriores impide cosechar una cantidad suficiente como para poder llevar a cabo el cultivo larvario a escala industrial.

### Cultivo de Paralarvas

Se han realizado en total 8 cultivos de paralarvas alimentadas con Artemia y zoeas de centolla, 4 en 2011 y 4 en 2012. Los resultados pormenorizados se detallan en los informes anuales respectivos (véanse anexos 1 y 2). Se han obtenido los mejores resultados de crecimiento al mes de vida ( $3.00 \pm 0.56$  y

2.90±0.59 en 2011 y 2012 respectivamente) y supervivencia utilizando una dieta de Artemia complementada con zoeas de centolla (anexos 2 y 3). Paralelamente a estos cultivos con zoeas se realizó otra experiencia comparando un cultivo control utilizando Artemia enriquecida con Isochrysis y otro con artemia enriquecida con un producto elaborado en el ICCM. Este último cultivo tuvo mejor supervivencia (47% a los 23 días) que el cultivo control (21%), aunque los pesos secos finales no difieren significativamente (Anexo 4). Queda pendiente la analítica correspondiente a los ensayos realizados con el enriquecedor elaborado por el ICCM y el cultivo control con Artemia con microalgas.

### Análisis bioquímicos

Los análisis bioquímicos de paralarvas y presas fueron realizados en el CIMA. Tablas en Anexo 5

Año 2011

Se tomaron muestras por triplicado para el análisis de paralarvas procedentes de los diferentes cultivos desarrollados a día 0 (cultivos 1, 2, 3 y 4), día 15 (cultivos 1, 2 y 4) y día 30 (cultivo 4). La descripción detallada de los experimentos está en el Informe correspondiente. Asimismo se tomaron muestras de las presas utilizadas como alimento de las paralarvas en cada uno de los sistemas de cultivo: Artemia de 1 día de vida y zoeas de centolla recién eclosionadas.

Se realizaron análisis de proteínas y lípidos totales, clases de lípidos (ésteres y ceras, triglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides y fosfolípidos) y ácidos grasos de las muestras recogidas. Los resultados indican que los valores de lípidos y proteínas de las paralarvas de pulpo a día 0 están entre el 11 y el 13% de peso seco de lípidos y entre el 42 y el 46% en las proteínas en los 4 cultivos desarrollados, a día 15 los valores de lípidos fueron del 13-18% y en proteínas entre el 41 y el 51%, estos valores a día 30 de cultivo, eran del 10 y 45% respectivamente.

En lo relativo a las clases lipídicas, cabe destacar la abundancia de fosfolípidos en la composición de las paralarvas, seguida por los esteroides. El porcentaje de fosfolípidos en paralarvas de 0 días varía entre el 37 y el 38%, aumentando al 41-49% a día 15 y 39% a día 30 de cultivo. Los valores de esteroides oscilaron entre el 12 y el 20% en los distintos experimentos realizados, siendo los valores más altos los correspondientes a día 0 de vida.

Los ácidos grasos más abundantes en el cultivo de paralarvas estudiadas (% total de ácidos grasos) fueron los poliinsaturados PUFA (52-55%) en paralarvas recién eclosionadas y de entre el 35 al 46% a día 15 de vida, aumentando al 52% en las paralarvas de día 30. En el grupo de los PUFA  $\omega$ 3, los ácidos grasos más abundantes fueron el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) que representan a día 0 de las paralarvas entre 19-24% y el 16-18% respectivamente. A día 30 de cultivo, los valores de DHA y EPA son del 16 y 21%.

Se puede observar como las paralarvas alimentadas con una mayor densidad de zoeas (cultivos 2 y 4) muestran unos valores de PUFA más altos que las correspondientes al cultivo 1 (con una densidad de zoeas más baja) y lo mismo



ocurre con los porcentajes de EPA, DHA y ARA que también son en general más altos en las paralarvas de 15 días en estos cultivos.

Año 2012

En lo referente a las presas se tomaron muestras de Artemia de 1 día enriquecida con *Isochrysis galbana* y con el fitoplancton utilizado en Remagro: procedente de las bolsas de cultivo interiores de la nave y del obtenido por “bloom” artificial en el exterior, así como de las zoeas de centolla (*Maja brachydactyla*) utilizadas en la alimentación de las paralarvas cultivadas en el Centro Oceanográfico de Vigo. Asimismo se tomaron muestras de zoeas de diferentes crustáceos: de nécora (*Necora puber*) y buey de mar (*Cancer pagurus*) con el fin de conocer la composición bioquímica de las mismas y su posible utilización como presas. Además se tomaron muestras de Artemia adulta de 8 días de vida enriquecida con *I. galbana* en el IEO y con la mezcla de fitoplancton de la empresa Remagro.

Las muestras de paralarvas del pulpo recogidas para la realización de los análisis bioquímicos son las que se detallan a continuación:

Experimento 1: Recogidas muestras a día 0 y 15.

Experimento 2: Recogidas muestras a día 0 y 15.

Experimento 3: Recogidas muestras a día 0 y 15.

Experimento 4: Recogidas muestras a día 0, 15 y 30.

Los análisis que se realizaron fueron: proteínas y lípidos totales, clases de lípidos (ésteres y ceras, triglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides y fosfolípidos) y ácidos grasos de las muestras recogidas.

El análisis de las presas nos indica que no existen diferencias significativas en el contenido de lípidos cuando la Artemia es enriquecida durante 24 horas con *I. galbana* (Alg) y con la mezcla de especies (AM) ó con el bloom utilizado en la empresa Remagro (AB), variando entre 16-18% e inferior al 20% obtenido en la Artemia recién eclosionada (AC). El nivel de proteínas es por el contrario más alto en Alg y AM (43-47%), que en AB (38%). La Artemia recién eclosionada tiene un 49% de proteínas. En clases de lípidos se observa un descenso de triglicéridos (TAG) en el enriquecimiento de Artemia desde el 57% del total en AC a niveles comprendidos entre el 25 y 36% enriquecida 24 horas correspondiendo los valores más altos (36%) a AB y entre el 25-29% a Alg y AM. Por el contrario, el porcentaje de fosfolípidos se incrementa desde el 10% en la AC al 25-31% en la enriquecida 24 horas. En lo referente a ácidos grasos, el porcentaje de PUFAs de la Artemia recién eclosionada es más alto (52%) que el de la Artemia enriquecida (44-47%) representando los PUFA  $\omega$ 3 entre el 35-39%. El porcentaje de saturados y monoinsaturados es en general más alto en la Artemia enriquecida que en la recién eclosionada. El ácido graso 20:5n-3 (EPA) supone entre el 2-3% en la Artemia enriquecida, el 22:6 n-3 (DHA) es prácticamente inexistente y el 20:4 n-6 (ARA) el 2% del total

En cuanto a la Artemia de 8 días alimentada con *Isochrysis galbana* (AIEO) y con la mezcla de fitoplancton (AR) no existen diferencias en el nivel de proteínas variando entre el 35-38%. Por el contrario, sí existen diferencias significativas en

el nivel de lípidos cuando es alimentada con *I. galbana* (17,8%) frente a la alimentada con la mezcla de fito (14,5%) debido fundamentalmente al nivel de TAG que representa el 17 y 9% del total de lípidos respectivamente y los fosfolípidos representan el 45% de los lípidos en AIEO frente al 39% en AR. El nivel de PUFAs es superior en la Artemia alimentada con *I. galbana* (48%) frente a la de la mezcla de fitoplancton (43%) debido fundamentalmente al alto contenido en PUFA  $\omega 6$  (21%) de la primera, frente al 8% de la segunda. El porcentaje de DHA sobre el total de ácidos grasos es también más elevado en el caso de la Artemia alimentada con *I. galbana* (3%) frente al 1% cuando es alimentada con la mezcla de fitoplancton.

Existen diferencias significativas en el nivel de lípidos y proteínas de los diferentes tipos de zoeas, siendo las zoeas de nécora las que presentan un nivel más alto de lípidos (14%) frente al 9-10% de lípidos obtenido en las zoeas de centolla y buey. El nivel de proteínas es también más alto en las zoeas de nécora (43%) seguido por las de centolla (33%) y las de buey (27%). En todos los casos las zoeas de crustáceos presentan un nivel de lípidos inferior a la Artemia enriquecida y el nivel de proteínas de las zoeas de nécora es similar a la Artemia. En clases de lípidos las zoeas de centolla y nécora presentan un nivel más elevado de TAG (17-20%total) frente al 9% de las zoeas de buey. El nivel de fosfolípidos más elevado corresponde a las zoeas de centolla (42%), seguido por las de buey (38%) y las de nécora (31%). Como se puede observar estos niveles son más elevados que los obtenidos en los diferentes tipos de Artemia enriquecida 24 horas donde varía entre el 25 y 31% del total de lípidos. Por el contrario el nivel de TAG supone en la Artemia enriquecida entre el 25-36% mientras que en las zoeas de crustáceos oscila entre el 9,5 y el 20%.

Las zoeas de crustáceos analizadas presentan algunas diferencias en la composición de ácidos grasos, así los PUFA  $\omega 3$  son significativamente más altos en las zoeas de buey (ZB) representando el 43% de los ácidos grasos frente al 38% de las zoeas de nécora (ZN) y de centolla (ZC) y la tendencia contraria se produce en los PUFA  $\omega 6$  que suponen el 7% del total en ZN y ZC y el 4,5% en ZB. El nivel de EPA supone el 25% en ZB, 24% en ZN y el 20% en ZC y las zoeas que alcanzan un nivel más elevado de DHA son las de centolla donde suponen el 17% del total, seguidas por las de buey con el 14% y las de nécora con el 11%. El ARA supone el 6% de los ácidos grasos en ZN y ZC y el 4% en ZB. El conjunto de los PUFAs varían en las diferentes zoeas entre el 47-49% del total, los ácidos grasos saturados el 23-26% y los monoinsaturados entre el 27 y el 28%.

Se puede observar como aunque en el porcentaje de PUFAs sobre el total de ácidos grasos no existen diferencias entre la Artemia enriquecida y las zoeas de crustáceos si existen notables diferencias en los niveles de EPA, DHA y ARA, que representan en la Artemia enriquecida el 2-3%(EPA), 0-0,2% (DHA) y 2% ARA, frente a los niveles mucho más elevados de las zoeas de crustáceos con niveles comprendidos entre 20-25% (EPA), 12-17% (DHA) y 4-6% (ARA).

En lo que se refiere a la composición de las paralarvas de los cultivos realizados en el 2012, los resultados de clases de lípidos y ácidos grasos están siendo procesados pero los primeros resultados obtenidos de lípidos y proteínas nos

indican que las paralarvas de día 0 tienen un nivel de proteínas de 41-42% y 14-16% de lípidos, a día 15 de vida las proteínas varían entre el 38-45% y los lípidos entre el 11-17% y a día 30 de vida las paralarvas de pulpo tienen un nivel de proteínas entre el 40-45% y el nivel de lípidos del 11-12%. Estos niveles con pequeñas diferencias son similares a los obtenidos en los cultivos larvarios realizados el año 2011 en que las paralarvas de día 30 de vida presentaban un nivel de proteínas del 45% y 10% de lípidos. El peso seco de las paralarvas obtenidas (3mg) a día 30 de vida fue similar en los 2 años citados.

Al no disponer de financiación JACUMAR para la anualidad 2013, no podrán realizarse los experimentos previstos de cultivo de paralarvas con las diferentes presas descritas y caracterizadas a nivel nutricional, con la finalidad de comprobar el efecto de éstas sobre la supervivencia y la calidad de las paralarvas de pulpo.

## 2.5. CONCLUSIONES

Se ha demostrado una vez más la eficacia del uso de estadios larvarios de crustáceos (en nuestro caso, zoeas de centolla) en el cultivo larvario de pulpo, lográndose mucho mejor crecimiento. Los valores de peso seco de las paralarvas alcanzados fueron de 1,41 mg y 3 mg a los 15 y 30 días de vida respectivamente, notablemente más altos que cuando no se utilizan zoeas en su alimentación.

En términos de composición bioquímica el uso de zoeas de centolla tiene un claro efecto beneficioso sobre la composición de las paralarvas fundamentalmente en el contenido de fosfolípidos y de algunos PUFAs como el EPA, DHA y ARA.

Ha quedado demostrada la facilidad para obtener zoeas de crustáceos como alimento para las paralarvas, necesitando sólo de unos tanques donde estabular las hembras ovadas en sus distintos estadios y un tanque recolector de las zoeas recién eclosionadas.

Sin embargo no se ha tenido éxito en los métodos de obtención de zooplancton para su utilización en los cultivos de paralarvas por la escasez existente de este tipo de organismos, tanto en el agua proveniente de la toma principal como en los afloramientos artificiales de los tanques exteriores.

## C.A. de Murcia.

### OBJETIVOS:

#### 2. Subproyecto subadultos.

##### 2.1. Requerimientos nutritivos del pulpo de roca.

##### 2.2. Optimización de los formatos de pienso para el pulpo de roca.

Dadas las reducciones presupuestarias se ha realizado aproximadamente la mitad de los experimentos planteados.

### Metodología y resultados

#### Línea 2.1. Requerimientos nutritivos del pulpo de roca.

Mediante ensayos de ayuno a corto plazo se ha demostrado que el pulpo moviliza un promedio de 0,23 g de lípidos por día de ayuno, principalmente triglicéridos, procedentes de la glándula digestiva. Los lípidos pueden llegar a cubrir el 24 % de los requerimientos energéticos diarios para ejemplares de 1 Kg en situación de rutina. Los carbohidratos contribuyen con el 9,9 % al gasto energético diario del pulpo en situación de ayuno (8,6 % procedente del músculo y 1,3% de la glándula digestiva, respectivamente). En la gónada los carbohidratos permanecen inalterados.

A partir de la elaboración de dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado se proponen tasas de ingesta de lípidos óptimas alrededor de 1 g/día y porcentajes de grasa apropiados del 13-14 % SS en dietas formuladas, aunque estos valores podrían variar en estudios futuros según la proporción de lípidos polares y neutros de la dieta. El distinto contenido lipídico de las dietas no afectó a la digestibilidad de la proteína, que se mantuvo por encima del 95 %. Fue destacable la elevada digestibilidad de los lípidos polares (83-89 %) respecto de los neutros (2-87 %). La composición nutritiva de la carcasa (animales sin la glándula digestiva) no se ve afectada por el aumento en la ingesta de lípidos. Por el contrario, en la glándula digestiva el contenido de lípidos aumenta desde un 37 % SS para ingestas de 1 g lípidos/día hasta un 51 % SS para ingestas de entre 2 y 3,3 g lípidos/día, principalmente en forma de triglicéridos.

Línea 2.2. Optimización de los formatos de pienso para el pulpo de roca.

Las gomas comerciales tienen un efecto espesante y/o gelificante y no se han mostrado apropiadas como aglomerantes para la elaboración de piensos. No obstante, la gelatina comercial en proporciones del 15 al 25 % permite aglomerar tanto pasta de pescado como harinas generando piensos de excelente cohesividad, elevada estabilidad en agua y buena digestibilidad. Los ingredientes que presentan una mayor aceptabilidad y generan mayor crecimiento en el pulpo son los liofilizados de pescado y la yema de huevo en polvo. Los peores resultados se obtienen con las harinas animales o vegetales, siendo el gluten de trigo el que ofrece mejores prestaciones.

Una dieta semihúmeda (50 % de agua) formulada a base de gelatina (20 %), yema de huevo (10 %) y liofilizados de pota (*Todarodes* sp., 15 %) y alacha (*Sardinella aurita*, 5 %) presenta moderadas tasas de ingesta (9,7 g/día), con buenas tasas de crecimiento (9,6 g/día), índice de conversión (1,0), retención de proteína (43,6 %) y digestibilidad (93,2 % materia seca). La sustitución de pota por guisante no altera las tasas de ingesta, pero genera peores tasas de crecimiento, eficacia alimentaria y digestibilidad.

CONCLUSIONES:

### **Sobre el metabolismo energético: Lípidos**

-La glándula digestiva del pulpo tiene la capacidad de almacenar preferentemente triglicéridos y lípidos polares al suministrar una dieta mixta de cangrejo y pescado.

-El pulpo de roca movilizó un promedio de 0,23 g de lípidos por día de ayuno, principalmente triglicéridos, procedentes de la glándula digestiva.

-Los lípidos pueden llegar a cubrir el 24 % de los requerimientos energéticos diarios para ejemplares de 1 Kg en situación de rutina.

-El ayuno no afectó a la concentración (mg/100 g) ni al contenido (mg/individuo) de los lípidos polares en el tejido muscular, aunque provocó un aumento de los monoglicéridos.

-Los resultados sugieren que los triglicéridos y el colesterol pueden ser transportados desde la glándula digestiva hacia el tejido muscular durante el ayuno. Durante las fases de crecimiento existiría un uso preferencial de los lípidos polares y colesterol.

### **Sobre el metabolismo energético: Carbohidratos**

-El pulpo almacena bajas concentraciones de carbohidratos a nivel muscular (3,2 % peso seco), en la glándula digestiva (4,2 % peso seco) y en la gónada (3,2 % peso seco).

-Los carbohidratos contribuyen con el 9,9 % al gasto energético diario del pulpo en situación de ayuno (8,6 % procedente del músculo y 1,3% de la glándula digestiva, respectivamente). En la gónada permanecen inalterados.

### **Sobre el desarrollo de piensos y empleo de nuevos ingredientes para el engorde**

-Las gomas comerciales tienen un efecto espesante y/o gelificante y no se han mostrado apropiadas como aglomerantes para la elaboración de piensos para el pulpo de roca.

-La gelatina comercial en proporciones del 15 al 25 % permite aglomerar tanto pasta de pescado como harinas generando piensos de excelente cohesividad y elevada estabilidad en agua.

-Los ingredientes que presentan una mayor aceptabilidad y generan mayor crecimiento en el pulpo son los liofilizados de pescado y la yema de huevo en polvo. Los peores resultados se obtienen con las harinas animales o vegetales.

-Una dieta semihúmeda (50 % de agua) formulada a base de gelatina (20 %), yema de huevo (10 %) y liofilizados de pota (*Todarodes* sp., 15 %) y alacha (*Sardinella aurita*, 5 %) presenta moderadas tasas de ingesta (9,7 g/día), con buenas tasas de crecimiento (9,6 g/día), índice de conversión (1,0), retención de proteína (43,6 %) y digestibilidad (93,2 % materia seca).

-La sustitución del liofilizado de pota (*Todarodes* sp.) por guisante en las dietas semihúmedas no altera las tasas de ingesta, pero genera peores tasas de crecimiento (2,2 g/día), índice de conversión (3,9), retención de proteína (20,2 %) y digestibilidad (73,8 % materia seca).

-La composición nutricional del tejido muscular del pulpo no varía al sustituir el liofilizado de pota (*Todarodes* sp.) por guisante, sin embargo provoca una disminución importante de las reservas lipídicas de la glándula digestiva (5,5 % vs 35,0 % lípidos en peso seco para el guisante y la pota, respectivamente).

### **Sobre los niveles de lípidos en dietas formuladas**

-El pulpo acepta dietas semihúmedas con distinto contenido en aceite de bacalao (0, 10 y 20 %) y lípidos (Dieta A0: 13,8 % lípidos SS; Dieta A10: 28,6 % lípidos SS; Dieta A20: 38,8 % lípidos SS), observándose las mayores ingestas ( $15,8 \pm 1,2$  g/ día), crecimientos ( $9,6 \pm 1,4$  g/ día; 0,91 %P/día), eficacia alimentaria (60,3 %) y retención de proteína (27,4 %) con la dieta A0.

-El distinto contenido lipídico de las dietas no afectó a la digestibilidad de la proteína, que se mantuvo por encima del 95 % en todas ellas.

-Sólo la dieta A0 obtuvo un alto coeficiente de digestibilidad de lípidos (81,25 %), disminuyendo drásticamente hasta el 12,3 % en la A20. Fue destacable la elevada digestibilidad de los lípidos polares (83-89 %) respecto de los neutros (2-87 %) en todas las dietas.

-La composición nutritiva de la carcasa (animales sin la glándula digestiva) no se ve afectada por el aumento en la ingesta de lípidos. Por el contrario, en la glándula digestiva el contenido de lípidos aumenta desde un 37 % SS para ingestas de 1 g lípidos/día hasta un 51 % SS para ingestas de entre 2 y 3,3 g lípidos/día, principalmente en forma de triglicéridos,

-Se proponen tasas de ingesta de lípidos óptimas alrededor de 1 g/día y porcentajes de grasa apropiados del 13-14 % SS en dietas formuladas para el engorde de *O. vulgaris*, aunque estos valores podrían variar en estudios futuros según la proporción de lípidos polares y neutros de la dieta.

### **Sobre la inclusión de carbohidratos en las dietas de engorde**

-La inclusión de glucosa o almidón al 5 % en dietas formuladas aumenta la concentración de carbohidratos en al glándula digestiva y el músculo respecto de una dieta sin carbohidratos añadidos.

-Las tasas de crecimiento absoluto fueron similares para dietas sin carbohidratos añadidos (Dieta C0: 10,1 g/día) en comparación con dietas con un 5 % de glucosa (Dieta GLU5: 9,4 g/día) o un 5 % de almidón (Dieta ALM5: 11,2 g/día).

-La dieta mejor aceptada fue la que incluía almidón al 5 %, con TAR de  $1,26 \pm 0,15$  %P/día, aunque los mejores índices de aprovechamiento nutritivo (IEA, IC, PPV y CPV) se observaron en la dieta con glucosa al 5 %, destacando un PPV del 71,88 % e índices de conversión inferiores a 1.

-La digestibilidad de la proteína y la grasa fue similar en las tres dietas (96-98 % y 85-94%, respectivamente), aunque la correspondientes a los carbohidratos fue mayor para las dietas C0 (84 %) y GLU5 (97%) respecto de la dieta ALM5 (0,4 %).

-Se puede concluir que la glucosa es altamente digestible y metabolizada, permitiendo que una mayor cantidad de proteína se destine al crecimiento. El almidón presenta una digestibilidad prácticamente nula, sin embargo, la textura final obtenida en la dieta que lo incluye aumenta su aceptabilidad por parte del pulpo.

## 2.6. VALORACIÓN

Aunque aún faltan tres CCAA por finalizar el proyecto, es obvio que los recortes presupuestarios -que ha supuesto la supresión de actividades durante el segundo año y totalmente durante el tercero- no sólo han interrumpido actividades en los distintos grupos, sino que al ser un proyecto coordinado de cooperación los resultados que se han podido alcanzar son aislados y en muchos casos no se pueden sacar conclusiones de carácter general sólidos. Los distintos grupos a pesar de las dificultades han hecho, y están haciendo, un gran esfuerzo pero cuyos resultados reales son lamentablemente, y como cave esperar de esta situación, dispersos y por lo general poco consistentes.

## 2.7. DIFUSIÓN

### Congresos nacionales.

Andree, K.; Gairin, J.I., Celades, J., Duncan, N., Estévez, A., Carbó, R., Carrasco, N., Rodgers, C., Roque, A., Furones, M.D. (2012). Observations from the Mediterranean coast of Spain of *Aggregata* spp. (Protista: Apicomplexa), a parasite of *Octopus vulgaris*. A: AQUA 2012. Prague (Czech Republic), 1-5 September, 2012 (Pòster)

Brea Fernández, M.D., Duncan, N., Rodríguez Vázquez, C.J., Gairin, J.I., Pérez-Larruscain, J., Pascual López, C. (2011). Desarrollo de cebos semihúmedos para alimentación de *Octopus vulgaris*. A: XIV Foro de Recursos Marinos y Acuicultura de las Rías Gallegas. 6-7 Octubre, 2011 Isla de la Toja, O Grove, (Pòster)

Domingues, P.; Sánchez, F.J.; Iglesias J.; Otero J.J.; Pazos, G. y Linares F. 2012. Variaciones en peso, lípidos y proteínas totales de paralarvas recién eclosionadas de *Octopus vulgaris* (Cuvier1797) durante la puesta. Poster nº 18 presentado en el Foro Iberoamericano de Recursos Marinos y Acuicultura (FIRMA 2012).Cádiz.

Duncan, N., Gairin, J.I. (2011). Maduración gonadal durante el engorde del pulpo común (*Octopus vulgaris*) y la falta del efecto de un fotoperiodo de invierno (9:15 luz : oscuridad) aplicada en primavera. A: XIII Congreso Nacional de Acuicultura. En Equilibrio con el Medio Ambiente. Castelldefels, Barcelona, 21 - 24 noviembre, 2011 (Pòster)

Gairin, J.I., Tomás, A., Rodríguez, C.J., Duncan, N., Querol, P., Pascual, M<sup>a</sup> C. (2011). Engorde del pulpo (*Octopus vulgaris*) con dos dietas artificiales, una semi-húmeda y otra seca extruida. A: XIII Congreso Nacional de Acuicultura. En Equilibrio con el Medio Ambiente. Castelldefels, Barcelona, 21-24 noviembre, 2011 (Pòster)

Guerrero, A., Rodríguez, C., Carrasco, F.J. 2011. Diferencias en el cultivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) utilizando dos sistemas de estabulación: circuito semiabierto y circuito cerrado. IVX Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura en las Rías Galegas. O Grove 6 y 7 de Octubre de 2011. (Póster)

- Guerrero, A., Rodríguez, C., Carrasco, F.J. 2011. Diferentes enriquecedores de *Artemia salina* y su empleo en el cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Castelldefells 21 al 24 de Noviembre de 2011. (Póster)
- Iglesias J, G. Pazos, J. Fernández, F.J. Sánchez, J.J. Otero, P. Domingues, M.J. Lago and F. Linares 2012. The use of crab zoeae on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris* paralarvae. Aqua 2012 Prague. Poster nº 1053.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J. Serra Llinares, R.M., García García, B. 2011. Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en distintos tejidos del pulpo común (*Octopus vulgaris*). XIV Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura Das Ras Galegas. 6 y 7 de octubre en la Isla de la Toja, O Grove. (Poster)
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., García García, B., 2011. Aceptabilidad de distintos ingredientes para la formulación de piensos para el pulpo común (*O. vulgaris*). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. 21-24 Nov. 2011. Barcelona. (Poster).
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, B., García García, B., 2011. Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común (*Octopus vulgaris*). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. 21-24 Nov. 2011. Barcelona.(Póster).

## Publicaciones

- Fuentes, L., F.J. Sánchez, M.J. Lago, J. Iglesias, G. Pazos, F. Linares. 2011. Growth and survival of *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) paralarvae fed on three *Artemia*-based diets complemented with frozen fish flakes, crushed zooplankton and marine microalgae. *Scientia Marina* 75(4), 771-777.
- Gairín, J.I., Rodríguez C.J., Guerao, G. 2013. Growth of *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) with a mois pellet-bait. Enviada a *Mediterranean Marine Science*
- Querol, P., Gairín, J.I., Guerao, G., Jover, M., Tomás, A. 2013. Growth and feed efficiency of *Octopus vulgaris* fed on dry pelleted. Enviada a *Aquaculture Research*
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García B., 2011. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Molluscan Stud.* 77, 318–320.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B., 2012a. Changes in lipid composition of different tissues of common octopus (*Octopus vulgaris*) during short-term starvation. *Aquaculture Res.* doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03131.x.
- Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde, J., Hernández M.D., Aguado-Giménez, F., García García B., 2012b. Growth and digestibility of formulated diets based on dry and freeze-dried ingredients in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 368-369, 139–144.



- Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde, J., García García B. 2013. Lipid requirements of common octopus (*Octopus vulgaris*) obtained from formulated diets with different fish oil content. *Aquaculture International*. Enviado.
- Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde, J., García García B. 2013. A simple format feed to test the acceptability of ingredients for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture Research*. Enviado.
- Sánchez, F.J., Fuentes, L., Otero, J.J., Lago, M.J., Linares, F., Pazos, G., Iglesias, J. 2011. Effect of tank volume on the growth and survival of reared *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture Research*. DOI:10.1111/j.1365-2109.2011.03049.x
- Uriarte, I., J. Iglesias, C. Rosas, M.T. Viana, J. C. Navarro, P. Seixas, E. Vidal, A. Ausburger, S. Pereda, F. Godoy, K. Paschke, A. Farías, A. Olivares and O. Zuñiga. 2011. Current status and bottle neck of octopod aquaculture: the case of American species. *Journal of the World Aquaculture Society* 42 (6): 735-752.
- Viciano, E., Iglesias, J., Lago, M.J., Sanchez F.J., Otero, J.J. y Navarro, J.C. 2011. Fatty acid composition of polar and neutral lipid fractions of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae reared with enriched on-grown *Artemia*. *Aquaculture Research* 42, 704-709.

#### **Tesis de Master.**

- Vidal Vázquez, C. 2012. Cría de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797) bajo diferentes condiciones de cultivo. Máster Acuicultura y Pesca: Recursos Marinos y Sostenibilidad. Universidad de Cádiz.
- Mejias García, L. 2011. Memoria de la Estancia de prácticas y trabajo de fin de Máster, en el LIMIA. UB-UAB-UPC.

#### **OPTIPULPO**

- Cerezo Valverde, J., Hernández M.D., Aguado-Giménez, F., Morillo-Velarde P.S., García García B., 2012. Performance of formulated diets with different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03201.x
- Cerezo Valverde J., Hernández M.D., García-Garrido S., Rodríguez C., Estefanell J., Gairín J.I., Rodríguez C.J., Tomás A. & García García B. (2012) Lipid classes from marine species and meals intended for cephalopod feeding. *Aquaculture International* 20, 71-89.
- Cerezo Valverde J., Martínez-Llorens, S., Tomás, A., Jover, M., Rodríguez C., Estefanell J., Gairín J.I., Domingues P.M., Rodríguez C.J. & García García B. (2012). Amino acids composition and protein quality evaluation of marine species and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquaculture International*. DOI 10.1007/s10499-012-9569-620, 71-89.

## 2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

La mayor dificultad del proyecto han sido los recortes presupuestarios el primero durante el segundo año de ejecución y segundo la supresión presupuestaria del tercer año (2013).

Situación de las actividades debido al recorte de 2012 y la no existencia de financiación en 2013.

	AND	AST	BAL	CAN	CAT	GAL	VAL	MUR
<b>SP1. Paralarvas.</b>								
L1. Reproductores		AET	AET	AEP	AET	AET		
L2. Mesocosmos			AET	AEP				
L3. Eriquecedores		AET	AET	AEP	AET			
L4. Dietas inertes		ANE	ANE		ANE			
L5. Zooplancton	PSP	AEP			AEP			
Zooplancton capturado						AEP		
Zoeas centollo						AET		
Otras zoeas						ANE		
<b>SP2. Subadultos</b>								
L6. Requerimientos	AEP	AEP		PSP	ANE		AEP PSP	AEP
L7. Piensos	AEP	AEP		PSP	AET		AEP PSP	AEP

Actividad ejecutada totalmente. AET

Actividad ejecutada parcialmente. AEP

Actividad no ejecutada. ANE.

Prorroga sin presupuesto. PSP (a realizar en 2013)

## 3.- ANEXOS CON LOS INFORMES DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE TRABAJO (estos informes podrán tener el formato que determine cada grupo de trabajo, incluidos sus logotipos oficiales)

En los Anexos siguientes se encuentran los informes extensos de aquellas CCAA que han finalizado el proyecto. En el próximo año se remitirán los de Andalucía, Canarias y Valencia.

Anexo II: Asturias.

Anexo III: Baleares.

Anexo V: Cataluña.

Anexo VI: Galicia.

Anexo VII: Murcia.

**JACUMAR**  
**JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

**INFORME FINAL**

**Título: Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*)**

## **RESUMEN EJECUTIVO (MÁXIMO 10 PÁGINAS)**

### **1.- DATOS ADMINISTRATIVOS**

**TITULO:**

**FECHAS DE REALIZACIÓN**

**PRESUPUESTO TOTAL EN EUROS**

**DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO**

Nombre y Apellidos:

Organismo/ Centro:

Correo electrónico:

**Comunidades Autónomas participantes**

### **2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL**

2.1. OBJETIVOS

2.3. METODOLOGÍA

2.4. RESULTADOS

2.5. CONCLUSIONES/APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL PLAN

**Para completar este apartado, se acompañará una presentación en Power Point (máximo 10-15 diapositivas) que incluirá solo los aspectos más generales de los objetivos generales y las acciones desarrolladas y dedicará especial atención a los resultados y su utilidad para el sector acuícola.**

2.6. VALORACIÓN

2.7. DIFUSIÓN

2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

### 3.- JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA DEL PRESUPUESTO ASIGNADO

(Deberá se cumplimentada una hoja para cada una de las Comunidades Autónomas participantes en el Plan).

COMUNIDAD AUTÓNOMA: ANDALUCÍA

Presupuesto transferido:

¿Se ha ajustado el gasto a las partidas presupuestarias previstas inicialmente en el plan? ..... **Si**

En caso de NO, indicar a qué partidas se han asignado

Firma de la Autoridad Competente

## **INFORME FINAL EXTENSO**

### **1.- DATOS ADMINISTRATIVOS**

**TITULO:** Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*)

### **FECHAS DE REALIZACIÓN**

Inicio: 2011

Finalización: 2012

### **PRESUPUESTO TOTAL EN EUROS**

### **DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO**

Nombre y Apellidos:

Organismo/ Centro:

Departamento:

Teléfono:

Fax:

Correo electrónico:

Dirección postal completa:

### **PARTICIPANTES ANDALUCÍA**

#### **CENTROS DE INVESTIGACIÓN**

Tipo de centro: IFAPA

Nombre: IFAPA Centro "Agua del Pino"

CIF:

Nombre Representante Legal:

#### **DATOS DE LOS INVESTIGADORES**

Apellidos: Cordero Villafáfila

Nombre: María Luisa

Organismo: IFAPA

Centro: IFAPA Centro "Agua del Pino"

Departamento: Dirección

Equipo:

Teléfono: 959024901

Fax.:959024929

Correo electrónico: marial.cordero@juntadeandalucia.es

Dirección Postal:

Apellidos: García Garrido

Nombre: Sandra

Organismo: IFAPA  
Centro: IFAPA Centro "Agua del Pino"  
Departamento: Nutrición  
Equipo: Cefalópodos  
Teléfono: 671532200 – 671532204  
Fax.: 671532182  
Correo electrónico: marias.garcia.garrido@juntadeandalucia.es  
Dirección Postal: Ctra. Cartaya – Punta Umbría, Km. 4 21459 El Rompido

## 2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

### 2.1. OBJETIVOS INICIALES

Dentro del Subproyecto Subadultos, y en el marco de la "Optimización de los formatos de pienso para el pulpo de roca", los objetivos iniciales fueron: 2.2.4. Digestibilidad "in vitro" de las materias primas, piensos semihúmedos y secos extrusionados, 2.2.5. Determinación de la fisiología digestiva del pulpo, y 2.2.6. Ensayos de engorde con los piensos compuestos por las materias primas o alimentos más adecuados a la fisiología digestiva del pulpo.

### 2.2. OBJETIVOS REALIZADOS

2.2.5. Determinación de la fisiología digestiva del pulpo: Identificación del paquete enzimático presente en la glándula digestiva y en el jugo gástrico (**en proceso**) y Caracterización de actividad enzimática en el intervalo de pH 2 a 12 y de temperatura (10 a 70°C) para jugo gástrico y glándula digestiva (**completo**).

2.2.6. Ensayos de engorde con los piensos compuestos por las materias primas o alimentos más adecuados a la fisiología digestiva del pulpo (**en proceso**).

### 2.3. METODOLOGÍA

- Identificación del paquete enzimático presente en la glándula digestiva y en el jugo gástrico: Desarrollo y puesta a punto de las técnicas electroforéticas para la obtención del peso molecular de las enzimas con actividad en el jugo gástrico y glándula digestiva del pulpo.
- Caracterización de actividad enzimática en el intervalo de pH 2 a 12 y de temperatura (10 a 70°C) para jugo gástrico y glándula digestiva:

Las enzimas evaluadas fueron proteasas totales (ácidas y alcalinas), medidas en diferentes niveles de pH y al pH óptimo obtenido en el ensayo anterior, pero a diferentes temperaturas de incubación. Se usó el método de Anson (1938) para proteasas. Proteína soluble determinada mediante Bradford (1976).

2.2.6. Ensayos de engorde con los piensos compuestos por las materias primas o alimentos más adecuados a la fisiología digestiva del pulpo: De manera previa a los ensayos de engorde se han llevado a cabo análisis bioquímicos en pulpos juveniles y en el alimento referencia (calamar, *L. gahi*), según el protocolo E de la Memoria del presente proyecto.

### 2.4. RESULTADOS

El perfil proteico obtenido mediante técnicas electroforéticas muestra una gran variedad de bandas proteicas entre 0-200 KDa. De todas ellas, sólo encontramos actividad enzimática en una (20.1 KDa), a pH 8 y para jugo gástrico.

La identificación mediante inhibidores enzimáticos específicos mostró la presencia de diferentes clases de proteasas tanto en jugo gástrico como en glándula digestiva de pulpos.

El perfil de actividad enzimática de proteasas totales en el jugo gástrico indica dos picos de actividad máxima, a pH 3 y 8. En la glándula digestiva estos dos picos se encuentran a pH 2 y 10. Las enzimas presentes en el jugo gástrico son menos estables a distintos pHs que las de la glándula digestiva. Para proteasas ácidas del jugo, la máxima actividad enzimática se registra a 30°C y para proteasas alcalinas a 50°C. Para proteasas ácidas de la glándula, la máxima actividad enzimática se registra a 20°C y para proteasas alcalinas a 40°C. Las proteasas ácidas del jugo presentaron una estabilidad enzimática similar a 3 temperaturas distintas y próximas al 50% respecto de la actividad de la muestra control. En el caso de proteasas alcalinas, el porcentaje de actividad para 25 y 40°C es igual y próxima al 100% hasta los 70 minutos. En cambio, a 60°C la actividad enzimática se reduce mucho incluso desde los 10 minutos de pre-incubación. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas ácidas (pH 2) y alcalinas (pH 10) de glándula digestiva indica que las proteasas ácidas también presentaron una alta estabilidad enzimática, similar para las tres temperaturas y no inferior al 50% respecto de la actividad de la muestra control, no expuesta previamente a ninguna temperatura. En el caso de proteasas alcalinas, la actividad enzimática disminuye respecto a proteasas ácidas siendo esta bajada progresiva desde el inicio y estable en torno al 50% a partir de los 30 minutos. Al igual que en el jugo gástrico, a 60°C la actividad enzimática se reduce mucho a los 10 minutos de pre-incubación.

En principio, sin diferencias en peso, entre pulpos alimentados y en ayuno: El volumen de jugo gástrico fue mayor en pulpos en ayuno, la humedad es igual tanto en ayuno como tras alimentar para cada órgano en estudio, el % de Lípido Total fue más alto en el Ciego y la Glándula Digestiva de pulpos en ayuno respecto de los alimentados, el % de Ceniza muestra una tendencia superior en pulpos en ayuno, el % de Carbohidratos muestra una tendencia mayor en el Manto de pulpos en ayuno, y el calamar cuenta con Humedad alta, Lípido Total similar al del Intestino de pulpos en ayuno y alimentados, Cenizas similar a la todos los pulpos para cada órgano y un contenido en Carbohidratos situado entre el registrado para Glándula Digestiva y Ciego de pulpos en ayuno y alimentados. Queda por determinar clases lipídicas y ácidos grasos y sin todos los datos es difícil contar con unas conclusiones finales. Cuando en un futuro se consiga, dicho estudio preliminar complementará a los que habrá que realizar en pulpos alimentados con diferentes piensos experimentales así como a dichos alimentos. El objetivo principal será obtener información sobre posibles carencias nutricionales en la dieta de los cefalópodos cultivados.

## 2.5. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que varios tipos de enzimas digestivas, tanto ácidas como alcalinas, participan en la digestión tanto extracelular del jugo gástrico como intracelular llevada a cabo en la glándula digestiva del pulpo *O. vulgaris*. Aún así, parece que las enzimas no soportan el proceso electroforético y que durante el mismo pierden actividad siendo necesario su estudio mediante otras técnicas enzimáticas.

La caracterización enzimática del jugo gástrico y la glándula digestiva del pulpo *O. vulgaris* muestra que el óptimo de actividad de proteasas ácidas se sitúa a pH 3 y el de proteasas alcalinas a pH 8 para el jugo gástrico siendo a pH 2 y pH 10 en la glándula digestiva para proteasas ácidas y alcalinas respectivamente. Las proteasas digestivas tanto del jugo gástrico como de la glándula digestiva mostraron ser más estables a pHs ácidos que alcalinos siendo a pH 9 y 12 donde se aprecia una mayor inestabilidad de la actividad enzimática frente al tiempo.

Los óptimos de temperatura se localizaron a 30 °C para proteasas ácidas y 50 °C para alcalinas en el jugo gástrico, y a 20 °C y a 40°C para ácidas y alcalinas de la glándula digestiva. Temperaturas



superiores a 40 °C parecen afectar a la estabilidad de proteasas ácidas y, principalmente, a las alcalinas.

El conocimiento obtenido en esta investigación podría ser útil para el posible uso de enzimas con características especiales en procesos industriales del ámbito acuícola así como en la elaboración de alimentos específicos para el pulpo *Octopus vulgaris*.

## 2.6. VALORACIÓN

### 2.7. DIFUSIÓN

López-Sanmartín M., García-Garrido S., Domingues P., Cordero M.L. (2012) *Preliminary enzymatic characterization of the gastric juice of Octopus vulgaris*. En: Aquaculture Europe 2012 (AQUA 2012. 1-5 Septiembre 2012. Praga, República Checa).

<https://www.was.org/WASMeetings/Meetings/ShowAbstract.aspx?Id=26023>

García-Garrido S., Domingues P., Rosas C., Hachero-Cruzado I., Garrido D., Cordero ML. (2011) Efectos de un ayuno prolongado sobre la composición en aminoácidos del manto de *Octopus vulgaris*. En: Libro de Actas XIII Congreso Nacional de Acuicultura. En equilibrio con el medio ambiente (XIII Congreso Nacional de Acuicultura. 21-24 Noviembre 2011. Castelldefels, Barcelona, España): 96.

### 2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

Los fondos previstos se recibieron por parte del equipo investigador. El presupuesto previsto para el primer año (2011) del proyecto no se ajustó al 100% con el ejecutado debido a que el proyecto no se inició hasta Octubre de 2011, ya que la contratación de la persona responsable de llevar a cabo las diferentes tareas previstas en el proyecto a realizar en IFAPA Centro Agua del Pino se produjo en dicho mes. En 2012 se redujo el presupuesto inicial al 40% debiendo hacer una reestructuración de los objetivos iniciales. A final de 2012 dejaron de financiar el proyecto por lo que no se ha podido finalizar los objetivos previstos.

### 2.9. BIBLIOGRAFÍA

Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol., 22, 79-89.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. An. Biochem., 72, 248-254.

### 3.- ANEXOS CON LOS INFORMES DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE TRABAJO

#### 2. Subproyecto Subadultos

#### 2.2. Optimización de los formatos de pienso para el pulpo de roca.

#### 2.2.5. Determinación de la fisiología digestiva del pulpo

#### Tarea 1. Identificación del paquete enzimático presente en la glándula digestiva y en el jugo gástrico.

##### OBJETIVOS

La identificación de enzimas presentes en la glándula digestiva y en el jugo gástrico de juveniles de pulpo capturados del medio natural y mantenidos en cultivo (alimentados con calamar, *L. gahi*), se llevará a cabo mediante técnicas electroforéticas e inhibidores específicos.

##### METODOLOGÍA

##### Técnicas electroforéticas

Se fundamentan en la aplicación de campos eléctricos a un gel, lo cual permite el movimiento de moléculas cargadas en solución. Las moléculas en el campo eléctrico se mueven a una velocidad determinada por su carga, forma y tamaño. La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida es una herramienta bioquímica empleada en estudios de caracterización de proteínas (Laemmli, 1970) y detección de actividades enzimáticas (García-Carreño *et al.*, 1993), entre muchas otras funciones.

Para el estudio de las proteasas alcalinas de los extractos de glándula digestiva y jugo gástrico de pulpos alimentados con calamar, se realizó electroforesis en presencia de lauril (duodecil) sulfato sódico (SDS), en condiciones desnaturalizantes, empleando un sistema discontinuo (gel almacenador preparativo y gel separador resolutivo), de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970), y adaptada por García-Carreño *et al.* (1993) para visualizar actividad proteasa alcalina.

La electroforesis para proteasas ácidas se preparó bajo condiciones nativas de acuerdo a lo propuesto por Davis (1964) en geles de poliacrilamida.

##### Inhibidores

Son compuestos que disminuyen la tasa de hidrólisis de un sustrato dado. El uso de inhibidores específicos es una herramienta importante para la caracterización enzimática ya que éstos se unen a la enzima inactivándola, y disminuyendo la tasa de hidrólisis sobre un sustrato (Salvensen & Nagase, 1989). Tras un período de incubación, donde los extractos se mezclaron con la solución inhibidora, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDSPAGE). De esta manera, se podrá determinar el mecanismo de acción de las enzimas (García-Carreño *et al.*, 1993).

##### RESULTADOS

El perfil proteico obtenido (Fig. 1) tras realizar técnicas electroforéticas nos muestra una gran variedad de bandas proteicas en el intervalo de 0 a 200 KDa. De todas estas bandas sólo

encontramos actividad enzimática en una de ellas, a pH 8 y para jugo gástrico de pulpo. Esta banda con actividad posee un peso molecular de 20.1 KDa según el patrón de bandas utilizado. Tanto para glándula digestiva como para proteasas ácidas de jugo gástrico y glándula, aunque se muestra un perfil proteico tras la electroforesis, ninguna banda mostró actividad enzimática.

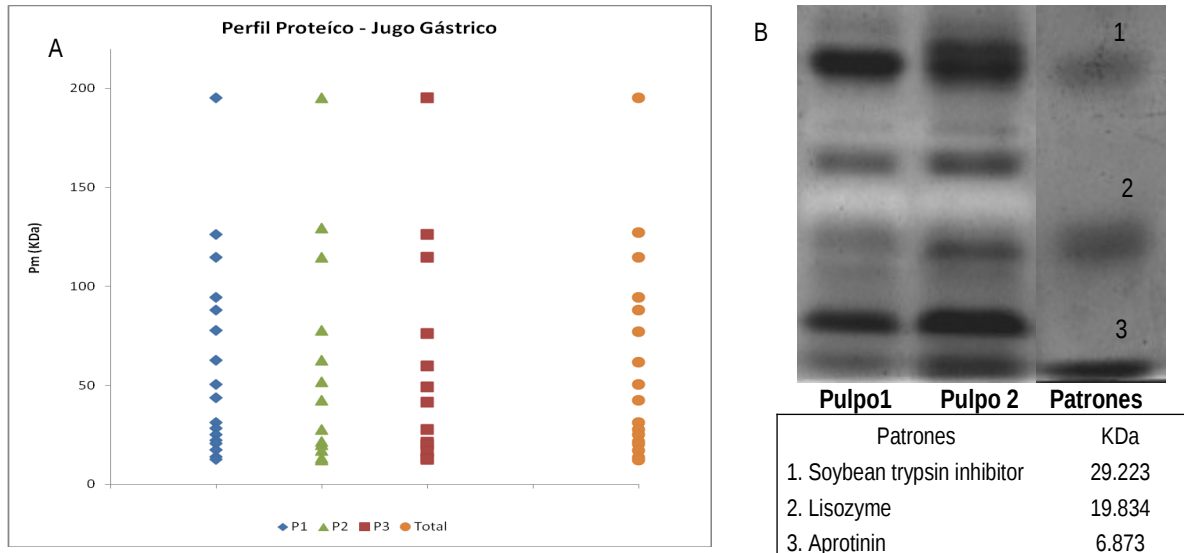


Figura 1. A. Perfil proteico del jugo gástrico de pulpos en ayuno. B. SDS-PAGE para jugo gástrico de pulpos, a pH 8. Bandas negras, presencia de proteínas, bandas blancas, presencia de enzimas alcalinas con actividad a pH 8.

Los inhibidores enzimáticos (Fig. 2) utilizados fueron: PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) para inhibir serina proteasas; TLCK (tosyl-Lys-chloromethyl ketone), para inhibir actividad tripsina; TPCK (tosyl-Phe-chloromethyl ketone), para inhibir actividad quimotripsina; E-64 (epoxysuccinyl leucylamide-4-guanidinio-butane), para inhibir cisteína proteasas; EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) como inactivador de metaloproteasas; y Pepstatin A, para inhibir áspartico o proteasas ácidas. Esta identificación mostró la presencia de diferentes clases de proteasas tanto en jugo gástrico como en glándula digestiva de pulpos. En el jugo gástrico los porcentajes de inhibición más marcados fueron para serina proteasas y metaloproteasas, seguido por proteasas ácidas tipo pepsina. En la glándula digestiva ocurre algo similar siendo la inhibición de serina proteasa aún más acusada y la de proteasas ácidas mucho más suave.

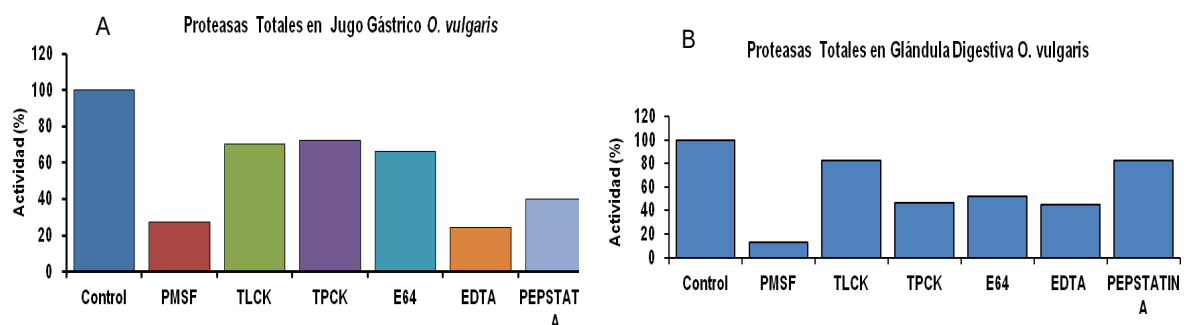


Figura 2. A. Proteasas totales en Jugo gástrico de *O. vulgaris*. B. Proteasas totales en Glándula digestiva de *O. vulgaris*. El % de Actividad fue calculado respecto a un extracto enzimático no tratado con inhibidores.

## CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que varios tipos de enzimas digestivas, tanto ácidas como alcalinas, participan en la digestión tanto extracelular del jugo gástrico y como intracelular llevada a cabo en la glándula digestiva del pulpo *O. vulgaris*. Aún así, parece que las enzimas no soportan el proceso electroforético y que durante el mismo pierden actividad siendo necesario su estudio mediante otras técnicas enzimáticas.

## Tarea 2. Caracterización de actividad enzimática en el intervalo de pH 2 a 12 y de temperatura (10 a 70°C) para jugo gástrico y glándula digestiva.

### OBJETIVOS

El estudio de las enzimas puede complementarse a través de la caracterización de diversos parámetros operacionales como pH y temperatura para comprender su modo de acción. Además, estos conocimientos pueden ser muy útiles para la posible utilización de enzimas con características especiales en procesos industriales. Los estudios de caracterización de las distintas enzimas digestivas son esenciales si se quiere entender los tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que representan.

### METODOLOGÍA

#### Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima

Uno de los principales factores que afectan la actividad de las enzimas proteolíticas es el pH, debido a que de éste depende la estructura de las enzimas y la capacidad de transformar los sustratos en el alimento (Murray *et al.*, 2001). La mayoría de las enzimas poseen un pH característico en el que su actividad es máxima y a este pH sus centros activos presentan una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con eficiencia. De este modo, cada enzima presenta un determinado perfil de actividad con respecto al pH. Si las enzimas están fuera del intervalo de pH fisiológico u óptimo, su estabilidad puede afectar su conformación secundaria, terciaria y/o cuaternaria sufriendo desnaturalizaciones irreversibles en soluciones muy ácidas o alcalinas (Ásgeirsson *et al.*, 1995).

Se tomaron muestras de glándula digestiva y de jugo gástrico de al menos 3 pulpos juveniles cultivados por dieta. La toma de muestras se llevó a cabo 30 minutos después de ser alimentados con el alimento de referencia, el calamar (*L. gahi*). Las enzimas a evaluar fueron proteasas totales (ácidas y alcalinas), medidas en diferentes niveles de pH de entre 2 y 12. Se utilizó el método de Anson (1938) para proteasas, con una modificación, la utilización exclusiva del tampón universal de Stauffer (1989), ya que es más estable en todo el intervalo de pH. Los ajustes de pH se realizaron utilizando HCl y NaOH, para cada tampón y sustrato preparado. La cantidad de proteína soluble presente en los extractos se determinó mediante la técnica de Bradford (1976). Cada medición de actividad enzimática fue determinada por triplicado y según el protocolo G.

#### Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima.

El punto óptimo aparente de temperatura es un parámetro operacional más que una característica fisiológica de la enzima, dado por el aumento de actividad con la temperatura (Q10 2,0), y por la posterior pérdida de la actividad de la enzima por desnaturalización térmica fuera de su intervalo de

operación, ya que al absorber demasiada energía, los enlaces no covalentes que mantienen su estructura terciaria se rompen y la enzima se desnaturaliza. El verdadero óptimo, es aquel valor de temperatura al cual la enzima no solamente muestra una actividad alta, sino también una alta estabilidad a lo largo del tiempo.

Se tomaron muestras de glándula digestiva y de jugo gástrico de al menos 3 pulpos juveniles cultivados por dieta. La toma de muestras se llevó a cabo 30 minutos después de ser alimentados con el alimento de referencia utilizado normalmente, el calamar (*L. gahi*). Las enzimas a evaluar fueron proteasas totales (Anson, 1938), incubadas con sus respectivos sustratos y al pH óptimo obtenido en el ensayo anterior, pero a diferentes temperaturas de incubación (de 10 a 70° C). Para la medición enzimática se procedió como en el apartado anterior (Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima). La cantidad de proteína soluble presente en los extractos se determinó mediante la técnica de Bradford (1976). Cada medición de actividad enzimática fue determinada por triplicado. La actividad de las enzimas fue referida en UI/mg de proteína.

## RESULTADOS

El perfil de actividad enzimática de proteasas totales en el jugo gástrico de *O. vulgaris* en el rango de pH 2 a 12 (Fig. 3.A), indica que existen dos picos de actividad enzimática máxima, a pH 3 y 8. En el caso de la glándula digestiva (Fig. 3.B) estos dos picos se encuentran a pH 2 y pH 10.

El efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de proteasas totales de *O. vulgaris* (Fig. 3.C y 3.D) muestran que las enzimas presentes en el jugo gástrico son menos estables a distintos pHs que las presentes en la glándula digestiva.

El perfil de actividad enzimática para proteasas ácidas, medidas a pH 3, y proteasas alcalinas, a pH 8, obtenido mediante pre-incubación de los extractos enzimáticos del jugo gástrico de *O. vulgaris* a distintas temperaturas del rango de 10 a 70°C se muestra en la Figura 3.E. Para proteasas ácidas, la máxima actividad enzimática se registra a 30°C mientras que para proteasas alcalinas este máximo se sitúa a 50°C. Similares parámetros fueron observados en *Sepia officinalis* (Perrin, 2004). El perfil de actividad enzimática para proteasas ácidas, medidas a pH 2, y proteasas alcalinas, a pH 10, obtenido mediante pre-incubación de los extractos enzimáticos de glándula digestiva de *O. vulgaris* a distintas temperaturas del rango de 10 a 70°C se muestra en la Figura 3.F. Para proteasas ácidas, la máxima actividad enzimática se registra a 20°C y para proteasas alcalinas a 40°C.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas ácidas (pH 3) y alcalinas (pH 8) de jugo gástrico se muestra en las Figuras 3.G y 3.H. Los extractos enzimáticos del jugo gástrico fueron incubados, tomando muestras de los mismos a los 10, 30, 50 y 70 minutos, a tres temperaturas diferentes: 25, 40 y 60 °C. Las proteasas ácidas presentaron una estabilidad enzimática (% Actividad Residual) similar para las tres temperaturas utilizadas y próxima al 50% respecto de la actividad de la muestra control, no expuesta previamente a ninguna temperatura. En el caso de proteasas alcalinas, el porcentaje de actividad para 25 y 40°C es igual y próxima al 100% hasta los 70 minutos. En cambio, a 60°C la actividad enzimática se reduce mucho incluso desde los 10 minutos de pre-incubación.

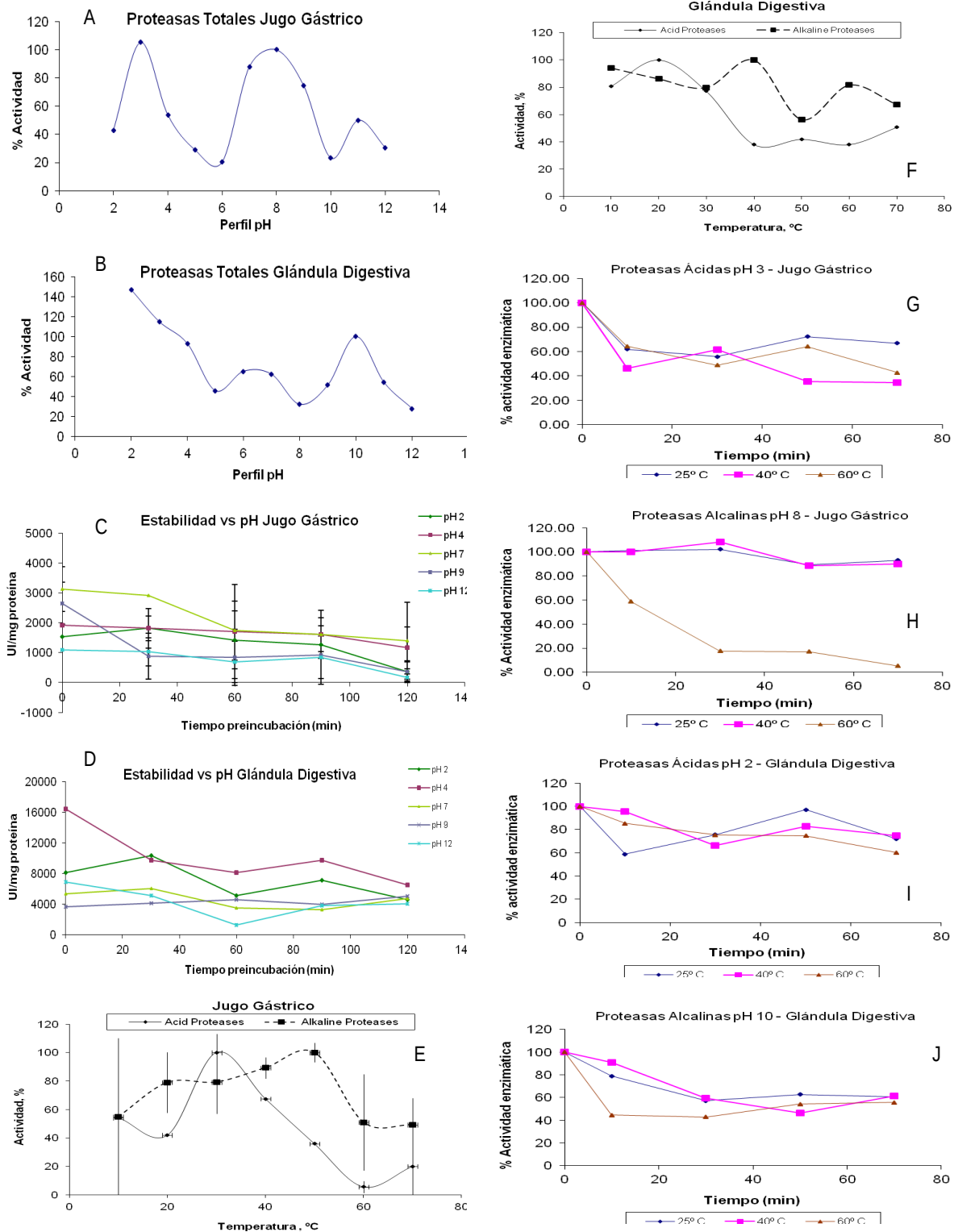


Figura 3. A. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de proteasas totales en el jugo gástrico de *O. vulgaris*. B. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de proteasas totales en glándula digestiva. C. Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de proteasas totales en jugo gástrico. D. Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de proteasas totales en glándula digestiva. E. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de proteasas ácidas (pH 3) y alcalinas (pH 8) en el jugo gástrico. F. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de proteasas ácidas (pH 2) y alcalinas (pH 10) en glándula digestiva. G. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas ácidas (pH 3) en el jugo gástrico. H. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas alcalinas (pH 8) en el jugo gástrico. I. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas ácidas (pH 2) en glándula digestiva. J. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas alcalinas (pH 10) en glándula digestiva.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de proteasas ácidas (pH 2) y alcalinas (pH 10) de glándula digestiva se muestra en las Figuras 3.G y 3.H. Las proteasas ácidas también presentaron una alta estabilidad enzimática, similar para las tres temperaturas y no inferior al 50% respecto de la actividad de la muestra control, no expuesta previamente a ninguna temperatura. En el caso de proteasas alcalinas, la actividad enzimática disminuye respecto a proteasas ácidas siendo esta bajada progresiva desde el inicio y estable en torno al 50% a partir de los 30 minutos. Al igual que en el jugo gástrico, a 60°C la actividad enzimática se reduce mucho a los 10 minutos de pre-incubación.

## CONCLUSIONES

La caracterización enzimática del jugo gástrico y la glándula digestiva del pulpo *O. vulgaris* muestra que el óptimo de actividad de proteasas ácidas se sitúa a pH 3 y el de proteasas alcalinas a pH 8 para el jugo gástrico siendo a pH 2 y pH 10 en la glándula digestiva para proteasas ácidas y alcalinas respectivamente.

Las proteasas digestivas tanto del jugo gástrico como de la glándula digestiva mostraron ser más estables a pHs ácidos que alcalinos siendo a pH 9 y 12 donde se aprecia una mayor inestabilidad de la actividad enzimática frente al tiempo.

Los óptimos de temperatura se localizaron a 30 °C para proteasas ácidas y 50 °C para alcalinas en el jugo gástrico, y a 20 °C y a 40°C para ácidas y alcalinas de la glándula digestiva. Temperaturas superiores a 40 °C parecen afectar a la estabilidad de proteasas ácidas y, principalmente, a las alcalinas.

## 2.2.6. Ensayos de engorde con los piensos compuestos por las materias primas o alimentos más adecuados a la fisiología digestiva del pulpo.

### OBJETIVOS

Previo a los ensayos de engorde con piensos preparados según los resultados obtenidos de la fisiología digestiva del pulpo y mediante digestibilidad *in vitro*, se llevaron a cabo análisis bioquímicos tanto de los pulpos objeto de estudio así como del alimento referencia para el pulpo en IFAPA Centro Agua del Pino (calamar, *Loligo gahi*).

### METODOLOGÍA

Este estudio previo se ha realizado sobre pulpos juveniles capturados en las costas de Huelva, en Noviembre de 2011, usando redes artesanales de arrastre y transportados con la mayor rapidez posible a las instalaciones del IFAPA Centro Agua del Pino. Una vez allí, los pulpos fueron estabulados en tanques cilindro-cónicos e individuales, con flujo de agua abierto. Fueron alimentados con calamar (*L. gahi*) una vez al día durante 15 días. La temperatura y salinidad fueron controladas.

Los análisis bioquímicos a realizar se llevaron a cabo sobre:

- Pulpos (N=3) aclimatados y alimentados con calamar 1 hora antes de la toma de muestras.
- Pulpos (N=3) aclimatados con calamar pero en ayuno durante 24 horas antes de la toma de muestras.
- Alimento de referencia: calamar *L. gahi* (N=3).

Tanto en pulpos alimentados como en ayuno se tomaron muestras de los órganos: Manto (M), Glándula Digestiva (GD), Estómago (E), Intestino (I) y Ciego (C). En el caso del calamar, éste fue homogenizado entero antes del muestreo.

Los análisis bioquímicos puestos en marcha son:

- Humedad
- Cenizas
- Lípidos totales
- Clases lipídicas
- Ácidos grasos
- Carbohidratos
- Proteínas

Se realizaron de acuerdo al protocolo E del apartado 2 “Protocolos ensayos subadultos” de la Memoria del presente proyecto.

## RESULTADOS

Los resultados preliminares (Tabla 1) con los que se cuenta muestran que, sin haber diferencias en peso, entre pulpos alimentados y en ayuno:

1. El volumen recogido de jugo gástrico (JG) fue mayor en pulpos en ayuno.
2. La humedad es igual tanto en ayuno como tras alimentar para cada órgano en estudio.
3. El % de Lípido Total (Peso Seco, PS) fue más alto en el Ciego y la Glándula Digestiva de pulpos en ayuno respecto de los alimentados (Fig. 4).
4. Los % de Cenizas y Proteínas (PS) muestran una tendencia superior en pulpos en ayuno.
5. El % de Carbohidratos (PS) muestra una tendencia mayor en Manto de pulpos en ayuno.
6. El Calamar cuenta con:
  - Humedad (%) alta,
  - Lípido Total (% PS) similar al del Intestino de pulpos en ayuno y alimentados (Fig. 4),
  - Ceniza (% PS) similar a la todos los pulpos para cada órgano
  - Y un contenido en Carbohidratos (% PS) situado entre el registrado para Glándula Digestiva y Ciego de pulpos en ayuno y alimentados.

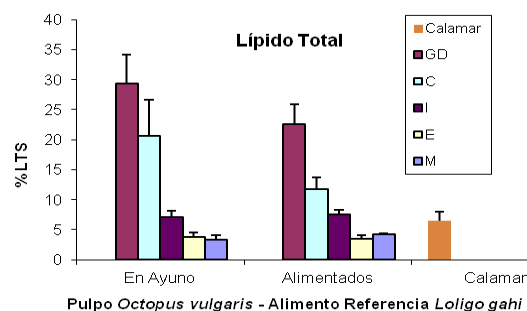


Figura 4. Porcentaje de Lípido Total en Peso Seco (% LTS) de pulpos alimentados y en ayuno y de calamar *L. gahi*. El % LTS se analizó en muestras de calamar completos previamente homogenizados y en los órganos de pulpos: GD (glándula digestiva), C (ciego), I (intestino), E (estómago) y M (manto o músculo).



Tabla 1. Peso total (gr), Volumen recogido de jugo gástrico (microlitros) y Composición proximal (Humedad, Lípidos, Cenizas y Carbohidratos) de los distintos órganos de pulpos alimentados y en ayuno, además del alimento de referencia, el calamar *Loligo gahi*. Las muestras se tomaron de especies de calamar completos previamente homogenizados (TC) y de los órganos de pulpos: GD (glándula digestiva), C (ciego), I (intestino), E (estómago) y M (manto o músculo).

		Pulpos Alimentados		Pulpos en Ayuno		Calamar	
		Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
<b>Peso Total (gr)</b>		1066.13	± 98.23	945	± 38.73	24.9	± 1.14
<b>Vol. Jugo Gástrico (µl)</b>		266.67	± 144.34	675	± 259.81		
<b>Humedad (%)</b>	<b>M / TC</b>	79.36	± 2.64	78.78	± 0.87	84.98	± 0.48
	<b>E</b>	79.38	± 1.05	77.73	± 0.44		
	<b>C</b>	78.94	± 2.94	77.5	± 1.53		
	<b>I</b>	82.69	± 0.85	80.42	± 1.37		
	<b>GD</b>	70.59	± 3.55	64.45	± 2.5		
<b>Lípido Total (% PS)</b>	<b>M/TC</b>	4.31	± 0.09	3.38	± 0.63	6.46	± 1.51
	<b>E</b>	3.44	± 0.7	3.79	± 0.81		
	<b>C</b>	11.69	± 2.03	20.69	± 5.92		
	<b>I</b>	7.62	± 0.67	7.13	± 1.04		
	<b>GD</b>	22.55	± 3.31	29.4	± 4.72		
<b>Proteína (% PS)</b>	<b>M/TC</b>	71.16	± 17.99	88.50	± 9.25	94.78	± 3.80
	<b>E</b>	78.06	± 14.29	90.88	± 5.70		
	<b>C</b>	68.53	± 17.85	73.51	± 11.12		
	<b>I</b>	59.99	± 17.71	69.14	± 7.54		
	<b>GD</b>	66.55	± 15.03	84.77	± 16.28		
<b>Carbohidratos (% PS)</b>	<b>M/TC</b>	0.82	± 0.57	1.90	± 1.02	1.66	± 0.47
	<b>E</b>	1.19	± 0.40	1.74	± 0.56		
	<b>C</b>	1.31	± 0.24	2.08	± 0.94		
	<b>I</b>	1.40	± 0.41	1.81	± 0.50		
	<b>GD</b>	2.58	± 1.00	3.30	± 1.05		
<b>Ceniza (% PS)</b>	<b>M/TC</b>	5.51	± 0.42	7.15	± 0.39	6.41	± 0.35
	<b>E</b>	6.97	± 0.62	7.64	± 0.55		
	<b>C</b>	6.67	± 1.22	6.73	± 1.09		
	<b>I</b>	5.71	± 2.85	8.67	± 1.2		
	<b>GD</b>	4.06	± 1.33	5.33	± 0.62		
<b>Total (%)</b>	<b>M / TC</b>	81.80		100.93		109.31	
	<b>E</b>	89.66		104.05			
	<b>C</b>	88.20		103.01			
	<b>I</b>	74.72		86.75			
	<b>GD</b>	95.74		122.80			

## CONCLUSIONES

Queda por completar el estudio de los lípidos (clases lipídicas y ácidos grasos) por lo que al no poseer todos los datos es difícil contar con unas conclusiones finales. Este estudio preliminar complementará a los que habrá que realizar en un futuro en pulpos alimentados con diferentes piensos experimentales así como a dichos alimentos, teniendo como objetivo primordial obtener información sobre posibles carencias nutricionales en la dieta de los cefalópodos cultivados.

## Bibliografía

- Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
- Ásgeirsson, B., Hartemink, R., Chlebowski, J.F. (1995) Alkaline phosphatase from atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110B, 315-329.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.* 72: 248-254.
- Davis, B.J. (1964) *Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.* *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F. (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.*, 214, 65-69.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K. y Rodwell, V.W. (2001). *Bioquímica de Harper. Manual Moderno (15ª ed.)* pp. 747-772.
- Perrin, M.A., 2004. Étude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode): Impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. Tesis Doctoral. Université de Caen, Normandie, Francia, 145 p.
- Salvansen, G., Nagase, H. (1989) Inhibition of proteolytic enzymes. pp. 83-104. In: R. Beynon and J.S. Bond (Eds.). *Proteolytic enzymes.* IRL Press Oxford. UK.
- Stauffer, C., 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists.* Van Nostand Reinhold/AVI, New York: 552 pp.

**PRINCIPADO DE ASTURIAS**  
**Centro de Experimentación Pesquera**

**Planes Nacionales de Cultivos Marinos**

**NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE  
PARALARVAS Y SUBADULTOS DEL  
PULPO DE ROCA (*Octopus vulgaris*)**

**Informe final**  
**2010-2012**



**JACUMAR**  
**2012**

## Índice

---

Introducción.....	3
Línea 1.1. Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables.....	4
Tarea 1.1.1.....	4
Material y Métodos.....	4
Resultados y Discusión.....	6
Línea 1.3. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas <i>Artemia salina</i> enriquecida con fitoplancton y enriquecedores comerciales.....	11
Tarea 1.3.1. Engorde de <i>Artemia salina</i> a tallas adaptadas a la paralarva.....	11
Material y Métodos.....	11
Resultados y Discusión.....	13
Tarea 1.3.2. Enriquecimiento de <i>Artemia</i> .....	14
Material y Métodos.....	15
Resultados y Discusión.....	16
Tarea 1.3.3. Cultivo de paralarvas.....	17
Material y Métodos.....	18
Resultados y Discusión.....	19
Tarea 1.3.5. Análisis bioquímico de <i>Artemia</i> enriquecida y paralarvas.....	21
Material y Métodos.....	21
Resultados y Discusión.....	22
Línea 1.5. Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidáceos cultivados y zoeas de crustáceos vivas o congeladas.....	24
Tarea 1.5.1. Obtención de zoeas de decápodos (cangrejos autóctonos, cangrejo, nécora, centolla, buey, etc.).....	24
Material y Métodos.....	24
Resultados y Discusión.....	24

Tarea 1.5.2. Obtención de zooplancton del medio natural.....	26
Material y Métodos.....	26
Resultados .....	26
Tarea 1.5.3. Otras dietas vivas alternativas.....	27
Tarea 1.5.4. Cultivo de paralarvas.....	30
Línea 2.1. Requerimientos nutritivos del pulpo de roca.....	54
Conclusiones.....	64
Acciones de difusión.....	65
Bibliografía.....	74

## Introducción

---

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) se adapta fácilmente a las condiciones en cautividad, tiene unas tasas de crecimiento y reproducción muy altas y adquiere un alto valor en el mercado, es por eso que se considera una especie con gran potencial para la acuicultura.

Su biología, fisiología, comportamiento, reproducción y crecimiento han sido estudiados en profundidad, pero en lo que se refiere al cultivo larvario existe un importante cuello de botella. En los últimos años los grupos que investigan en este campo solo han logrado pequeños avances a escala experimental. Los investigadores japoneses fueron los primeros en lograr resultados relevantes: Itami *et al.* (1963), Imamura (1990) y Hamazaki *et al.* (1991). En España destacan trabajos como los de Villanueva *et al.* (1995,1996) y Moxica *et al.* (2002), más tarde Iglesias *et al.*, en 2001 Y Carrasco *et al.*, en 2005, consiguieron cerrar el ciclo de esta especie. Desde 2001 hasta 2004 se llevó a cabo el proyecto JACUMAR PULPO que reveló como conclusión final que el principal problema son las altas tasas de mortalidad y el escaso crecimiento durante la fase larvaria, lo cual puede deberse principalmente a la falta de técnicas de cultivo estandarizadas, deficiencias nutricionales en la dieta y un escaso conocimiento de la biología de esta especie en fases tempranas.

En cuanto al engorde de subadultos, se hace necesario aún encontrar un pienso que sea aceptado por los pulpos, se adecue a sus necesidades nutricionales y su coste no sea elevado, lo cual haría más rentable su engorde en cautividad. En este caso, las mayores dificultades se encuentran en la aceptabilidad por parte de los pulpos. Durante el proyecto JACUMAR “Optimización del engorde de pulpo” llevado a cabo entre 2007 y 2009, se obtuvieron formatos de pienso aceptados e ingeridos por los pulpos, generando además un crecimiento significativo (Cerezo Valverde *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008).

Con la finalidad de seguir avanzando en ambas vertientes surge el proyecto JACUMAR “NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE PARALARVAS Y SUBADULTOS DEL PULPO DE ROCA”, cuyos resultados finales se resumen en este informe.

## Línea 1.1. Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables

- ✓ **OBJETIVOS:** Obtención de paralarvas para llevar a cabo los distintos ensayos de cultivo que se plantean en las Líneas 1.3 y 1.5.

### Tarea 1.1.1.

#### **Material y Métodos:**

Los progenitores de pulpo (*Octopus vulgaris*) utilizados para el aprovisionamiento de paralarvas fueron estabulados a comienzo de cada año, con entradas sucesivas, para así secuenciar las puestas.

Procedieron siempre de las pesquerías locales (Tapia de Casariego y Puerto de Vega), fueron capturados mediante nasas y se trasladaron al Centro de Experimentación Pesquera de Castropol en cubos con agua y refugios para mantenerlos en perfectas condiciones fisiológicas.

Una vez en el Centro, se pesaron, se sexaron y se distribuyeron en tanques sombreados de fibra de poliéster blancos de 1.000 y 500 L (Figura 1) y en una piscina compartimentada de 35 m<sup>3</sup> (Figura 2), donde previamente se habían colocado refugios (tubos de PVC). Se mantuvieron en circuito abierto y se colocó aireación en el fondo de los tanques de fibra.

La alimentación consistió en: Lirio (*Micromesistius poutassou*), Sardina (*Sardina pilchardus*), cangrejos vivos (*Carcinus maenas*) y mejillones vivos (*Mytilus edulis*). La cantidad administrada fue aproximadamente el 5% del peso de los ejemplares. El pescado era congelado y descongelado previamente.

El mantenimiento diario consistió en:

- Control de parámetros físico-químicos de los tanques.
- Retirada de los restos de alimento y limpieza del tanque mediante sifonado.
- Aporte de alimento.

- Control de refugios y puestas. Las hembras con puesta se aislaron con sus refugios en tanques independientes.
- Seguimiento del desarrollo embrionario de los huevos cada 10 días. Se fotografiaron las distintas fases de la embriogénesis al microscopio. (Figura 4)
- Recogida de paralarvas recién eclosionadas a la salida del tanque con un colector de malla de 500  $\mu\text{m}$  y limpieza del mismo. (Figura 5)
- Control de talla y peso de las paralarvas. Tres controles distribuidos a lo largo de la eclosión de cada puesta.



Fig. 1: Distintos tipos de tanques de fibra de poliéster donde se estabularon los reproductores



Fig. 2: Piscina compartimentada



Fig. 3: Cópula entre un macho y una hembra



Fig. 4: Huevo con embrión de 40 días



Fig. 5: Recogida de las paralarvas tras la eclosión



### **Resultados y Discusión:**

Anualidad 2010:

Se estabularon 7 hembras y 1 macho, 3 de ellas ya venían fecundadas del mar y todas ellas llegaron a realizar la puesta. En la tabla I se resumen las características de las hembras estabuladas.

La hembra H7 realiza la puesta a los dos meses de estabulación y se muere antes de la eclosión de los huevos, siendo estos cuidados por otra hembra con puesta. A los 48 días de desarrollo embrionario parte de la puesta se despegó y se paso a otro tanque con aireación fuerte y temperatura del agua a 20°C, a modo de incubador. El incremento de la temperatura produjo la eclosión inmediata de los huevos, facilitando la sincronización y manejo de las paralarvas, mientras que el resto de la puesta, a menor temperatura, no inició la eclosión hasta cuatro días después, prolongándose durante 25 días más.

Tabla I: Datos de las hembras estabuladas de las que se obtuvo puesta en 2010

	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>	<b>H4</b>	<b>H5</b>	<b>H6</b>
<b>Estabulación</b>	29/04/10	29/04/10	29/04/10	29/04/10	12/08/10	12/08/10
<b>Peso (g)</b>	1600	1150	1300	1300	2100	1300
<b>Inicio puesta</b>	24/05/10	02/06/10	02/06/10	7/06/10	13/08/10	14/10/10
<b>Desarrollo embr. (días)</b>	47	48	49	50	41	52
<b>Tª media (°C)</b>	16,7±0,68	17,2±0,88	17,3±0,93	17,4±1,10	18,3±1,16	14,2±2,04
<b>S‰ media</b>	31,8±1,19	32,0±1,37	32,0±1,35	32,0±1,33	33,6±0,30	33.4±0.82
<b>Inicio eclosión</b>	09/07/10	19/07/10	20/07/10	26/07/10	23/09/10	10/12/10
<b>Duración eclos. (días)</b>	20	15	18	19	28	23
<b>Final eclosión</b>	28/07/10	02/08/10	5/08/10	13/08/10	20/10/10	03/01/11
<b>LM (mm)</b>	1,67	2,00	1,90	1,90	3,00	2,2
<b>PS (mg)</b>	0,54	0,35	0,28	0,46	0,65	0,41

La duración del desarrollo embrionario osciló entre 41 y 52 días, para un rango de temperaturas medias de  $14,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,04$  a  $18,3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,16$ . El incremento de la temperatura reduce el periodo de maduración de los huevos, adelantando la eclosión de los mismos.

La hembra H5, con un peso de 2.100g, proporcionó la mayor puesta y el mayor tamaño de las paralarvas.

### Anualidad 2011:

Se acondicionaron cinco hembras y tres machos capturados en los meses de abril y septiembre. Los reproductores del mes de septiembre fueron estabulados en un tanque con calentadores para incrementar la temperatura del agua en 2 a 3  $^{\circ}\text{C}$ , para adelantar las puestas y la eclosión de las paralarvas. Tres de las hembras llegaron a efectuar su puesta, aunque solo se obtuvieron paralarvas de dos de ellas, por un fallo en el circuito de agua.

Tabla III: Datos de las hembras estabuladas de las que se obtuvo puesta en 2011

	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>
<b>Estabulación</b>	04/04/11	04/04/11	29/04/11
<b>Procedencia</b>	Tapia de C.	Tapia de C.	Tapia de C.
<b>Peso (g)</b>	1,875	1,540	2,735
<b>Inicio puesta</b>	25/05/11	20/05/11	19/05/11
<b>Desarrollo embr. (días)</b>	43	48	43
<b>Talla huevo día 40 (mm)</b>	3,10	3,15	3,30
<b>Tª media (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	$17,44 \pm 1,42$	$17,22 \pm 1,42$	$17,56 \pm 2,05$
<b>S‰ media</b>	$32,16 \pm 1,20$	$32,18 \pm 1,20$	$32,20 \pm 1,10$
<b>Inicio eclosión</b>	06/07/11	06/07/11	01/07/11
<b>Duración eclos. (días)</b>	2	15	-
<b>Final eclosión</b>	08/07/11	21/07/11	-
<b>LM paralarvas (mm)</b>	2,40	2,35	-
<b>PS paralarvas (mg)</b>	0,56	0,54	-

## Anualidad 2012:

Se estabularon 9 hembras y 4 machos en tanques con distintas temperaturas del agua para escalar la eclosión de las puestas. La hembra H1, muere prematuramente y su puesta se logra gracias a los cuidados de otra hembra con puesta que los mantiene limpios y aireados hasta la eclosión de los mismos.

Tabla IV: Datos de las hembras estabuladas de las que se obtuvo puesta en 2012

	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>	<b>H4</b>
<b>Fecha estabulación</b>	08/02/2012	16/02/2012	16/02/2012	22/03/2012
<b>Procedencia</b>	P. de Vega	Tapia de C.	Tapia de C.	Tapia de C.
<b>Peso</b>	2,140 Kg	1,140 Kg	1,270 Kg	1,630 Kg
<b>Fecha puesta</b>	05/04/2012	16/04/2012	01/06/2012	16/04/2012
<b>Talla huevo día 30</b>	2,5± 0,03	2,57± 0,05	3,13± 0,07	2,71± 0,05
<b>Tª media estabulación</b>	16,99±1,21	12,32±0,82	13,53± 1,54	14,29±1,89
<b>S% media estab.</b>	33,86±1,01	33,93±0,76	33,04± 1,16	33,93±0,59
<b>Fecha eclosión</b>	17/05/2012	17/06/2012	15/07/2012	08/06/2012
<b>Duración des. emb.</b>	43 días	63 días	45 días	53 días
<b>Tª media des. emb.</b>	17,79±1,11	15,62±1,51	18,00±0,80	15,28±1,51
<b>S% media des. emb.</b>	33,35±1,13	32,61±1,25	33,62±0,83	32,61±1,25
<b>Fecha final eclosión</b>	04/06/2012	11/07/2012	02/08/2012	25/06/2012
<b>Duración eclosión</b>	19 días	25 días	18 días	18 días
<b>LM paralarvas</b>	2,06±0,05	2,68±0,15	2,42±0,08	2,52±0,06
<b>LT paralarvas</b>	3,02±0,08	3,38±0,13	3,24±0,05	3,56±0,14
<b>PS paralarvas</b>	0,36±0,15	0,41±0,04	0,50±0,11	0,65±0,05

Tabla V: Datos de las hembras estabuladas de las que se obtuvo puesta en 2012

	H5	H6	H7	H8	H9
<b>Fecha estabulación</b>	22/03/2012	22/03/2012	28/05/2012	29/06/2012	29/06/2012
<b>Procedencia</b>	Tapia de C.	Tapia de C.	Tapia de C.	Tapia de C.	Tapia de C.
<b>Peso</b>	1,031 Kg	1,600 Kg	1,200 Kg	1,045 Kg	1,000 Kg
<b>Fecha puesta</b>	05/04/2012	05/04/2012	22/06/2012	01/08/2012	16/08/2012
<b>Talla huevo día 30</b>	3,14± 0,06	3,14± 0,06		2,69± 0,12	
<b>Tª media estabulación</b>			17,49± 0,77	18,61± 0,63	19,01±0,81
<b>S‰ media estab.</b>			33,59± 0,81	33,77± 0,69	33,84±0,66
<b>Fecha eclosión</b>	17/06/2012	17/06/2012	23/07/2012	04/09/2012	24/09/2012
<b>Duración des. emb.</b>	74 días	74 días	30 días	35 días	40 días
<b>Tª media des. emb.</b>	15,30±1,84	15,30±1,84	18,82±0,47	20,05±0,82	19,05±1,04
<b>S‰ media des. emb.</b>	32,66±1,19	32,66±1,19	33,21±0,84	34,11±0,67	34,43±0,40
<b>Fecha final eclosión</b>	11/07/2012	11/07/2012	20/08/2012	22/09/2012	15/10/2012
<b>Duración eclosión</b>	25 días	25 días	29 días	19 días	22 días
<b>LM paralarvas</b>	2,68±0,15	2,68±0,15	2,88±0,10	2,33±0,03	2,42±0,08
<b>LT paralarvas</b>	3,38±0,13	3,38±0,13	3,68±0,08	3,23±0,03	3,32±0,03
<b>PS paralarvas</b>	0,41±0,04	0,41±0,04	0,36±0,03	0,35±0,04	0,31±0,02

Se comprobó, como en años anteriores, que la temperatura juega un papel fundamental en el momento de realizar la puesta y la duración del desarrollo embrionario. Esto nos permitió secuenciar las eclosiones para poder llevar a cabo las distintas experiencias de cultivo de las paralarvas.

### Línea 1.3. Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas *Artemia salina* enriquecida con fitoplancton y enriquecedores comerciales

- ✓ **OBJETIVOS:** Obtención de juveniles de pulpo empleando como alimento *Artemia salina* nutricionalmente enriquecida.

#### Tarea 1.3.1. Engorde de *Artemia salina* a tallas adaptadas a la paralarva

##### **Material y Métodos:**

El protocolo que se siguió para el cultivo y enriquecimiento fue el siguiente:

##### 1) Hidratación:

- 14 g de cistes de Artemia (EG INVE, Bélgica)  
(1 g de cistes 250.000 nauplios 100% eclosión)
- Tiempo: 1,5 h
- Agua de mar filtrada 35 ‰
- Tanque de metacrilato de 12 L
- Tª: 19 °C
- Aireación fuerte
- Lavado de cistes con agua de mar y tamizados con malla de 132 µm
- Tamaño del ciste hidratado 250 µm

##### 2) Descapsulación:

- Solución descapsuladora:
  - Agua de mar filtrada: 4 mL/g de ciste
  - Hipoclorito sódico: 0.35 g/g de ciste (50 g de NaClO/L lejía)
  - NaOH: 0.066 g/g de ciste
- Se preparó una cantidad grande de solución descapsuladora para varios usos:
  - ✓ 1 L lejía
  - ✓ 600 mL agua de mar
  - ✓ 10 g de NaOH
- Tiempo: 5-8 minutos

- Aireación fuerte
- Sin luz
- Cambio de color (de marrón a naranja)
- Lavado con agua de mar malla de 132  $\mu\text{m}$  (eliminar olor a lejía)
- Sedimentación de los cistes descapsulados sin aireación
- Tamaño del ciste descapsulado 250  $\mu\text{m}$
- La mitad de los cistes se guardaron una vez descapsulados y secos en la nevera durante una semana

### 3) Eclosión:

- Tiempo: 24 h
- Agua de mar filtrada 35 ‰
- Tanque de metacrilato de 12 L
- Tª: 28 °C
- Aireación fuerte
- Luz continua
- Recogida de los nauplios de artemia en malla de 132  $\mu\text{m}$ , oscureciendo todo el tanque excepto la salida
- Lavado con agua de mar

### 4) Cultivo:

- Densidad cultivo 35 art/mL en tanque de fibra de poliéster de 50 L (Figura 6)
- Agua de mar filtrada 35 ‰
- Tª: 28 °C
- Aireación
- Luz continua superior
- Alimento:  
Especies de fitoplancton: *Tetraselmis suecicca* e *Isochrysis galbana*  
1.050.000 cels de fito/mL para una densidad de 35 artemias /mL
- Se renovó la mitad del tanque, con aporte de agua nueva, todos los días previo a la alimentación



Fig. 6: Zona de engorde y enriquecimiento de Artemia

### **Resultados y Discusión:**

En el 2010 se llevaron a cabo tres experiencias de cultivo de Artemia, cuyo protocolo fue mejorado en el 2011, obteniéndose mejores resultados.

Los datos relativos al engorde de la Artemia se detallan en la tabla VI. En la figura 7 se aprecia visualmente la diferencia de tallas en función del tiempo, cabe destacar la dispersión de tallas observada en los últimos días del cultivo (Figura 8).

Tabla VI: Datos de engorde de Artemia

Días	Densidad (art/mL) $\pm$ sd	Talla (mm) $\pm$ sd	PS (mg) $\pm$ sd
0	37,33 $\pm$ 0,58	0,69 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,0001
1	35,67 $\pm$ 1,53	0,90 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,0001
2	35,00 $\pm$ 1,00	1,10 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,0001
3	34,00 $\pm$ 2,00	1,10 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,0001
4	30,67 $\pm$ 1,55	1,30 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,0001
5	28,00 $\pm$ 1,00	1,57 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,0001
6	15,00 $\pm$ 1,73	1,65 $\pm$ 0,08	0,08 $\pm$ 0,0001
7	12,67 $\pm$ 1,53	1,82 $\pm$ 1,11	0,10 $\pm$ 0,0001



Fig. 7: Diferentes tallas de la Artemia, según el día de cultivo

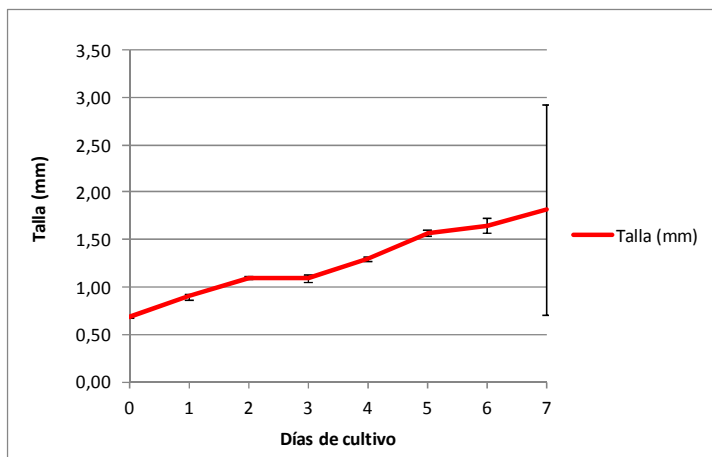


Fig. 8: Talla en función de los días de cultivo

### Tarea 1.3.2. Enriquecimiento de Artemia

Todos los trabajos llevados a cabo por diferentes autores y relativos al cultivo integral del pulpo, han coincidido en señalar que existe un déficit de ácidos grasos poliinsaturados en las presas suministradas a las paralarvas. Podemos afirmar que estas cadenas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), especialmente los ácidos EPA y DHA, son esenciales para los cefalópodos (Navarro *et al.*, 1992, 1993) y su déficit se traduce en bajos índices de supervivencia y bajas tasas de crecimiento (Iglesias *et al.*, 1997, Villanueva *et al.*, 2002).



Existen enriquecedores comerciales, Selco y Ori Green, elaborados a base de aceites y harinas de pescado que han dado buenos resultados de cara a aumentar el contenido nutricional de las paralarvas de pulpo a través de vectores como la Artemia.

Las microalgas también son buenos enriquecedores debido a su elevado contenido en ácidos grasos. La especie *Nannochloropsis oculata* ha sido muy valorada por varios autores (Hamazaki *et al.*, 1991, Moxica *et al.*, 2006) y las especies de *Rhodomonas* poseen un alto contenido proteico y lipídico, por ello, las paralarvas cultivadas con Artemia enriquecida con esta especie, muestran alta supervivencia, un crecimiento adecuado y un contenido en ácidos grasos esenciales (EPA y DHA) muy superior al aportado por otro tipo de enriquecedores (Seixas, 2009).

Por todo lo anterior se realizaron experiencias en la que se ensayaron estos enriquecedores comerciales frente a las microalgas y otros experimentales como la harina de krill.

### ***Material y Métodos:***

Se compararon diferentes concentraciones de enriquecedores experimentales para determinar la cantidad que daba mejores resultados en cuanto a supervivencia y crecimiento de las Artemias.

Artemias de tres días de engorde y 300  $\mu\text{m}$  se cultivaron hasta el día 7, con tres concentraciones diferentes para cada enriquecedor (harina de krill, *Nannochloropsis oculata* (No) y *Rhodomonas sp.* (Rh)). Las condiciones fueron las siguientes:

- 3 art/mL
- Aireación fuerte
- Tª: 26 °C
- Tanque de metacrilato de 10 L

### Resultados y Discusión:

Los resultados con las diferentes concentraciones de cada enriquecedor se resumen en la tabla VII. En dicha tabla se han resaltado los valores máximos de cada variable (densidad, talla y peso seco) en función del día de cultivo y de la concentración de enriquecedor:

- Verde: Mejor dato de densidad para ese día de cultivo.
- Rojo: Mejor dato de talla para ese día de cultivo.
- Morado: Mejor dato de peso seco para ese día de cultivo.

Tabla VII: Datos de densidad, talla y peso seco con diferentes concentraciones de enriquecedor

Harina de Krill									
	0,2 g/L			0,3 g/L			0,4 g/L		
Días	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)
4	0,90	1,50	0,05	0,75	1,44	0,04	1,75	1,20	0,08
5	2,25	1,65	0,08	2,50	1,75	0,06	2,90	1,78	0,11
6	1,50	1,85	0,08	1,60	1,89	0,10	1,00	1,90	0,12
7	1,20	2,00	0,09	2,00	2,10	0,12	1,00	2,10	0,15
Nannochloropsis oculata									
	10 <sup>6</sup> cels/mL			5x10 <sup>6</sup> cels/mL			10 <sup>7</sup> cels/mL		
Días	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)
4	2,00	1,18	0,05	3,00	1,21	0,07	1,00	1,20	0,05
5	3,00	1,38	0,05	2,00	1,37	0,05	1,00	1,28	0,05
6	2,00	1,47	0,05	3,00	1,65	0,07	1,00	1,73	0,07
7	3,00	1,95	0,08	2,00	2,10	0,08	3,00	2,03	0,07
Rhodomonas sp.									
	0,5x10 <sup>6</sup> cels/mL			10 <sup>6</sup> cels/mL			1,5x10 <sup>6</sup> cels/mL		
Días	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)	Dens (art/mL)	Talla (mm)	PS (mg)
4	2,00	1,51	0,06	3,00	1,40	0,07	3,00	1,51	0,08
5	3,00	1,67	0,07	2,00	1,61	0,07	2,00	1,61	0,07
6	2,00	1,91	0,11	3,00	1,81	0,10	1,30	1,89	0,08
7	1,10	1,93	0,12	3,00	2,10	0,12	1,40	2,20	0,10

Podemos determinar, que en el caso de la **harina de krill**, las concentraciones más adecuadas serían las de 0,3 g/L y 0,4 g/L, ya que aporta mejores valores de talla, peso y supervivencia.

Con **Nannochloropsis oculata**, la concentración que mejores resultados arroja es la de **5x10<sup>6</sup> cels/mL**, ya que la talla, el peso seco y la supervivencia son superiores en todos los días que se ha enriquecido.

Si enriqueciéramos con **Rhodomonas sp.** usaríamos una concentración de **0,5x10<sup>6</sup> cels/mL**, aunque en cuanto a supervivencia no parece ser la más adecuada.

Si se comparan los resultados de cada enriquecedor, podemos decir que los mejores valores en cuanto a supervivencia son los obtenidos con *Nannochloropsis oculata* a  $5 \times 10^6$  cels/mL y con *Rhodomonas sp.* a  $0,5 \times 10^6$  cels/mL y en cuanto a talla y peso seco, con harina de krill a 0,4 g/L y con *Rhodomonas sp.* a  $0,5 \times 10^6$  cels/mL. Por tanto, se recomendaría enriquecer con ***Rhodomonas sp.*** a una concentración de  **$0,5 \times 10^6$  cels/mL**

Se tomó una muestra de 1 g de Artemia enriquecida de cada enriquecedor experimental, en aquella concentración que dio mejores resultados, para su posterior análisis bioquímico. Dichas muestras se congelaron a  $-20$  °C, sin ser lavadas previamente y fueron enviadas al CIMA de la Xunta de Galicia.

### **Tarea 1.3.3. Cultivo de paralarvas**

Anualidad 2010:

Se realizaron dos experiencias (una por duplicado) para comparar el efecto de diferentes enriquecedores comerciales de Artemia sobre el crecimiento y supervivencia de las paralarvas de pulpo.

#### ***Material y Métodos:***

Se utilizó un sistema de cultivo semiabierto de tanques parabólicos de fibra de poliéster de 30 L de color blanco (dos tanques, uno por cada tipo de alimentación). El depósito regulador de estos tanques era de 60 L y se aportó agua nueva al sistema con un caudal de 1,3 L/minuto. La entrada de agua en los tanques se realizaba a través de un dispositivo basal que favorecía la circulación vertical tanto de larvas como de alimento (Figura 9) y se colocó una aireación suave alrededor de la malla central del desagüe, de 300  $\mu$ m, para evitar que las paralarvas y el alimento se acercasen. El fotoperiodo fue natural y la densidad de paralarvas fue de 20 individuos/L.

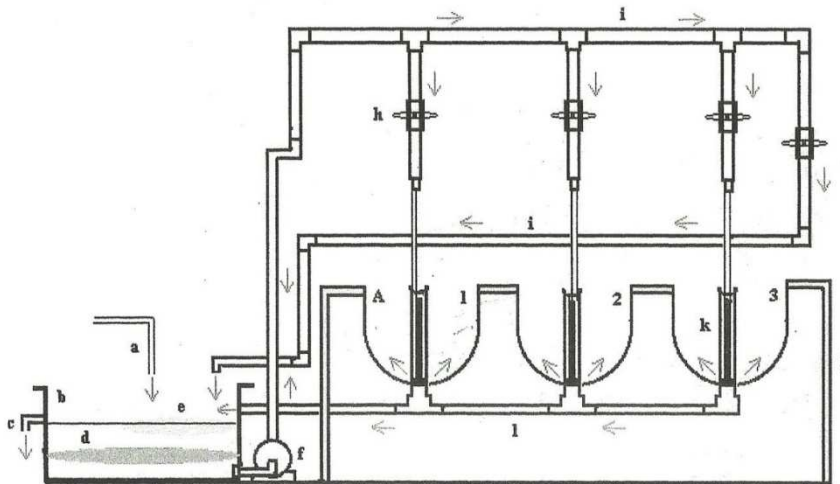


Fig. 1. Sistema de recirculación de tanques parabólicos.  
 (a) aporte de agua nueva; (b) tanque biológico; (c) desagüe; (d) filtro biológico de conchilla; (e) filtro mecánico de perlón; (f) bomba de circulación; (g) conducción de aire; (h) llaves de control de flujo; (i) tubería de conducción de agua; (j) soporte de los tanques; (k) desagüe y malla; (l) conducto de retorno.

Fig. 9: Sistema semiabierto de tanques parabólicos para el cultivo larvario

Las paralarvas se alimentaron con Artemia enriquecida con Selco y con harina de krill, a una densidad de presa de 1 artemia/ml.

Se llevó un control de crecimiento sobre talla y peso de 10 paralarvas. Para la talla se utilizó la longitud del manto (LM) tomando la distancia entre la parte posterior del cuerpo y la línea imaginaria que une los 2 ojos de paralarvas muertas por anoxia. Para el peso se determinó el peso seco a 55 °C durante 24 h, previamente lavadas con agua destilada. Se pesaron en una balanza de precisión de cuatro decimales.

Las tareas diarias que se llevaron a cabo fueron:

- Control de los parámetros físico-químicos de los tanques
- Retirada de paralarvas muertas y limpieza del fondo mediante sifonado
- Limpieza de la malla central del desagüe
- Limpieza de los filtros mecánicos colocados en el depósito regulador
- Aporte de alimento

### **Resultados y Discusión:**

Las condiciones y los resultados de las dos experiencias se resumen en las tablas VIII, IX y X.

Tabla VIII: Datos relativos a las condiciones de cultivo de las dos experiencias

Días	1T1 Art. enriq. Selco			1T2 Art. enriq. harina de krill		
	LM	PS	% Sup	LM	PS	% Sup
1	2,50	0,65	100	2,50	0,65	100
10	3,20	1,18	10	2,70	0,92	2

Tabla IX: LM (mm), PS (mg) y % de supervivencia de las paralarvas para la primera experiencia

	Exp.1	Exp.2
Inicio cultivo	29/09/10	11/10/10
Densidad (larvas/L)	20	20
LM (mm)	2,50	2,36
Peso seco (mg)	0,65	0,70
Tª media (°C)	17,90±0,59	15,60±0,80
S‰ media	33,80±0,49	33,30±0,84
Días de cultivo	10	7

Tabla X: LM (mm), PS (mg) y % de supervivencia de las paralarvas para la segunda experiencia

Días	2T1 Art. enriq. Selco			2T2 Art. enriq. harina de krill		
	LM	PS	% Sup	LM	PS	% Sup
1	2,36	0,70	100	2,36	0,70	100
7	2,50	0,74	3.33	2,50	0,72	0,33

En las figuras 10 y 11 se representan la supervivencia y crecimiento en cada una de las experiencias. La duración del cultivo en ninguno de los casos superó los 10 días.

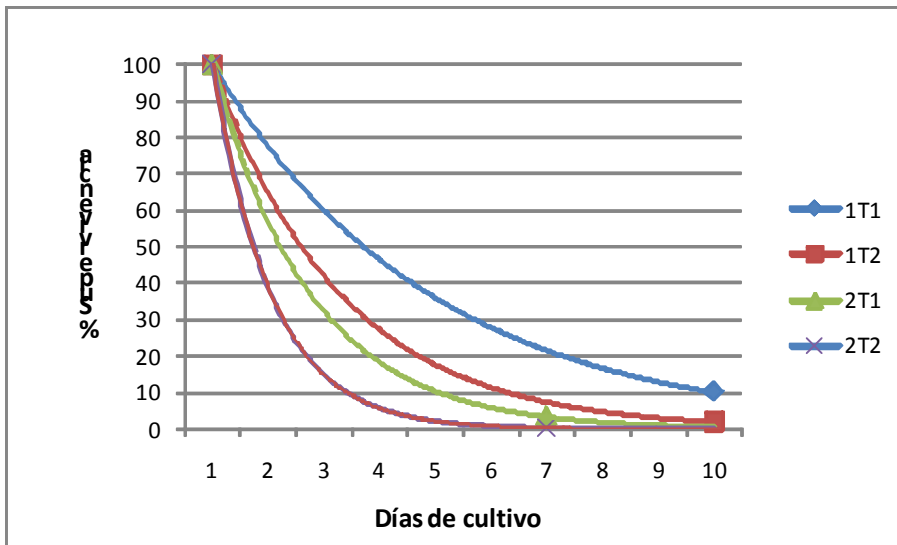


Fig. 10: Supervivencia de las paralarvas según el día de cultivo

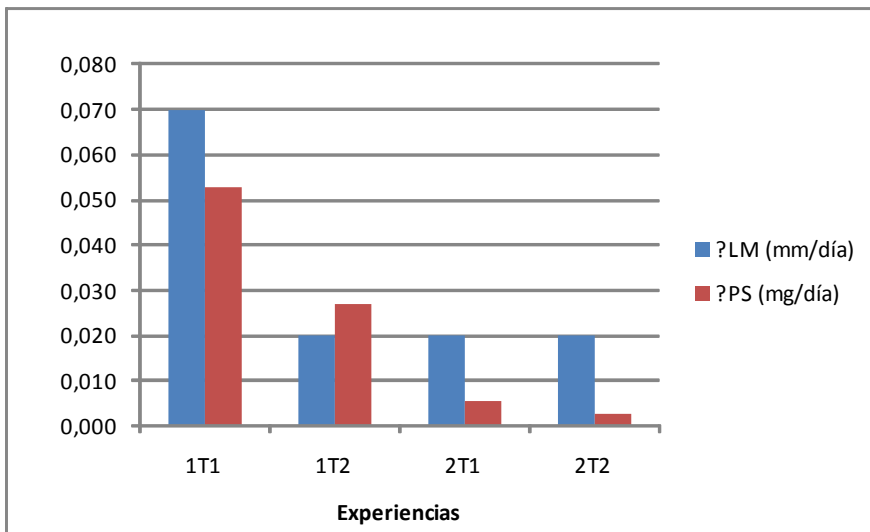


Fig. 11: Variación de longitud y peso seco según la experiencia

Anualidad 2011 y 2012:

Las experiencias de cultivo de paralarvas realizadas durante estos años se detallarán en la siguiente línea de trabajo, ya que en ellas se han empleado Artemia enriquecida, zoeas de crustáceos y otras dietas alternativas.

### Tarea 1.3.5. Análisis bioquímico de Artemia enriquecida y paralarvas

#### **Material y Métodos:**

Se tomaron muestras de Artemia enriquecida con distintas microalgas y productos comerciales y paralarvas de 15 días alimentadas con estas Artemias que se congelaron a 20°C y se enviaron al CIMA para su análisis bioquímico. La relación de muestras fue la siguiente:

- Presas: Artemia con 5 y 8 días de cultivo
- Artemia sin enriquecer
  - ✓ Artemia enriquecida con Selco (0,6 g/L)
  - ✓ Artemia enriquecida con Ori Green (0,4 g/L)
  - ✓ Artemia enriquecida con Harina de Krill (0,4 g/L)
  - ✓ Artemia enriquecida con *N. oculata* ( $5 \times 10^6$  cels/mL)
  - ✓ Artemia enriquecida con *Rhodomonas sp.* ( $0,5 \times 10^6$  cels/mL)
- Paralarvas de pulpo:
  - ✓ Recién eclosionadas
  - ✓ Alimentadas con Artemia enriquecida con Selco a los 15 días de cultivo
  - ✓ Alimentadas con Artemia enriquecida con Selco (cultivo en aguas verdes) a los 15 días de cultivo
  - ✓ Alimentadas con Artemia enriq. con Ori Green a los 15 días de cultivo
  - ✓ Alimentadas con Artemia enriq. con *N. oculata* a los 15 días de cultivo

#### **Resultados y Discusión:**

En la tabla XI se resumen los resultados obtenidos en cuanto al % en ácidos grasos de las Artemias enriquecidas. De estos resultados se extrae que los enriquecedores de Artemia que más aportan en cuanto a su contenido en ácidos grasos son las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Rhodomonas sp.* y el enriquecedor comercial Selco.

En la tabla XII se muestran los resultados obtenidos en el análisis bioquímico de las paralarvas de pulpo cultivadas. De ella se extrae que las paralarvas alimentadas con Artemia enriquecida con Selco y *Nannochloropsis oculata* tienen un contenido nutricional, en cuanto a ácidos grasos, muy similar al de las paralarvas recién eclosionadas, es decir, muy próximo a sus requerimientos nutricionales. Por todo lo anterior, los enriquecedores Selco, *Rhodomonas sp.* y *Nannochloropsis oculata* fueron los elegidos para ser utilizados en las experiencias de cultivo de paralarvas del año 2012.

Tabla XI: Perfil de ácidos grasos de las Artemias cultivadas con distintos enriquecedores a día 5 y 8 de cultivo

% Total Ac. Grasos												
	Art sin		Art Ori		Art Selco		Art krill		Art No		Art Rh	
	5d	8d	5d	8d	5d	8d	5d	8d	5d	8d	5d	8d
PUFA	17,01	28,03	12,93	28,55	17,01	26,53	17,47	24,73	35,32	32,27	35,63	46,48
SAFA	38,12	34,8	67,23	41,47	38,12	30,29	42,61	34,1	27,81	28,40	34,90	31,33
MUFA	44,87	37,17	19,83	29,98	44,87	43,18	39,91	41,17	36,86	39,34	29,47	22,19
$\omega 3$	9,97	20,52	6,29	17,94	9,97	15,9	13,34	18,07	25,65	20,83	15,74	21,57
$\omega 6$	6,35	7,23	6,35	10,36	6,35	10,04	3,28	5,98	9,24	10,66	19,50	24,48
EPA	2,1	4,33	1,9	4,89	2,1	4,71	6,67	9,22	7,26	11,85	3,15	5,13
DHA	2,09	0,08	0,81	3,49	2,09	5,77	1,9	1,49	0,21	0,21	0,79	1,87
ARA	1,02	1,56	2,02	2,12	1,02	1,5	1,01	1,23	2,93	3,76	3,33	5,29

Tabla XII: Perfil de ácidos grasos de las paralarvas cultivadas con Artemia enriquecida con distintos productos

%Total Ac. Grasos					
	Recién eclosionadas	Selco	Ori	No	Selco Aguas verdes
PUFA's	42,54	37,11	41,57	45,55	44,31
SAFA's	48,66	31,89	32,32	28,66	28,39
MUFA's	8,80	31,00	26,11	25,79	27,30
$\Sigma\omega 3$	33,65	26,70	29,47	31,03	31,02
$\Sigma\omega 6$	4,55	7,66	9,37	11,17	10,75
EPA	12,74	14,56	13,57	12,60	14,14
DHA	19,92	8,51	10,21	14,25	12,63
ARA	4,23	5,30	5,87	5,71	5,13



Línea 1.5. Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidáceos cultivados y zoeas de crustáceos vivas o congeladas

- ✓ **OBJETIVOS:** Obtención de juveniles de pulpo a partir de zoeas de crustáceos, aplicando tecnologías de cultivo innovadoras que permitan mejorar las tasas de crecimiento y supervivencia de las paralarvas.

**Tarea 1.5.1. Obtención de zoeas de decápodos (cangrejos autóctonos, cangrejo, nécora, centollo, buey, etc.)**

***Material y Métodos:***

Durante los años 2010, 2011 y 2012 se establecieron hembras de centollo (*Maja squinado*) ovadas que fueron realizando puestas sucesivas (Figura 12). Se mantuvieron en un tanque de 250 L, en circuito abierto, con una renovación de 1,5 L/min, aireación en el fondo y desagüe en superficie. Se utilizó un colector de malla de 500 µm para la recogida de las zoeas. El alimento fue Lirio congelado (*Micromesistius poutassou*) y mejillones vivos (*Mytilus edulis*) *ad libitum*.

Las zoeas recién eclosionadas (Figura 13) se congelaron a -20 °C para su posterior uso como dieta inerte.

***Resultados y Discusión:***

La elección de zoeas de centollo como dieta para las paralarvas de pulpo se debe a los resultados obtenidos en estudios anteriores (Itami *et al.* 1963; Villanueva 1995, Iglesias *et al.* 2004 y Carrasco *et al.*, 2002 y 2006). Además se trata de una especie autóctona y abundante en zonas de puesta de los pulpos, por lo que podemos suponer que las zoeas de centollo podrían formar parte de la dieta natural de las paralarvas durante sus primeras fases de desarrollo. Esta especie muestra también una supervivencia muy elevada en cautividad. Los datos del desove de las hembras de centollo establecidas en 2011 se resumen en la tabla XIII.



Fig. 12: Puesta en el abdomen de la hembra Fig. 13: Zoeas de centollo recién eclosionadas

Tabla XIII: Datos relativos al desove de las hembras de *Maja squinado* en 2011.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b>Estabulación</b>	13/09/10	13/09/10
<b>Peso (g)</b>	800	900
<b>Primera puesta</b>	≈13/09/10	≈13/09/10
<b>Desarrollo embrionario (días)</b>	≈47	≈47
<b>Duración eclosión (días)</b>	2	4
<b>Segunda puesta</b>	07/02/2011	22/02/2011
<b>Desarrollo embrionario (días)</b>	74	63
<b>Duración eclosión (días)</b>	1	1
<b>Tercera puesta</b>	22/04/2011	26/04/2011
<b>Desarrollo embrionario (días)</b>	54	54
<b>Duración eclosión (días)</b>	1	1
<b>Cuarta puesta</b>	15/06/2011	19/06/2011
<b>Desarrollo embrionario (días)</b>	36	32
<b>Duración eclosión (días)</b>	1	1
<b>Quinta puesta</b>	21/07/2011	22/07/2011
<b>Desarrollo embrionario (días)</b>	35	34
<b>Duración eclosión (días)</b>	1	1
<b>Sexta puesta</b>	01/09/2011	01/09/2011
	No llegó a completarse	No llegó a completarse
<b>Talla media de las zoeas largo (mm)</b>	2,40	2,40
<b>Talla media de las zoeas ancho (mm)</b>	1,18	1,18

El ciclo vital del centollo ha sido estudiado en profundidad y se conoce que las hembras realizan varias puestas sin necesidad de ser fecundadas de nuevo y que el desarrollo embrionario dura entre 30 y 40 días a temperaturas de 16 - 18 °C (Iglesias et al., 2002).

## Tarea 1.5.2. Obtención de zooplancton del medio natural

### ***Material y Métodos:***

Durante los años 2010 y 2011 se acondicionó un tanque circular de 7000 L, con 1 m de altura y 3 m de diámetro, con aireación desde el fondo por inyección de aire, lo que nos permitía el intercambio de aguas dentro del tanque y la suspensión del fitoplancton (Figura 14). En dicho tanque se realizó una inoculación inicial de fitoplancton con Ts y Pt y medio de cultivo, que se fue renovando semanalmente para mantener un bloom natural de fitoplancton. En primavera, aprovechando el bloom natural, se procedió al tamizado manual de agua de la ría e inoculación del tanque con el zooplancton encontrado.



Fig. 14: Tanque de cultivo de zooplancton

### ***Resultados:***

Periódicamente se examinaron los tamices colocados dentro del tanque para conocer la variedad de especies presentes y su abundancia. Los resultados no fueron muy satisfactorios, por lo que se descartó el uso de zooplancton para alimentar a las paralarvas.

### Tarea 1.5.3. Otras dietas vivas alternativas

Se valoró la utilización de otras dietas alternativas como por ejemplo, las larvas de erizo y las zoeas de otros crustáceos como la quisquilla (*Palaemon elegans*).

#### Larvas de Erizo de mar

##### **Material y Métodos:**

En enero de 2010 y 2011, al comienzo del desarrollo gonadal del erizo de mar (*Paracentrotus lividus*), se estabularon 20 ejemplares, en un tanque de 250 L con renovación de agua, aireación y macroalgas de la zona. La inducción a la puesta se realizó mediante la inyección de 2,5 - 5,0 ml de KCl 0,5 N a través de la membrana peristomial y colocación de los ejemplares en vasos con agua de mar para la expulsión de los productos sexuales (Figuras 15 y 16)

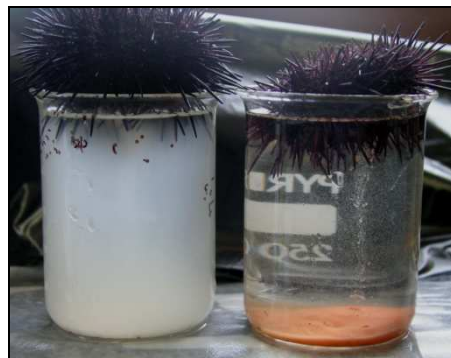


Fig. 15: Inyección de KCl Fig. 16: Expulsión de los productos sexuales

Para la fecundación se eliminó el sobrenadante de las hembras y se pasaron los ovocitos a un vaso de 500 mL donde se procedió a la fecundación con 1 mL del esperma de los machos. Se comprobó al microscopio que la fecundación había sido satisfactoria, observándose la membrana de fecundación en la mayoría de ovocitos.

Los huevos fecundados se colocaron en un cubo con 5 L de agua de mar esterilizada a una temperatura de 18 -19 °C durante 24-48 horas, tras este periodo se observaron las larvas en estado de gástrula con un tamaño aproximado de 100 µm. En las figuras 16 - 21 se observan varios estadios del desarrollo embrionario.



Fig. 16: Ovocito sin fecundar Fig.17: Ovocito con membrana de fecund. Fig. 18: Embrión con 2 células

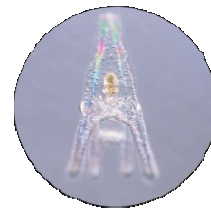
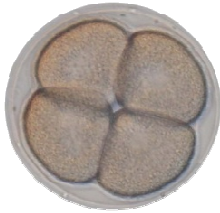


Fig. 19: Embrión con 4 células

Fig. 20: Estado de gástrula

Fig. 21: Larva de erizo

### **Resultados:**

Las larvas de erizo obtenidas se congelaron y se utilizaron como alimento para paralarvas de pulpo en los primeros días del cultivo, en las experiencias del año 2011.

### **Zoeas de quisquilla (*Palaemon elegans*)**

#### **Material y Métodos:**

En el mes de abril se establecieron hembras ovadas de quisquillas (*Palaemon elegans*) (Figura 22) con el fin de suministrar las zoeas a las paralarvas, como dieta alternativa (Figura 23).

Se trata de una especie ovípara cuya reproducción tiene lugar entre abril y septiembre, coincidiendo con la época natural de reproducción de los pulpos. La fecundación es externa y una vez fertilizados los huevos la hembra los lleva en sus apéndices abdominales. Pueden llegar a tener varias puestas.

Se capturaron en la ría del Eo y se estabularon en un tanque de 250 L, en circuito abierto, con un aporte de agua nueva al sistema de 1,5 L/min, aireación en el fondo y desagüe en superficie. El alimento fueron mejillones vivos (*Mytilus edulis*) *ad libitum*.



Fig. 22: Quisquilla (*Palaemon elegans*)



Fig. 23: Zoea de *Palaemon elegans* con un día de vida

### **Resultados:**

Tras la eclosión, las zoeas, con un tamaño de 3 mm de largo y 0,75 mm de ancho, se congelaron a -20 °C para su posterior uso como dieta inerte. No llegaron a utilizarse.

### **Tarea 1.5.4. Cultivo de paralarvas**

Anualidad 2010:

### **Material y Métodos:**

Se realizó una experiencia donde se ensayaron dos sistemas diferentes de cultivo. La alimentación se basó en Artemia enriquecida y zoeas de centollo congeladas.

### Sistema 1:

Circuito semiabierto de dos tanques parabólicos de fibra de poliéster de 30 L de color blanco, con un aporte de agua nueva al sistema de 0,4 L/minuto. La entrada de agua basal favorecía la circulación vertical de las larvas y del alimento, que junto con una aireación suave alrededor de la malla central del desagüe, de 300  $\mu\text{m}$ , evitaba que las paralarvas y el alimento se acercasen. La densidad de paralarvas fue 20 individuos/L. El fotoperiodo fue natural.

### Sistema 2:

Dos tanques cilíndricos de base cónica de 200 L (uno réplica) con un tamiz de malla de 300  $\mu\text{m}$ , delimitando un volumen de 30 L. Era un circuito cerrado con recirculación de agua desde el fondo por inyección de aire (figuras 24 y 25). El fotoperiodo fue natural y la densidad del cultivo fue de 20 paralarvas/L. Diariamente se renovaba el 8 % del volumen del tanque y, cada 10 días, coincidiendo con el muestreo de paralarvas el volumen completo del tanque.

El alimento empleado en ambos sistemas de cultivo fue *Artemia* cultivada con fitoplancton (*Tetraselmis suecica* y *Phaeodactylum tricorutum*) y enriquecida durante 24 h con Selco, en una concentración de 1 artemia/ml, más zoeas de centollo congeladas en una concentración de 0,1 zoeas/ml.

Cada 10 días se hizo un control de talla/peso, se utilizó la longitud del manto (LM) de paralarvas muertas por anoxia y el peso seco en estufa a 55°C durante 24 horas de 10 paralarvas, previamente lavadas con agua destilada. Se pesaron en una balanza de precisión de cuatro decimales.



Fig. 24: Sistema de cultivo 2



Fig. 25: Detalle del tamiz en el sistema de cultivo 2

Las tareas diarias que se llevaron a cabo fueron:

- Control de los parámetros físico-químicos de los tanques
- Retirada de paralarvas muertas y limpieza del fondo mediante sifonado
- Limpieza de la malla central del desagüe (Sistema 1)
- Limpieza de filtros mecánicos colocados en el depósito regulador (Sistema 1)
- Limpieza de la malla del tamiz mediante sifonado (Sistema 2)
- Renovación de 15 L (Sistema 2)
- Aporte de alimento

### **Resultados y Discusión:**

En la tabla XIV se resumen las condiciones de cultivo en cada sistema.

Tabla XIV: Datos relativos a las condiciones de cultivo

	<b>S1.1</b>	<b>S1.2</b>	<b>S2.1</b>	<b>S2.2</b>
<b>Inicio cultivo</b>	06/12/10	09/12/10	06/12/10	09/12/10
<b>Tipo sistema</b>	Semiabierto	Semiabierto	Cerrado	Cerrado
<b>Densidad (larvas/L)</b>	20	20	20	20
<b>Volumen (L)</b>	30	30	30	30
<b>Malla (µm)</b>	300	300	300	300
<b>Alimentación</b>	Artemia enrq. + zoeas centollo	Artemia enrq. + zoeas centollo	Artemia enrq. + zoeas centollo	Artemia enrq. + zoeas centollo



	congeladas	congeladas	congeladas	congeladas
<b>LM inicial (mm)</b>	2,1	2,1	2,1	2,1
<b>Peso seco inicial (mg)</b>	0,31	0,31	0,31	0,31
<b>Tª media (°C)</b>	21,63±1,14	21,63±1,14	21,20±1,58	21,20±1,58
<b>S‰ media</b>	33,35±1,00	33,35±1,00	33,78±1,00	33,78±1,00
<b>Días de cultivo</b>	14	6	38	20

El sistema 2 arrojó mejores resultados que el sistema 1, donde las paralarvas no superaron los 14 días de cultivo. La causa de estos resultados podría ser debido a la complejidad del sistema que dificultaba las labores de mantenimiento y limpieza.

En la figura 26 se puede observar cómo, en esta experiencia (en rojo), se superan los días de cultivo de las experiencias realizadas con anterioridad (línea 1.3) en donde la alimentación de las paralarvas se basaba solo en Artemia enriquecida con diferentes productos (en azul). La mejoría de los resultados podría deberse a tres factores principales: El incremento de la temperatura del agua a 20°C-22°C, el aporte de zoeas de centollo y la simplificación de las labores de manipulación de las paralarvas durante el cultivo.

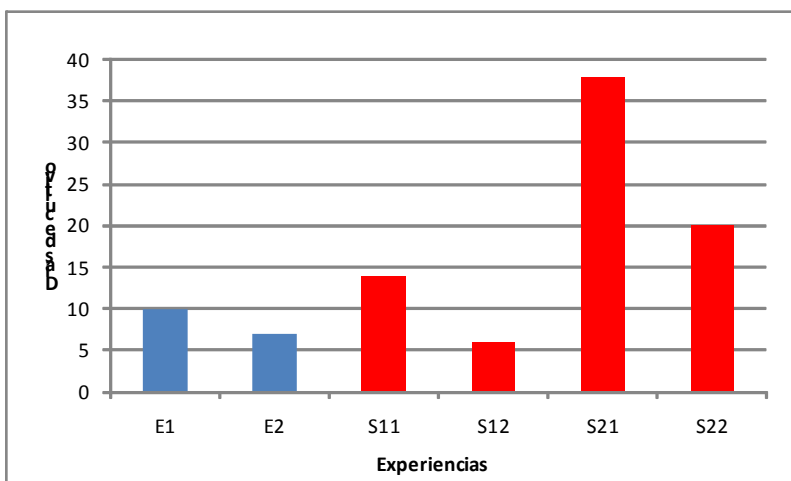


Fig. 26: Días de cultivo en función de la experiencia

En las tablas XV, XVI, XVII y XVIII se indican los datos de longitud, peso seco y supervivencia para cada sistema.

Tablas XV, XVI, XVII y XVIII : Datos relativos a la LM (mm), PS (mg) y supervivencia (%) de cada tanque en función del sistema de cultivo.

#### Experiencia S11:

Días	LM (mm)	PS (mg/paralarva)	Supervivencia (%)
1	2,1	0,31	100
7	2,5	1,58	60
10	2,7	1,33	17
14	2,8	1,25	3,8

#### Experiencia S12:

Días	LM (mm)	PS (mg/paralarva)	Supervivencia (%)
1	2,1	0,31	100
6	2,4	0,84	2,2

#### Experiencia S21:

Días	LM (mm)	PS (mg/paralarva)	Supervivencia (%)
1	2,1	0,31	100
7	2,7	1,88	95
10	2,9	1,94	95
20	3,7	1,90	45
30	3,9	1,98	1,33
38	3,9	1,89	1

#### Experiencia S22:

Días	LM (mm)	PS (mg/paralarva)	Supervivencia (%)
1	2,1	0,31	100
7	2,4	2,38	95
10	3,1	0,80	70
20	3,5	1,20	2,8

En la figura 27 podemos ver la supervivencia por parciales. Observamos que con el sistema 2, a día 10 de cultivo, la supervivencia se mantiene por encima del 70 %, disminuyendo a los 30 días al 1,33 %, muy lejos del 10% obtenido por Iglesias *et al.*, (1997) y Carrasco *et al.*, (2001), donde se llega al mismo número de días de cultivo.

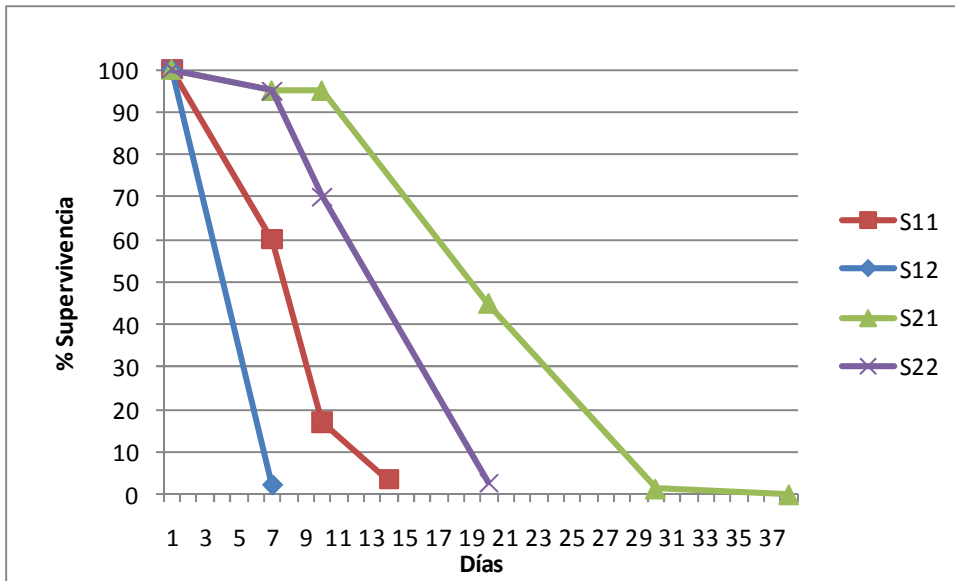


Fig. 27: Supervivencia larvaria de cada tanque en función del sistema de cultivo

En la figura 28 se comparan las experiencias S1 y S2 con las realizadas anteriormente en donde solo se alimentaba a las paralarvas con *Artemia salina* enriquecida con diferentes productos. No se observan resultados significativos en cuanto a crecimiento, ni en función del sistema (comparando S1 con S2) ni de la alimentación (comparando S1 y S2 con el resto de experiencias).

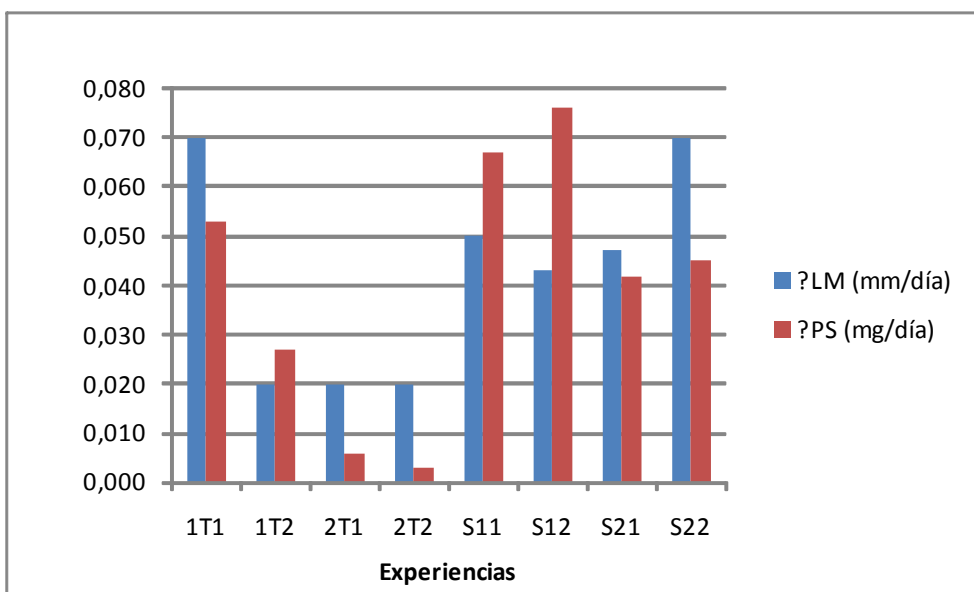


Fig. 28: Variación de LM y PS al día en función de la experiencia

No podemos concluir que el aporte de zoeas de centollo, en este caso congeladas, haya ayudado al crecimiento, solo a evitar la mortalidad, aunque diversos autores han comprobado que el crecimiento de las paralarvas mejora cuando se utilizan como dieta larvas de crustáceos vivas (Itami *et al.*, 1963; Villanueva, 1995; Iglesias *et al.* 2004 y Carrasco *et al.*, 2002 y 2006) obteniendo paralarvas de 60 días, en cultivos realizados en pequeños volúmenes de menos de 100 L. Sin embargo, cuando se trata de cultivar paralarvas en grandes volúmenes, la Artemia es el único alimento sin problemas de disponibilidad y es bien aceptada por las paralarvas (Hamazaki *et al.*, 1991; Iglesias *et al.*, 1997).

La mejora de los resultados, en cuanto a supervivencia y duración del cultivo, coincide con un incremento de la temperatura del agua, con el aporte de zoeas de centollo congeladas y con la optimización del sistema de cultivo. Todo ello nos lleva a pensar que el sistema de tanques troncocónicos con tamices, facilita las labores de limpieza reduciendo el estrés de las paralarvas.

Anualidad 2011:

### **Material y Métodos:**

Se realizó una experiencia en la que se compararon diferentes tipos de enriquecedores de *Artemia salina* suministrada como base de la dieta de las paralarvas (dos enriquecedores comerciales y uno experimental).

Dicha dieta estaba compuesta de Artemia cultivada con *Tetraselmis suecicca* e *Isochrysis galbana* y enriquecida durante 24 horas (1 art/mL) y Zoeas de centollo congeladas (0,1 zoeas/mL). Además, durante la primera semana, se realizó un aporte de larvas de erizo congeladas (0,6 larvas/mL) en todos los tanques.

Los diferentes enriquecedores de Artemia empleados, fueron:

- Selco (Easy DHA Selco, INVE Bélgica, 0,6 g/L)
- Ori Green (Ori-Go, Skretting, 0,4 g/L)
- *Nannochloropsis oculata* ( $5 \times 10^6$  cels/mL)

- Además se estudió el efecto de la adición de *N. oculata* en el tanque de cultivo de paralarvas alimentadas con Artemia enriquecida con Selco (Aguas verdes).

El tanque de cultivo empleado fue el utilizado anteriormente, con tanques troncocónicos y tamiz con malla delimitando un volumen de cultivo de 20L. La densidad de cultivo fue de 20 paralarvas/L, la temperatura de 21 °C y fotoperiodo natural suavizado con una malla sombreadora. Se emplearon dos tanques por cada tipo de alimentación.

Las tareas llevadas a cabo fueron:

- Limpieza diaria de restos y paralarvas muertas, renovación del 50 % del agua de cultivo y aporte de alimento.
- Renovación total y limpieza del tanque cada 7 días.
- Control de supervivencia y crecimiento. Medidas de LM y peso seco en 10 paralarvas mediante lavado con agua destilada y secado durante 24 h a 100 °C) los días 1, 15 y 30.

### Resultados y Discusión:

La duración del cultivo varió en función del tipo de enriquecedor empleado en el cultivo de la Artemia que se suministró a las paralarvas. Si observamos la Figura 29, se comprueba que unos enriquecedores parecen ser más efectivos que otros. La utilización de Selco como enriquecedor permitió llevar el cultivo a 39 días, mientras que con el resto se incrementa la mortalidad.

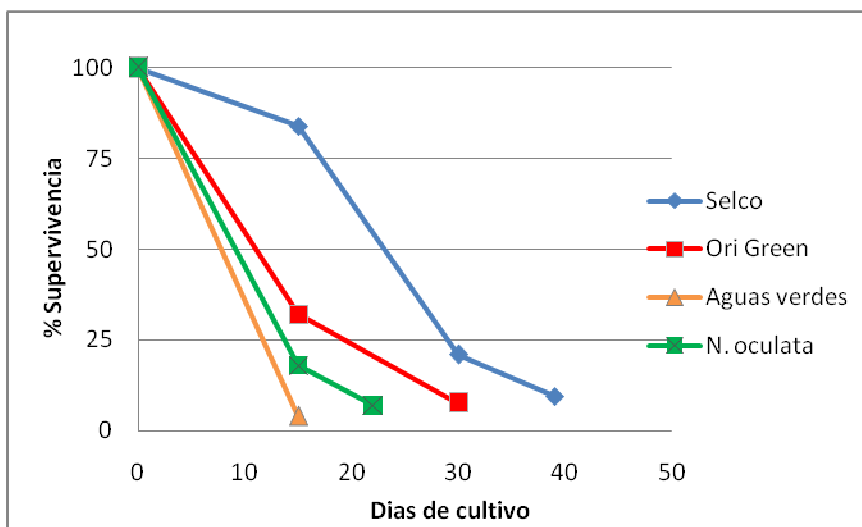


Fig. 29: Supervivencia de las paralarvas según el tipo de dieta y día de cultivo

Además de la duración total del cultivo, a día 15 ya se observan diferencias significativas en la supervivencia, y los enriquecedores Selco y Ori Green muestran mejores resultados que los demás. A partir del día 15, la supervivencia de las paralarvas alimentadas con el resto de enriquecedores queda por debajo del 50 %, mientras que con Selco es del 84 % y a día 30 del 21% frente al 10% observado por Iglesias *et al.* (1997) con el mismo tipo de dieta. La utilización de la microalga *N. oculata*, tanto como enriquecedor como aditivo al agua de cultivo, no arrojó los resultados esperados ya que la edad alcanzada por las paralarvas fue de 22 y 15 días respectivamente, por debajo de los 70 días alcanzados por Moxica *et al.* (2006) donde utilizaba el alga como enriquecedor. El cultivo en Aguas verdes no resultó efectivo, con el tipo de sistema de estabulación empleado, ya que se observó demasiada suciedad en el tamiz.

En cuanto a longitud y peso seco (Tabla XIX y Figuras 30 y 31), los mejores resultados son los obtenidos con los enriquecedores Ori Green y Selco, y coinciden con los observados por Carrasco *et al.* (2001, 2003. Informe interno) hasta el día 30 de cultivo, posteriormente son inferiores. Los valores obtenidos utilizando *N. oculata* como enriquecedor son superiores a los observados por Moxica *et al.* (2006) donde a día 30 de cultivo el peso seco es de 1,87 mg.

No podemos determinar que el empleo de larvas de erizo haya favorecido el cultivo, ya que si comparamos esta experiencia con la del año 2010, los resultados para el cultivo con Artemia enriquecida con Selco son muy similares.

Tabla XIX. Valores medios de longitud (LM) (mm) y peso seco (PS) (mg) de las paralarvas

Días	Selco		Ori Green		Aguas verdes		<i>N. oculata</i>	
	LM±sd	PS±sd	LM±sd	PS±sd	LM±sd	PS±sd	LM±sd	PS±sd
1	2,4±0,0	0,6±0,0	2,4±0,0	0,6±0,0	2,4±0,0	0,6±0,0	2,4±0,0	0,6±0,0
15	2,8±0,0	1,4±0,2	3,0±0,1	1,0±0,2	2,5±0,0	1,2±0,0	2,6±0,3	1,1±0,1
22							2,8±0,0	2,2±0,0
30	3,4±0,5	2,2±0,2	3,4±0,6	2,5±0,3				
39	4,2±0,4	3,9±0,2						

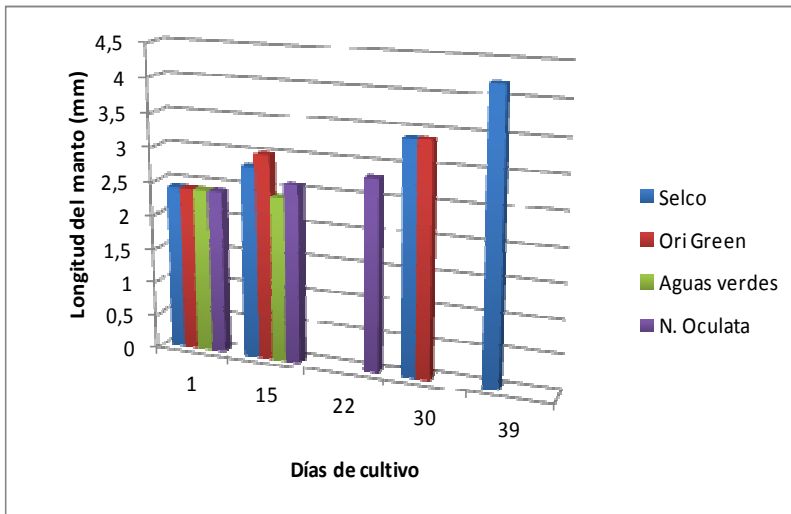


Fig. 30: Longitud del manto (mm)

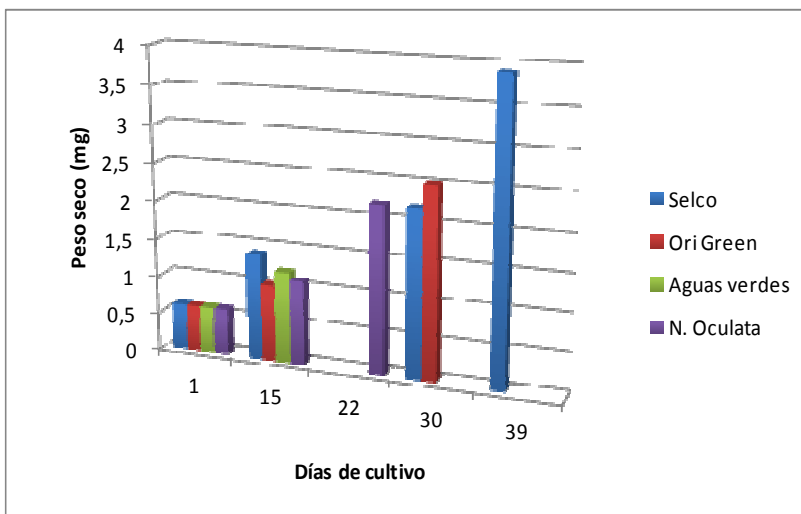


Fig. 31: Peso seco (mg)

Anualidad 2012:

Las experiencias realizadas durante el año 2012 pueden dividirse en dos grupos. En el primer grupo se continúa con la línea de años anteriores utilizando el mismo sistema de cultivo, ligeramente modificado y diferentes enriquecedores de Artemia. En el segundo grupo de experiencias se experimenta con un nuevo sistema de cultivo.

### Primer grupo de experiencias:

Se realizaron varias experiencias en las que se compararon diferentes tipos de enriquecedores de *Artemia salina*, como base de la dieta de las paralarvas.

#### **Material y Métodos:**

Los tanques de cultivo empleados fueron los que en experiencias anteriores dieron mejores resultados (Figura 32), tanques troncocónicos con recirculación del agua en circuito cerrado y tamices con malla de 300  $\mu\text{m}$ , delimitando un volumen de cultivo de 30 L. La densidad de cultivo fue de 20 paralarvas/L, la temperatura entre 20°C-22°C y fotoperiodo natural suavizado con una malla sombreadora. Como novedad, se diseñó un sistema de giro del agua que, mediante bombeo, la introducía en el tamiz forzando la resuspensión del alimento inerte.

Todas las dietas se basaron en el aporte de *Artemia* cultivada con *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*, enriquecida durante 24 horas, y zoeas de centollo congeladas. Cada dieta se ensayó por duplicado.

El mantenimiento llevado a cabo fue:

- Limpieza diaria de restos y paralarvas muertas, renovación del 50 % del volumen de agua y aporte de alimento.
- Control de supervivencia, LM, LT (de 5 paralarvas/tanque) y peso seco (de 5 paralarvas, por triplicado, de cada tanque, durante 24 h a 100 °C), los días 1, 15, 30, 40 y 50.
- Renovación total y limpieza del tanque cada 7 días.



Fig. 32: Tanques de cultivo



#### PRIMERA EXPERIENCIA:

La alimentación consistió en:

- ✓ 1ª toma: Artemia cultivada con Ts e Ig y enriquecida durante 24 horas con Selco (Easy DHA Selco, INVE Bélgica, 0,6 g/L) (0,5 art/mL) y Zoeas de centollo congeladas (0,02 zoeas/mL) en todos los tanques.
- ✓ 2ª toma: Artemia cultivada con Ts e Ig y enriquecida durante 24 horas con Rh o No (0,5 art/mL) y Zoeas de centollo congeladas (0,02 zoeas/mL) en todos los tanques.
  - T1A y T1B: Artemia enriquecida con No ( $5 \times 10^6$  cels/mL) (Aguas verdes  $0,1 \times 10^6$  cels/mL de No)
  - T2A y T2B: Artemia enriquecida con Rh ( $0,5 \times 10^6$  cels/mL) (Aguas rojas  $0,1 \times 10^6$  cels/mL de Rh)

#### SEGUNDA EXPERIENCIA:

La alimentación fue la misma, en tres tomas diarias:

- ✓ 1ª toma: Artemia cultivada con Ts e Ig y enriquecida durante 24 horas con Selco (0,5 art/mL) y con Rh o No (según el tanque) (0,5 art/mL) y zoeas de centollo congeladas (0,01 zoeas/mL) en todos los tanques.
- ✓ 2ª toma: Zoeas de centollo congeladas (0,01 zoeas/mL) en todos los tanques.
- ✓ 3ª toma: Zoeas de centollo congeladas (0,005 zoeas/mL) en todos los tanques.

A partir del día 47 de cultivo se aportó krill troceado para incluir una presa de mayor tamaño en la dieta.

#### TERCERA EXPERIENCIA:

Consistió en realizar un cultivo suministrando aquella dieta que mejores resultados arrojó en la experiencia anterior, en concreto con la microalga *Rhodomonas sp*:

- ✓ 1ª toma: Artemia cultivada con Ts e Ig y enriquecida durante 24 horas con Selco (0,5 art/mL) y con Rh (0,5 art/mL) y zoeas de centollo congeladas (0,01 zoeas/mL) en todos los tanques.
- ✓ 2ª toma: Zoeas de centollo congeladas (0,01 zoeas/mL) en todos los tanques.
- ✓ 3ª toma: Zoeas de centollo congeladas (0,005 zoeas/mL) en todos los tanques.

Tanto el sistema de cultivo como las pautas seguidas también fueron las mismas que en el caso anterior.

Para todas las experiencias se calculó la tasa de crecimiento como Daily growth index (DGI)..

$$DGI = \left[ \left( PS_f^{1/3} - PS_i^{1/3} \right) / (T_f - T_i) \right] \times 100$$

### **Resultados y Discusión:**

#### PRIMERA EXPERIENCIA:

<b>Resumen</b>	
<b>Densidad</b>	20 paralarvas/L
<b>Fotoperiodo</b>	Natural con malla sombreadora
<b>Temperatura media</b>	20,04 ± 0,93 °C
<b>Circuito</b>	Cerrado, recirculación de agua desde el fondo
<b>Renovación</b>	Parcial diaria y total semanal
<b>Alimento</b>	1 art. enriq./mL + 0,04 zoeas centollo/mL (2 tomas)
✓ <b>T1A y T1B</b>	0,5 art/mL enriq. Selco + 0,5 art/mL enriq. No
✓ <b>T2A y T2B</b>	0,5 art/mL enriq. Selco + 0,5 art/mL enriq. Rh
<b>Sistema de giro</b>	Hasta el día 9 de cultivo

La experiencia comenzó con el sistema de giro mencionado, que mantenía el alimento inerte en suspensión, pero se eliminó a los 9 días por no dar los resultados esperados

En el T1, a día 50 de cultivo, las paralarvas comienzan a cambiar su comportamiento y ya se aprecian características de la fase bentónica. La longitud de sus brazos ya representaba el 43,40 % de la longitud total (LT) frente al 29,20 % tras la eclosión. Este dato se aproxima al obtenido por Moxica *et al.* en 2006 con paralarvas bentónicas de 70 días.

El peso seco de las paralarvas, a día 30 de cultivo, es de 3,23 mg valor superior al observado por Moxica *et al.* en 2006 (1,89 mg), con la misma alimentación, y ~~Es también un valor~~ muy similar al obtenido por Carrasco *et al.* en 2005 (3,38 mg), utilizando Artemia y zoeas de centollo, y al mostrado por Seixas en 2009, donde utilizando Selco como enriquecedor y aportando *Nannochloropsis oculata* al tanque de cultivo obtiene paralarvas de 25 días con un peso seco de 3,30 mg. No obstante, el valor es muy inferior al obtenido por Villanueva *et al.* en 2002 donde enriqueciendo las Artemias con microencapsulados obtiene paralarvas de 30 días con un peso seco de 7,95 mg.

Con 40 días su peso seco es de 3,47 mg, por tanto, su tasa de crecimiento diario ha disminuido considerablemente. Con 53 días su peso seco es de 4,50 mg y queda muy por debajo de lo obtenido por Carrasco *et al.* en 2005 a día 50 (9.20 mg) y Moxica *et al.* en 2002 a día 56 (9,21mg).

Tabla XX: Resultados obtenidos en la primera experiencia

Tanque	Días de cultivo	Supervivencia (%)	Talla (mm)		PS±sd (mg)	Obs.
			LM±sd	LT±sd		
	1	100	2,52 ± 0,06	3,56 ± 0,14	0,65 ± 0,05	
T1A	7	40,00	2,49 ± 0,07	3,26 ± 0,20	0,91 ± 0,03	
T1B		66,00	2,51 ± 0,07	3,28 ± 0,18	0,92 ± 0,03	
T2A		26,00	2,54 ± 0,04	3,30 ± 0,07	0,90 ± 0,02	
T2B		27,80	2,53 ± 0,06	3,25 ± 0,09	0,89 ± 0,05	
T2A	9	1,50	2,96 ± 0,14	3,66 ± 0,22	0,80 ± 0,05	Final
T2B		6,50	3,11 ± 0,11	4,01 ± 0,29	0,82 ± 0,04	Final
T1A	15	5,50	3,02 ± 0,09	4,06 ± 0,07	2,09 ± 0,11	
T1B		19,33	3,12 ± 0,08	4,09 ± 0,04	2,03 ± 0,17	Se juntan
T1B	30	3,50	3,78 ± 0,26	5,88 ± 0,15	3,23 ± 0,81	
T1B	39	0,33	4,63 ± 0,13	6,29 ± 0,19	3,47 ± 0,24	
T1B	53	1 individuo	6,00	10,60	4,50	Final

La tasa de crecimiento diario (DGI) hasta el día 15 de cultivo va aumentando, excepto en los tanques T2, pero a partir de aquí disminuye hasta que finaliza el cultivo.

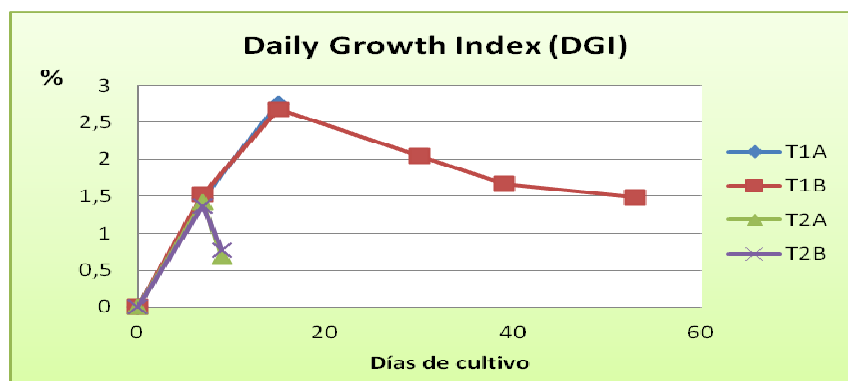


Fig. 33: Daily Growth Index, primera experiencia

SEGUNDA EXPERIENCIA:

<b><u>Resumen</u></b>	
<b>Densidad</b>	20 paralarvas/L
<b>Fotoperiodo</b>	Natural con malla sombreadora
<b>Temperatura media</b>	20,88 ± 1,10 °C
<b>Circuito</b>	Cerrado, recirculación de agua desde el fondo
<b>Renovación</b>	Parcial diaria y total semanal
<b>Alimento</b>	1 art. enriq./mL + 0,025 zoeas centollo/mL (3 tomas)
✓ <b>T1A y T1B</b>	0,5 art/mL enriq. Selco + 0,5 art/mL enriq. No
✓ <b>T2A y T2B</b>	0,5 art/mL enriq. Selco + 0,5 art/mL enriq. Rh

Tabla XXI: Resultados obtenidos en la segunda experiencia

Tanque	Días de cultivo	Supervivencia (%)	Talla (mm)		PS±sd (mg)	Obs.
			LM±sd	LT±sd		
T1A	1	100	2,46 ± 0,07	3,18 ± 0,10	0,35 ± 0,03	
T1B		100	2,33 ± 0,03	3,23 ± 0,03	0,35 ± 0,04	
T2A		100	2,68 ± 0,15	3,38 ± 0,13	0,41 ± 0,04	
T2B		100	2,68 ± 0,15	3,38 ± 0,13	0,41 ± 0,04	
T1A	15	64,67	3,02 ± 0,07	3,93 ± 0,36	1,38 ± 0,57	
T1B		33,33	2,62 ± 0,34	3,48 ± 0,24	1,26 ± 0,48	
T2A		87,83	2,83 ± 0,08	3,58 ± 0,13	2,33 ± 0,32	
T2B		73,17	3,14 ± 0,10	4,73 ± 0,23	2,20 ± 0,10	
T1A	30	10,17	3,16 ± 0,16	4,65 ± 0,31	2,44 ± 0,08	
T1B		0,66	3,43 ± 0,29	4,90 ± 0,44	1,80 ± 0,15	Final
T2A		51,17	3,28 ± 0,23	4,49 ± 0,34	2,62 ± 0,27	
T2B		42,50	3,62 ± 0,04	4,88 ± 0,00	2,36 ± 0,56	
T1A	40	2,00	4,53 ± 0,45	6,57 ± 0,40	3,31 ± 0,45	Final
T2A		22,50	3,62 ± 0,08	4,68 ± 0,13	3,44 ± 0,40	
T2B		14,16	3,75 ± 0,04	4,94 ± 0,06	3,64 ± 0,47	
T2A	50	10,83	3,73 ± 0,25	5,77 ± 0,25	3,92 ± 0,08	
T2B		4,00	4,37 ± 0,47	6,03 ± 0,45	4,02 ± 0,17	
T2A	58	1,00	4,43 ± 0,10	6,23 ± 0,08	4,98 ± 0,77	Final
T2B		0,83	4,34 ± 0,17	6,23 ± 0,25	5,05 ± 0,28	Final



Fig. 34: Paralarva de 58 días



Fig. 35: Detalle de las ventosas de una paralarva de 58 días

Observando los resultados de esta experiencia (Tabla XXI), la supervivencia de las paralarvas ha mejorado con respecto al cultivo anterior, a día 15 de cultivo se pasa de un 12 % a un 65 % de media, aunque sigue siendo muy baja.

Si comparamos el tipo de enriquecedor utilizado vemos que la supervivencia es mayor en el tanque con paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con *Rhodomonas sp.*, aunque la talla y peso seco son muy similares.

Como ocurrió en la experiencia anterior, con 50 días de cultivo las paralarvas comienzan a cambiar su comportamiento, la longitud de sus brazos ya representaba el 31,36 % de la longitud total (LT) (Figura 34) frente al 22,62 % tras la eclosión, además de presentar un gran número de ventosas (Figura 35).

En cuanto al peso seco de las paralarvas, los valores a día 30 son muy similares a los obtenidos por otros autores, pero tras este periodo la tasa de crecimiento disminuye. A día 58 de cultivo es de aproximadamente 5 mg, valor muy inferior al obtenido por Moxica *et al.* en 2002 (9,21 mg) y por Carrasco *et al.* en 2005 (22 mg) donde utilizan una dieta muy similar.

Observando la tasa de crecimiento diario (DGI) (Figura 36) vemos que, al igual que en la experiencia anterior, esta aumenta hasta el día 15 de cultivo en todos los tanques y a partir de este momento comienza a disminuir hasta que finaliza el cultivo.

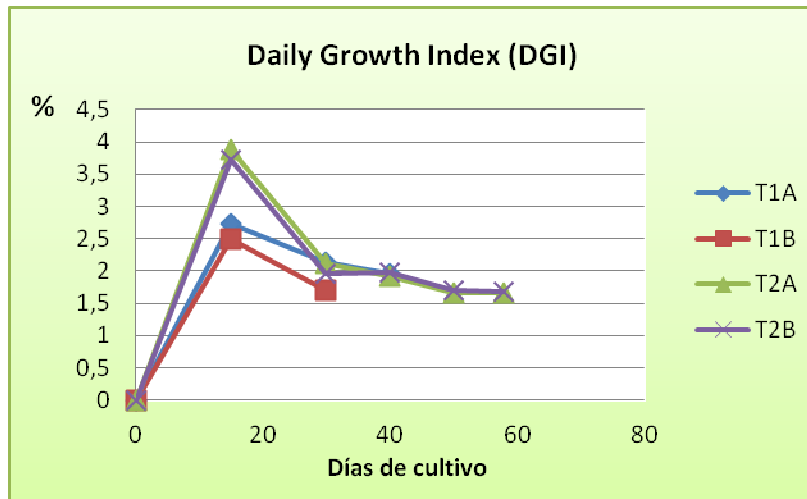


Fig. 36: Daily Growth Index, segunda experiencia

#### TERCERA EXPERIENCIA:

##### Resumen

<b>Densidad</b>	20 paralarvas/L
<b>Fotoperiodo</b>	Natural con malla sombreadora
<b>Temperatura media</b>	19.56 ± 1,15 °C
<b>Circuito</b>	Cerrado, recirculación de agua desde el fondo
<b>Renovación</b>	Parcial diaria y total semanal
<b>Alimento</b>	1 art. enriq.(Selco y Rh)/mL + 0,025 zoeas centollo/mL (3 tomas)

En esta experiencia, como en la anterior, la supervivencia hasta el día 15 de cultivo se mantiene en torno al 60%, momento en que comienza a disminuir y el cultivo finaliza antes de llegar a los 50 días. Teniendo en cuenta que en esta experiencia todas las variables son iguales a la anterior, esta diferencia podría explicarse por la variación en la temperatura y los cambios en el fotoperiodo, al haberse realizado fuera de los meses de verano.

En cuanto a talla y peso seco, los resultados no muestran diferencias significativas con las experiencias previas. Pero sí se observa una tasa de crecimiento (DGI) muy elevada los primeros 30 días de cultivo (Figura 37).

Tanque	Días de cultivo	Supervivencia (%)	Talla (mm)		PS $\pm$ sd (mg)	Obs.
			LM $\pm$ sd	LT $\pm$ sd		
	1	100	2,33 $\pm$ 0,03	3,23 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,04	
TA	15	61,08	2,76 $\pm$ 0,19	3,60 $\pm$ 0,29	0,83 $\pm$ 0,08	
TB		53,50	2,75 $\pm$ 0,17	3,53 $\pm$ 0,35	0,79 $\pm$ 0,10	
TA	30	9,00	3,84 $\pm$ 0,32	5,41 $\pm$ 0,40	2,60 $\pm$ 0,33	
TB		7,58	3,55 $\pm$ 0,40	4,82 $\pm$ 0,41	2,28 $\pm$ 0,23	
TA	40	2,00	3,96 $\pm$ 0,05	5,53 $\pm$ 0,13	2,95 $\pm$ 0,18	
TB		2,42	4,03 $\pm$ 0,16	5,27 $\pm$ 0,16	3,15 $\pm$ 0,20	
TA	46	1,00	4,26 $\pm$ 0,20	5,66 $\pm$ 0,20	3,17 $\pm$ 0,08	Final
TB		1,50	4,34 $\pm$ 0,31	5,93 $\pm$ 0,25	3,37 $\pm$ 0,28	Final

Tabla XXIII: Resultados obtenidos en la tercera experiencia

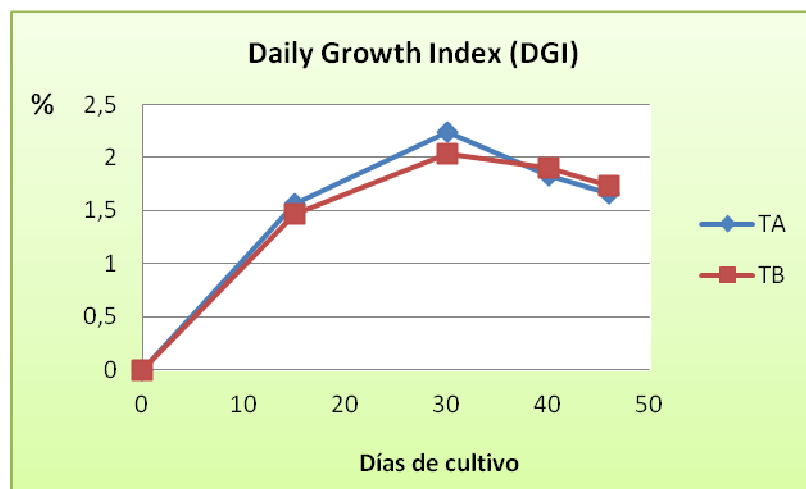


Fig. 37: Daily Growth Index, tercera experiencia

## Segundo grupo de experiencias:

### ***Material y Métodos:***

Se diseñaron un grupo de experiencias para realizar de forma paralela a las detalladas en el epígrafe anterior.

Se utilizó un nuevo sistema de cultivo que consistió en un tanque rectangular blanco de 1000 L de fibra de poliéster. En él se colocó una barra central en la que se sujetaban 3 tamices y sus réplicas, con una malla de 300  $\mu\text{m}$  en el fondo, delimitando así un volumen de 17,5 L. El circuito era abierto y la temperatura de aproximadamente 20 °C. El fotoperiodo fue natural pero se rebajó la intensidad de luz con una malla sombreadora. Las diferencias consistieron en el alimento y en la densidad de cultivo, que variaron en función de la experiencia.

El mantenimiento consistió en:

- Retirada diaria de restos y paralarvas muertas mediante sifonado, renovación del 20 % del agua de cultivo y aporte de alimento.
- Control de supervivencia, LM, LT y peso seco (de 5 paralarvas, por triplicado, de cada tanque, durante 24 h a 100 °C) los días 1 y 15 y 30.
- Renovación total y limpieza del tanque cada 15 días.



## EXPERIENCIA KRILL:

La experiencia consistió en determinar el efecto del aporte de Krill deshidratado de la marca SERA (Figura 38), picado hasta un tamaño de partícula de 500  $\mu\text{m}$ , como complemento de la dieta habitual. La densidad del cultivo fue de 10 paralarvas/L y una duración de 15 días.

- ✓ T1A y T1B: Artemia viva enriquecida con Selco (1 art/mL) + zoeas de centollo congeladas (0.01 zoeas/mL)
- ✓ T2A y T2B: Artemia viva enriquecida con Selco (1 art/mL) + krill picado (1 g)
- ✓ T3A y T3B: Artemia viva enriquecida con Selco (1 art/mL)



Fig. 38: Krill SERA picado y entero

## EXPERIENCIA DENSIDAD:

Se trabajó con 2 densidades de cultivo (10 y 20 paralarvas/L). El alimento consistió en Artemia viva enriquecida con Selco y Rh a 0,5 art/mL.

Para todas las experiencias se calculó la tasa de crecimiento diario como Daily growth index (DGI).

$$DGI = \left[ \left( PS_f^{1/3} - PS_i^{1/3} \right) / (T_f - T_i) \right] \times 100$$

## Resultados y Discusión:

KRILL:

<b>Resumen</b>	
<b>Densidad</b>	10 paralarvas/L
<b>Fotoperiodo</b>	Natural con malla sombreadora
<b>Temperatura media</b>	19,12 ± 0,87 °C
<b>Circuito</b>	Abierto, recirculación de agua desde el fondo
<b>Renovación</b>	Parcial diaria
<b>Alimentos</b>	
✓ <b>T1A y T1B</b>	1 art. viva enriq./mL + 0,01 zoeas centollo/mL
✓ <b>T2A y T2B</b>	1 art. viva enriq./mL + krill picado (1 g)
✓ <b>T3A y T3B</b>	1 art. viva enriq./mL

Tabla XXIV: Resultados obtenidos con el aporte de krill como complemento

Tanque	Días de cultivo	Supervivencia (%)	Talla (mm)		PS±sd (mg)	Obs.
			LM±sd	LT±sd		
	1	100	2,45 ± 0,07	3,26 ± 0,04	0,38 ± 0,03	
<b>T1A</b>	15	16,00	3,14 ± 0,33	4,23 ± 0,35	2,10 ± 0,10	Final
<b>T1B</b>		9,71	3,17 ± 0,34	4,51 ± 0,20	1,93 ± 0,72	Final
<b>T2A</b>		42,29	3,17 ± 0,20	4,26 ± 0,24	1,73 ± 0,05	Final
<b>T2B</b>		22,86	2,92 ± 0,14	3,66 ± 0,12	1,70 ± 0,12	Final
<b>T3A</b>		44,00	3,03 ± 0,06	4,46 ± 0,07	1,94 ± 0,18	Final
<b>T3B</b>		45,14	2,95 ± 0,09	4,15 ± 0,29	1,97 ± 0,05	Final

En general la tasa de crecimiento es buena aunque no podemos decir que el aporte de krill haya repercutido en el crecimiento y supervivencia, aunque su aceptabilidad fue buena.

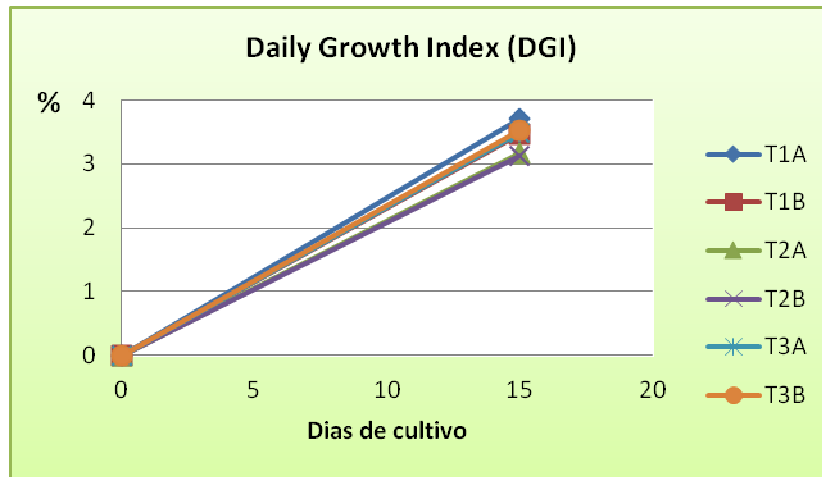


Fig. 39: Daily Growth Index, experiencia krill

DENSIDAD:

<b>Resumen</b>	
<b>Densidad</b>	
✓ T1A y T1B	10 paralarvas/L
✓ T2A y T2B	20 paralarvas/L
<b>Fotoperiodo</b>	Natural con malla sombreadora
<b>Temperatura media</b>	20,77 ± 0,63°C
<b>Circuito</b>	Abierto, recirculación de agua desde el fondo
<b>Renovación</b>	Parcial diaria
<b>Alimento</b>	0,5 art. viva enriq. Selco/mL + 0,5 art. viva enriq. Rh/mL

Tabla XXV: Resultados obtenidos variando la densidad

Tanque	Días de cultivo	Supervivencia (%)	Talla (mm)		PS±sd (mg)	Obs.
			LM±sd	LT±sd		
	1	100	2,43 ± 0,09	3,28 ± 0,14	0,40 ± 0,02	
<b>T1A</b>	15	58,86	2,17 ± 0,29	2,97 ± 0,38	1,63 ± 0,26	
<b>T1B</b>		74,14	2,18 ± 0,32	3,17 ± 0,72	1,61 ± 0,23	
<b>T2A</b>		47,43	2,62 ± 0,13	3,45 ± 0,40	1,35 ± 0,13	
<b>T2B</b>		32,00	2,50 ± 0,50	3,53 ± 0,50	1,32 ± 0,25	
<b>T1A</b>	30	19,42	2,92 ± 0,29	4,25 ± 0,66	2,75 ± 0,06	Final
<b>T1B</b>		14,28	3,18 ± 0,29	4,58 ± 0,29	2,97 ± 0,37	Final
<b>T2A</b>		36,00	2,95 ± 0,15	4,30 ± 0,20	2,61 ± 0,32	Final
<b>T2B</b>		22,29	2,75 ± 0,22	3,87 ± 0,34	2,21 ± 0,31	Final

Al igual que en la experiencia anterior los resultados son muy positivos en cuanto a supervivencia y crecimiento (Tabla XXV). Además la tasa de crecimiento coincide con las experiencias pertenecientes al otro grupo, donde aumentaba hasta el día 15 de cultivo (Figura 40). Con la disminución de la densidad se mejoran ligeramente los datos de supervivencia y crecimiento.

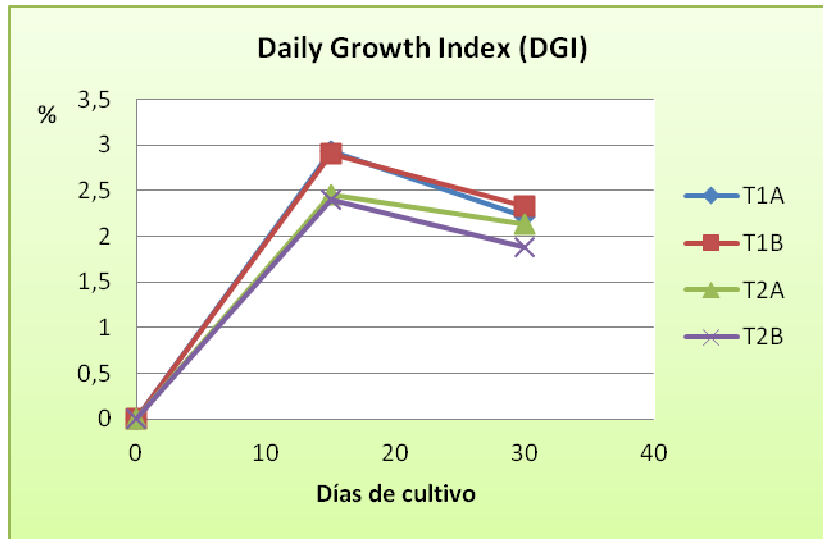


Fig. 40: Daily Growth Index, experiencia densidad

## Línea 2.1 Requerimientos nutritivos del pulpo de roca

- ✓ **OBJETIVOS:** Avanzar en el conocimiento general de los requerimientos de proteína y aminoácidos, de lípidos totales, clases de lípidos y ácidos grasos, y de minerales específicos en el pulpo de roca.

### *Material y Métodos:*

En el mes de junio de 2012 se estabularon en el Centro 18 pulpos (*Octopus vulgaris*) con el fin de llevar a cabo una experiencia de engorde con un pienso desarrollado por el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA).

Los ejemplares, con un peso de 1 Kg aproximadamente, procedían de pesquerías locales (Tapia de Casariego). A su llegada al Centro se estabularon en una piscina de 35 m<sup>3</sup> compartimentada, donde previamente se habían colocado tubos de PVC, a modo de refugios (Figura 41). El circuito era abierto y la renovación de agua fue de 20 m<sup>3</sup>/hora.

Se seleccionaron exclusivamente los machos para evitar competencia y mermas de crecimiento, en el caso de las hembras durante la maduración sexual y puesta.

Se ensayaron, por triplicado, dos tipos de dieta, pienso experimental y dieta natural, 3 lotes de 3 ejemplares por cada tipo de dieta.

Tabla XXVI: Distribución de subadultos de pulpo en lotes según su peso

	Dieta natural	Dieta pienso
	Peso (g)	Peso (g)
<b>Lote 1</b>	1.110	990
	1.055	920
	920	870
<b>Lote 2</b>	915	915
	815	895
	730	865
<b>Lote 3</b>	1.400	1.080
	955	950
	930	935

La dieta natural consistió en alternar Lirio (*Micromesistius poutassou*), Sardina (*Sardina pilchardus*), cangrejos vivos (*Carcinus maenas*) y mejillones vivos (*Mytilus edulis*). Los ingredientes del pienso eran huevina, gelatina, almidón de patata y aminoácidos.

La pauta de alimentación seguida durante la experiencia se describe en la tabla XXVII y consistió en suministrar el alimento 5 días a la semana, dejándolos dos días en ayuno para evitar el rechazo de la monodieta de pienso.

Tabla XXVII: Pauta de alimentación seguida durante la experiencia de engorde

	Dieta natural	Dieta pienso
<b>Lunes</b>	Lirio	Pienso
<b>Martes</b>	Cangrejo	Pienso
<b>Miércoles</b>	X	X
<b>Jueves</b>	Sardina	Pienso
<b>Viernes</b>	Cangrejo	Pienso
<b>Sábado</b>	X	X
<b>Domingo</b>	Mejillones	Pienso

Diariamente, previo a la alimentación, se retiraron los restos de alimento del día anterior y se determinó la cantidad de alimento no ingerido. Para los restos de pienso no ingerido, se calculó un factor de conversión para eliminar el error por absorción de agua. El factor de conversión quedó definido como:

$$Y = 1,3677X + 4,1604 \rightarrow X = Y - 4,1604/1,3677 \quad R^2 = 0,9961$$

Para la determinación de la tasa de crecimiento específico (G), el incremento medio diario en peso ( $\Delta P$ ), el índice de conversión (IC) y la eficiencia (E) se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$G (\%) = [(\ln \text{ peso medio final} - \ln \text{ peso medio inicial}) / \text{ días de cultivo}] \times 100$$

$$\Delta P (\text{g/día}) = (\text{Peso medio final} - \text{Peso medio inicial}) / \text{ días de cultivo}$$

$$IC = [\text{Peso alimento ingerido} / (\text{Peso final} - \text{Peso inicial})]$$

$$E (\%) = (\text{Peso ganado} / \text{alimento suministrado}) \times 100$$

## Resultados y Discusión:

La experiencia llevada a cabo tuvo una duración de 2 meses, durante los meses de julio y agosto, los resultados obtenidos se detallan en las tablas XXVIII y XXIX.

Tabla XXVIII: Resultados obtenidos durante el primer mes de engorde

	Dieta natural			Dieta pienso		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Fecha inicio	29/06/12	29/06/12	29/06/12	29/06/12	29/06/12	29/06/12
Fecha final	30/07/12	30/07/12	30/07/12	30/07/12	30/07/12	30/07/12
Días de cultivo	31	31	31	31	31	31
Tª media (°C) ± sd	19,21±0,46	19,21±0,46	19,21±0,46	19,21±0,46	19,21±0,46	19,21±0,46
S ‰ media ± sd	33,76±0,64	33,76±0,64	33,76±0,64	33,76±0,64	33,76±0,64	33,76±0,64
Nº ejem inicio	3	3	3	3	3	3
Nº ejem final	2	3	3	3	3	3
Biom.tot.inicio (Kg)	3,085	2,460	3,285	2,780	2,675	2,965
Dens.inicio(ejem/m <sup>3</sup> )	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51
Carga inicio (Kg/ m <sup>3</sup> )	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Rango de pesos (Kg)	0,920 -1,110	0,730-0,915	0,930-1,400	0,870-0,990	0,865-0,915	0,935-1,080
Pm inicio (Kg)	1,028	0,820	1,095	0,927	0,892	0,988
Desviación típica	0,098	0,093	0,264	0,060	0,025	0,080
G (%)	1,309	0,822	1,329	0,357	-0,623	0,277
G media (%) ± sd	1,153 ± 0,287			0,004 ± 0,544		
ΔP (g/día)	16,613	7,677	1,800	3,484	-5,065	2,871
ΔP media (g/día) ± sd	14,097 ± 5,602			0,430 ± 4,768		
IC	13,294	29,626	15,290	7,468	-0,760	6,620
IC media ± sd	19,403 ± 8,909			4,443 ± 4,525		
E (%)	6,983	2,900	6,540	2,969	-4,396	2,441
E media (%) ± sd	5,474 ± 2,241			0,338 ± 4,108		
Mortalidad (%)	33,33	0	0	0	0	0

Tabla XXIX: Resultados obtenidos durante el segundo mes de engorde

	Dieta natural			Dieta pienso		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Fecha inicio	30/07/12	30/07/12	30/07/12	30/07/12	30/07/12	30/07/12
Fecha final	24/08/12	24/08/12	24/08/12	24/08/12	24/08/12	24/08/12
Días de cultivo	25	25	25	25	25	25
Tª media (°C) ± sd	20,50±0,73	20,50±0,73	20,50±0,73	20,50±0,73	20,50±0,73	20,50±0,73
S ‰ media ± sd	34,24±0,28	34,24±0,28	34,24±0,28	34,24±0,28	34,24±0,28	34,24±0,28
Nº ejem. inicio	2	3	3	3	3	3
Nº ejem. final	1	1	3	3	0	2
Biom.tot.inicio (Kg)	3,085	3,175	4,960	3,105	2,205	3,230
Dens.inicio(ejem/m <sup>3</sup> )	0,340	0,510	0,510	0,510	0,510	0,510
Carga inicio (Kg/ m <sup>3</sup> )	0,530	0,540	0,850	0,530	0,380	0,550
Rango de pesos (Kg)	1,490-1,595	0,815-1,325	1,460-1,870	0,980-1,095	0,660-0,810	0,895-1,210
Pm inicio (Kg)	1,543	1,058	1,653	1,035	0,735	1,077
Desviación típica	0,074	0,256	0,206	0,058	0,075	0,163
G (%)	0,948	2,645	0,807	0,490		0,890
G media (%) ± sd	1,467 ± 1,023			0,690 ± 0,283		
ΔP (g/día)	16,480	39,680	14,800	5,400		10,720
ΔP media (g/día) ±sd	23,653 ± 13,905			5,373 ± 5,360		
IC	7,124	3,465	14,959	4,926		2,027
IC media ± sd	8,516 ± 5,872			3,477 ± 2,050		
E (%)	14,037	28,862	6,685	6,934		15,36
E media (%) ± sd	16,528 ± 11,297			11,147 ± 5,958		
Mortalidad (%)	50,00	66,66	0	0	100,00	33,33

### Alimentación:

Durante la experiencia se observó que los pulpos alimentados con dieta natural ingerían el alimento sin problemas, mientras que con el pienso se mostraban reticentes a aceptar el alimento, teniendo que suministrárselo uno a uno para facilitar el contacto y asegurarnos de que comenzaban a comérselo (Figura 41 y 42). En algunos casos era rechazado después de morderlo.





Fig. 40: Piscina de estabulación



Fig. 41: Aporte de pienso



Fig. 42: Pulpo comiendo pienso



Fig. 43: Pienso con marcas de haber sido comido.

Con la dieta natural se observó que el alimento más aceptado fue el cangrejo vivo, que los ingerían de inmediato succionando la carne y dejando intacto el exoesqueleto. El pescado congelado fue rechazado en algunas ocasiones. La composición detallada de la dieta natural está representada en la figura 44.

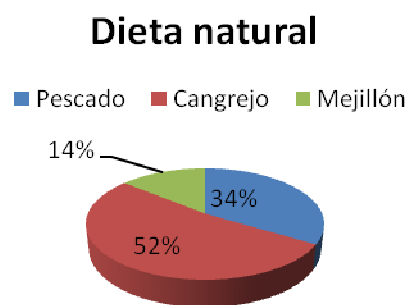


Fig. 44: Composición detallada de la dieta natural

En la figura 45 se muestra el Índice de conversión del alimento para cada tipo de dieta y en función de los días. Este índice, en ambos casos, disminuyó el segundo mes.

Esto podría ser debido a que la cantidad del alimento ingerido también disminuyó. La diferencia entre los índices de conversión de cada dieta estaría relacionada con la calidad y aceptabilidad de la misma, ya que el pienso era rechazado por algunos de los ejemplares.

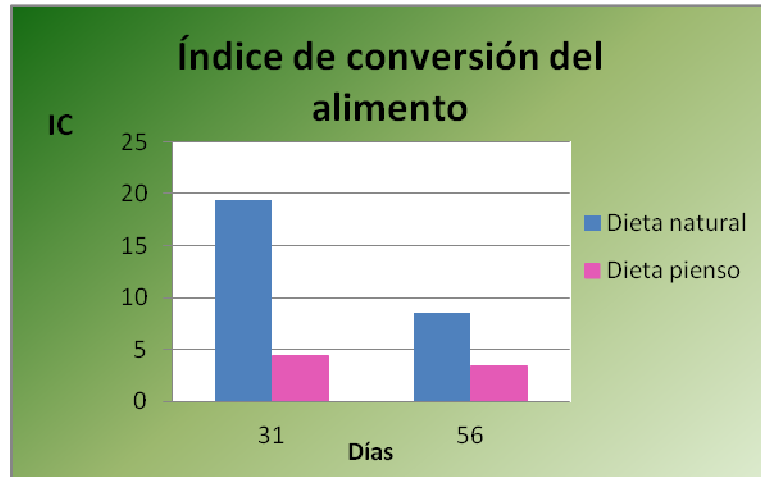


Fig. 45: Índice de conversión del alimento (IC)

La eficiencia de conversión del alimento aumentó progresivamente (Figura 46), esto fue debido a que, aunque disminuyó la cantidad de alimento ingerida, los ejemplares siguieron ganando peso. La eficiencia fue mayor para el caso de la dieta natural, aproximándose al 18%.

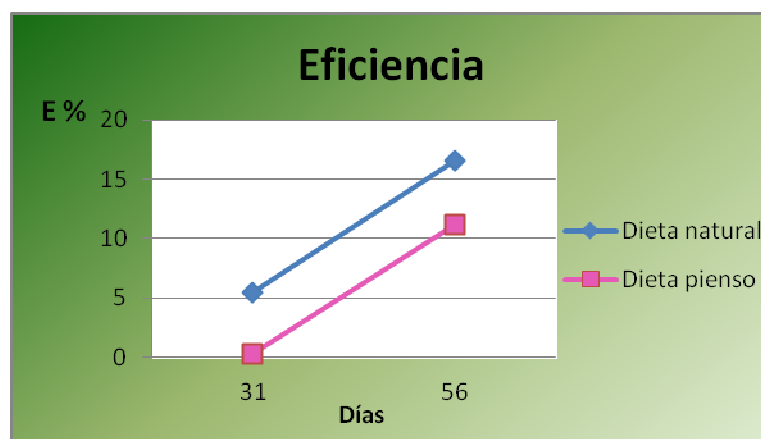


Fig.46: Eficiencia del alimento (E)

## Crecimiento:

En la figura 47 se representa la evolución del crecimiento en peso fresco de los ejemplares. En el caso de la dieta natural, el primer mes, de un peso fresco medio de 0,981 Kg se alcanza un peso medio final de 1,418 Kg. Esto supone un incremento medio en peso ( $\Delta P$ ) de 14,097 g/día (Figura 48) y una tasa de crecimiento específico (G) (Figura 49) de 1,153 %. Durante el segundo mes, los ejemplares llegan a alcanzar los 2 Kg, por lo que el incremento medio en peso ( $\Delta P$ ) aumentó a 23,653 g/día (Figura 48) y la tasa de crecimiento específico (G) (Figura 49) a 1,467 %.

En el caso de la dieta pienso, todos los valores son inferiores a los obtenidos con la dieta natural durante la experiencia. Si observamos la ecuación del crecimiento en peso, vemos que la función no se aproxima a un tipo de crecimiento exponencial como ocurre con la dieta natural.

Los valores de crecimiento obtenidos con la dieta natural son inferiores a los obtenidos en otras experiencias realizadas en el Centro. En el año 1999 se llevó a cabo una experiencia de engorde en la misma piscina y con variables similares, en la que se ensayó una dieta mixta natural, y el incremento medio de peso obtenido fue de 27,8 g/día, frente a los 18,875 g/día obtenidos de media en esta experiencia. Posteriormente, en 2003 otra experiencia de engorde en jaula se obtuvieron unos resultados de incremento medio de peso diario de 33,18 g/día, con el mismo tipo de dieta y una carga superior. Si comparamos el crecimiento específico (G) vemos que se aproxima al valor obtenido en una experiencia con monodieta de lirio realizada en el 2009, en donde se obtiene un valor de 1,41%

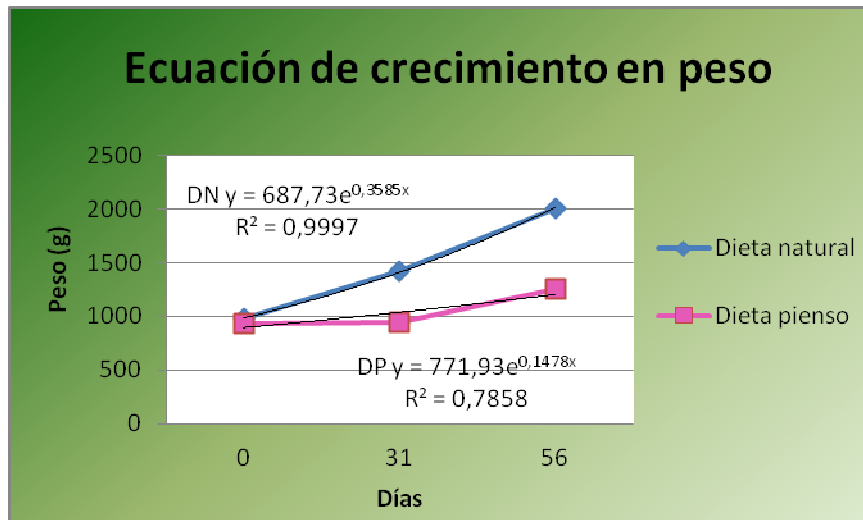


Fig. 47: Ecuación de crecimiento en peso fresco



Fig. 48: Variación en peso ( $\Delta P$ )

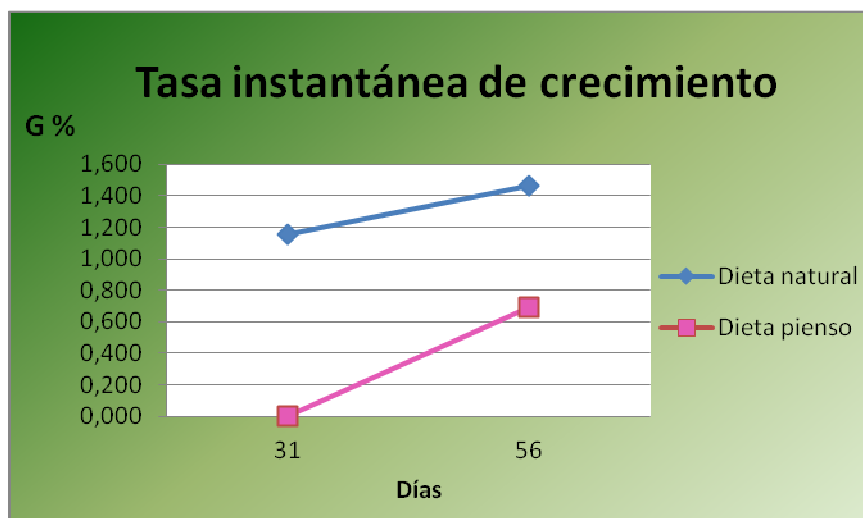


Fig. 49: Tasa instantánea de crecimiento (G)

## Mortalidad:

En la figura 50 se aprecia el incremento de la mortalidad en los dos meses que duró la experiencia. Se produjeron un total de 8 bajas, concentradas en su mayoría en el segundo mes. Cabe destacar que la mortalidad acumulada final fue la misma para ambas dietas (44,44 %). La mayor parte de estas bajas fueron causadas por canibalismo. Se observó también que algunos ejemplares presentaban pequeños desgarros de la epidermis a nivel de la cabeza. Estas heridas podrían haberse producido por peleas o por golpes contra las paredes debidos al estrés.

La alta mortalidad registrada, a pesar de la baja densidad de estabulación, estaría asociada a la pauta de alimentación de 2 días de ayuno a la semana y a las deficiencias nutricionales del pienso, lo que se tradujo en una baja tasa de crecimiento y en ataques de canibalismo, en ambos casos.

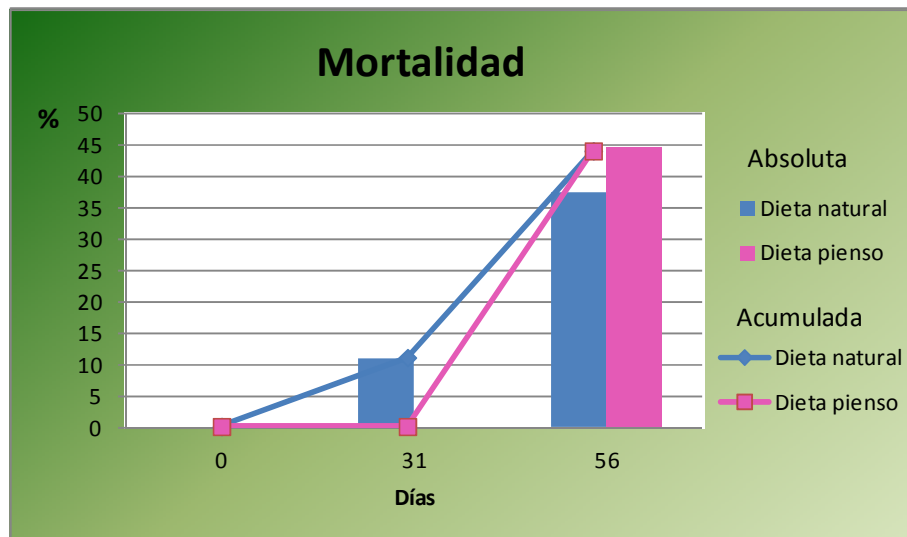


Fig. 50: Mortalidad

## Conclusiones

- La relación entre temperatura y duración del desarrollo embrionario nos permite escalonar las eclosiones y así asegurarnos un aprovisionamiento constante de paralarvas.
- Las hembras con puesta son capaces de adoptar otra y llevar a cabo la eclosión de los huevos de ambas puestas.
- El empleo de Artemia enriquecida con productos comerciales y las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Rhodomonas sp.* y zoeas de centollo congeladas, mejoran la supervivencia y crecimiento de las paralarvas aunque no satisface los requerimientos nutricionales mínimos para superar la fase planctónica.
- El diseño de sistemas de cultivo de fácil mantenimiento y que favorezcan la suspensión del alimento inerte en el tanque, reduciría el estrés de las paralarvas y simplificaría los cultivos auxiliares y por tanto los cultivos de paralarvas.
- Los piensos testados ofrecieron una mejora en cuanto a su aceptabilidad por parte del pulpo, sin embargo no aportan los requerimientos nutritivos suficientes para llevar a cabo un óptimo proceso de engorde.

## Bibliografía

- ✓ Carrasco, F. J. y Rodríguez, C., 2000-2003. Cultivo de pulpo (*Octopus vulgaris*). Informe-Memoria JACUMAR-2000-2003 (Informe interno).
- ✓ Carrasco, F. J., Rodríguez, C. y Rodríguez, M., 2005. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier) utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de crustáceos. En: *Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura* (2005. Sevilla, España). pp. 219–222.
- ✓ Carrasco, F. J., Arronte, J.C. y Rodríguez, C., 2005. Paralarval rearing of the common octopus, *Octopus vulgaris* (Cuvier). *Aquaculture Research*. 37, pp. 1601 – 1605.
- ✓ Carrasco, F. J. y Rodríguez, C., 2007-2009. Optimización del engorde del pulpo (*Octopus vulgaris*). Informe-Memoria JACUMAR-2007-2009 (Informe interno).
- ✓ Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F. y García García, B., 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*. 275, pp. 266 – 273.
- ✓ Hamazaki, H., Fukunaga, K., Yoshida, Y. y Maruyama, K., 1991. Effects of marine microalgae *Nannochloropsis* sp. on survival and growth on rearing pelagic paralarvae of *Octopus vulgaris*, and results of mass culture in the tank of 20 metric tons. *Saibai-giken* 19, pp. 75–84.
- ✓ Helm, M. M., Bourne, N. y Lovatelli, A., 2006. *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. FAO, Documento Técnico de Pesca Nº 471, Italia.
- ✓ Iglesias, J., Sánchez, F. J. y Otero, J. J., 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier) en el Instituto Español de Oceanografía. En: *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura* (1997. Cartagena, Murcia, España). pp. 221-226.

- ✓ Iglesias, J., Otero, J.J., Moxica, C., Fuentes, L. y Sánchez, F.J., 2002. Paralarvae culture of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier) using *Artemia* and crab zoeae and first data on juvenile growth up to eight months of age. *Aquaculture Europe* 2002. European Aquaculture Society. Special Publication. 32, pp. 268–269.
- ✓ Imamura, S., 1990. Larval rearing of Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier). The progress of technological development and some problems remained. *Collect. Breed.* 52, pp. 339–343.
- ✓ Itami, K., Izawa, Y., Maeda, S. y Nakai, K., 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 29 (6), pp. 514-519.
- ✓ Moxica, C., Linares, F., Otero, J. J., Iglesias, J. y Sánchez, F. J., 2002. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797,) en tanques de 9 m<sup>3</sup>. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4), pp. 31-36.
- ✓ Moxica, C., Fuentes, L., Hernández, J., Iglesias, J., Lago, M.J., Otero, J.J. and Sánchez, F.J., 2006. Efecto de *Nannochloropsis* sp. en la supervivencia y crecimiento de paralarvas de pulpo *Octopus vulgaris*. *IX Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. 10 y 11 de Octubre de 2006, O Grove, España. pp. 255–269.
- ✓ Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R., 1992. Fatty acid composition of coastal and inland *Artemia* sp. populations from Spain. *Aquaculture*. 102, pp. 219 – 230.
- ✓ Navarro, J. C. y Villanueva, R., 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*. 183, pp. 161 – 177.
- ✓ Quintana, D., Domingues, P. y García, S., 2008. Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*. 280, pp. 161 – 164.



- ✓ Rodríguez, C y Carrasco, J.F., 1999. Engorde del pulpo (*Octopus vulgaris*). Resultados de crecimiento, supervivencia y reproducción. En: *Actas del VII Congreso Nacional de Acuicultura* (1999. Las Palmas de Gran Canaria, España).pp. 19-21.
- ✓ Rodríguez, C., Carrasco, J.F., Arronte, J.C. y Rodríguez, M. 2006. Common Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile ongrowing in floating cages. *Aquaculture*. 254, pp. 293 – 300.
- ✓ Seixas, P., 2009. Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*), alimentadas con juveniles de Artemia enriquecida con microalgas y otros suplementos nutricionales. PhD thesis, Universidad de Santiago de Compostela, 288 pp.
- ✓ Villanueva, R., 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, pp. 2639-2650.
- ✓ Villanueva, R., Koueta, N., Riba, J., Boucaud-Camou, E., 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. . *Aquaculture*. 205, pp. 269 – 286.

# INFORME FINAL COMUNIDAD AUTÓNOMA ISLAS BALEARES



**Govern  
de les Illes Balears**

*LABORATORI D'INVESTIGACIONS  
MARINES I AQÜICULTURA*

CONSELLERIA D'AGRICULTURA, MEDI AMBIENT I TERRITORI

## **Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).**

### **Subproyecto paralarvas**

#### **Línea 1.1 Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables.**

**Objetivo: Obtención de un número suficiente de paralarvas para llevar a cabo los distintos ensayos cultivo que se plantean en las Líneas 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5.**

**Actividades:**

**Tarea 1.1.1.**

#### **2010**

Para la captura de pulpo sea procedido al uso de nasas, con personal del laboratorio. Esta actividad se ha iniciado en septiembre, calándose de lunes a viernes. Se ha conseguido la captura de ejemplares de pesos comprendidos entre 650 y 1200 gr, con un predominio de machos.

Debido a que el rendimiento de las nasas no ha sido bueno, se procedió posteriormente al embarque en un arrastrero. Se ha obtenido así un stock de reproductores, con un peso aproximado de 350.

El stock de reproductores se mantiene en un tanque rectangular de 10 tn, lleno hasta la mitad de su altura, cubierto con tela sombreadora. En el interior se han dispuesto refugios de 90 mm de diámetro fabricados con tubo de PVC y unidos mediante una varilla de acero inoxidable para evitar que floten. Se alimentan con una dieta compuesta de mejillón, pescado (sardina, alacha y jurel) y gamba o cangrejo.

Los reproductores de mayor tamaño se mantienen en tanques circulares de una tonelada, con refugios de PVC de 250 mm de diámetro, cubiertos con tela sombreadora y alimentados con la misma dieta.

#### **2011**

Durante el año 2011 se ha procedido por una parte al mantenimiento del stock de reproductores obtenido el año 2010 y a la captura de nuevos ejemplares con vistas disponer de un stock de reproductores para las experiencias de cultivo del año 2012.

El stock del año 2010 se obtuvo mediante captura por una embarcación de arrastre en las cercanías a la isla Dragonera. Una vez sacados del copo, se introdujeron en un balde y se transportaron al Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuicultura, donde se estabularon en un tanque de 10 m<sup>3</sup> al 50% de su capacidad, con una renovación de 40 l/m y sin aireación, cubierto por una tela sombreadora durante los primeros días. Posteriormente, se colocó una tapa de plástico rígido traslúcido y la misma

tela sombreadora. En el interior del tanque se dispusieron refugios elaborados con tubos de PVC rígido, de 20 cm de diámetro, que se sustituyeron por otros, de 50 cm de diámetro para adaptarlos al tamaño de los pulpos. A la semana, se muestrearon y se marcaron con una marca tipo T-anchora para identificarlos. La marca la perdieron a los pocos días. El peso medio fue de unos 350 gr.

De los 21 ejemplares obtenidos, 3 murieron durante los primeros días por las heridas y el stress sufrido durante la captura y transporte. Durante el periodo de estabulación el número de pulpos se redujo a 10, por peleas y escapes.

También se obtuvieron pulpos mediante nasas y pulperas dispuestas en el muelle del laboratorio. Se obtuvieron 6 machos, que se devolvieron al mar y una hembra de 1,540 kg que se estabuló en un tanque de 1 m<sup>3</sup>, que se cubrió de manera similar al tanque de 10 m<sup>3</sup>.

La alimentación consistió en boga, jurel, alacha, caramelo, mejillón, gamba y cangrejo, aproximadamente un 5% del peso de los ejemplares.

Las tareas diarias realizadas fueron:

- Control de la temperatura de los tanques,
- Limpieza de restos y sifonado,
- Control de bajas,
- Revisión de refugios.

El 10 de junio se muestrearon y se devolvieron los machos al mar. Una de las hembras falleció como consecuencia del traslado a un tanque de 1 m<sup>3</sup> (por escape).

A partir del 10 de junio de 2011, se añadieron a las tareas diarias:

Control de puestas y aislamiento de hembras con puesta en tanques de 120 l tapados y con renovación de agua de 20 l/min,.

Recogida de las puestas diariamente. Las paralarvas se sacaron del tanque de incubación manualmente, con jarras de 2 l. para evitarles daños.

#### Resultados:

De las 4 hembras, sólo se obtuvieron 2 puestas viables. De la tercera, la puesta no llegó a eclosionar y la cuarta no llegó a realizar la puesta y falleció a principios de agosto.

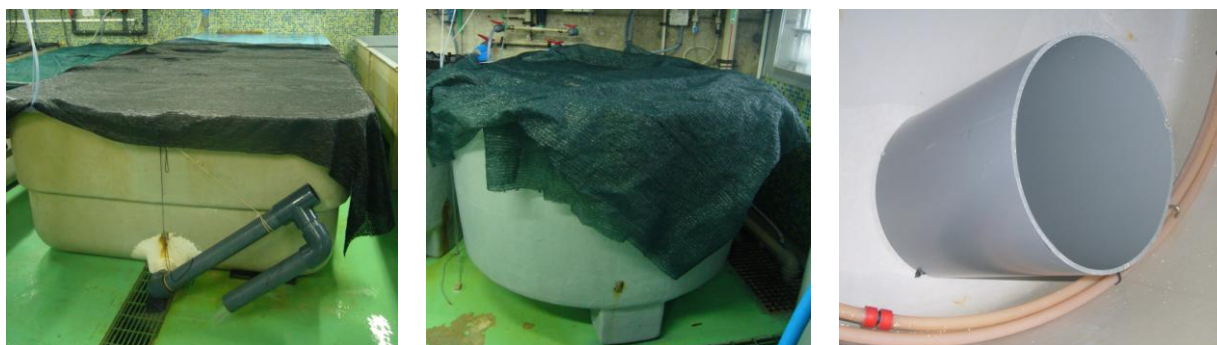


Figura 1. Tanque de 10 m<sup>3</sup>, de 1m<sup>3</sup> y detalle de un refugio.

Los resultados se resumen en la tabla I.

Hembra	H1	H2	H3	H4
<b>Aislamiento</b>	10/6/2011	17/6/2011	21/6/2011	11/7/2011
<b>Peso (gr.)</b>	3.800	1.300	2.700	1.700
<b>Inicio eclosión</b>	4/7/2011	11/7/2011	No eclosionan	No pone
<b>Duración eclosión (días)</b>	12	9	----	----
<b>T<sup>a</sup> media</b>	23,51	23,78	23,89	24.07
<b>Nº paralarvas</b>	303.500	143.290	----	----
<b>Peso seco paralarvas (mg)</b>	0,355	0,352	---	---
<b>LM (mm) paralarvas</b>	2,201	1,965	---	---
<b>δ</b>	0,09608	0,10764	---	----

Tabla I. Datos de las hembras y puestas.

Obtención del stock de reproductores para el cultivo de 2012.

Desde el final de las experiencias de cultivo del año 2011 se ha procedido a la captura de pulpos del medio. Para ello se han realizado inmersiones en apnea para capturar pulpos a mano y se han calado nasas en el muelle del laboratorio.

### **2012**

Entre octubre del 2011 y marzo del 2012 se capturaron y estabularon un total de 10 ejemplares, de los cuales 9 eran hembras y 1 macho. Algunas hembras ya venían fecundadas del mar ya que se capturaron durante su época de reproducción.

Una vez en el laboratorio se pesaban y determinaba el sexo de éstos. Mientras son pequeños se separan en tanques distintos según el tamaño y el sexo ya que en ocasiones se han observado peleas y canibalismo. Posteriormente se introducen en un tanque rectangular de 10 toneladas, en circuito abierto (40 L min<sup>-1</sup>), lleno hasta la mitad de su altura, cubierto con tela sombreadora y a temperatura ambiente. En su interior se disponen refugios de ladrillo o de tubos de PVC de 25cm de diámetro, en donde los pulpos pueden fijar sus puestas. Se alimentaron diariamente a base de

mejillón, pescado, gambas y cangrejos congelados, en una cantidad aproximadamente el 5% del peso del animal.

Las tareas diarias que se llevan a cabo eran:

- Control de los parámetros físico-químicos de los tanques.
- Retirada de los restos de alimento y limpieza del fondo mediante sifonado.
- Aporte de alimento.
- Revisión de refugios, control de puestas y aislamiento de las hembras con puesta en otro tanque.

Seis hembras realizaron puesta y fueron aisladas en tanques diferentes tapados con tela sombreadora y mantenidas en ayuno. En la tabla II se presentan las características de éstas.

Hembra	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Inicio puesta (fecha)	30/04	30/04	11/06	14/06	19/06	04/07
Eclosión (sí/no)	sí	sí	sí	no	sí	no
Inicio eclosión (fecha)	01/06	01/06	10/07	-	18/07	-
Desarrollo embrionario (días)	32	32	30	-	30	-
Duración eclosión (días)	20	20	13	-	11	-
Nº total paralarvas	30850	140808	398520	-	93080	-

Tabla II. Características de las seis puestas de pulpo que se obtuvieron en el año 2012.



Fig. 2. Puesta de pulpo fijada a un tubo de PVC.



Fig. 3. Detalle de dos racimos en los que se observan los huevos

De estas 6 puestas, sólo 4 han llegado a eclosionar (las de las hembras H1, H2, H3 y H5). Las otras dos no, debido al fallecimiento de las madres. La duración de la eclosión fue de entre 11 y 20 días. La cantidad de paralarvas varió bastante de unas eclosiones a otras, con un mínimo de 30.850 y un máximo de 398.520.

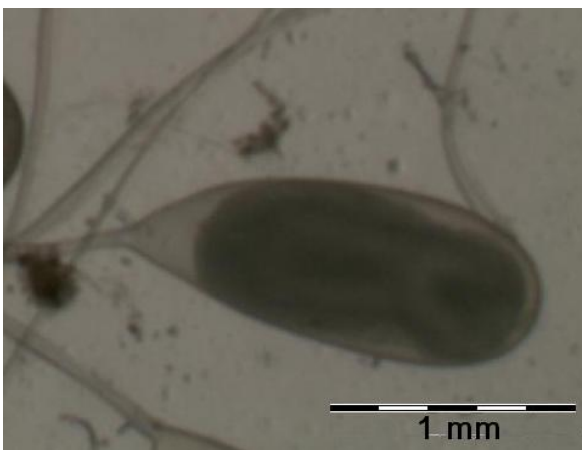
La duración del desarrollo embrionario en todas las puestas es de aproximadamente 30 días debido a las altas temperaturas del agua en la época de la puesta (22-24°C). Durante este tiempo los huevos de pulpo han pasado por varias fases de desarrollo (Figuras 6 a 9).



*Fig. 4. Eclosión masiva de paralarvas. Al fondo se observa la madre*



*Fig. 5. Paralarvas recién eclosionadas*



*Fig. 6: Embrión de un día.*



*Fig.7: 15. Huevo en una etapa intermedia. Estadio X-XII.*



Fig. 8: Huevo en estadio XV-XVI. Se observa el vitelo frente a la boca.

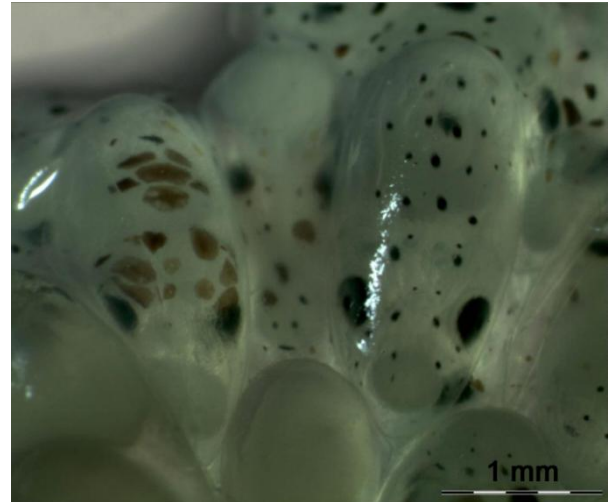


Fig. 9: Huevos en un estadio avanzado: XVIII. El vitelo se ha reducido.

Las puestas de las hembras H1 y H2 no se utilizaron para el cultivo larvario. La puesta de la H1 fue reducida y la de la H2 se solapó con la de la H5. Las eclosiones de las de la hembras H3 y H5 fueron numerosas y las paralarvas se usaron en las distintas pruebas de cultivo larvario. En la tabla III se resumen las características de las puestas.

Hembra	H3	H5
Inicio puesta	11/06/2012	19/06/2012
Inicio eclosión	10/07/2012	18/07/2012
Desarrollo embrionario (días)	30	30
Tª media (°C)	24,8 ± 1,4	24,6 ± 1,4
Salinidad (‰)	37	37
Duración de la eclosión (días)	13	11
Final de la eclosión	22/07/2012	28/07/2012
Muerte hembra	30/07/2012	25/06/2012
		(Adoptiva: 01/08/2012)
Nº total de paralarvas	398.520	93.080
Longitud del manto a día 0 (mm)	1854,61 ± 79,30	1860,51 ± 58,12
Peso húmedo paralarvas a día 0 (mg)	1,7810 ± 0,0945	1,6002 ± 0,2510
Peso seco paralarvas a día 0 (mg)	0,2632 ± 0,0058	0,2052 ± 0,0321

Tabla III. Características de las dos hembras que se usaron para las experiencias, de sus puestas y de las paralarvas resultantes.



Una de las hembras, la H5, que inició su puesta el 19 de junio, murió a los 6 días por causas desconocidas. Los huevos quedaron sin protección y se optó por utilizar a otra hembra (H1) como madre adoptiva cuya puesta ya había acabado de eclosionar. La aceptación de la nueva puesta fue casi instantánea. La hembra se encargó de su cuidado y limpieza desde el 25 de junio hasta el 1 de agosto, día en el que murió.

Una vez que la hembra falleció, el cilindro con las puestas se aisló en un tanque de 250 L, colocando un difusor de aire en el fondo del refugio con poco caudal de aire, para que se oxigenen los racimos de huevos y al mismo tiempo se hace incidir un chorro de agua de mar limpia y filtrada a 100  $\mu\text{m}$ . De esta manera se consiguió que aproximadamente eclosionasen algo más de 4000 paralarvas, quedando bastantes huevos sin eclosionar.

### **Línea 1.2 Sistema de cultivo de paralarvas utilizando un mesocosmos.**

**Objetivo: Aplicación de sistemas de cultivo de mesocosmos para la producción de juveniles de pulpo.**

**Tarea 1.2.3 Cultivo Larvario de pulpo en sistema mesocosmos con filosofía extensiva e intensiva en Baleares.**

#### **2011**

Se realizó una prueba preliminar del funcionamiento del mesocosmos a principios de mayo, obteniéndose un boom de fitoplancton en unos 15 días. En ese momento, se añadió 10 millones de nauplios y se mantuvo en estas condiciones hasta el día 10 de junio, en que se detectó la primera puesta.

El 20 de junio preparó el tanque exterior, con unos 40 m<sup>3</sup> de agua para el cultivo de paralarvas en un mesocosmos.

La preparación consistió en el vaciado del tanque, seguido de una limpieza con agua a presión y posterior rellenado con agua cruda. Una vez llenado el tanque, se colocaron aireadores en el fondo y se fertilizó el tanque con 200 gr de nitrógeno y 20 gr de fósforo.

A los 15 días, se añadieron 20 millones de nauplios recién eclosionados de artemia. Durante los 5 días siguientes se añadieron 10 millones más diarios. La densidad de artemia fue de 1/ml antes de la siembra de paralarvas.

Se sembraron 86700 paralarvas entre los días 7 y 10 de julio (2,2 paralarvas/l). Se controlaron los siguientes parámetros: Temperatura, pH, O<sub>2</sub>, salinidad, clorofilas y amonio.

La temperatura media fue de 26,07 $\pm$ 0,6614 °C, el pH medio de 8,23 $\pm$ 0,1222, la concentración media de O<sub>2</sub> de 5,98 $\pm$ 0,2700 ppm y la salinidad media de 37,4 $\pm$ 0,2988‰. El amonio se midió con un kit y se mantuvo por debajo de 0,25 mg/l hasta el 4 de agosto, momento en que se abre el circuito y se renovó el 10% diario del volumen (Fig. 10).

Cada día se comprobaba la presencia de larvas. A partir del día 7 no se observan larvas, pero se mantiene el mesocosmos como fuente de artemia para los tanques de cultivo intensivo.

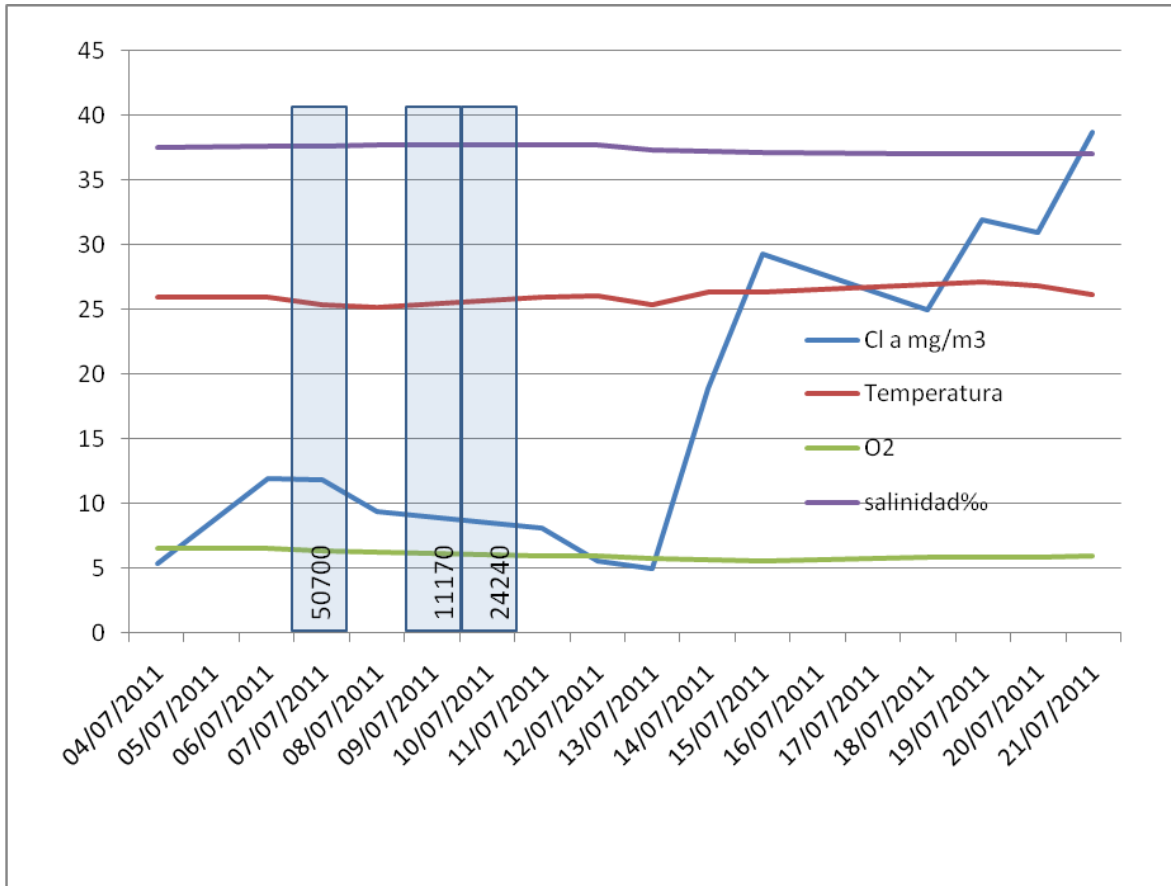
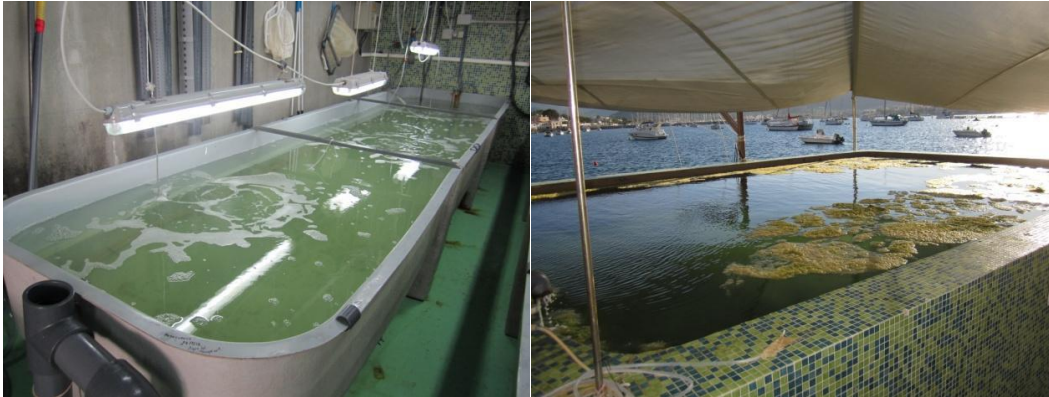


Fig. 10. Parámetros ambientales del mesocosmos. Las barras indican el día de siembra de las paralarvas y el número de paralarvas introducidas.

## 2012

Para la obtención de un afloramiento de zooplancton natural se llenaron dos tanques con agua de mar sin filtrar: uno situado en el exterior del laboratorio, de 60 m<sup>3</sup> y otro en el interior, de 5 m<sup>3</sup> (Figs. 11 y 12). La iluminación del tanque exterior era natural y la del tanque interior mediante fluorescentes a una intensidad de 800 luxes con fotoperiodo de 24 horas de luz. La renovación del agua era de un 10% diaria. Se fertilizó el medio añadiendo abono (Abono Azul Universal NovaTec, Compo) a una concentración de 80 g·m<sup>-3</sup>, para provocar un boom de fitoplancton y zooplancton.

No se realizó ningún seguimiento, excepto varios test de amonio para comprobar los niveles de este ión en el agua. En alguna ocasión se aportó a los tanques Artemia de 5 días enriquecida. Se añadieron paralarvas recién eclosionadas durante varios días dependiendo de las eclosiones obtenidas. En total, en el tanque exterior se sembraron 289.672 paralarvas y en el tanque interior 46.266 especímenes.



Figs. 11 y 12. Tanques interior y exterior donde se realizaron las experiencias de mesocosmos.

En ambos tanques se observó una mortalidad total a los pocos días después de cada siembra. Las causas de esta mortalidad son desconocidas,

**Línea 1.3. Sistema de cultivo de paralarvas utilizando como presas artemia enriquecida con fitoplancton y enriquecedores..**

**Objetivo: Obtención de juveniles de pulpo empleando como alimento Artemia nutricionalmente enriquecida.**

**Tarea 1.3.1. Engorde de Artemia a tallas adaptadas a la paralarva.**

**2010**

Se han realizado pruebas de producción de artemia (INVE EG) a una densidad de 150 artemias/ml, siguiendo el protocolo del proyecto.

Como alimento de las artemias se ha usado “red pepper” a una concentración de 0,4 g/l o Nannocloropsis (Phytobloom) a 1gr/100l. En ambos casos la supervivencia ha sido similar, entre el 85 y el 90 % hasta el día 7, muriendo toda la artemia entre los días 8 y 9.

**2011**

El engorde de artemia se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Lavar, desinfectar, llenar tanque de eclosión (truncocónico, 100 l) con agua de mar filtrada a 100  $\mu$ , poner resistencia a 28°C y añadir 2,3 ml de lejía (día anterior).
2. Desinfectar cistes (4.6 ml lejía + 4 l agua mar + cistes+ aire +20’).
3. Lavado de cistes (agua salada, 10 minutos).
4. Neutralizar con tiosulfato sódico el agua del eclosionador (8 ml).
5. Añadir al eclosionador el acondicionador Inve (Ace Sanocare, dosis 40 ml/100l)
6. Sembrar cistes: densidad siembra hasta 2 g /l agua (poner 2 aireadores).
7. Día siguiente (24h eclosión)--tapar---poner linterna---esperar 15’--- purgar cistes---cosechar nauplios---esperar 15’---terminar cosechar.

8. Lavar muy bien (10' agua salada+ 5' agua dulce).
9. Contaje, ajustar nº de nauplios y sembrarlos en tanque cilíndrico en 250 l con aireación (2 aireadores).
10. Cada día:
  - a. Medir temperatura, O<sub>2</sub> disuelto, contaje de artemia
  - b. Medir artemia
  - c. Añadir 1 gr de tetraselmis liofilizada y 2 ml de phytobloom (nanocloropsis).

Los resultados del engorde a alta densidad dieron como resultado elevadas mortalidades (ver tabla IV y fig. 13), especialmente cuando la temperatura era más elevada. Se optó también por no renovar los tanques cada día, porque aumentaba la mortalidad.

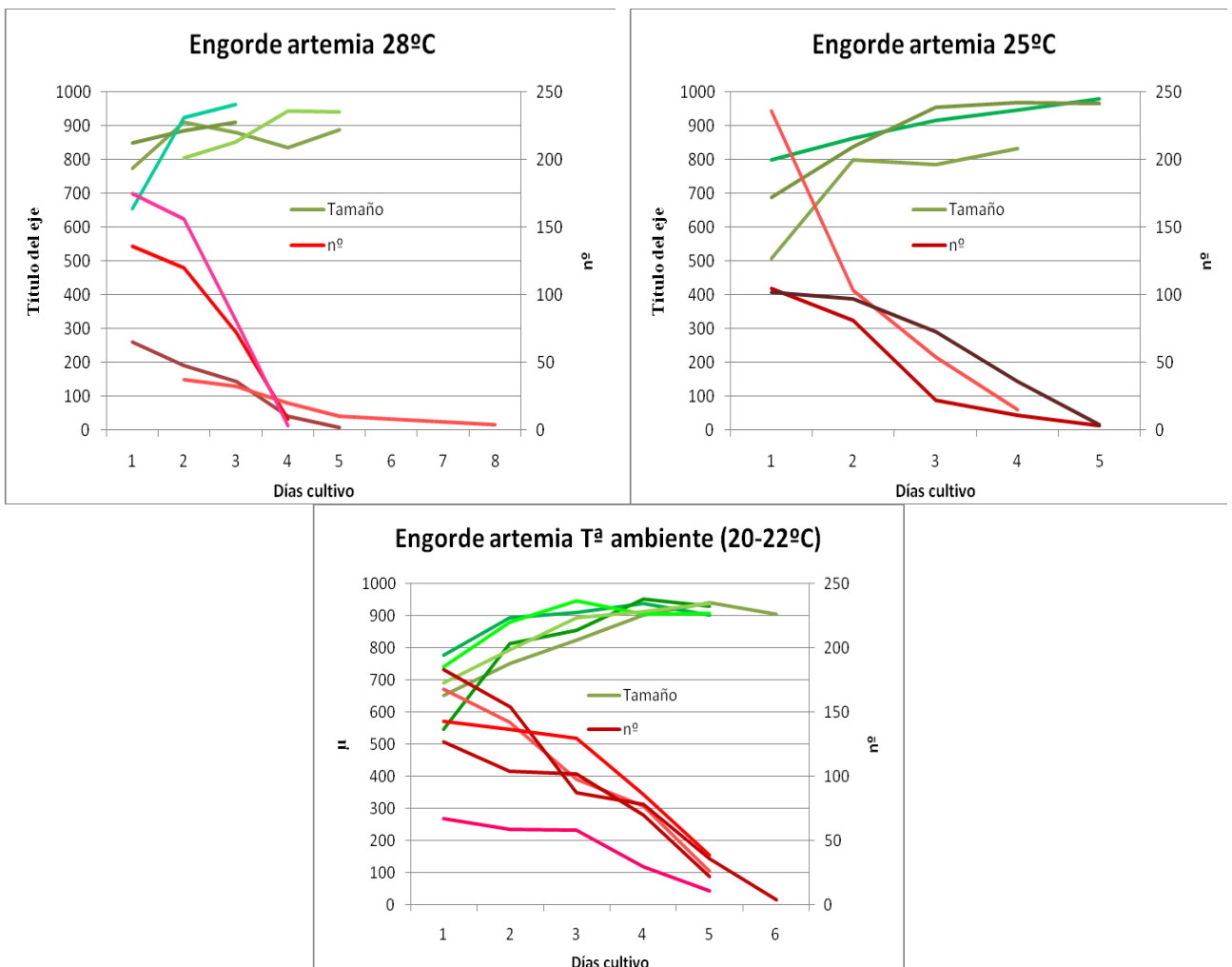


Fig. 13: Resultados de las diferentes pruebas de engorde. Las líneas rojas corresponden al nº de individuos y las verdes a las tallas. Los tamaños a los 4 días son menores a 20°, pero la supervivencia mayor.

En vista de los resultados, se decidió realizar los engordes a temperatura ambiente, que con un crecimiento algo inferior, proporciona suficientes metanauplios para realizar el enriquecimiento posterior.

28°C			25°C			Tª ambiente (20-22°C)		
% supervivencia día 4			% supervivencia día 4			% supervivencia día 4		
máxima	media	mínima	máxima	media	mínima	máxima	Media	mínima
35,29%	15,14%	5,88%	35,29%	17,38%	6,36%	60,14%	50,92%	42,62%
Talla media día 4			Talla media día 4			Talla media día 4		
máxima	media	mínima	máxima	media	mínima	máxima	Media	mínima
945	---	835	968,86	916,42	833,5	957,37	923,71	904,25
% supervivencia día 5			% supervivencia día 5			% supervivencia día 5		
máxima	media	mínima	máxima	media	mínima	máxima	Media	mínima
3,92%	2,90%	1,71%	3,92%	----	2,86%	27,27%	19,23%	15,48%
Talla media día 5			Talla media día 5			Talla media día 5		
máxima	media	mínima	máxima	media	mínima	máxima	Media	mínima
943	---	888,4	980,54	----	966,23	942,6	924,6	902,39

Tabla IV: Resultados del engorde de artemia a diferentes temperaturas. La medición se realiza con una lupa Olympus acoplada a un sistema de análisis de imagen

## 2012

Se utilizó el protocolo establecido el año anterior. Sólo se modificó la dieta que se proporcionaba, en concreto, se aportaba cada día como alimento, 0,03 g/l de levadura y 0,01g/l del enriquecedor Ori-green. De esta manera se obtenía la talla deseada ( $1.000 \pm 70 \mu\text{m}$ ) a los 5 días de cultivo.

### Tarea 1.3.2.4 Enriquecimiento de Artemia con emulsiones comerciales.

## 2011

Se ha usado el enriquecedor red-pepper de Bernaqua. (Ficha en anexo).

## 2012

Se ha usado el enriquecedor Ori-Green de Skretting. Ori-Green es un producto concentrado en polvo, basado en algas naturales, proteínas, fosfolípidos y aceites marinos, rico en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA).

### Tarea 1.3.2.4 Enriquecimiento de Artemia con emulsiones comerciales.

## 2011

El protocolo seguido para el enriquecimiento fue el siguiente:

1. Recogida de los metanauplius.
2. Lavado de 10 minutos con agua de mar y 5 minutos con agua dulce.
3. Siembra en tanque cilíndrico de 200 l para enriquecimiento

4. Enriquecimiento con red pepper. (24 horas, 0,6 gr/l), a alta densidad
5. Recogida de metanauplius enriquecidos.
6. Lavado de 10 minutos con agua de mar y 5 minutos con agua dulce.
7. Tratamiento con OXAQUA, 80 ml en 10 litros, con aireación.
8. Lavado de 10 minutos con agua de mar y 5 minutos con agua dulce.

Los metanauplius obtenidos se han usado en la alimentación del cultivo larvario.

**Línea 1.5. Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio, misidáceos cultivados y zoeas de crustáceos, vivas o congeladas.**

**Tarea 1.5.6. Obtención de zoeas de decápodos.**

**2011**

No se ha realizado en 2011.

**2012**

No se ha ejecutado debido a las restricciones presupuestarias.

**Tarea 1.5.7. Obtención de zooplancton del medio natural.**

**2011**

No se ha realizado en 2011

**2012**

No se ha ejecutado debido a las restricciones presupuestarias.

**Tarea 1.5.8. Otras dietas vivas alternativas.**

**2011**

No se ha realizado en 2011.

**2012**

No se ha ejecutado debido a las restricciones presupuestarias.

**Tarea 1.5.9. Cultivo de paralarvas.**

**2011**

Para el cultivo de paralarvas se siguió el protocolo básico establecido, excepto en las resiembras:

1. Densidad inicial 10-20 paralarvas por litro
2. Iluminación 200-300 lux, fotoperiodo 12 h luz- 12 h oscuridad.
3. Recogida de muestras días 0, 15 y 30.
4. Alimentación:
  - día 1 a 15 nauplios recién eclosionados (0,5/l)
  - 15 en adelante: metanauplius de 4 días enriquecidos.

Las hembras con puesta se separaron en tanques de 120 l, en oscuridad y con una renovación de 20 l/min. Aproximadamente, a los 25 días empezó la eclosión. Las paralarvas se retiraban con sumo cuidado del tanque donde habían eclosionado mediante jarras y sifones. Toda la puesta se concentraba en un balde de 60 l para facilitar su conteo por volumetría. La siembra se realizó en distintos tanques y densidades de cultivo:

- 3 tanques de 0,4 m<sup>3</sup> a una densidad máxima de 25-30 paralarvas/l
- 3 de 1 m<sup>3</sup> a un densidad de 15-20 paralarvas/l (máximo, 28/l)
- 1 tanque de 10 m<sup>3</sup>, con densidad de 15-20 paralarvas.



Fig. 14: Diferentes momentos de la incubación, eclosión y siembra en tanques.

De las distintas puestas se recogió una muestra inicial para determinaciones bioquímicas (1 g de paralarvas). Una vez comenzados los cultivos se muestreaban 10 paralarvas cada cuatro días para determinar las variaciones en la longitud corporal. La única experiencia de cultivo en la que se pudo realizar fue la del tanque TL1. Los datos se muestran en la tabla V.

No se recogieron muestras del día 15 en ninguna de las experiencias de cultivo, debido a que sólo en dos tanques se superó el día 15 de cultivo, quedando muy pocas paralarvas. Por este motivo, y tal como se decidió en la reunión de coordinación, no se procesaron debido a la escasa supervivencia de los cultivos.

	04/07/2011	07/07/2011	11/07/2011	15/07/2011	19/07/2011
<b>media (<math>\mu</math>) LM</b>	2210,23	2096,85	2027,05	2307,22	2728,59
<b>Desviación estándar</b>	96,080	196,937	99,814	231,934	126,068

Tabla V: crecimiento de las paralarvas TL1. La medición se realiza con una lupa Olympus acoplada a un sistema de análisis de imagen.

La alimentación se proporcionaba en 2 tomas diarias. Para alimentar a las paralarvas se utilizaron nauplios de artemia Tyca durante los primeros 14 días. A partir del día 15 se les proporcionó metanauplios de 4 días de artemia GSL 85%.

Durante los primeros 7 días, los tanques se mantuvieron en circuito cerrado, con aireación muy suave.

Diariamente, se comprobaba la concentración de artemia que quedaba en el tanque de cultivo. Si ésta era elevada se abría el circuito de agua durante 3 horas para eliminarla, estableciendo un flujo que permitía la renovación del 100% del volumen del tanque. Al cerrar la entrada de agua se contaba por volumetría la cantidad de artemia que quedaba en el tanque y se ajustaba la primera toma (10:00 h) a 0,25 artemias/ml. La segunda toma (14:00 h) consistía en 0,25 artemias/ml, 0,01 ml /l de phytobloom y 0,003g/l de *Thalassiosira* liofilizada. En los tanques TL (1000 l), la segunda toma se hacía mediante bombas peristálticas y el resto a mano.

Cuando se producían mortalidades más o menos elevadas se sifonaba suavemente el fondo de los tanques para eliminar los restos.

En concreto se realizaron los siguientes cultivos:

#### 1. Tanques de 400 l

- 5 de julio: se siembran 3 tanques de 400 l, troncocónicos, con desagüe en el centro, con 8.000 paralarvas (20 paralarvas/l). La supervivencia fue de 4 días en todos los tanques.
- 10-11 de julio: se siembran 3 tanques de 400 l, troncocónicos, con desagüe en el centro, con 12.000 paralarvas (30 paralarvas/l). La supervivencia fue de 2 días en todos los tanques.



## 2. Tanque de 10 m<sup>3</sup>

12 julio: se siembran 120.000 paralarvas en un tanque de 10 m<sup>3</sup>. El día 10 se observa una gran mortalidad. El día 14 de cultivo se elimina.

## 3. Tanques de 1000 l (2 con paredes negras, 1 con pared azul, agua filtrada a 100 µ).

Se siembran, entre los días 4 y 6 de julio, 3 tanques con 20.000 paralarvas. Uno negro y el azul se eliminan a los tres días y se resiembran. El día 11 de julio se resiembran ambos. El tanque azul se elimina a los 6 días de cultivo y se resiembra el 18 de julio. A los 8 días se vuelve a eliminar.

Los tanques restantes, con muy pocas paralarvas, se mantienen, consiguiendo la supervivencia de varias paralarvas hasta el día 31 y el 43.

No ha sido posible realizar más cultivos por la falta de puestas, que se esperaba obtener en otoño.

Los mejores resultados se han obtenido con tanques de paredes negras, alimentados con la secuencia: nauplios de artemia hasta el día 15, metanauplius de 4 días enriquecidos desde el día 16 hasta el final del cultivo y artemia adulta (del mesocosmos) aportada a partir del día 26 hasta el final del cultivo.

Tanque	Inicio cultivo	tipo de sistema	Color pared	Densidad (paral./l)	Vol. l	Alimentación	Tª media	días de cultivo
N4	12/07	Abierto, sin filtro	azul	12	10000	Nauplius artemia	24,07+0,358	14
I3(1)	05/07	Cerrado	azul	20	400	Nauplius artemia	23,62+0,411	4
I4(1)	05/07	Cerrado	azul	20	400	Nauplius artemia	23,45+0,5	4
I5(1)	05/07	Cerrado	azul	20	400	Nauplius artemia	23,25+0,189	4
I3(2)	11/07	Abierto	azul	30	400	Nauplius artemia	24,8+0,340	3
I4(2)	12/07	Abierto	azul	30	400	Nauplius artemia	24,92+0,371	2
I5(2)	12/07	Abierto	azul	30	400	Nauplius artemia	25+0,387	2
TL1	04/07	cerrado (1 a 7) Semiabierto (8 a 43)	negra	20	1000	Nauplius (1 a 15) Metanauplius enriquecidos (16 a 43) Artemia adulta (26 a 43)	23,07+1,343	43
TL3(1)	08/07	Cerrado	azul	20	1000	Nauplius artemia	19	1
TL3(2)	11/07	Abierto	azul	28,5	1000	Nauplius artemia	25,2+0,311	6
TL3(3)	18/07	Abierto	azul	13,5	1000	Nauplius artemia	24,34+0,282	8
TL4(1)	06/07	Cerrado	negro	20	1000	Nauplius artemia	19,1+1,76	4
TL4(2)	11/07	Abierto	negro	28,5	1000	Nauplius (1 a 15) Metanauplius enriquecidos (16 a 31) Artemia adulta (26 a 31)	24,3+0,779	31

Tabla VI: Resumen de los diferentes cultivos realizados. Se ha resaltado en los que se obtuvieron mejores resultados.

## **2012**

### **Cultivo a diferentes temperaturas**

Unas 18.000 paralarvas recién eclosionadas se transfirieron a 6 tanques de fibra de 200 litros, resultando una concentración de 15 individuos/L (en total, unas 3.000 paralarvas por tanque). Los tanques eran circulares, de 1 m de diámetro y con paredes y fondo blanco. De los 6 tanques, tres se ajustaron a una temperatura de 21°C y otros tres a 24-26°C. La salinidad era de 37‰. Se estableció un ciclo de 24 horas de luz, mediante dos tubos fluorescentes por tanque, resultando en una intensidad de 500-700 lux en la superficie del agua. Los tanques se mantuvieron en circuito ligeramente abierto (0,3 L/min) con aireación central muy suave. Se añadieron diariamente microalgas liofilizadas (*Isochrysis galbana* a una concentración de 3,75·10<sup>5</sup> cél/mL y *Nanochloropsis gaditana* a 1,2·10<sup>5</sup> cel/mL, EasyAlgae, España). El fondo del tanque se limpió por sifonado cuando se creía necesario y se observaban bajas en el fondo. Las paralarvas fueron alimentadas dos veces al día (9:00 y 14:00 horas) con metanauplios de *Artemia* cultivados como se ha descrito anteriormente. La concentración de *Artemia* se ajustó en ambas tomas a 0,5 individuos/mL. En la salida del agua se colocaron mallas de 315 µm para evitar el escape de la *Artemia*.

### **Cultivo en aguas verdes**

En este estudio se analizaron los efectos de añadir fitoplancton a los tanques de cultivo de paralarvas. Se sembraron 15.000 paralarvas por tanque en seis tanques circulares de 1.000 L (densidad 15 paralarvas/l). La temperatura del agua se mantuvo a 21°C mediante el uso de climatizadores y se estableció un flujo de agua de unos 0,8 l/min. La alimentación, como en la experiencia anterior, se hizo con *Artemia* adulta de 5 días enriquecida, a una concentración de 0,5 metanauplios/ml. Se establecieron dos grupos, cada uno por triplicado: el primero se mantuvo en condiciones de aguas claras mientras que en el segundo se establecieron las condiciones de aguas verdes añadiendo diariamente fitoplancton liofilizado (*Isochrysis galbana* a una concentración de 3,75·10<sup>5</sup> cél/ml y *Nanochloropsis gaditana* a 1,2·10<sup>5</sup> cel/ml, EasyAlgae, España).

En todos los experimentos se determinaron los siguientes parámetros:

- Supervivencia. Cuando se observaban paralarvas muertas en el fondo de los tanques se sifonaban y se determinaba el número de bajas mediante su contaje por volumetría. Cuando ya quedaban pocas paralarvas vivas en los tanques se contaban una a una.
- Peso seco de las paralarvas a los días 0, 15, 30, etc. Para su determinación se lavaban 10 paralarvas con agua destilada para eliminar los restos de sal. Se colocaban en un portaobjetos previamente tarado y se eliminaban los restos de agua mediante succión con una jeringuilla y papel secante. Se pesaban en húmedo con una balanza de precisión y se colocaban en una estufa a 60°C hasta obtener peso constante (24 horas). Posteriormente se pesaban en la misma balanza para determinar el peso seco.



Fig. 15. Paralarva recién eclosionada. Se observa la medida de la longitud del manto hecha con el programa Cell<sup>^</sup>D, de Olympus.

- Longitud del manto (LM) y longitud total (LT) a los días 0, 15, 30, etc. Para su determinación se realizaron fotografías mediante una cámara acoplada a una lupa usando el programa analySIS genII, Olympus (Fig. 15). Primero se anestesiaban las paralarvas con una solución de etanol al 1%. Con un programa de procesamiento de imágenes (Cell<sup>^</sup>D, Olympus) se midió la longitud del manto como la distancia entre el extremo posterior del cuerpo y el punto medio entre los ojos.
- Recuento del número de ventosas por tentáculo.
- Histología. Se recogieron unas 30 paralarvas a los días 0, 15, 30, etc. y se almacenaron fijadas en formol al 10% tamponado con fosfatos, a la espera de su posterior análisis.
- Bioquímica. Se recogió una muestra de las paralarvas recién eclosionadas para su posterior análisis bioquímico. Se colocaron en un criotubo que se conservó a -80°C. También se recogieron muestras del alimento (Artemia).

### **Resultados y discusión**

#### **Cultivo a diferentes temperaturas**

Los resultados de esta experiencia no fueron concluyentes debido a fallos en el sistema de refrigeración del agua. En varios tanques se registraron variaciones de hasta 2 grados, solapándose los grupos de temperatura baja y alta.

El tanque E1 presentó una mortalidad total a día 5 de cultivo debido a variaciones de temperatura de hasta 4,8°C. El resto de tanques sufrieron una mortalidad similar a los 14-18 días (Tabla VII).

Estos resultados no permiten sacar conclusiones en cuanto a la temperatura a la cual se obtienen mejores resultados, por lo que se pretendía repetir la experiencia el año 2013.

Temp. (°C)	Tanque	Edad final
24-26	E1	5
	E3	14
	E6	18
21	E2	18
	E4	18
	E5	14

Tabla VII. Edad final de las paralarvas en los distintos tanques de cultivo.

### **Cultivo en aguas verdes**

El uso de la técnica de aguas verdes (Fig. 16) para cultivar especies marinas es una práctica bien conocida en acuicultura y ha demostrado que mejora la supervivencia, crecimiento e índice de conversión de más de 40 especies en comparación con las condiciones de aguas claras.



Figs. 16 y 17. Paralarvas de pulpo en los tanques de cultivo en condiciones de aguas verdes o aguas claras.

En la tabla 4 se presenta la supervivencia de las paralarvas a lo largo del cultivo. Las paralarvas criadas en condiciones de aguas verdes sobrevivieron hasta día 46, a diferencia de las paralarvas criadas en aguas claras, que sólo llegaron hasta el día 35. Esta diferencia parece indicar los posibles efectos beneficiosos del sistema de aguas verdes.

Si analizamos cada tanque por separado (existen 3 tanques para cada tipo de cultivo) se aprecian grandes diferencias dentro del mismo tipo de cultivo (Fig. 18 y 19). A día 4, en uno de los tanques de aguas verdes mueren todas las paralarvas, sin saber con certeza la causa. Es probable que quedaran restos de pegamento de una reparación que se hizo al tanque un día antes de introducir las paralarvas. Esto hace que la media de este grupo disminuya. Si obviamos este tanque, las diferencias entre un sistema de cultivo u otro son todavía más acusadas. En los dos tanques restantes se llega a una edad final de 45 y 46 días. En cambio, en los tanques sin aporte de fitoplancton, dos tanques llegan a día 20 y uno a los 35 días (Tabla VIII).

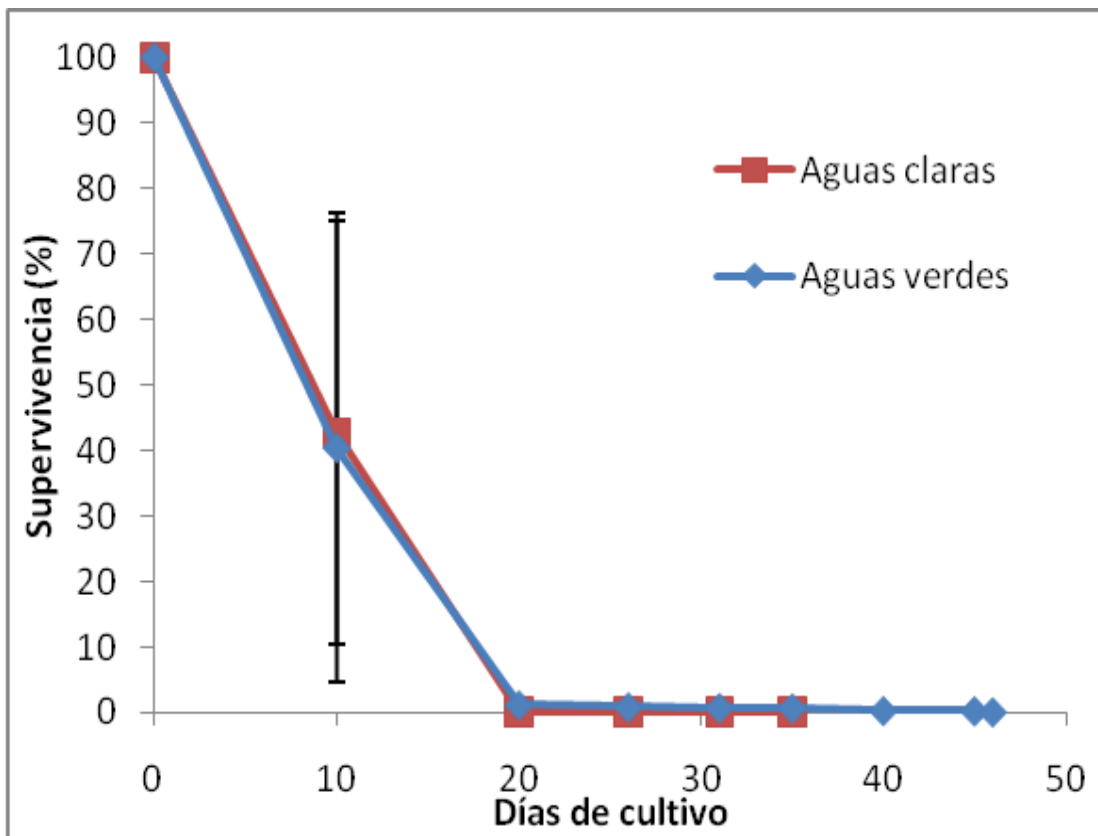


Fig. 18. Tasa de supervivencia de las paralarvas de pulpo cultivadas en condiciones de aguas verdes o claras a lo largo del experimento. Medias  $\pm$  S.D. (n=3).

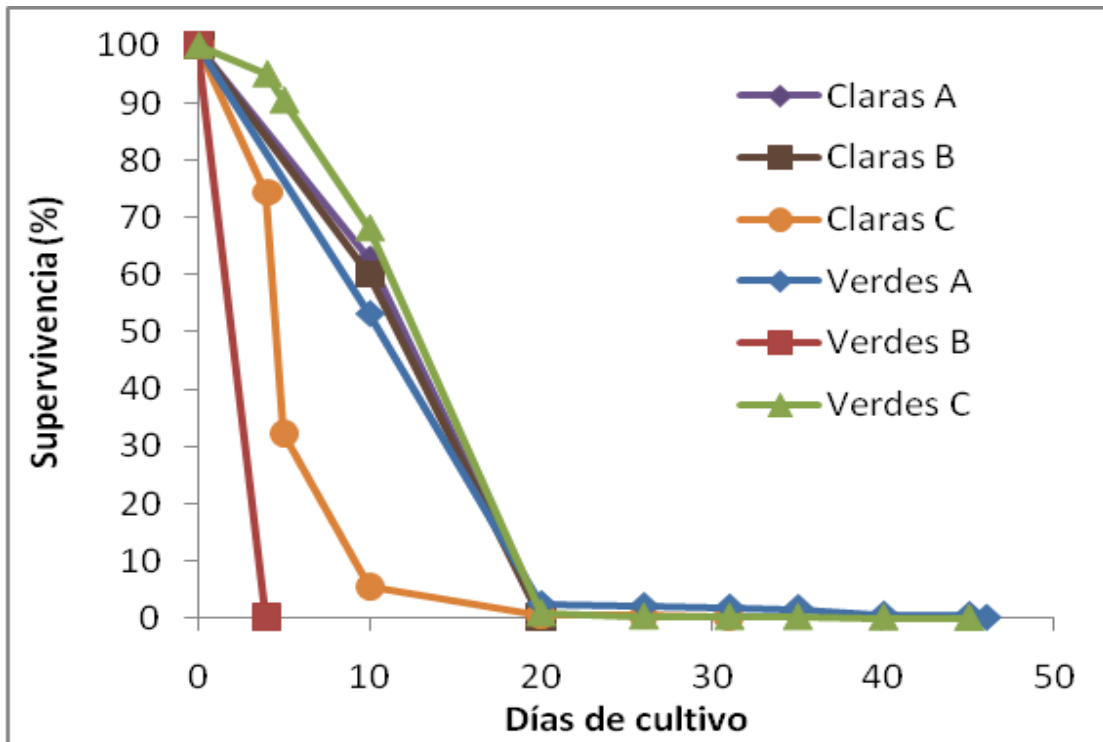


Fig. 19 Tasa de supervivencia de cada uno de los tanques de cultivo por separado: tres de aguas claras y tres de aguas verdes.

Como se observa, se han conseguido criar paralarvas hasta los 46 días de edad, con una supervivencia en uno de los tanques del 0,5% (73 paralarvas vivas de las 15.000 iniciales).

Este resultado es, en esta especie, un número bastante elevado teniendo en cuenta que sólo se le aporta como alimento Artemia enriquecida.

Tipo Cultivo	Tanque	Edad final (días)
Aguas verdes	A	46
	B	4
	C	45
Aguas claras	A	20
	B	35
	C	20

Tabla VIII. Edad alcanzada por las paralarvas en cada tanque de cultivo.

La muerte de estas paralarvas, a día 46, se produjo de forma masiva y repentina, sin saber exactamente las causas de tal acontecimiento. Se cree que puede ser debido al aporte, por primera vez, de Artemia adulta descongelada. Se observó que las paralarvas la aceptaban y capturaban, pero al día siguiente todas las paralarvas aparecieron muertas. Lo mismo sucedió el mismo día con otro tanque

de una experiencia diferente, al que también se le aportó la Artemia adulta congelada.

### Crecimiento

A los 15 días de cultivo no se observaron diferencias significativas en el crecimiento en longitud entre las paralarvas a las que se les había suministrado fitoplancton al agua de cultivo y a las que no (Fig. 18). No se pueden analizar diferencias posteriores al no poseer datos suficientes del cultivo de aguas claras ya que debido a las pocas paralarvas existentes no se pudo determinar el peso.

En aguas verdes, las paralarvas crecieron  $1.274,71 \pm 175,36 \mu\text{m}$  en 45 días en cuanto a longitud del manto, y  $2.008,21 \pm 168,21 \mu\text{m}$  en cuanto a longitud total. Se empieza a observar un crecimiento diferencial de los tentáculos frente al resto del cuerpo (figs. 20-25).

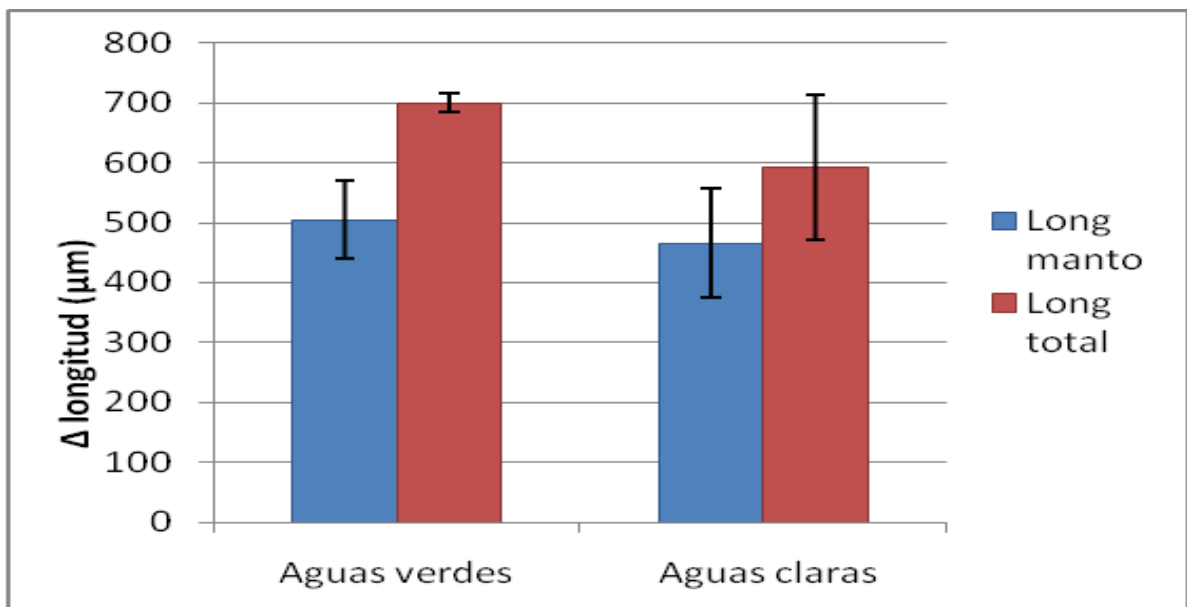


Fig. 20: Incremento de longitud del manto y longitud total respecto de la talla inicial en las paralarvas criadas en aguas verdes y en aguas claras.





Fig. 21: Paralarva recién eclosionada



Fig. 22: Paralarva de 15 días de vida.



Fig. 23: Paralarva de 30 días de edad.

Fig. 24: Paralarva de 45 días de edad.

En cuanto al crecimiento en peso, tomando los datos del mejor resultado (aguas verdes) se observa que sigue un modelo exponencial (Fig. 25), cuya ecuación resulta en:

$$\text{Peso seco (mg)} = 0,2443e^{0,0428(\text{edad})}$$

Estas paralarvas casi cuadruplicaron su peso seco en un periodo de 30 días, pasando de 0,26 a 0,95 miligramos, con una supervivencia del 1,8%.

Comparando los resultados con los obtenidos por el grupo del IEO de Vigo con artemia enriquecida, los valores de peso seco que se obtienen son algo mayores que los nuestros: 1,4 mg y una supervivencia del 10% a los 30 días. Las diferencias son incluso más grandes si se comparan con resultados obtenidos con aporte de zoeas de centolla vivas: se obtienen a los 45 días valores de  $9,5 \pm 1,9$  mg con un 31,5% de supervivencia (fig. 26).

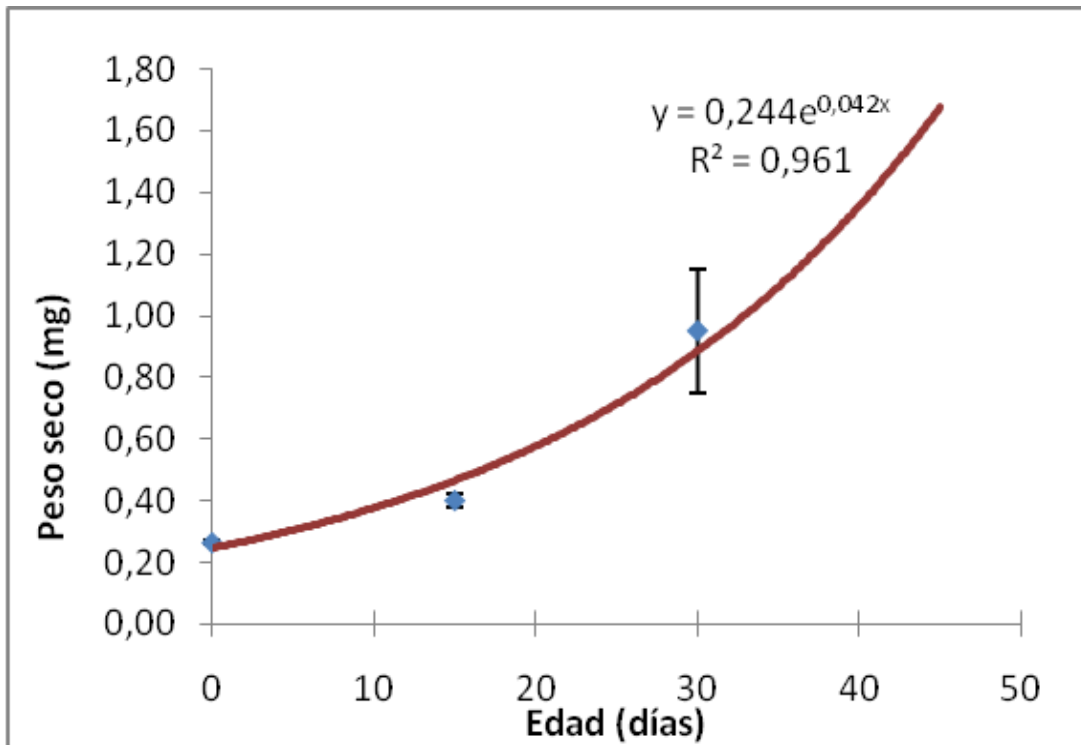


Fig. 25. *Peso seco de las paralarvas criadas en aguas verdes.*

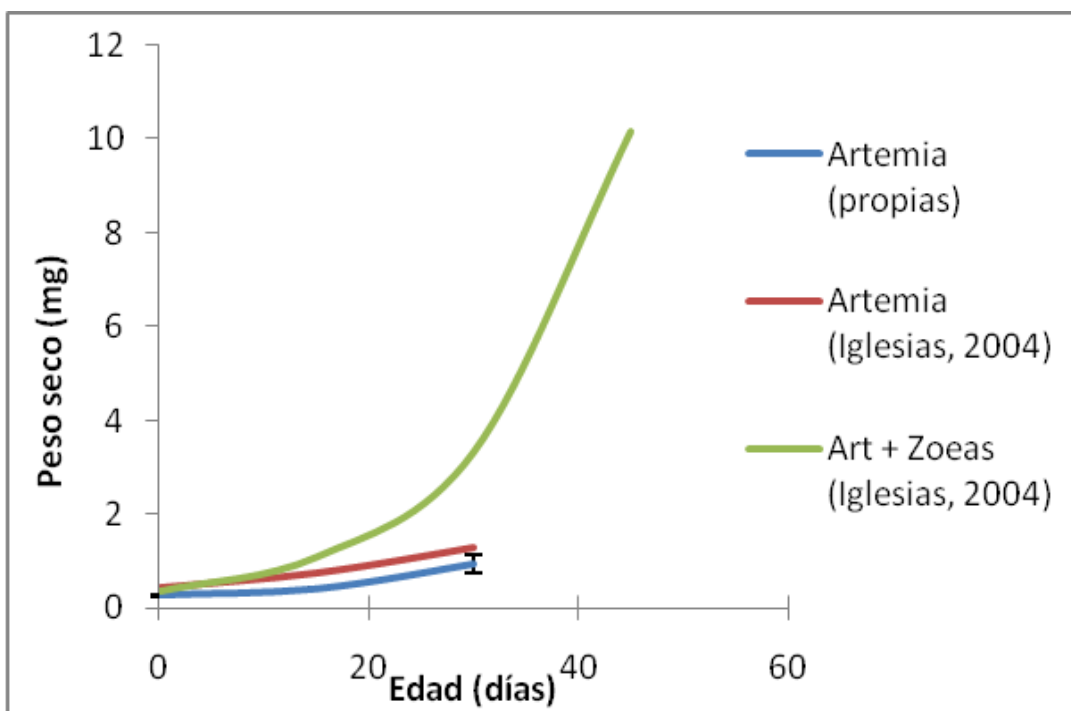


Fig. 26: *Comparación del crecimiento en peso seco de las paralarvas obtenidas en el LIMIA respecto a las obtenidas en el IEO deVigo ( alimentadas con Artemia o con Artemia y zoeas de centollo).*

### **Número de ventosas**

Las paralarvas, al nacer, presentan tres ventosas en cada tentáculo. Este número va aumentando a medida que la paralarva crece. A los 45 días casi la totalidad de paralarvas observadas poseían todavía 3 ventosas y sólo en algunas se observó

una cuarta (Fig. 27). En cambio, en los resultados de Iglesias et al., 2004, a los 40 días de edad, las paralarvas ya poseían un número medio de 23 ventosas por brazo.



*Fig.27: Paralarva de 45 días. Flecha: inicio del crecimiento de la cuarta ventosa.*

## Anexo

### TECHNICAL CARD

# RED PEPPER



*Red Pepper is a complete enrichment product for rotifers and Artemia. Red Pepper is not only formulated with essential fatty acids but is containing well balanced important nutrients often lacking in yeast based diets or lipid emulsions. Red Pepper is containing the most important vitamins having an impact on immunity and development of collagen tissues. The levels of Vitamin C included are unique on the market and ensure the highest vitality of live food and subsequently of the fish larvae. Red Pepper is also containing chelated trace minerals, immuno-stimulants, ... Red Pepper is an encapsulated product wich easily disperse once placed in water. The nutrients present in the product are well protected and do not leach in the enrichment tank, hence reducing water pollution and excessive bacterial development.*

### INGREDIENTS

Water, encapsulated purified DHA oils, phospholipids, vitamin and trace minerals, natural anti-oxidants, immunomodulating substances.

### ANALYSIS

Nutrient	Value	Nutrient	Value
Moisture (%)	68,0	Vitamin A	50.000 IU/kg
Protein (%)	3,0	Vitamin D <sub>3</sub>	10.000 IU/kg
Lipids (%)	14,0	Vitamin C	11.500 ppm
Ash (%)	3,0	Vitamin E	1500 ppm
Cellulose (%)	5,0	Astaxanthin	700 ppm
Phosphorus	1,0		
Total (n-3) HUFA	65,0 mg/g		
DHA	55,0 mg/g		
EPA	5,0 mg/g	Total Energy (kj/g)	6,71
ARA	1,5 mg/g	Digestible Energy (kj/g)	6,17

### INSTRUCTION FOR USE

**Rotifer enrichment** Cleaned rotifers should be enriched at a density of 500.000 rotifers per liter (or more), for a period of 6 hours. Red Pepper is added in 2 rations of 180 gram/m<sup>3</sup>/ration. Rotifers are harvested after 6 hours and rinsed to remove all traces of the enrichment medium.

**Artemia enrichment** Incubate Artemia nauplii at densities of 300.000 nauplii per liter (or more), at a temperature of 25-30°C while maintaining an oxygen concentration of more than 4 mg oxygen per liter. Red Pepper is added in 2 rations of 750 grams/m<sup>3</sup>/ration, 12 hours apart for a standard 24 hour enrichment. Harvested Artemia must be rinsed to remove all traces of the enrichment medium.

### PACKAGING

Red Pepper is packed in 1,0 kg PE bottles. One carton contains 10 kg Keep refrigerated 4°C - max. storage at 15°C.



Bernaqua NV Hagelberg 3 B-2250 Olen Belgium [www.bernaqua.eu](http://www.bernaqua.eu)  
T +32 14 282 520 F +32 14 282 529 [info@bernaqua.com](mailto:info@bernaqua.com)

Registration feed producer: αBE2269

## **ICCM**

### **Plan Nacional NUTRIPULPO: Subproyecto Paralarvas.**

#### **Línea 1.1.: Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables**

**OBJETIVOS:** Obtención de un número suficiente de paralarvas para llevar a cabo los distintos ensayos cultivo que se plantean en las Líneas 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5

Los ejemplares que utilizados como reproductores fueron capturados anualmente por pescadores artesanales con nasas, un arte específico y selectivos que minimiza el posible daño.

El volumen de los tanques de reproductores fue de 2 m<sup>3</sup> y los ejemplares se estabularon en una relación 2:1 macho/hembra. La luz en los tanques se redujo con una malla de sombreo y se colocaron un número suficiente de refugios para reducir los ataques y el canibalismo entre los individuos. La renovación de agua fue del 100/h en circuito abierto, de modo que el nivel de oxígeno se mantenga por encima del 80% de saturación. Los reproductores fueron alimentados con una mezcla de crustáceos y pescado, suministrados diariamente *ad libitum*. Las dietas se congeladas durante un mínimo de dos semanas para minimizar la presencia de patógenos

Cada hembra con puesta se aisló en tanques más pequeños para facilitar su monitorización. Al eclosionar las paralarvas, se realizó un conteo por volumetría previo a su traslado a los tanques de cultivo.

#### **Línea 1.2.: Sistema de cultivo de paralarvas utilizando un mesocosmos**

**Objetivos:** Aplicación de sistemas de cultivo mesocosmos para la producción de juveniles de pulpo.

#### **Tarea: 1.2.1. Cultivo larvario de pulpo en sistema Mesocosmos con filosofía extensiva.**

De acuerdo al plan de trabajo inicial a finales de la anualidad 2011 han dado comienzo las experiencias de cría larvaria en sistemas mesocosmos, con filosofía extensiva: La falta de puestas de pulpo ha limitado las actividades realizadas a una única experiencia en esta anualidad.

## Metodología

Los sistemas de cultivo mesocosmos se basan en la generación de una cadena trófica que se reproduce de forma endógena a través de la adición de un inóculo externo. En este caso, un tanque de 40 m<sup>3</sup> se llenó con agua de mar previamente filtrada y esterilizada. Se fertilizó con nutrientes (200g de nitrato puro y 20 g de fosfato) se introdujo un inóculo de fitoplancton (*Nannochloropsis oculata*), zooplancton *Brachionus plicatilis* y copépodos (*Tisbe furcata*) alcanzando una media de 150.000 cells/ml y >2 indiv zoop/ml. El agua del tanque se mantuvo en circuito cerrado, durante 10 días antes de la introducción de las paralarvas, esta se produjo durante 5 días consecutivos desde el día 21/12/2011 de acuerdo a la eclosión diaria de una misma hembra, sembrando un total de 54.462 paralarvas con una densidad final de 1,3 indiv/ml).

A partir del primer día de la introducción de las paralarvas se abrió el circuito de agua manteniendo una renovación diaria de 5%/h que se incremento hasta llegar a un 100%/hora al final de la experiencia al día 30 de cultivo. Manteniéndose una temperatura media de 19.8° C y un nivel disuelto de 7.0. Igualmente desde la introducción de las paralarvas se aportó al tanque Artemia A1 enriquecida con productos comerciales (A1 DHA Selco) manteniendo diariamente una concentración en el tanque de 0,5 indiv/ml. A partir del día 20 se aportó microdieta comercial (50g/día) (Genma Micra 150) manualmente. Para estimar el crecimiento se recogieron datos de longitud total, longitud y ancho del manto, además se determinó el peso fresco y peso seco (100°C durante 24 h) de 10 larvas a los días 0, 15 30 y 35. Para estimar la supervivencia, se realizó un conteo individual de las paralarvas presentes al día 35, cuando se dió por finalizada la experiencia. De igual manera se han recogido muestras para análisis bioquímica del alimento y paralarvas iniciales. También se han almacenado muestras para análisis histológico los días.

## Resultados

Las larvas de pulpo cultivada en Mesocosmos presentaron unas migraciones diarias muy marcadas en este sistema de cría, así durante la primera hora de la mañana se podían observar las paralarvas nadando cerca de la superficie y paredes del tanque, mientras que a medida que avanzaba el día, se detecto una tendencia a migrar en profundidad, la altura del tanque de cría (2,5m) parece favorecer este comportamiento que podría ser reflejo de hábitos naturales en la especie.

Respecto al crecimiento observado, como se observa en las figuras 1 y 2, hay un crecimiento de todos los parámetros morfométricos observados hasta el día 30 de vida, detectándose un ligero descenso a partir de esta etapa. Este hecho se ha asociado con la elevada mortalidad de paralarvas durante esta etapa quedando al día 35 únicamente ejemplares que representan los rangos de población de menor tamaño que se apuntan podría ser los de menor edad.

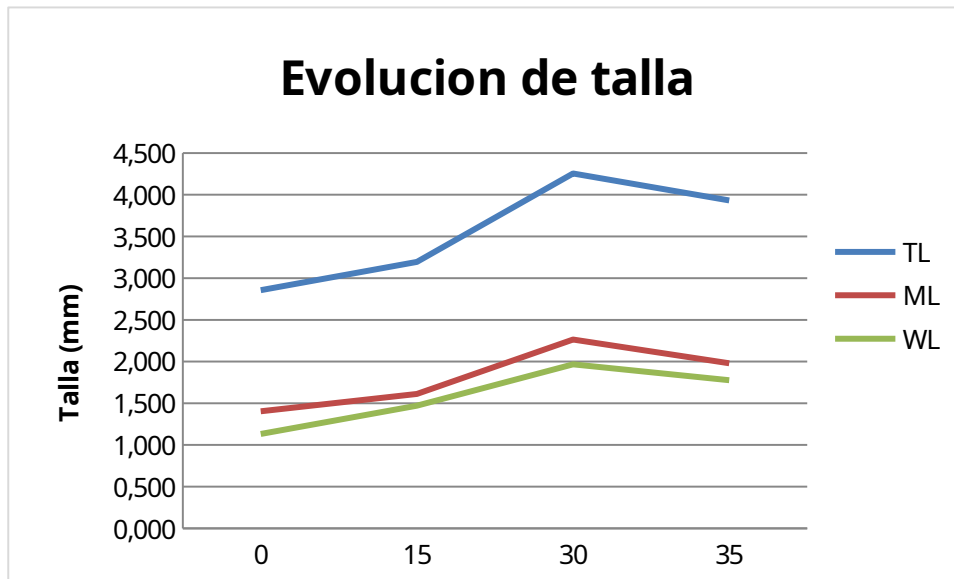


Figura 1. Evolución de la talla de las paralarvas de pulpo en sistema de cultivo Mesocosmos Semi-intensivo.



Figura 3. Evolución del peso de las paralarvas de pulpo en sistema de cultivo Mesocosmos Semi-intensivo.

La supervivencia obtenida en esta primera experiencia fue muy modesta, 95 ejemplares en fase pre-bentónica, lo que supone un 0,17%. Esta experiencia sin embargo ha servido como acercamiento y aprendizaje del manejo de los tanques Mesocosmos para esta especie, detectando diferentes aspectos de la zootecnia que será necesario adaptar a las condiciones de la cría larvaria de pulpo.

**Línea 1.3.: Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas *Artemia* enriquecida con fitoplancton y enriquecedores.**

OBJETIVOS: Obtención de juveniles de pulpo empleando como alimento *Artemia* nutricionalmente enriquecida

**Tarea 1.3.1. Engorde de *Artemia* a tallas adaptadas a la paralarva**

Metodología

Para evaluar el efecto de los productos usados en el cultivo de *Artemia* (*Tetraselmis sp.*, y ORI-Culture) sobre su crecimiento y supervivencia, se procedió inicialmente a la determinación del contenido de la fracción orgánica de estos productos y sus perfiles de ácidos grasos. Posteriormente se evaluó el crecimiento en longitud de la artemia hasta las 72 horas de engorde, supervivencia y efecto en su composición bioquímica.

Resultados

***Crecimiento en longitud***

El experimento de engorde de *Artemia* con Ori-Culture y *Tetraselmis sp.* se llevo a cabo con *Artemia* recién eclosionada (24h) de longitud  $0,78 \pm 0,17$ mm. A las 48 horas de vida, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las *Artemia* ( $P > 0,05$ ) (Tabla I y Figura 4). Sin embargo se observaron diferencias significativas a las 72 horas y 96 horas de cultivo ( $P < 0,05$ ), con un mayor crecimiento de la *Artemia* cultivada con Ori-Culture en comparación a la alimentada con *Tetraselmis sp.*

**Tabla I:** Longitud total (mm) de juveniles de *Artemia sp.* cultivados con Ori-Culture y *Tetraselmis sp.*



	48h	72h	96h
Long. Art_Tetra (mm)	0,92 ± 0,06	0,94 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,07 <sup>a</sup>
Long. Art_Ori-C (mm)	0,93 ± 0,04	0,98 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,08 ± 0,08 <sup>b</sup>

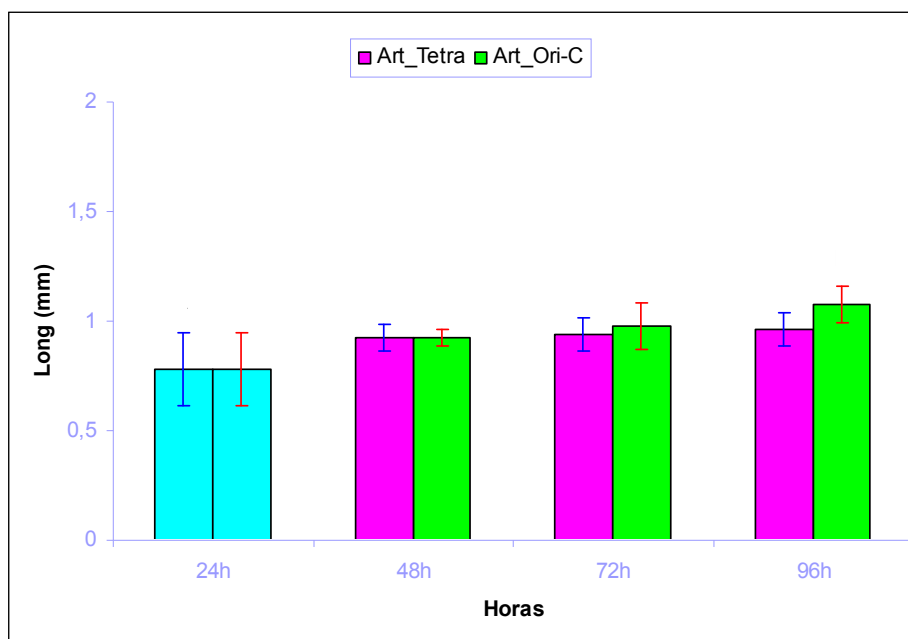


Figura 4: Evolución de la longitud total de la *Artemia* cultivada con Ori-Culture y *Tetraselmis sp.*

### **Supervivencia**

Los datos de la supervivencia ilustrados en la tabla II y figura 5 muestran que aunque, el porcentaje de supervivencia de Art\_Ori-C es más alto que en Art\_Tetra, a las 48 y 72 horas, no se han observado diferencias significativas entre ellos ( $P > 0,05$ ).

**Tabla II:** Tasa de supervivencia de *Artemia sp.* cultivada con Ori-Culture y *Tetraselmis sp.*

	24h	48h	72h	96h
Supervivencia Art_Tetra (%)	100 ± 0,00	81,93 ± 7,47	69,13 ± 15,08	36,51 ± 1,46 <sup>a</sup>
Supervivencia Art_Ori-C (%)	100 ± 0,00	94,25 ± 5,14	91,44 ± 7,58	47,14 ± 2,15 <sup>b</sup>

Sin embargo, estas diferencias, si son significativas en a las 96 horas, con una mayor tasa de supervivencia de la Art\_Ori-C (Tabla II; Figura 5).

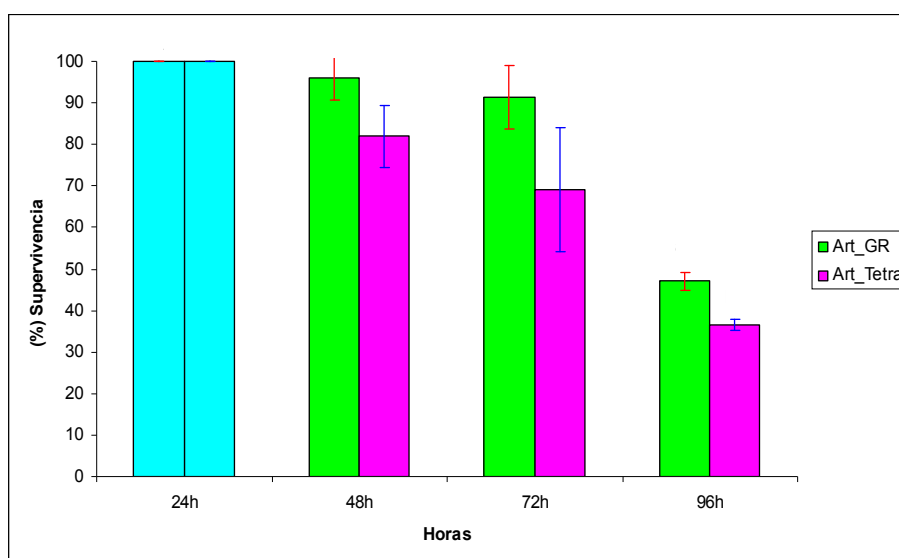


Figura 5: Tasa de supervivencia de *Artemia* sp. cultivada con Ori-Culture y *Tetraselmis* sp.

#### Tarea 1.3.2.5. Enriquecimiento de *Artemia* con emulsiones comerciales

Se plantea una experiencia destinada a evaluar el enriquecimiento de artemia, para próximas experiencias de alimentación de las paralarvas con *Artemia* de 48 horas desde día 0 a 10 días post eclosión (dpe) y *Artemia* de 96 horas desde 11 a 20dpe. En ambos casos la *Artemia* será enriquecida durante 24 horas con diferentes enriquecedores comerciales, Easy DHA Selco®, Ori-Green®, y Ori-Prot®.

#### Metodología

##### ***Enriquecimiento de Artemia***

Basado en los resultados obtenidos en la experiencia previa, se seleccionó el engorde de *Artemia* con Ori-go, como protocolo estándar para la producción de *Artemia* en las siguientes experiencias de cultivo de paralarvas. Si bien el siguiente paso consistió en el enriquecimiento de la misma con los diferentes productos comerciales detallados anteriormente.

##### ***Determinación de la Longitud total de Artemia***

Al enriquecer *Artemia* recién eclosionada (ARE) de  $0,72 \pm 0,13$ mm, durante 24 horas con los distintos productos testados, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las *Artemia* ( $P > 0,05$ ) (Tabla III).

**Tabla III:** Longitud total (mm) de *Artemia* de 24horas (ARE) enriquecida con Selco (AE\_S), Ori-Green (AE\_OG) y Ori-Prot (AE\_OP)

	Longitud (mm)
ARE	$0,72 \pm 0,13$
AE_S	$0,79 \pm 0,16$
AE_O G	$0,72 \pm 0,13$
AE_OP	$0,76 \pm 0,04$

En el caso de *Artemia* cultivada con Ori-culture 96 horas, y posteriormente enriquecida 24 horas con los distintos enriquecedores probados, si se han observado diferencias significativas en el tamaño ( $P < 0,05$ ), siendo la *Artemia* enriquecida con Ori-Green la que presentó un tamaño significativamente menor que las enriquecidas con Selco, aunque sin diferencias respecto a la enriquecida con Ori-Prot (Tabla IV).

**Tabla IV:** Longitud total (mm) de *Artemia* de 96 horas enriquecida con Selco (AC-OC\_ES), Ori-Green (AC-OC\_EOG) y Ori-Prot (AC-OC\_EOP)

	Longitud (mm)
AC-OC_ES	$1,28 \pm 0,17^a$
AC- OC_EOG	$1,18 \pm 0,13^b$
AC-OC_EOP	$1,26 \pm 0,22^{ab}$

### ***Supervivencia de Artemia de 96h enriquecidas 24h***

Aunque las *Artemia* de 96h enriquecidas con Selco presentaron un mayor porcentaje de supervivencia (Tabla V y Figura 6) que los demás, no se han observado diferencias significativas entre ellos ( $P > 0,05$ ).

**Tabla V:** Tasa de supervivencia de *Artemia* (ARE) enriquecida con Selco, Ori-Green

y Ori-Prot.

	Supervivencia (%)
ARE	100 ± 0,00
AE_S	69,11 ± 18,93
AE_O	48,56 ± 22,41
G	
AE_OP	49,81 ± 28,29

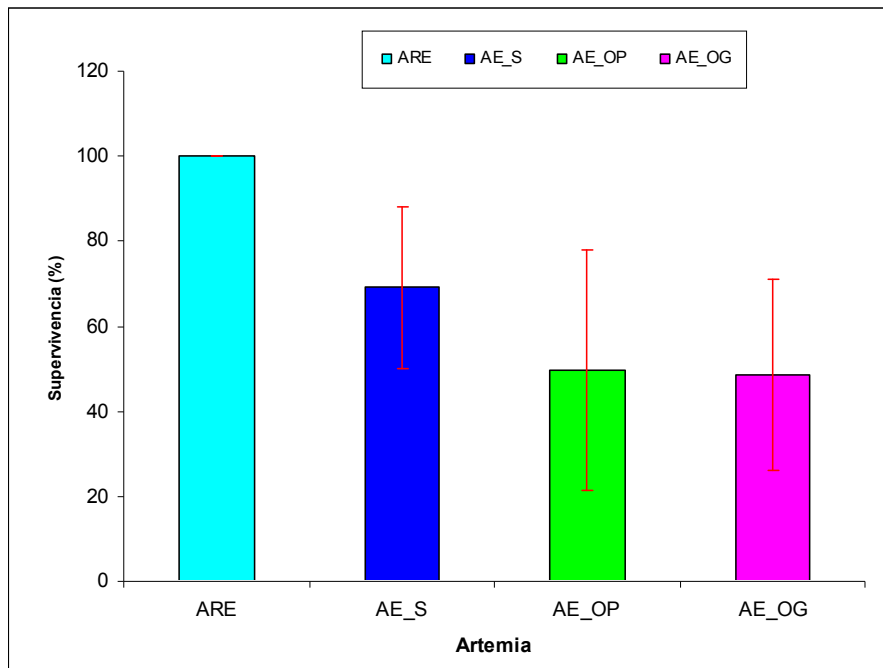


Figura 6: Tasa de supervivencia de *Artemia* (ARE) enriquecida con Selco, Ori-Green y Ori-Prot.

#### Tarea 1.3.2.6. Enriquecimiento de *Artemia* con emulsiones experimentales

Continuando con las tareas desarrolladas sobre el engorde de *Artemia*, se han desarrollado diferentes experiencias de formulación y testado de enriquecedores experimentales para *Artemia*, evaluando su efecto sobre la mejora del valor nutricional y supervivencia de la misma .

#### Metodología

Los protocolos de producción de *Artemia* siguen la metodología ya descrita en informes previos para la producción de *Artemia* en criaderos marinos y que sigue un protocolo regular en el ICCM. Incluye, hidratación de cistes; descapsulación, conservación en salmuera; eclosión, engorde y enriquecimiento.

Con el fin de evaluar un mayor número de enriquecedores en diferentes series se ha construido un sistema que incluye el uso de recipientes troncocónicos de 4 L de capacidad en un tanque de 500 L.

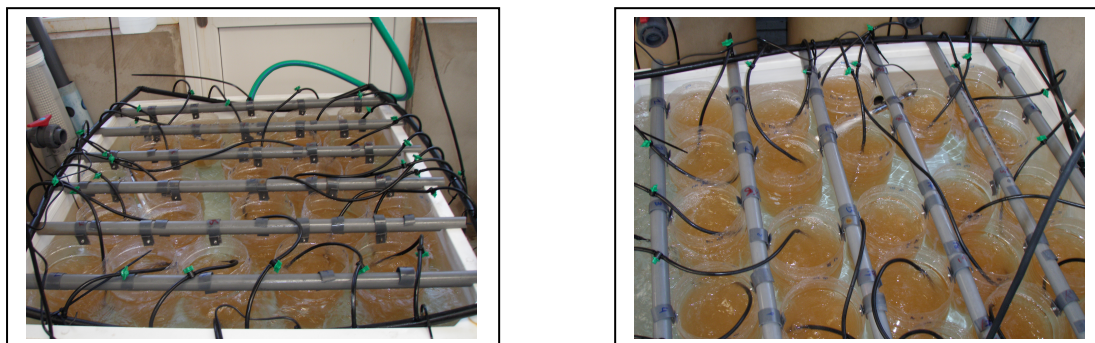


Fig. 7: Recipientes de 4 litros de capacidad.

El protocolo de enriquecimiento seguido de manera común para todas las emulsiones testadas fue el siguiente:

Se utilizaron tanques troncocónicos con un volumen de 4 litros donde se sembraron *Artemia* de diferentes edades a una concentración de 250.000 Nauplios/l manteniendo una temperatura de 28.0°C y oxígeno disuelto superior a 5 ppm.

Para las pruebas de enriquecimiento se utilizó *Artemia* de diferentes edades: A1= *Artemia* recién eclosionada; A2: *Artemia* 24 h y A3: *Artemia* 48h. El enriquecimiento se realizó por un periodo de 18 horas y a una concentración de 0,6g enrich/litro. Una vez transcurrido este periodo, se cosechó el contenido total de cada botella, lavando con agua del mar filtrada y esterilizada y contabilizando el n° de artemias vivas. Cada tratamiento se ensayó por triplicado, determinando la talla y supervivencia de *Artemia* diariamente.

#### Enriquecedores experimentales

La composición bioquímica de las presas aceptadas por las paralarvas de pulpo (Zoeas de centollas, Zoeas de cangrejos, mysis de camarones, copépodos, misidáceos, etc...) así como de las paralarvas recién eclosionadas, ha ofrecido importante información acerca de las necesidades nutricionales de la paralarva de pulpo. En particular, estas

primeras experiencias se han dirigido a modificar el contenido de ácido Araquidónico en la artemia enriquecida evaluando 5 niveles de ARA (0-15% TFA), en diferentes emulsiones experimentales y en diferentes estadios de desarrollo de la Artemia (48, 72 y 96 horas post eclosión).

## Resultados

Los resultados de estas experiencias demuestran que el tipo de enriquecedor no presentó un efecto significativo sobre las supervivencia de la *Artemia* independientemente de la edad: A1 (81-90%). A2 (51-60%) y A3 (40-55%). Sin embargo, se observa un marcado efecto de la edad de la *Artemia* sobre la supervivencia al proceso de enriquecimiento, cayendo desde una media de 85% en la A1 hasta 45% en la A3.

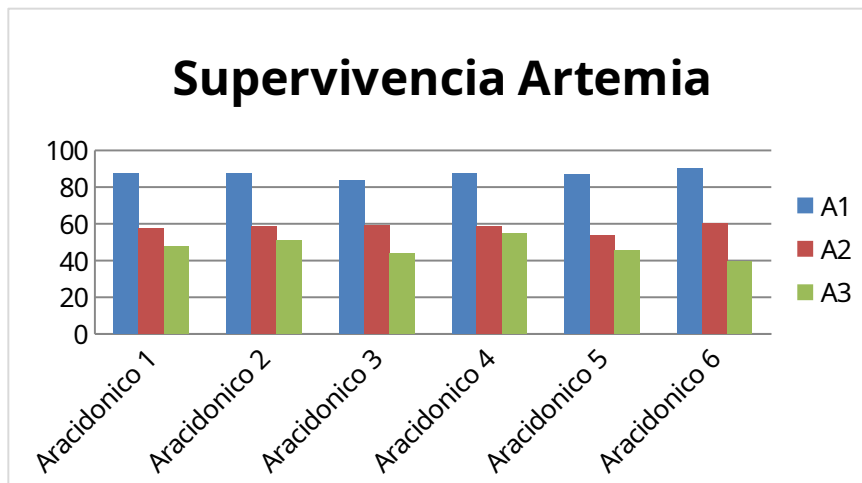


Figura 8: Supervivencia de la *Artemia* enriquecida con niveles crecientes de ARA (A1: Artemia0+18h enrich; A2: Artemia 24 h+18h enrich; A3: Artemia 48h+18h enrich)

Del mismo modo, se puede observar que el tipo de enriquecedor no presentó un efecto significativo sobre el crecimiento de la *Artemia*. Que se incremento de la misma forma en todos los enriquecedores testados desde 720 micras al eclosionar hasta 890 micras en la *Artemia* A3.

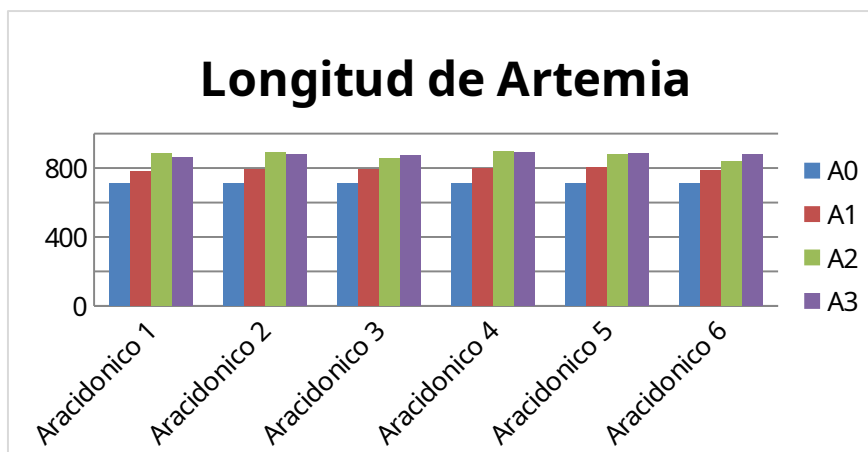


Figura 9: Crecimiento de la Artemia Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

### Tarea 1.3.3. Cultivo de paralarvas.

Se realizó una experiencia de cultivo larvario en condiciones intensivas donde se ha evaluado el efecto de los diferentes enriquecedores experimentales anteriormente mencionados.

Para determinar con mayor exactitud el efecto sobre la supervivencia final se ha utilizado un protocolo de siembra donde se han contado individualmente el nº de paralarvas iniciales sembrados (2000 indiv / tanque) a las que se les ha suministrado *Artemia* enriquecida a una densidad de 0.5 *Artemia*/ml . Cada dieta se ha evaluada por triplicado, en tanques de 200 litros, con fotoperiodo 12 h luz - 12 h oscuridad. La *Artemia* se ha suministrado 2 veces al día manteniendo la renovación en un 50% diario. Diariamente se ha sifonado el fondo de los tanques para evaluar la mortalidad. Se han recogido muestras para análisis bioquímico al comienzo y final del periodo de experimentación y se ha determinado el peso húmedo y seco de paralarvas recién eclosionadas y en los momentos de control en muestras de 15 paralarvas/ tanque. Para realizar esta medida las paralarvas se mantendrán 5 minutos en papel secante antes de su pesado. Para determinar el peso seco, estas mismas paralarvas se mantendrán 24 horas en la estufa a 100°C, o hasta peso constante. Igualmente se han determinado la longitud Total, Longitud del Manto y anchura del manto los días 0, 10 y 15.

El efecto del enriquecimiento no ha aportado un resultado concluyente, puesto que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. Es de destacar la elevada mortalidad larvaria durante los primeros 15 días de cultivo registrándose más del 70% de las bajas independientemente del tratamiento en los primeros diez días de cultivo.

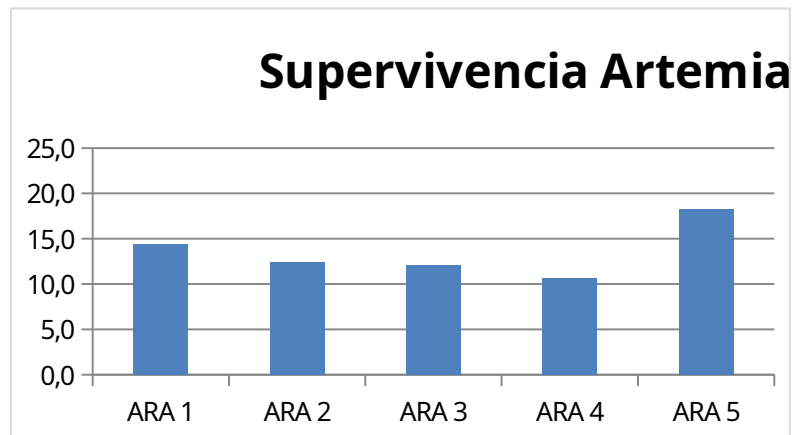


Figura 10. Supervivencia final (15dah) de las paralarvas de pulpo alimentadas con Artemia Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

No se detectaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros morfológicos evaluados.

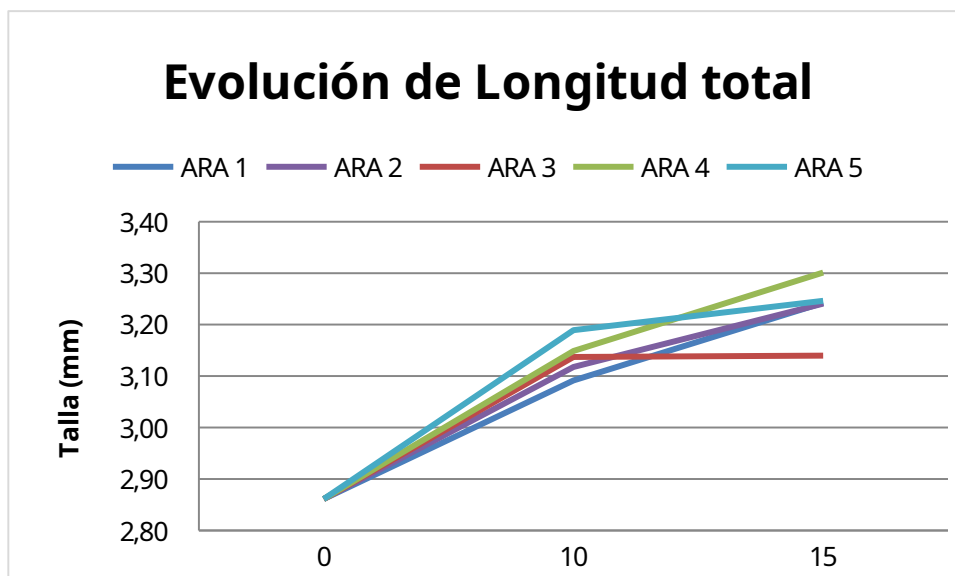




Figura 11. Evolución de la Talla total de las paralarvas de pulpo alimentadas con *Artemia* Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

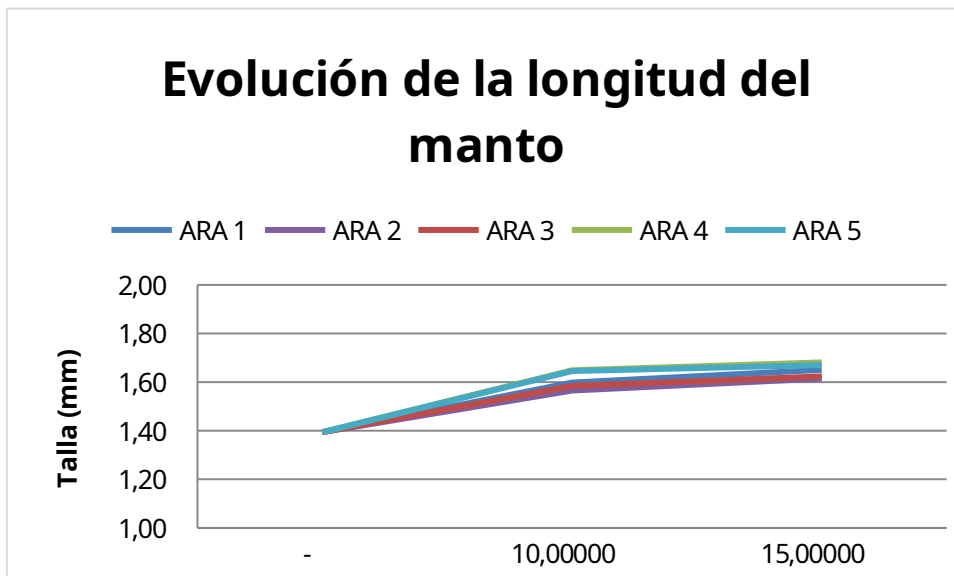


Figura 12. Evolución de la Longitud de Manto de las paralarvas de pulpo alimentadas con *Artemia* Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

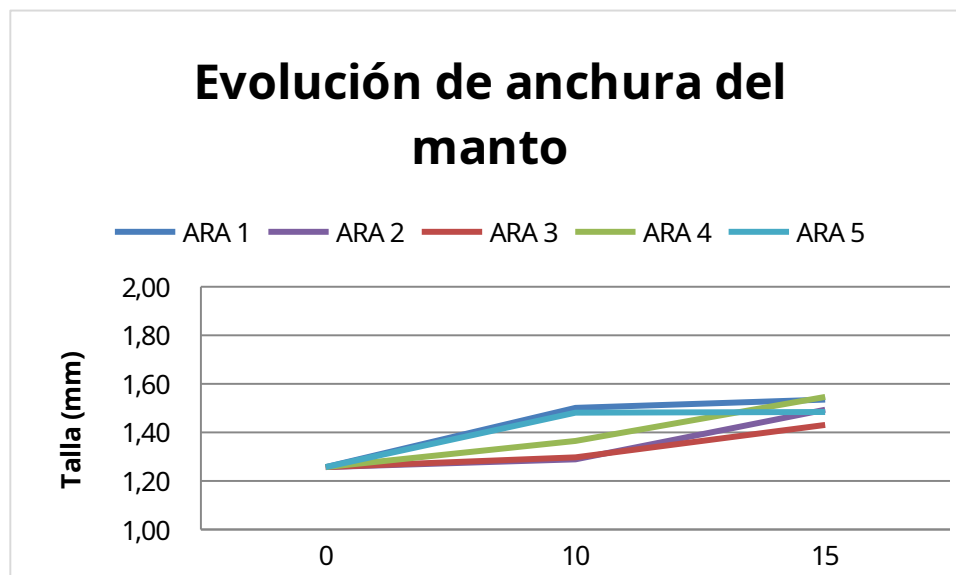


Figura 13. Evolución de la Anchura del Manto de las paralarvas de pulpo alimentadas con *Artemia* Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

Los análisis bioquímicos e histológicos de *Artemia* y paralarvas recogidas están actualmente en desarrollo.

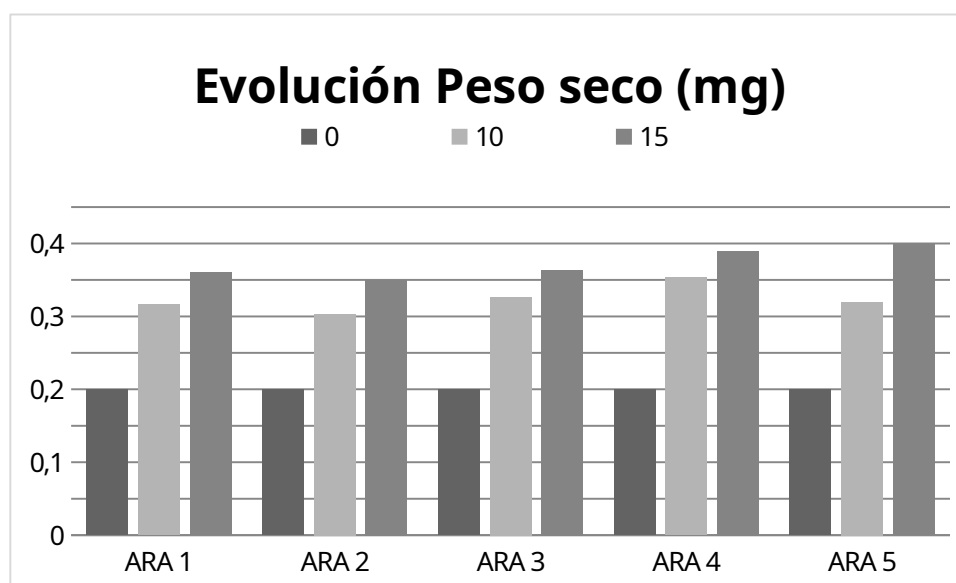


Figura 14. Evolución del peso seco de las paralarvas de pulpo alimentadas con *Artemia* Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

### **Tarea 1.3.5. Análisis bioquímica de *Artemia* enriquecidas y paralarvas**

#### **1.3.5.1. Composición bioquímica de los productos empleados en el engorde de *Artemia* y de la *Artemia* engordada:**

##### **a) Productos: *Tetraselmis sp.*, y Ori-Culture**

Se han encontrado diferencias significativas en el contenido de lípidos totales y proteínas de *Tetraselmis sp.*, y Ori-Culture ( $P < 0,05$ ) (Tabla VI). Así, el porcentaje de lípidos y proteínas de Ori-Culture, fue de  $23,07 \pm 0,05\%$  y  $59,88 \pm 0,01\%$  respectivamente, mientras que en el caso de *Tetraselmis sp.* fueron significativamente más bajos en ambos casos, con un valor de  $14,83 \pm 0,06\%$  y  $41,85 \pm 0,02\%$  en el contenido de lípidos totales y proteínas respectivamente.

**Tabla VI:** Contenido y porcentaje de la fracción orgánica en Ori-Culture y *Tetraselmis*. Las proteínas y los lípidos están expresados en (% de peso seco). Los datos representan medias ( $n=3$ ) y desviación típica

	Humedad (%)	Lípidos totales (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
ORI-Culture	5,87 ± 0,56 <sup>a</sup>	23,07 ± 0,05 <sup>a</sup>	59,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,07 <sup>a</sup>
Tetraselmis sp.	6,78 ± 0,03 <sup>b</sup>	14,83 ± 0,06 <sup>b</sup>	41,85 ± 0,02 <sup>b</sup>	15,22 ± 0,04 <sup>b</sup>

**b) *Artemia* engordada con ORI-Culture y *Tetraselmis sp.* :**

En la tabla siguiente (Tabla VII) se muestran los resultados de análisis de la fracción orgánica de *Artemia* cultivada con Ori-Culture y Tetraselmis.

**Tabla VII:** Contenido y porcentaje de la fracción orgánica en *Artemia* cultivada con Ori-Culture y *Tetraselmis sp.*

	Humedad (%)	Lípidos totales (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
ARE	87,74 ± 0,68	17,88 ± 0,51	56,96 ± 0,04	0,85 ± 0,09
Art_Ori-C 48H	84,75 ± 0,24 <sup>a</sup>	18,35 ± 0,03 <sup>a</sup>	59,18 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,02 <sup>a</sup>
Art_Tetra 48H	87,65 ± 0,67 <sup>b</sup>	22,43 ± 0,09 <sup>b</sup>	57,72 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,02 <sup>b</sup>
Art_Ori-C 72H	84,04 ± 1,10 <sup>a</sup>	17,05 ± 0,24 <sup>a</sup>	61,88 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,02 <sup>a</sup>
Art_Tetra 72H	86,78 ± 0,1 <sup>b</sup>	18,44 ± 0,36 <sup>b</sup>	58,19 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>b</sup>
Art_Ori-C 96H	84,74 ± 0,21 <sup>a</sup>	16,47 ± 0,47 <sup>a</sup>	64,97 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,05 <sup>a</sup>
Art_Tetra 96H	86,29 ± 0,07 <sup>b</sup>	18,12 ± 0,23 <sup>b</sup>	58,83 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,05 <sup>b</sup>

En general, la *Artemia* reflejó la composición bioquímica de la dieta en proteínas. Así, la *Artemia* cultivada con Ori-Culture presentaron el mayor contenido de proteínas. Sin embargo, la *Artemia* cultivada con *Tetraselmis sp.* fué la que presentó un contenido significativamente más alto de lípidos entre los dos grupos (P<0,05).

**1.3.5.2. Composición bioquímica de los productos empleados y de la *Artemia* enriquecida con emulsiones comerciales**

**a) Enriquecedores comerciales: SELCO, ORI-Green, ORI-Prot**

La tabla siguiente, muestra la composición bioquímica proximal de los diferentes productos testados (Tabla VIII). Los resultados muestran que el porcentaje de los lípidos totales del Selco es significativamente más alto que el de ORI-Green y ORI-Prot, respectivamente (P<0,05). Mientras que, el Ori-Green tiene el porcentaje en proteínas significativamente más alto, seguido por el Ori-Prot y el Selco (P<0,05), En cuanto al

contenido de cenizas, los tres productos también presentan una composición significativamente diferente.

**Tabla VIII:** Contenido y porcentaje de la fracción orgánica en los enriquecedores de *Artemia*. Las proteínas y los lípidos están expresados en (% de peso seco)

	Humedad (%)	Lípidos totales (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
SELCO	33,35 ± 0,23 <sup>a</sup>	91,65 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>a</sup>
ORI-Green	5,03 ± 0,07 <sup>b</sup>	36,91 ± 0,06 <sup>b</sup>	58,04 ± 0,06 <sup>b</sup>	10,85 ± 0,04 <sup>b</sup>
ORI-Prot	5,24 ± 0,13 <sup>b</sup>	29,4 ± 0,07 <sup>c</sup>	43,83 ± 0,03 <sup>c</sup>	6,65 ± 0,03 <sup>c</sup>

**b) *Artemia* enriquecida con emulsiones comerciales**

Los resultados relativos a los perfiles de lípidos y proteínas de *Artemia* recién eclosionada y *Artemia* cultivada 96 horas con Ori-Culture, ambos enriquecidas 24 horas con los diferentes productos citados se muestran en la tabla (Tabla XIX):

**Tabla XIX:** Contenido y porcentaje de la fracción orgánica de la *Artemia* enriquecida. Las proteínas y los lípidos están expresados en (% de peso seco)

	Humedad (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
ARE	87,74 ± 0,68	17,88 ± 0,51	56,96 ± 0,04	0,85 ± 0,09
Artemia recién eclosionada enriquecida 24 horas (1er día.....día 10)				
AE_S 24H	73,42 ± 0,02 <sup>a</sup>	16,69 ± 0,14 <sup>a</sup>	57,42 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,72 ± 0,07 <sup>a</sup>
AE_OG 24H	88,79 ± 0,07 <sup>b</sup>	16,56 ± 0,21 <sup>a</sup>	64,79 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,51 ± 0,02 <sup>b</sup>
AE_OP 24H	89,24 ± 0,1 <sup>c</sup>	12,92 ± 0,37 <sup>b</sup>	64,11 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,51 ± 0,08 <sup>b</sup>
Artemia cultivada 96 horas en Ori-Culture y enriquecida 24 horas (Día 10.....día 20)				
AC-OC_ES	82,77 ± 0,18 <sup>a</sup>	23,24 ± 0,27 <sup>a</sup>	51,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,05 <sup>a</sup>
AC-OC_EOG	84,76 ± 0,26 <sup>b</sup>	12,53 ± 0,3 <sup>b</sup>	60,11 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,59 ± 0,07 <sup>b</sup>
AC-OC_EOP	84,59 ± 0,32 <sup>b</sup>	14,74 ± 0,36 <sup>c</sup>	67,24 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,49 ± 0,07 <sup>c</sup>

De forma general, en la *Artemia* de 24h enriquecida, se ha observado un aumento significativo (P<0,05) en el porcentaje de proteínas con respecto a la *Artemia* recién eclosionada enriquecida con los tres productos. Siendo este valor más elevado en el caso de la *Artemia* enriquecida con Ori-Green y Ori-Prot respecto al Selco. También, se puede ver una disminución significativa (P<0,05) en el porcentaje de lípidos totales de

las *Artemia* de los tres grupos, siendo más elevada en el caso de *Artemia* enriquecida con Ori-Prot.

En el caso de *Artemia* cultivada con Ori-Culture 96h y enriquecida 24h con los tres productos, también se han observado diferencias significativas en el porcentaje de lípidos totales y proteínas entre los tres grupos. La *Artemia* (**AC-OC\_EOP**) es la que presenta el mayor contenido en proteínas con  $67,24 \pm 0,04$  %, y la *Artemia* (**AC-OC\_ES**) es la que presenta el mayor contenido en lípidos totales.

### **Tarea 1.3.5.3. Análisis bioquímico de paralarvas**

En este apartado se presentan los resultados de análisis bioquímico de paralarvas alimentados con *Artemia* enriquecida con emulsiones experimentales (ARA1, ARA2, ARA3, ARA4, ARA5)

#### Metodología

Las muestras recogidas al acabar el experimento se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. La elevada mortalidad limitó los análisis a humedad y lípidos totales. La humedad se calculó mediante desecado de la muestra a  $105^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante (AOAC, 2005). Los lípidos fueron extraídos mediante el método Folch *et al.* (1957) y posteriormente fueron metilados según Christie (1982). Los ácidos grasos obtenidos identificados mediante cromatografía de gases bajo las condiciones descritas por Izquierdo *et al.* (1992)

#### Resultados

Los resultados de perfil lipídico de las larvas alimentadas con diferentes niveles de ARA en la *Artemia*, mostraron que en todos los casos hay un claro aumento del contenido lipídico en las paralarvas. En particular, se detecta un ascenso de ácidos grasos monoinsaturados y en particular el ácido oleico, lo cual se correlaciona con el perfil lipídico de la *Artemia* enriquecida. Respecto al contenido de n-3 y n-3 HUFA no se ha podido establecer un patrón claro entre el contenido observado en las larvas y el suministrado en la dieta. De la misma manera el contenido de ARA en las larvas tampoco sigue un patrón fijo que se correlacione con el contenido de este en la *Artemia*, si bien en todos los casos se observa una reducción de ARA respecto al contenido inicial en las paralarvas.

**Tabla X:** Lípidos totales (en % de peso seco) y perfil de los ácidos grasos de las paralarvas de pulpo común alimentadas con niveles crecientes de ARA durante 15 días.

	<b>Eclosión</b>	<b>0% ARA</b>	<b>5% ARA</b>	<b>7.5% ARA</b>	<b>12.5% ARA</b>	<b>15% ARA</b>
<b>Lípidos (PS)</b>	<b>14.04</b>	<b>25.23</b>	<b>28.08</b>	<b>22.04</b>	<b>25.97</b>	<b>24.34</b>
<b>ΣSaturados</b>	31.29	25.79	44.29	42.94	29.35	42.83
<b>ΣMonoinsaturados</b>	22.28	32.79	39.48	26.84	26.65	28.51
<b>Σn-3</b>	27.05	29.35	6.89	18.81	29.71	17.07
<b>Σn-6</b>	11.76	8.85	5.47	7.43	11.26	7.85
<b>Σn-9</b>	18.78	22.77	26.55	17.45	17.32	17.36
<b>Σn-3HUFA</b>	26.16	16.22	2.36	12.25	17.24	9.11
<b>14:0</b>	1.27	0.68	1.16	1.23	0.95	1.08
<b>16:0</b>	24.78	14.96	25.37	23.87	16.54	23.34
<b>16:1 n-7</b>	0.44	1.50	1.79	1.57	1.75	1.51
<b>18:0</b>	4.68	9.26	16.42	16.61	10.89	17.15
<b>18:1 n-9</b>	13.27	21.98	25.49	16.59	16.62	16.45
<b>18:1 n-7</b>	1.65	5.31	6.53	4.12	4.40	5.37
<b>18:2 n-6</b>	2.54	5.04	3.69	4.79	5.71	3.53
<b>18:3 n-3</b>	0.45	12.32	4.21	5.15	11.07	7.20
<b>20:1 n-9</b>	4.68	0.20	0.27	0.19	0.18	0.22
<b>20:4n-6</b>	6.81	2.41	0.83	1.74	4.36	3.08
<b>20:5n-3</b>	8.68	5.67	0.68	3.75	5.13	2.83
<b>22: 6n-3</b>	14.31	8.50	1.06	7.28	10.51	5.29
<b>DHA/22:5 n-6</b>	21.23	18.42	17.25	35.63	29.38	25.82
<b>EPA/ARA</b>	1.31	2.35	0.82	2.16	1.18	0.92
<b>DHA/EPA</b>	1.65	1.50	1.57	1.94	2.05	1.87
<b>DHA/ARA</b>	2.14	3.52	1.28	4.18	2.41	1.71
<b>oleico/DHA</b>	0.94	2.59	23.96	2.28	1.58	3.11
<b>oleico/n-3HUFA</b>	0.51	1.35	10.79	1.35	0.96	1.80
<b>n-3/n-6</b>	2.31	3.32	1.26	2.53	2.64	2.17

### Discusión

El contenido de ácido araquidónico (%) en los ácidos grasos totales está comprendido entre 2,4 y 9,6 en el pulpo silvestre (Estefanell *et al.* 2011; Sinanoglou y Miniadis-

Meimaroglou, 1998). En nuestro trabajo este valor fue 6,6 % en las paralarvas (recién eclosionadas).

En general, la necesidad de ácido araquidónico ha sido principalmente relacionado con las reacciones estresantes en los peces (Sargent *et al.*, 1999; Bessonart *et al.*, 1999; Koven *et al.*, 2001). En el presente estudio, la disminución observada en los valores de n-3 HUFA de las paralarvas enriquecidas con ARA, fue contrarrestada con un incremento en el grupo de ácidos grasos 18:1. Resultados similares fueron observados en un estudio realizado en paralarvas de *Octopus vulgaris* alimentadas con una dieta deficiente en n-3 HUFA (Navarro y Villanueva, 2003).

### Conclusiones

Los resultados de ácidos grasos no muestran una relación clara entre dieta y paralarva, por lo tanto no es posible establecer conclusiones sobre este apartado.

### Referencias

- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M.M., Fernandez-Palacios, H., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179, 265–275.
- Estefanell J., Socorro J., Tuya F., Izquierdo M., Roo J. 2011c. Growth, protein retention and biochemical composition in *Octopus vulgaris* fed on different diets based on crustaceans and aquaculture by-products. *Aquaculture*, 322-323, 91-98. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.09.027
- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weis, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid 20:4n-6 on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107–122.
- Navarro, J.C. y Villanueva, R., 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*. 219: 613–631.
- Sargent, J., Bell, G., McEnvoy, L., Tocher, D., Estévez, A., 1999. Recent development in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191–199.
- Sinanoglou, V.J., Miniadis-Meimaroglou, S., 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Res. Int.* 31, 467–473.

### **Tarea 1.3.6. Análisis histológicos de paralarvas.**

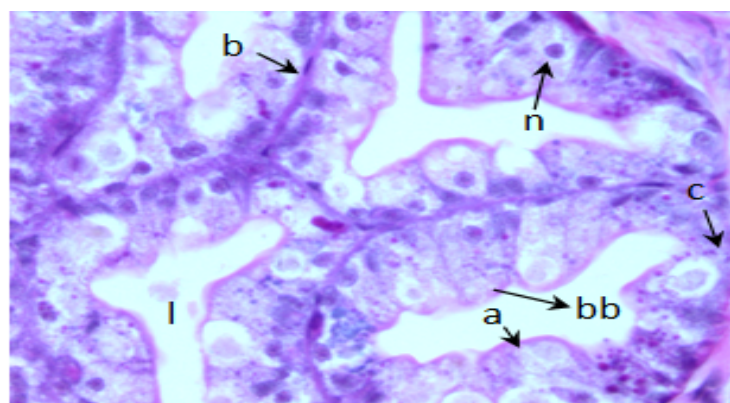
En este apartado se presentan los resultados de análisis histológico de paralarvas alimentados con *Artemia* enriquecida con emulsiones experimentales (ARA1, ARA2, ARA3, ARA4, ARA5)

#### **Metodología**

Las paralarvas fueron fijadas en parafina y teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E), (Martoja y Pearson, 1970) para su evaluación visual.

#### **Resultados**

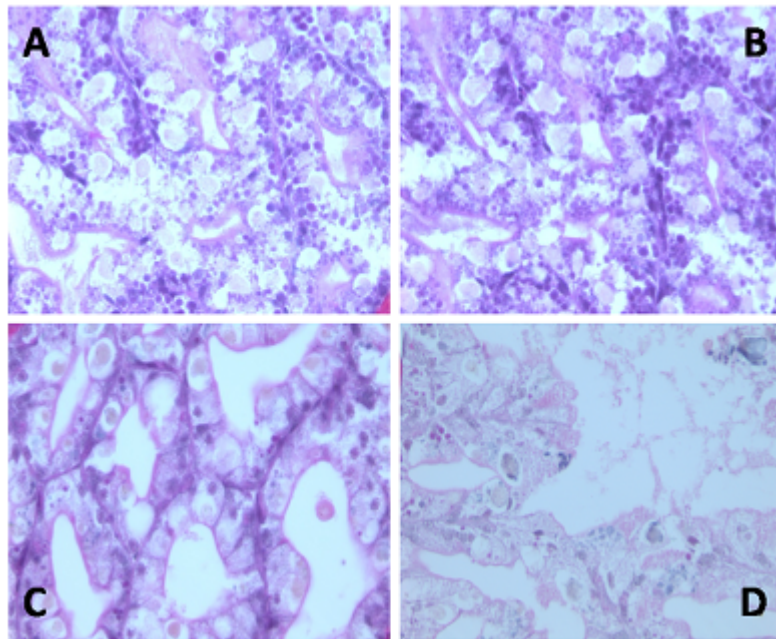
Las secciones histológicas a nivel de la glándula digestiva mostraron una membrana basal sobre la cual se observaban un epitelio monoestratificado con células cúbicas, caracterizadas por abundante presencia de vacuolas. Las células poseen un núcleo grande (n) y redondo, generalmente en posición centro-basal. El citoplasma presenta una gran heterogeneidad, debido a la presencia de abundantes regiones con vacuolas. Fundamentalmente grandes vacuolas de color pardo (bb), denominadas vacuolas marrones de excreción, (Boucher-Rodoni, 1976; Budelmann *et al.*, 1997) y pequeñas vacuolas altamente eosinófilas (va), determinadas como vacuolas de actividad enzimática, asociadas a la digestión y absorción, en particular nos centramos en evaluar estas últimas (Fig. 15).





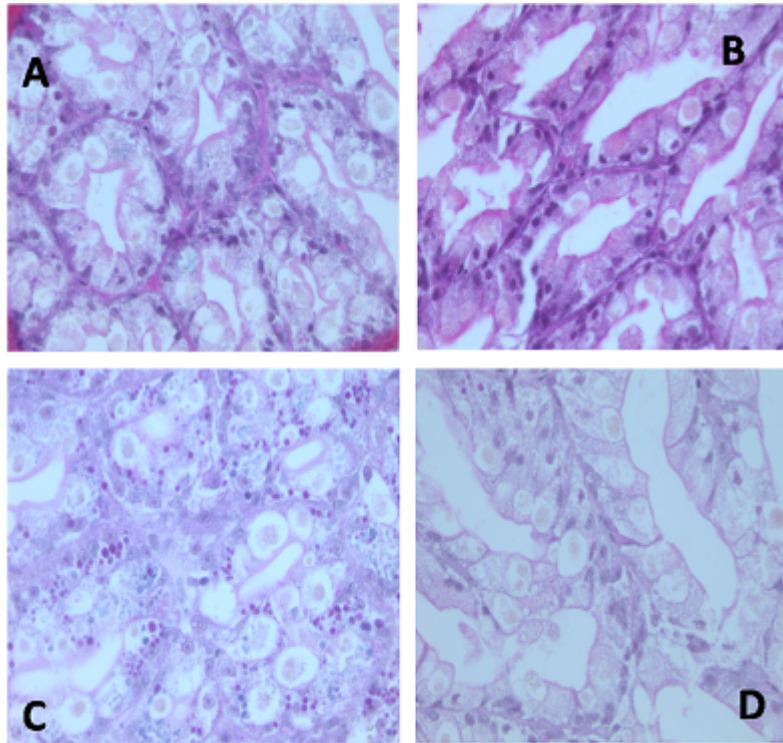
**Figura 15:** Características del tejido. a, vacuolas apicales; b, membrana basal; bb, vacuolas marrones de excreción; ve, vacuolas enzimáticas; va, vacuolas absorción; c, citoplasma; l, lumen; n, núcleo, H&E.

Las larvas recién eclosionadas no presentaban presencia de vacuolas para la digestión. Las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con 0% ARA a día 10 mostraron una baja presencia de vacuolas eosinófilas de absorción, mientras que en el día 15 esta presencia era nula. Se observaron presencia de degeneración en larvas de 15 días (Figura 16).



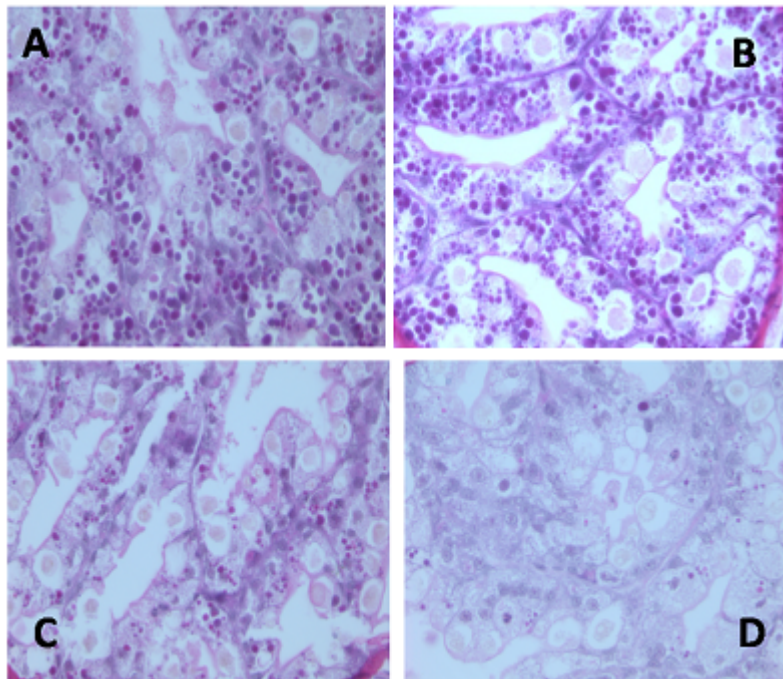
**Figura 16:** Glándula digestiva en paralarvas alimentadas con *Artemia* 0 % ARA. A-B: Día 10, C-D: Día 15.

Las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con 5% ARA en día 10 y día 15, mostraron una casi nula presencia de vacuolas eosinófilas de digestión (Figura 17).



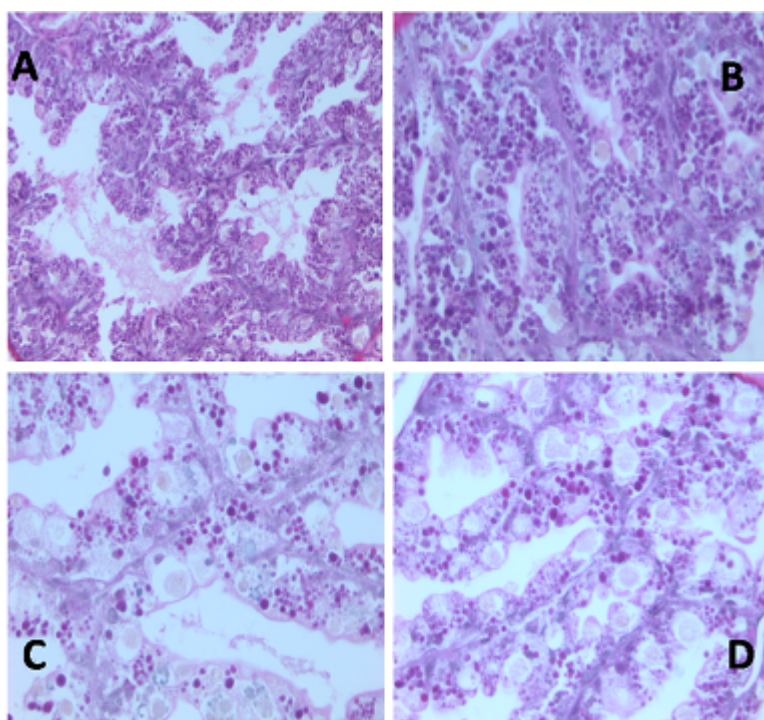
**Figura 17:** Glándula digestiva en paralarvas alimentadas con artemia 5 % ARA. A-B: Día 10, C-D: Día 15.

Las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con 7,5% ARA en día 10 mostraron una elevada presencia de vacuolas eosinófilas de digestión, mientras que en el día 15 esta presencia era casi nula (Figura 18).



**Figura 18:** Glándula digestiva en paralarvas alimentadas con artemia 7,5 % ARA. A-B: Día 10, C-D: Día 15.

Las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con 12,5% ARA en día 10 mostraron una muy elevada presencia de vacuolas eosinófilas. El número de vacuolas disminuyó el día 15, aunque seguía existiendo una elevada presencia de las mismas (Figura 19).



**Figura 19:** Glándula digestiva en paralarvas alimentadas con *Artemia* 12,5 % ARA. A-B: Día 10, C-D: Día 15.

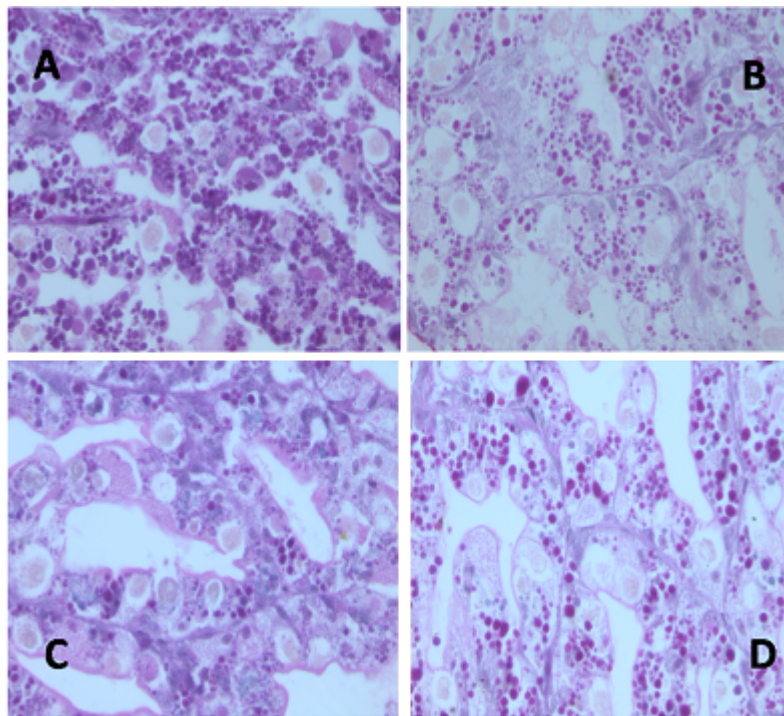
Las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con 15% ARA en día 10 mostraron una elevada presencia de vacuolas eosinófilas de digestión. El número de vacuolas disminuyó el día 15, aunque seguían siendo abundantes (Figura 20).

#### Discusión

En general se ha observado la carencia de vacuolas enzimáticas (fuertemente acidófilas) en las paralarvas recién eclosionadas, generalmente asociadas a la digestión (Boucher-Rodoni, 1976; Budelmann *et al.*, 1997). En contraste, se ha observado un incremento en el tamaño y número de vacuolas en las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida

con ácido araquidónico, que sin embargo han disminuído tras 15 días de cultivo, con respecto al mismo tratamiento el día 10.

Se puede comprobar un elevado número de vacuolas eosinófilas el día 10, en los tratamientos con un 7,5 12,5 y 15% de ARA, superior al observado en las larvas de la misma edad con menor proporción de ARA (0 y 5%). Por otro lado, solo los tratamientos 12,5% y 15% mostraron una elevada presencia de vacuolas enzimáticas en el día 15. Estos resultados podrían indicar que a partir de 7,5% de ARA en *Artemia*, se incrementa la capacidad de digestión y absorción de las paralarvas, incluso a las dos semanas de vida, etapa altamente crítica para esta especie.



**Figura 20:** Glándula digestiva en paralarvas alimentadas con *Artemia* 15 % ARA. A-B: Día 10, C-D: Día 15.

### Conclusiones

El aumento de vacuolas digestivas en paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con 12,5% y 15% de ARA a día 15 de cultivo sugiere que el ARA favorece la fisiología digestiva de esta especie.

### Referencias

- Boucher-Rodoni, R. 1976. Etude histologique du tube digestif de deux Céphalopodes, *Eledone cirrosa* (Octopoda) et *Illex illecebrosus* (Teuthoidea), au cours de la digestión.
- Budelmann, B. U., Schipp, R. and von Boletzky, S. 1997. Cephalopoda. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, vol. 6A, *Mollusca II* (ed. F. W. Harrison and A. J. Kohn), pp. 119–414. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Weinheim:Wiley-Liss, Inc.
- Martoja, M. y Pearson, M.E. 1970. Técnicas de Histología Animal En: Toray-Masson, ed.Barcelona. pp 350.

**Línea 1.4.: Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presa *Artemia* y dietas inertes.**

Tarea 1.4.1.: Desarrollo y ensayo de micro-dietas inertes

De acuerdo al plan de trabajo inicial, durante la anualidad 2011 se han realizado las experiencias de formulación y desarrollo de microdietas para pulpo. En una segunda fase se han realizado los primeros test de estas microdietas en el cultivo larvario en condiciones intensivas. Al igual que en otras actividades en las que participa el grupo de Canarias-ICCM, la limitación en la obtención de paralarvas, ha limitado el desarrollo de una experiencia de cultivo larvario en esta línea de trabajo. Si bien, durante los meses de Julio/agosto la coordinación con el equipo de IEO-Vigo permitió la realización de un ensayo preliminar donde una microdieta formulada y elaborada e por el grupo de Canarias (MD Vigo) se testó en comparación con una dieta comercial (Genma Micra Skretting).

Las condiciones de este ensayo y resultados se presentaron conjuntamente con el equipo del IEO de Vigo.

En el caso de los ensayos realizados en Canarias, estos han empleado una metodología similar a la de las experiencias de alimentación exclusiva con *Artemia* evaluando el efecto de las mismas microdietas que se enviaron al Grupo de IEO-VIGO. El protocolo de cultivo se describe a continuación:

Para determinar con mayor exactitud el efecto sobre la supervivencia larvaria se ha utilizado un protocolo de siembra donde se han contado individualmente el nº de paralarvas iniciales sembradas (100 indiv / tanque) utilizando larvas de 30 días de edad.

Las paralarvas a las que se les ha suministrado artemia enriquecida a una densidad de 0.5 artemia/ml y 2 gramos de MD cada hora durante las horas de luz. Cada dieta se ha evaluado por cuadruplicado, en tanques de 200 litros, con fotoperiodo 12 h luz - 12 h oscuridad. La Artemia se ha suministrado 2 veces al día manteniendo la renovación en un 50% hora. Diariamente se ha sifonado el fondo de los tanques para evaluar la mortalidad. Se han recogido muestras para análisis bioquímico al comienzo y final del periodo de experimentación y se ha determinado el peso húmedo y seco de paralarvas recién eclosionadas y en los momentos de control en muestras de 15 paralarvas/ tanque. Para determinar el peso seco, estas mismas paralarvas se mantuvieron 24 horas en la estufa a 100°C, o hasta peso constante. Igualmente se han determinado la longitud Total, Longitud del Manto y anchura del manto los días 30 y 39.

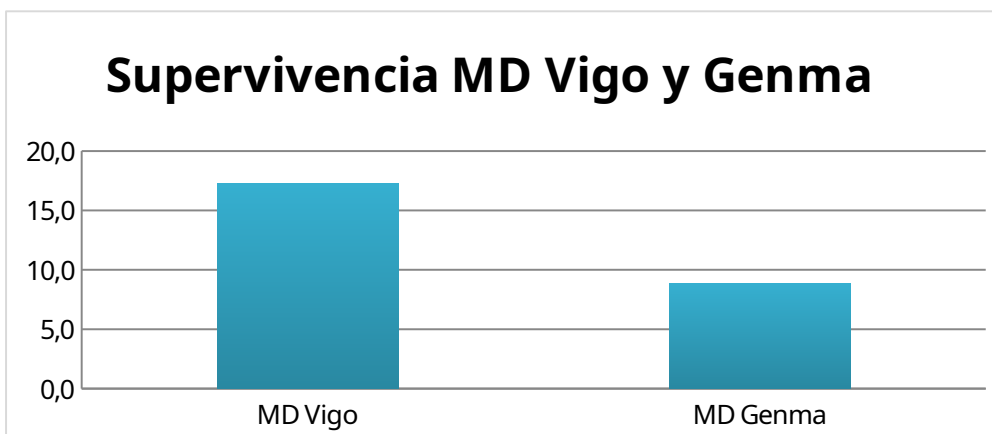


Figura 21. Supervivencia final de las paralarvas de pulpo alimentadas con Microdieta Vigo y Microdieta Genma.

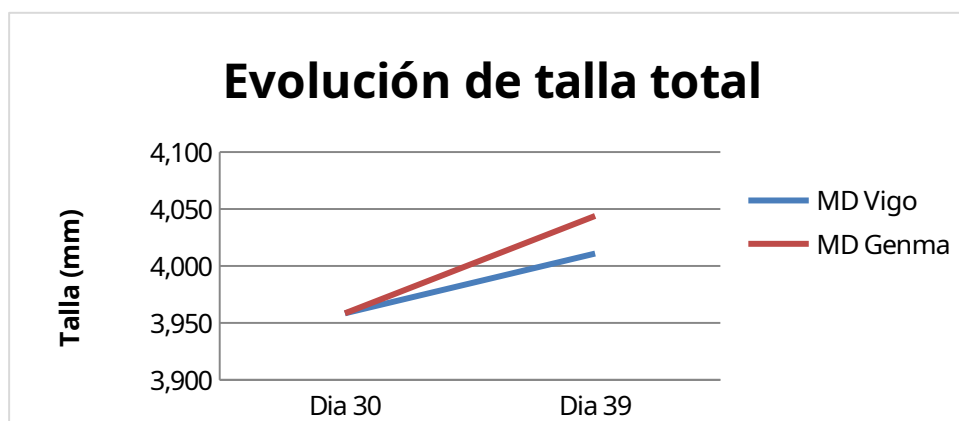


Figura 22. Evolución de la Talla total de las paralarvas de pulpo alimentadas con Microdieta Vigo y Microdieta Genma.

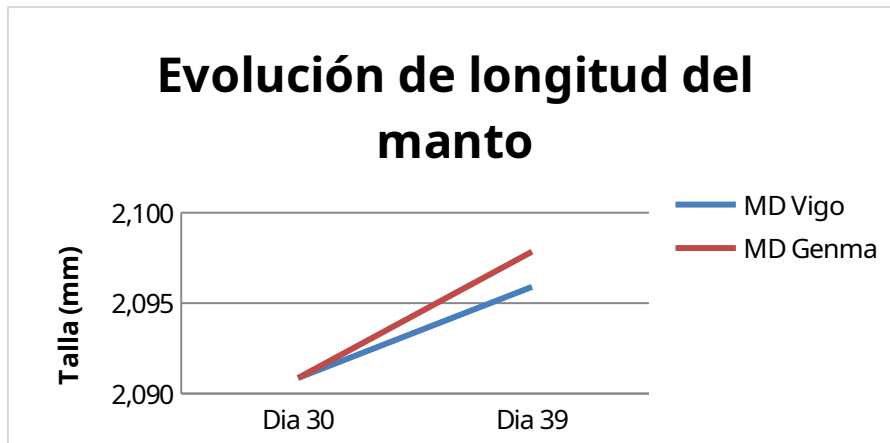


Figura 23. Evolución de la Longitud de Manto de las paralarvas de pulpo alimentadas con Microdieta Vigo y Microdieta Genma.



Figura 24. Evolución de la Anchura del Manto de las paralarvas de pulpo alimentadas con Microdieta Vigo y Microdieta Genma.

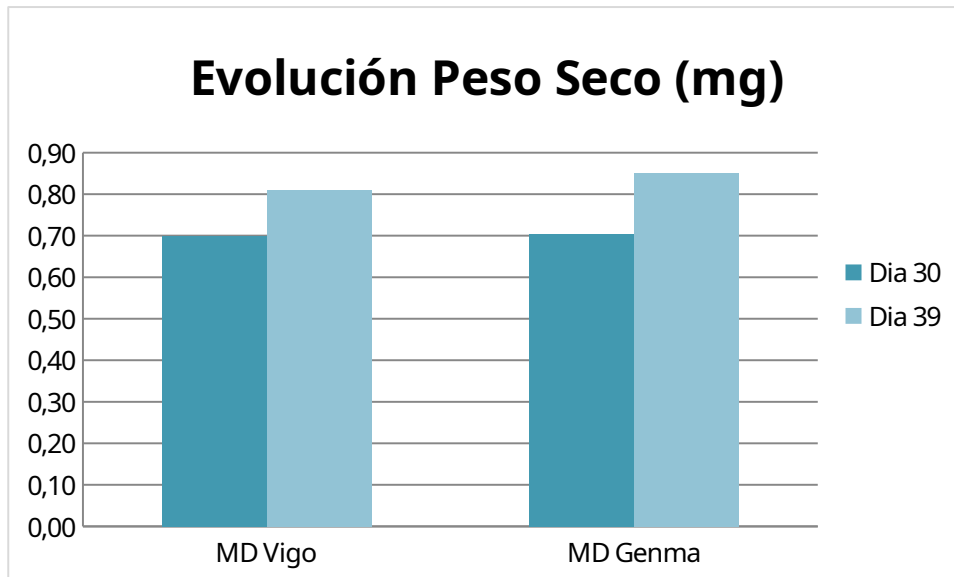


Figura 25. Evolución del peso seco (mg) de las paralarvas de pulpo alimentadas con Microdieta Vigo y Microdieta Genma.

Los primeros resultados de esta experiencia, demuestran que la MD experimental (MD Vigo) presentaron una mejor supervivencia larvaria en comparación con la MD comercial. Sin embargo esta relación se invierte sobre el efecto del crecimiento, lo cual se ha relacionado con una supervivencia en el caso de la MD comercial con aquellos ejemplares de mayor tamaño.



## **Línea 2.1. Requerimientos nutritivos del pulpo de roca.**

### **Crecimiento de pulpo *O. vulgaris* con dietas alternativas.**

#### Introducción

El pulpo común es una de las especies con gran potencial para diversificar la acuicultura marina (Vaz Pires *et al.*, 2004). El engorde de individuos salvajes en jaulas flotantes ha dado resultados prometedores (Rodríguez *et al.*, 2006; García García *et al.*, 2009). En Canarias, la gran expansión de la acuicultura en jaulas flotantes está generando una cierta cantidad de especies de descarte. Esto es, diversas especies de peces salvajes que se “cuelan” en las jaulas y permanecen ahí durante todo el ciclo de engorde comercial. Dichas especies se alimentan de pienso, lo que supone una pérdida de rentabilidad para las empresas. La especie de descarte más abundante es la boga *Boops boops* y parece tener una buena aceptación como dieta de pulpo común (Socorro *et al.*, 2005).

El objetivo del presente experimento es evaluar el efecto sobre el crecimiento y la mortalidad de diversas presas alternativas para pulpos. De este modo se ensayará durante 2 meses con 2 especies de cangrejo, suministrado sólo o incluyendo un 40% de boga de descarte, y con boga de descarte (entera y eviscerada)

#### Material y Métodos

El Cangrejo Blanco *Plagusia depressa* fue proporcionado fresco por pescadores locales, mientras que el *Portunus pelagicus* fue comprado congelado. Cada dieta se probó sobre 8 pulpos, mantenidos en compartimentos individuales de 200 l. La temperatura y oxígeno medio fue  $19.4 \pm 1.5^\circ\text{C}$  y  $6.9 \pm 0.5$  ppm respectivamente.

Las dietas fueron las siguientes:

1. Cangrejo azul *Portunus pelagicus*
2. Cangrejo azul *Portunus pelagicus* + Boga de descarte (60-40%)
3. Cangrejo Blanco *Plagusia depressa*
4. Cangrejo Blanco *Plagusia depressa* + Boga de descarte (60-40%)
5. Boga de descarte entera
6. Boga de descarte eviscerada

La evolución del peso se muestra en la Figura 26. Se calcularon los siguientes parámetros (Tabla XI): incremento de peso diario ( $\text{IPD} = (P_f - P_i) / t$ ) e ingesta diaria ( $\text{ID} = \text{AI} * 100 / (t * (P_f - P_i))$ ); donde “ $P_f$ ” es peso final, “ $P_i$ ” es peso inicial, “ $t$ ” es nº de días y “ $\text{AI}$ ” es alimento ingerido en g. La mortalidad, la temperatura y el oxígeno disuelto fueron se evaluaron diariamente.

Los piensos y los tejidos de pulpo (músculo y glándula digestiva) fueron analizados bioquímicamente siguiendo los criterios de la AOAC (1997): lípidos totales (Folch *et al.*, 1957), proteínas totales (método de Kjeldahl), humedad (peso constante a 105°C) y cenizas (combustión a 600°C). Los resultados, expresados en % de peso seco, se presentan en las Tablas XII y XIII.

**Tabla XI:** *Peso inicial, IDE, IPD e IC tras 8 semanas de cultivo*

	Cangrejo azul	Cangrejo azul+BD	Cangrejo blanco	Cangrejo blanco+BD	BD entera	BD eviscerada
Peso inicial (g)	1232±303	1145±167	1107±241	1185±281	1150±182	1182±258
ID (%/día)	4.0±0.8 <sup>c</sup>	3.6±0.2 <sup>bc</sup>	2.9±0.4 <sup>ab</sup>	2.7±0.4 <sup>a</sup>	2.4±0.6 <sup>a</sup>	2.4±0.5 <sup>a</sup>
IPD (g/día)	17.2±3.7 <sup>bc</sup>	23.7±8.7 <sup>c</sup>	14.0±3.4 <sup>abc</sup>	17.5±3.5 <sup>abc</sup>	12.0±5.5 <sup>ab</sup>	10.1±4.0 <sup>a</sup>
Supervivenc. (%)	100	100	100	87.5	100	87.5

### Resultados y Discusión

Los resultados de los parámetros evaluados en cada tratamiento se pueden ver en la tabla XI y la evolución de los pesos medios se refleja en la figura 26. En general las dietas que incluían *P. pelagicus* generaron una mayor ingesta respecto a los demás tratamientos. Sin embargo no hubo diferencias estadísticas en cuanto al crecimiento entre ninguna de las dietas que contenían crustáceos. Las dietas mixtas (crustáceo+boga de descarte) siempre generaron un crecimiento superior al crustáceo o la boga sólo, lo que pone de manifiesto que la combinación cangrejo-boga posiblemente cubra mejor los requerimientos nutricionales de esta especie (Cagneta y Sublimi, 2000; Biandolino *et al.*, 2009).

Los resultados de composición bioquímica de las dietas se reflejan en la tabla II. Ambas especies de cangrejo presentan casi el doble de proteínas que la boga de descarte, que a su vez presenta un mayor contenido lipídico, 8 veces superior a los cangrejos. Debido a que la boga eviscerada no mejoró el crecimiento respecto a la boga entera, se decidió no analizar dicha dieta por no aportar datos significativos de cara al engorde de pulpo. La estimación de ambas dietas mixtas refleja un perfil similar, con un contenido proteico y lipídico intermedio entre las monodietas de cangrejos y boga de descarte.

Finalmente, la composición bioquímica inicial de pulpos salvajes y final de los pulpos alimentados con las distintas dietas se muestran en la tabla III. La glándula digestiva refleja claramente el perfil lipídico de la dieta (Stowasser *et al.*, 2006; Fluckiger *et al.*,

2008). El aumento de lípidos del 23% de las dietas mixtas al 47% de la dieta de boga de descarte sola no aumentó significativamente el contenido lipídico de la glándula digestiva, lo que sugiere que el máximo de deposición de este órgano debe ser del 23% o inferior. Por otro lado, el aumento de proteínas en el músculo de los pulpos alimentados con dietas mixtas sugiere un efecto beneficioso de la grasa sobre el crecimiento, así como una buena utilización de los lípidos en esta especie, de acuerdo con lo observado en el Exp. 1 de la presente memoria.

**Tabla XII:** *Composición bioquímica (% peso seco) de las dietas empleadas y estimación de las dietas mixtas (60-40% cangrejo-boga)*

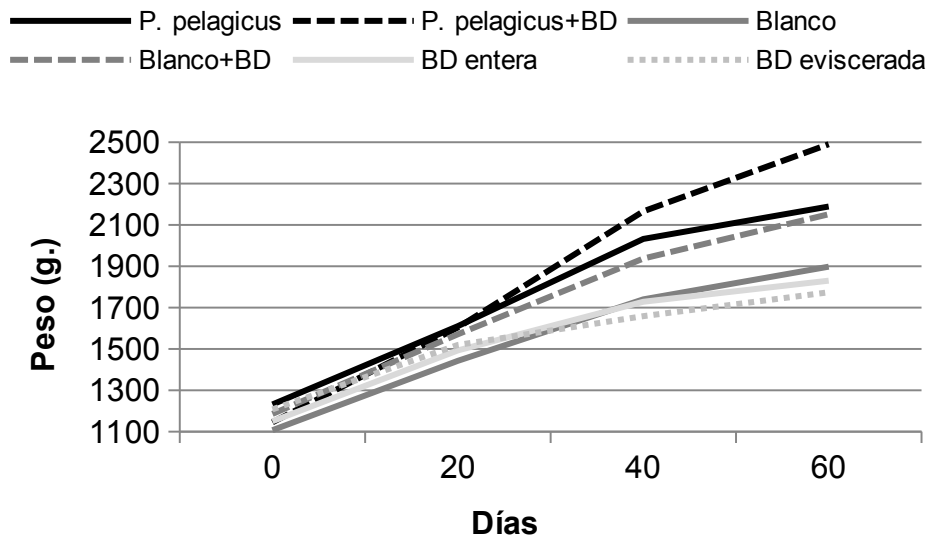
	Cangrejo azul	Cangrejo blanco	BD entera	Cangrejo azul+BD	Cangrejo blanco+BD
Lípidos	7.0±0.4 <sup>a</sup>	6.8±1.3 <sup>a</sup>	47.3±2.2 <sup>b</sup>	23.1	23.0
Proteínas	83.0±2.2 <sup>b</sup>	83.6±3.7 <sup>b</sup>	46.8±3.4 <sup>a</sup>	68.5	68.9
Humeda	79.4±1.5 <sup>b</sup>	76.4±0.9 <sup>b</sup>	63.0±2.8 <sup>a</sup>	72.8	71.0
d					
Cenizas	2.4±0.2	2.3±0.2	2.2±0.5	2.3	2.2

**Tabla XIII:** *Composición bioquímica (% peso seco) de los tejidos de pulpo*

	Salvajes (inicial)	Cangrejo azul	Cangrej o azul+B D	Cangrej o blanco	Cangrejo blanco+B D	BD entera	
Glándula digest.	Lípidos	21.5±4.8 <sup>a</sup>	19.5±0.6 <sup>a</sup>	45.6±4.4 <sup>b</sup>	25.6±1.8 <sup>a</sup>	48.2±3.9 <sup>b</sup>	45.5±6.1 <sup>b</sup>
	Proteínas	67.6±7.2 <sup>b</sup>	68.8±0.4 <sup>b</sup>	43.0±3.7 <sup>a</sup>	62.5±2.4 <sup>b</sup>	39.4±5.0 <sup>a</sup>	42.3±5.5 <sup>a</sup>
	Humeda	70.7±4.7 <sup>b</sup>	69.2±3.9 <sup>b</sup>	57.0±2.1 <sup>a</sup>	67.9±2.4 <sup>b</sup>	57.4±3.0 <sup>a</sup>	64.7±3.7 <sup>ab</sup>
	d						
Múscul	Cenizas	1.8±0.1	2.0±0.1	1.5±0.2	1.7±0.2	1.5±0.1	1.6±0.2
	Lípidos	5.5±0.2	5.7±0.2	5.4±0.3	5.8±0.3	5.1±0.6	4.8±0.8
	Proteínas	77.8±3.	78.3±0.	84.1±0.	78.0±3.	83.6±1.0 <sup>bc</sup>	81.3±1.

	2 <sup>a</sup>	9 <sup>ab</sup>	3 <sup>c</sup>	5 <sup>a</sup>		0 <sup>abc</sup>
Humeda	83.6±2.2	85.9±0.4	84.0±0.9	85.2±0.6	84.4±0.9	84.7±1.1
d						
Cenizas	1.8±0.1	1.6±0.1	1.7±0.0	1.7±0.2	1.6±0.1	1.7±0.0

Sorprendentemente, el cangrejo congelado generó mejores crecimiento que el cangrejo fresco local, motivo por el cual se utilizará en futuros experimentos como base de la dieta control. La boga de descarte, tanto entera como eviscerada, generó un crecimiento peor del esperado (Socorro *et al.*, 2005). Esto sugiere que el confinamiento podría tener un efecto negativo sobre el crecimiento cuando se suministran dietas basadas exclusivamente en pescado, a diferencia de dietas mixtas o basadas en crustáceos (Aguado Giménez and García García, 2002; García García and Cerezo Valverde, 2006)



**Fig. 26:** Evolución del peso a lo largo de 2 meses

#### Referencias bibliográficas

Aguado, F., García García, B., 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquacult. Int.* 10, 361–377.

Biandolino, F., Portacci, G., Prato, E., 2010. Influence of natural diet on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. *Aquacult Int* DOI 10.1007/s10499-010-9331-x

- Cagnetta, P., Sublimi, A., 2000. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C.) when fed on a monodiet. Recent advances in mediterranean aquaculture finfish species diversification. Cah Opt Medit 47, 331–336.
- Fluckiger, M., Jackson, G.D., Nichols, P., Virtue, P., Daw, A., Wotherspoon, S., 2008. An experimental study of the effect of diet on the fatty acid profiles of the European Cuttlefish (*Sepia officinalis*). Mar. Biol. 154, 363–372.
- García García, B., Cerezo Valverde, J., 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on growing. Aquaculture, 253: 502–511.
- García García, B., Cerezo Valverde, J., Aguado-Giménez, F., García García, J., Hernández, M., 2009. Growth and mortality of common octopus *Octopus vulgaris* reared at different stocking densities in Mediterranean offshore cages. Aquaculture Research 40, 1202–1212.
- Rodríguez, C., Carrasco, J.F., Arronte, J.C., Rodríguez, M., 2006. Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile on growing in floating cages. Aquaculture 254, 293–300.
- Socorro, J., Roo, J., Fernández-López, A., Guirao, R., Reyes, T., Izquierdo, M. 2005. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) alimentado exclusivamente con boga (Boops boops) de descarte de la acuicultura. X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía. Libro de Resúmenes, 428-429.
- Stowasser, G., Pierce, G.J., Moffat, C.F., Collins, M.A., Forsythe, J.W., 2006. Experimental study on the effect of diet on fatty acid and stable isotope profiles of the squid *Lolliguncula brevis*. J Exp Mar Biol Ecol 333, 97–114.
- Vaz-Pires, P., Seixas, P., Barbosa, A. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. Aquaculture 238, 221–238.

#### **Tarea 2.1.4. Determinación de la relación proteína-lípidos óptima**

##### Introducción

El engorde de pulpo común ha dado resultados prometedores en los últimos años, utilizando como dieta diferentes subproductos de la pesca y la acuicultura (García García *et al.*, 2009; Prato *et al.*, 2010; Estefanell *et al.*, 2011a). Sin embargo, un paso previo fundamental para la implementación del cultivo de esta especie es el desarrollo de una dieta comercial que cubra sus requerimientos nutricionales. En este sentido, varios autores han elaborado dietas semihúmedas obteniendo crecimientos similares a

los observados con dietas frescas troceadas (Rosas *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2008; Estefanell *et al.*, 2011b). En todos los casos se emplearon materias primas húmedas (filete de pescado, carne de cangrejo, etc.) que fueron aglutinados con diferentes compuestos comerciales. De hecho, el uso de estas dietas aglutinadas facilita el estudio de los requerimientos nutricional de esta especie, ya que permite incorporar diferentes nutrientes en las dietas para la realización de experimentos de nutrición

En el presente estudio se formularon 2 dietas basadas en filetes de boga salvaje con 2 niveles de lípidos. El contenido lipídico se obtuvo a partir de una mezcla de aceite de pescado, aceites purificados en DHA, EPA y ARA, y colesterol, de modo que presentase un perfil de ácidos grasos y colesterol similar al cangrejo (Prato *et al.*, 2010; Estefanell *et al.*, 2011a), la dieta natural de esta especie (Quetglas *et al.*, 1998).

### Material y Métodos

Los pulpos salvajes fueron capturados por pescadores profesionales de la Cofradía de Mogán (Sur de Gran Canaria) y transportados en tanques de 500 L hasta las instalaciones del ICCM. La aclimatación a condiciones de cultivo tuvo una duración de 2 semanas en tanques rectangulares de 2 m<sup>3</sup>, mantenidos en circuito abierto, provistos de guaridas (“T” de PVC) y malla de sombreo. Durante este período, los pulpos fueron alimentados con una dieta mixta de cangrejo *Portunus pelagicus* y boga *Boops boops*.

El sistema de cultivo utilizado durante este estudio fue de tipo individual en tanques compartimentados (Estefanell *et al.*, 2011a, 2011b). Cada tanque rectangular de aclimatación fue dividido en 4 compartimentos de 0.8x1x0.5 m, aprox. 0.4 m<sup>3</sup>, con malla negra de PVC de 1 cm de luz. Se seleccionaron 24 ejemplares macho (1062 ± 238 g), que fueron alojados individualmente en 6 grupos homogéneos de 4 pulpos por tanque. El sistema de cultivo fue en circuito abierto, manteniendo una renovación completa a la hora. En cada compartimento se incluyó una guarida (T de PVC) y cada tanque fue cubierto con malla de sombreo.

Se testaron 3 dietas, cada una suministrada en 2 tanques independientes (n = 8 pulpos por dieta). Las dietas fueron las siguientes:

1. Pienso de alto contenido lipídico (Pienso AL)
2. Pienso de bajo contenido lipídico (Pienso BL)
3. Dieta control: boga *Boops boops* subproducto de la acuicultura, fresca (BD)

Los piensos se basaron en filete de boga salvaje, al que se le añadieron diferentes niveles de varios aceites purificados en ARA, EPA y DHA, aglutinados con alginato y calcio (Cerezo Valverde *et al.*, 2008; Estefanell *et al.*, 2011b). La formulación empleada se muestra en la Tabla XIV.

Los pulpos fueron alimentados una vez al día (8:00 am) a saciedad (porciones individuales de 40-60 g, 5% de su peso diario) y los restos no ingeridos fueron retirados diariamente a las 13:00 y cada tanque sifonado para retirar las migas de pienso. Tanto los restos no ingeridos como las migas fueron secados hasta peso constante a 105° C para estimar la ingesta real y calcular el % de disgregación de cada dieta, que fue restado proporcionalmente de la ingesta de cada pulpo.

Al final del período de estudio (39 días) los pulpos fueron sacrificados mediante inmersión en agua-hielo, para ser posteriormente pesados y diseccionados. Se determinaron los siguientes parámetros biológicos: tasa de crecimiento absoluta (TCA, g/día), tasa de crecimiento estándar (TCE, %/día), tasa de ingesta estándar (TIE, %/día), índice de conversión (IC). Además se extrajo la glándula digestiva para calcular el índice de la glándula digestiva (IGD, %). Por último, se calcularon la tasa de disgregación (D, %) y el incremento de biomasa (IB, %) por tanque (n = 2 por dieta).

Se determinó la composición proximal de las dietas (un pool semanal, n = 6). Además también se analizó el músculo (brazo izquierdo II) y la glándula digestiva al final del período de estudio (n = 8). Los métodos analíticos siguieron los protocolos establecidos por la AOAC (1997). Los ácidos grasos fueron extraídos según el protocolo de Izquierdo *et al.* (1992).

**Tabla XIV:** Formulación (g/kg) de los piensos AL y BL.

	Pienso AL	Pienso BL
Filete de Boga salvaje	573,5	592,0
Aceite de pescado	2,5	-
EPA50	5,0	1,9
ARA (Vevodar)	11,0	4,5
DHA 70	5,0	0,7
Colesterol	3,0	0,9
Alginato	20,0	20,0
Agua destilada	370,0	370,0
Calcio	10,0	10,0

Total	1.000,0	1.000,0
-------	---------	---------

Finalmente, los datos fueron comparados estadísticamente mediante un ANOVA de 1 vía, y cuando se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se aplicó el test de Tukey para determinar las diferencias entre grupos ( $p < 0.05$ ). En el caso del peso final y los parámetros biológicos se incluyó el peso inicial como covariable en el modelo, y cuando se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se aplicó el test de Bonferroni para determinar las diferencias entre grupos ( $p < 0.05$ ).

### Resultados y discusión

El pienso AL presentó un mayor contenido lipídico y energético, y un menor contenido proteico y en humedad que el pienso BL (Tabla XV). La dieta control, la boga “subproducto de la acuicultura”, presentó un mayor contenido proteico y energético que los piensos, y un contenido lipídico similar al pienso AL (Tabla XV).

**Tabla XV:** Composición proximal (% en peso seco) y Energía (KJ/100 g en peso húmedo) de las dietas

	Pienso AL	Pienso BL	BD
Lípidos PS (%)	22,7 ± 0,9 <sup>b</sup>	13,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	22,1 ± 0,9 <sup>b</sup>
Proteínas PS (%)	63,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	71,2 ± 1,2 <sup>b</sup>	71,1 ± 1,2 <sup>b</sup>
Humedad (%)	79,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	81,4 ± 0,7 <sup>c</sup>	71,7 ± 0,9 <sup>a</sup>
Cenizas (%)	2,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
Energía (KJ/100 g PH)	496 ± 12 <sup>b</sup>	418 ± 15 <sup>a</sup>	724 ± 30 <sup>c</sup>

Los ácidos grasos principales de las dietas, que representaron el 92% del total, se muestran en la tabla XVI. Destaca el alto contenido en ARA, EPA y DHA en las dietas formuladas en comparación con la dieta control (boga).

Los pulpos alimentados con los piensos experimentales presentaron un crecimiento, un IB y un peso final similar a los alimentados con la dieta control (Tabla 4). Estos resultados confirman el adecuado valor nutricional de los piensos experimentales, de acuerdo con estudios previos (Quintana *et al.*, 2008; Estefanell *et al.*, 2011b). Sin embargo, la ingesta fue mayor en los ejemplares alimentados con el pienso AL (Tabla



XVII), posiblemente para compensar el menor contenido energético de la dieta. Al contrario que en estudios previos, el IC no presentó diferencias significativas entre la dieta control (fresca) y los piensos (Cerezo Valverde *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008; Estefanell *et al.*, 2011b) (Tabla 4).

**Tabla XVI:** Perfil de ácidos grasos de las dietas (% respecto al total de ácidos grasos)

	Pienso AL	Pienso BL	BD
14:0	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,2 <sup>c</sup>
16:0	14,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	18,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	19,1 ± 0,8 <sup>c</sup>
16:1 n-7	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,2 <sup>c</sup>
16:2n-4	0,6 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
17:0	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>b</sup>
18:0	5,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	5,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
18:1 n-9	15,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	22,8 ± 0,7 <sup>b</sup>
18:1 n-7	1,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>c</sup>
18:1n-5	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
18:2 n-6	4,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	18,4 ± 2,8 <sup>c</sup>
18:3 n-3	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>b</sup>
20:1 n-9	1,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>
20:2n-6	0,5 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>
20:4 n-6	13,1 ± 0,3 <sup>c</sup>	10,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
20:5 n-3	9,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	7,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
22:4 n-6	0,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>
22:5 n-6	1,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
22:5 n-3	1,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,0 <sup>b</sup>
22:6 n-3	17,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	15,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	7,8 ± 1,1 <sup>a</sup>
Σ Saturados	23,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	28,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	28,4 ± 1,1 <sup>b</sup>
Σ Monoenos	22,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	24,3 ± 0,5 <sup>b</sup>	33,4 ± 0,3 <sup>c</sup>

$\Sigma$ n-3	30,7 ± 0,5 <sup>c</sup>	27,1 ± 0,7 <sup>b</sup>	16,4 ± 1,6 <sup>a</sup>
$\Sigma$ n-6	21,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	18,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	20,8 ± 2,7 <sup>ab</sup>
$\Sigma$ n-9	17,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	17,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	25,1 ± 0,5 <sup>b</sup>
$\Sigma$ n-3 HUFA	29,0 ± 0,5 <sup>c</sup>	25,6 ± 0,7 <sup>b</sup>	13,3 ± 1,7 <sup>a</sup>
$\Sigma$ n-6 HUFA	16,0 ± 0,3 <sup>c</sup>	12,9 ± 0,6 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
DHA/EPA	1,8 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,2 <sup>ab</sup>
DHA/ARA	1,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	10,1 ± 0,5 <sup>c</sup>
EPA/ARA	0,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,3 <sup>c</sup>

**Tabla XVII:** Peso inicial, peso final, TCA, TCE, TIE, IC, IGD, D e IB en los pulpos tras 39 días de cultivo.

	Pienso AL	Pienso BL	Control: Boga troceada
Peso inicial (g)	847 ± 204	947 ± 286	913 ± 185
Peso final (g)	1269 ± 243	1563 ± 480	1515 ± 250
TCA (g/día)	10.8 ± 1.5	15.8 ± 5.6	15.4 ± 1.8
TCE (%/día)	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1
TIE (%/día)	2.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.2 <sup>b</sup>
IC	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.3	1.9 ± 0.1
IGD (%)	2.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.2 <sup>ab</sup>	3.4 ± 0.4 <sup>b</sup>
D (%)*	21.1 ± 0.9 <sup>c</sup>	16.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
IB (%)*	50 ± 8	65 ± 12	66 ± 1

\* Parámetros calculados por tanque

La disgregación fue mayor en los piensos en comparación con la dieta fresca, especialmente en la dieta AL (Tabla XVII), lo que pone de manifiesto la necesidad de mejorar la textura de los piensos, de modo que se maximice la ingesta y se minimicen los residuos orgánicos al medio. A pesar de no haber encontrado diferencias significativas en crecimiento en los pulpos alimentados con el pienso AL y BL, los resultados sugieren que posiblemente el óptimo de lípidos-proteínas podría estar más cercano al 13-71% que al 23-64% en peso seco, aunque son necesarios más

experimentos con dietas formuladas con diferentes niveles de lípidos y proteínas para poder obtener un resultado concluyente.

## INFORME RESUMEN CC CANARIAS

### Grupo de investigación ICCM-ULPGC (GIA)

#### Línea 1.1.: Acondicionamiento de reproductores y obtención de puestas viables

##### OBJETIVOS INICIALES

Obtención de un número suficiente de paralarvas para llevar a cabo los distintos ensayos cultivo que se plantean en las Líneas 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5.

##### OBJETIVOS ALCANZADOS

Se obtuvieron para realizar los diferentes ensayos.

##### METODOLOGÍA

Los ejemplares que utilizados como reproductores fueron capturados anualmente por pescadores artesanales con nasas, un arte específico y selectivos que minimiza el posible daño. El volumen de los tanques de reproductores fue de 2 m<sup>3</sup> y los ejemplares se estabularon en una relación 2:1 macho/hembra. Los reproductores fueron alimentados con una mezcla de crustáceos y pescado, suministrados diariamente *ad libitum*. Cada hembra con puesta se aisló en tanques más pequeños para facilitar su monitorización. Al eclosionar las paralarvas, se realizó un conteo por volumetría previo a su traslado a los tanques de cultivo.

#### Línea 1.2.: Sistema de cultivo de paralarvas utilizando un mesocosmos

##### OBJETIVOS INICIALES

Aplicación de sistemas de cultivo mesocosmos para la producción de juveniles de pulpo.

##### OBJETIVOS ALCANZADOS

La utilización de este sistema de cultivo tuvo resultados prometedores sin llegar a la fase bentónica.

#### Tarea: 1.2.1. Cultivo larvario de pulpo en sistema Mesocosmos con filosofía extensiva.

##### METODOLOGÍA

El tanque de 40 m<sup>3</sup> se llenó con agua de mar previamente filtrada y esterilizada. Se fertilizó con nutrientes (200g de nitrato puro y 20 g de fosfato) se introdujo un inóculo de fitoplancton (*Nannocloropsis oculata*), zooplancton *Brachionus plicatilis* y copépodos (*Tisbe furcata*) alcanzando una media de 150.000 cells/ml y >2 indiv zoop/ml. El agua del tanque se mantuvo en circuito cerrado, durante 10 días antes de la introducción de las paralarvas, esta se produjo durante 5 días consecutivos desde el día 21/12/2011 de acuerdo a la eclosión diaria de una misma hembra, sembrando un total de 54.462 paralarvas con una densidad final de 1,3 indiv/mL.

A partir del primer día de la introducción de las paralarvas se abrió el circuito de agua manteniendo una renovación diaria de 5%/h que se incremento hasta llegar a un 100%/hora al final de la experiencia al día 30 de cultivo. Manteniéndose una temperatura media de 19.8° C y un nivel disuelto de 7.0. Igualmente desde la introducción de las

paralarvas se aportó al tanque Artemia A1 enriquecida con productos comerciales (A1 DHA Selco) manteniendo diariamente una concentración en el tanque de 0,5 indiv/mL. A partir del día 20 se aportó microdieta comercial (50g/día) (Genma Micra 150) manualmente. Para estimar el crecimiento se recogieron datos de longitud total, longitud y ancho del manto, además se determinó el peso fresco y peso seco (100°C durante 24 h) de 10 larvas a los días 0, 15, 30 y 35. Para estimar la supervivencia, se realizó un conteo individual de las paralarvas presentes al día 35, cuando se dió por finalizada la experiencia.

## RESULTADOS

Las larvas de pulpo cultivada en Mesocosmos presentaron unas migraciones diarias muy marcadas en este sistema de cría, así durante la primera hora de la mañana se podían observar las paralarvas nadando cerca de la superficie y paredes del tanque, mientras que a medida que avanzaba el día, se detecto una tendencia a migrar en profundidad, la altura del tanque de cría (2,5m) parece favorecer este comportamiento que podría ser reflejo de hábitos naturales de esta especie. Respecto al crecimiento observado, como se observa en las figuras 1 y 2, hay un crecimiento de todos los parámetros morfométricos observados hasta el día 30 de vida, detectándose un ligero descenso a partir de esta etapa. Este hecho se ha asociado con la elevada mortalidad de paralarvas durante esta etapa quedando al día 35 únicamente ejemplares que representas los rangos de población de menor tamaño que se apuntan podría ser los de menor edad.

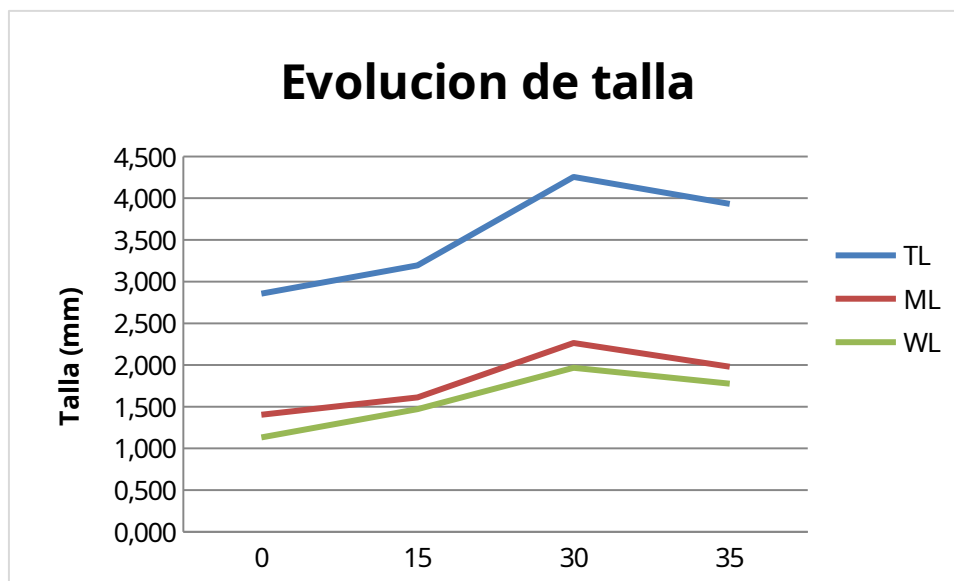


Figura 1. Evolución de la talla de las paralarvas de pulpo en sistema de cultivo Mesocosmos Semi-intensivo.



Figura 2. Evolución del peso de las paralarvas de pulpo en sistema de cultivo Mesocosmos Semi-intensivo.

La supervivencia obtenida en esta primera experiencia fue muy modesta, 95 ejemplares en fase pre-bentónica, lo que supone un 0,17%. Esta experiencia sin embargo ha servido como acercamiento y aprendizaje del manejo de los tanques Mesocosmos para esta especie, detectando diferentes aspectos de la zootecnia que será necesario adaptar a las condiciones de la cría larvaria de pulpo.

#### CONCLUSIONES

- Las larvas de pulpo cultivada en Mesocosmos presentaron unas migraciones diarias muy marcadas en este sistema de cría.
- Alta mortalidad
- Crecimiento de todos los parámetros morfométricos observados hasta el día 30 de vida, detectándose un ligero descenso a partir de esta etapa.

#### **Línea 1.3.: Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presas *Artemia* enriquecida con fitoplancton y enriquecedores.**

##### OBJETIVOS INICIALES

Obtención de juveniles de pulpo empleando como alimento *Artemia* nutricionalmente enriquecida

##### OBJETIVOS ALCANZADOS

No se obtuvieron juveniles bentónicos, sin embargo se obtuvo información sobre protocolos de engorde de *Artemia*, así como perfiles bioquímicos generados por diversos sistemas de enriquecimiento.

#### **Tarea 1.3.1. Engorde de *Artemia* a tallas adaptadas a la paralarva**

##### METODOLOGÍA

Para evaluar el efecto de los productos usados en el cultivo de *Artemia* (*Tetraselmis sp.*, y ORI-Culture) sobre su crecimiento y supervivencia, se procedió inicialmente a la determinación del contenido de la fracción orgánica de estos productos y sus perfiles de

ácidos grasos. Posteriormente se evaluó el crecimiento en longitud de la *Artemia* hasta las 72 horas de engorde, supervivencia y efecto en su composición bioquímica.

## RESULTADOS

### ***Crecimiento en longitud***

El experimento de engorde de *Artemia* con Ori-Culture y *Tetraselmis sp.* se llevo a cabo con *Artemia* recién eclosionada (24h) de longitud  $0,78 \pm 0,17$ mm. A las 48 horas de vida, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las *Artemia* ( $P>0,05$ ) (Figura 3). Sin embargo se observaron diferencias significativas a las 72 horas y 96 horas de cultivo ( $P<0,05$ ), con un mayor crecimiento de la *Artemia* cultivada con Ori-Culture en comparación a la alimentada con *Tetraselmis sp.*

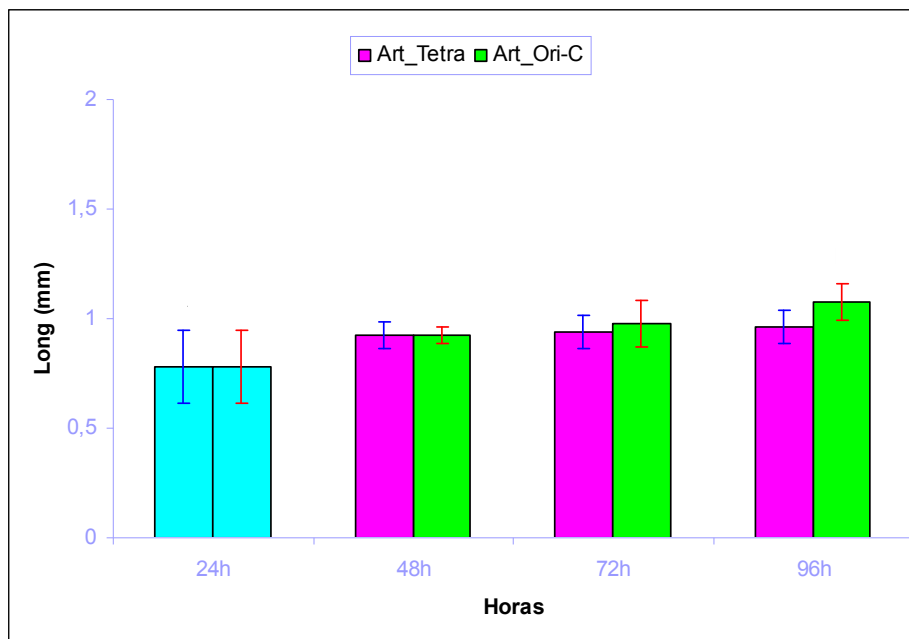


Figura 3: Evolución de la longitud total de la *Artemia* cultivada con Ori-Culture y *Tetraselmis sp.*

### ***Supervivencia***

Los datos de la supervivencia ilustrados en figura 4 muestran que aunque el porcentaje de supervivencia de Art\_Ori-C es más alto que en Art\_Tetra, a las 48 y 72 horas, no se han observado diferencias significativas entre ellos ( $P>0,05$ ). Sin embargo, estas diferencias, si son significativas en a las 96 horas, con una mayor tasa de supervivencia de la Art\_Ori-C (Figura 4).

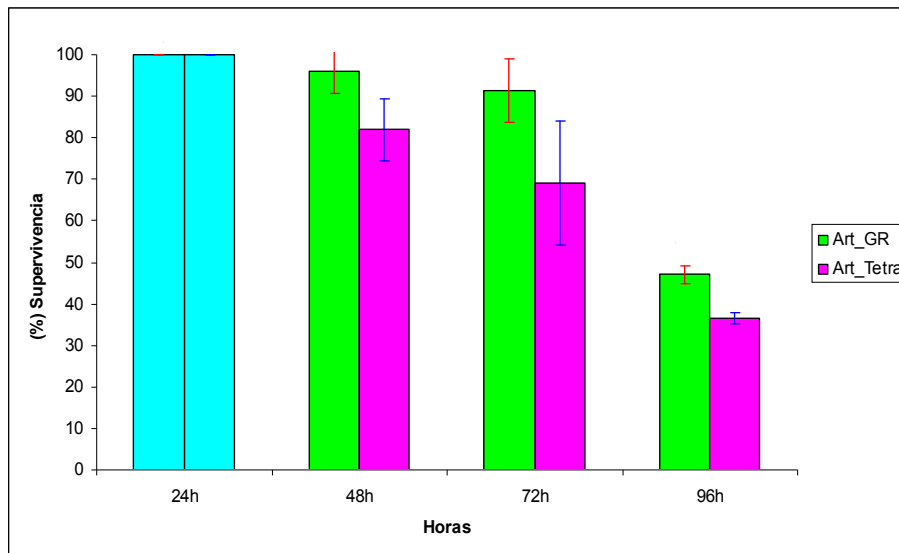


Figura 4: Tasa de supervivencia de *Artemia* sp. cultivada con Ori-Culture y *Tetraselmis* sp.

#### CONCLUSIONES

- Se observó un mayor crecimiento de la *Artemia* alimentada con Ori-Culture en comparación con la alimentada con *Tetraselmis* sp a partir de las 72h de cultivo.
- Se observó una mayor supervivencia de la *Artemia* alimentada con Ori-Culture en comparación a la alimentada con *Tetraselmis* sp a partir de las 96h de cultivo.

#### Tarea 1.3.2.5. Enriquecimiento de Artemia con emulsiones comerciales

##### METODOLOGÍA

**Enriquecimiento de Artemia:** Basado en los resultados obtenidos en la experiencia previa, se seleccionó el engorde de *Artemia* con Ori-go, como protocolo estándar para la producción de *Artemia* en las siguientes experiencias de cultivo de paralarvas. Se plantea una experiencia destinada a evaluar el enriquecimiento de artemia, para próximas experiencias de alimentación de las paralarvas con *Artemia* de 48 horas desde día 0 a 10 días post eclosión (dpe) y *Artemia* de 96 horas desde 11 a 20dpe. En ambos casos la *Artemia* será enriquecida durante 24 horas con diferentes enriquecedores comerciales, Easy DHA Selco® , Ori-Green®, y Ori-Prot®.

**Determinación de la Longitud total de Artemia:** Al enriquecer *Artemia* recién eclosionada (ARE) de  $0,72 \pm 0,13$ mm, durante 24 horas con los distintos productos testados, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las *Artemia* ( $P > 0,05$ ) (Tabla I).

**Tabla I:** Longitud total (mm) de *Artemia* de 24horas (ARE) enriquecida con Selco (AE\_S), Ori-Green (AE\_OG) y Ori-Prot (AE\_OP)

	Longitud (mm)
ARE	$0,72 \pm 0,13$
AE_S	$0,79 \pm 0,16$
AE_O	$0,72 \pm 0,13$



G	
AE_OP	0,76 ± 0,04

En el caso de *Artemia* cultivada con Ori-culture 96 horas, y posteriormente enriquecida 24 horas con los distintos enriquecedores probados, si se han observado diferencias significativas en el tamaño ( $P < 0,05$ ), siendo la *Artemia* enriquecida con Ori-Green la que presentó un tamaño significativamente menor que las enriquecidas con Selco, aunque sin diferencias respecto a la enriquecida con Ori-Prot (Tabla II).

**Tabla II:** Longitud total (mm) de *Artemia* de 96 horas enriquecida con Selco (AC-OC\_ES), Ori-Green (AC-OC\_EOG) y Ori-Prot (AC-OC\_EOP)

	Longitud (mm)
AC-OC_ES	1,28 ± 0,17 <sup>a</sup>
AC-OC_EOG	1,18 ± 0,13 <sup>b</sup>
AC-OC_EOP	1,26 ± 0,22 <sup>ab</sup>

### **Supervivencia de *Artemia* de 96h enriquecidas 24h**

Aunque las *Artemia* de 96h enriquecidas con Selco presentaron un mayor porcentaje de supervivencia (Figura 5) que los demás, no se han observado diferencias significativas entre ellos ( $P > 0,05$ ).

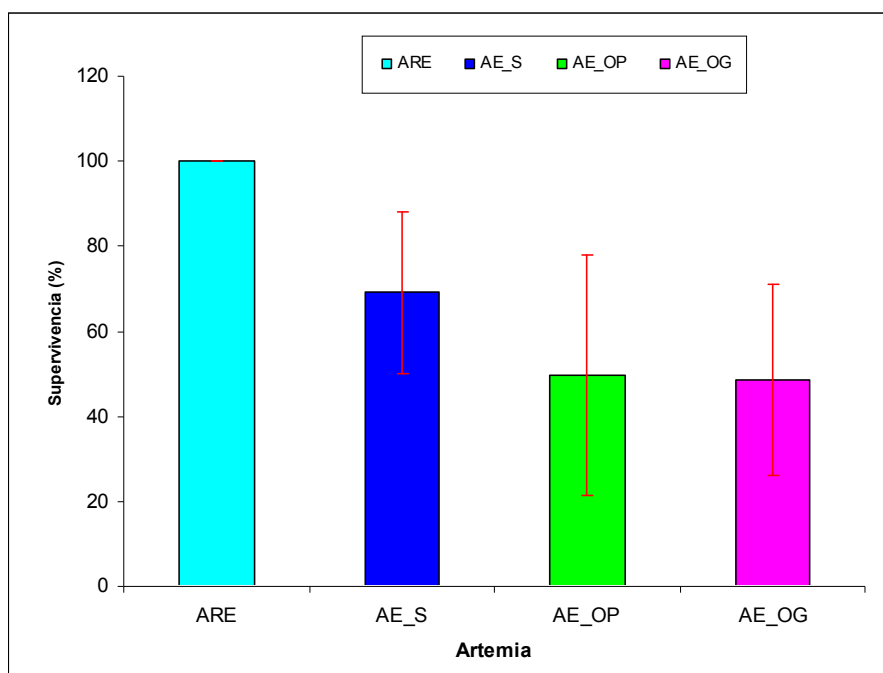


Figura 5: Tasa de supervivencia de *Artemia* (ARE) enriquecida con Selco, Ori-Green y Ori-Prot.

### CONCLUSIONES

- La *Artemia* recién eclosionada (ARE) enriquecida durante 24 horas con los distintos productos testados no presentaron diferencias significativas en tamaño ni en supervivencia.

### **Tarea 1.3.2.6. Enriquecimiento de *Artemia* con emulsiones experimentales**

#### **METODOLOGÍA**

Con el fin de evaluar un mayor número de enriquecedores en diferentes series se ha construido un sistema que incluye el uso de recipientes troncocónicos de 4 L de capacidad en un tanque de 500 L.

El protocolo de enriquecimiento seguido de manera común para todas las emulsiones testadas fue el siguiente: Se utilizaron tanques troncocónicos con un volumen de 4 litros donde se sembraron *Artemia* de diferentes edades a una concentración de 250.000 Nauplios/l manteniendo una temperatura de 28.0°C y oxígeno disuelto superior a 5 ppm. Para las pruebas de enriquecimiento se utilizó *Artemia* de diferentes edades: A1= *Artemia* recién eclosionada; A2: *Artemia* 24 h y A3: *Artemia* 48h. El enriquecimiento se realizó por un periodo de 18 horas y a una concentración de 0,6g enrich/litro. Una vez transcurrido este periodo, se cosechó el contenido total de cada botella, lavando con agua del mar filtrada y esterilizada y contabilizando el nº de artemias vivas. Cada tratamiento se ensayó por triplicado, determinando la talla y supervivencia de *Artemia* diariamente.

**Enriquecedores experimentales:** La composición bioquímica de las presas aceptadas por las paralarvas de pulpo (Zoeas de centollas, Zoeas de cangrejos, mysis de camarones, copépodos, misidáceos , etc...) así como de las paralarvas recién eclosionadas, ha ofrecido importante información acerca de las necesidades nutricionales de la paralarva de pulpo. En particular, estas primeras experiencias se han dirigido a modificar el contenido de ácido Araquidónico en la artemia enriquecida evaluando 5 niveles de ARA (0-15% TFA), en diferentes emulsiones experimentales y en diferentes estadios de desarrollo de la *Artemia* (48, 72 y 96 horas post eclosión).

#### **RESULTADOS**

Los resultados de estas experiencias demuestran que el tipo de enriquecedor no presentó un efecto significativo sobre las supervivencia de la *Artemia* independientemente de la edad: A1 (81-90%). A2 (51-60%) y A3 (40-55%). Sin embargo, se observa un marcado efecto de la edad de la *Artemia* sobre la supervivencia al proceso de enriquecimiento, cayendo desde una media de 85% en la A1 hasta 45% en la A3.

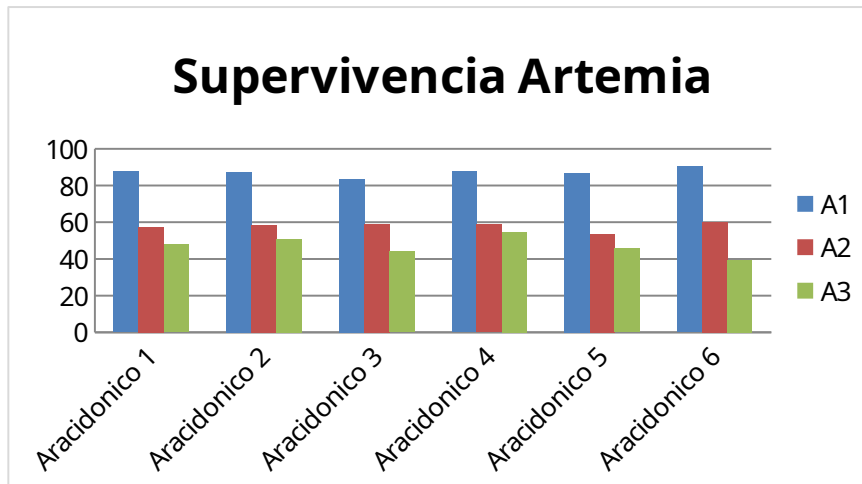


Figura 6: Supervivencia de la *Artemia* enriquecida con niveles crecientes de ARA (A1: Artemia 0+18h enrich; A2: Artemia 24 h+18h enrich; A3: Artemia 48h+18h enrich) Del mismo modo, se puede observar que el tipo de enriquecedor no presentó un efecto significativo sobre el crecimiento de la *Artemia*. Que se incremento de la misma forma en todos los enriquecedores testados desde 720 micras al eclosionar hasta 890 micras en la *Artemia* A3.

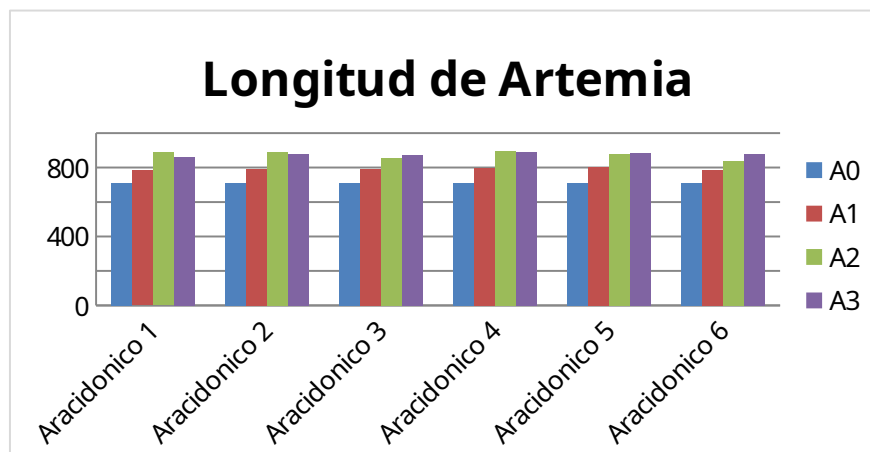


Figura 7: Crecimiento de la *Artemia* Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

## CONCLUSIONES

- El tipo de enriquecedor no presentó un efecto significativo sobre el crecimiento no sobre la supervivencia de la *Artemia* dentro de cada clase de edad.
- Se observa un marcado efecto de la edad de la *Artemia* sobre la supervivencia al proceso de enriquecimiento por edades, cayendo desde una media de 85% en la A1 (24h) hasta 45% en la A3 (96h).

## Tarea 1.3.3. Cultivo de paralarvas.

### METODOLOGÍA

Se realizó una experiencia de cultivo larvario en condiciones intensivas donde se ha evaluado el efecto de los diferentes enriquecedores experimentales anteriormente mencionados.

Para determinar con mayor exactitud el efecto sobre la supervivencia final se ha utilizado un protocolo de siembra donde se han contado individualmente el n° de paralarvas iniciales sembrados (2000 indiv / tanque) a las que se les ha suministrado *Artemia* enriquecida a una densidad de 0.5 *Artemia*/ml. Cada dieta se ha evaluado por triplicado, en tanques de 200 litros, con fotoperiodo 12 h luz - 12 h oscuridad. La *Artemia* se ha suministrado 2 veces al día manteniendo la renovación en un 50% diario. Diariamente se ha sifonado el fondo de los tanques para evaluar la mortalidad. Se han recogido muestras para análisis bioquímico al comienzo y final del periodo de experimentación y se ha determinado el peso húmedo y seco de paralarvas recién eclosionadas y en los momentos de control en muestras de 15 paralarvas/ tanque. Para realizar esta medida las paralarvas se mantendrán 5 minutos en papel secante antes de su pesado. Para determinar el peso seco, estas mismas paralarvas se mantendrán 24 horas en la estufa a 100°C, o hasta peso constante. Igualmente se han determinado la longitud Total, Longitud del Manto y anchura del manto los días 0, 10 y 15.

## RESULTADOS

El efecto del enriquecimiento no ha aportado un resultado concluyente, puesto que no existen diferencias significativas en peso seco ni supervivencia entre los tratamientos ensayados (Figuras 8 y 9). Es de destacar la elevada mortalidad larvaria durante los primeros 15 días de cultivo registrándose más del 70% de las bajas independientemente del tratamiento en los primeros diez días de cultivo.

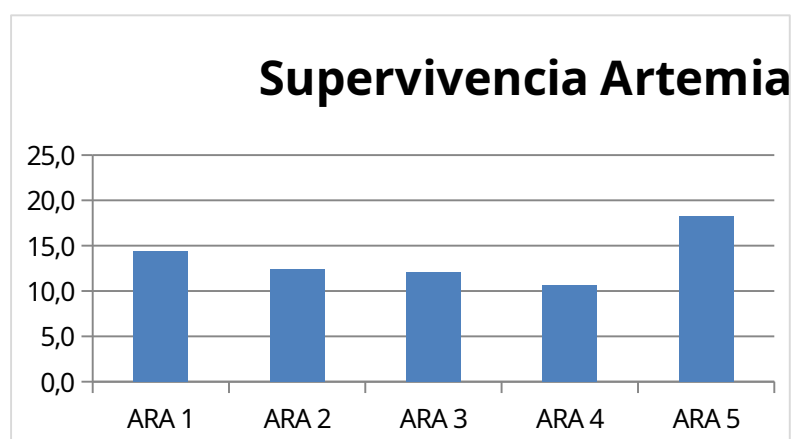


Figura 8. Supervivencia final (15dah) de las paralarvas de pulpo alimentadas con *Artemia* Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

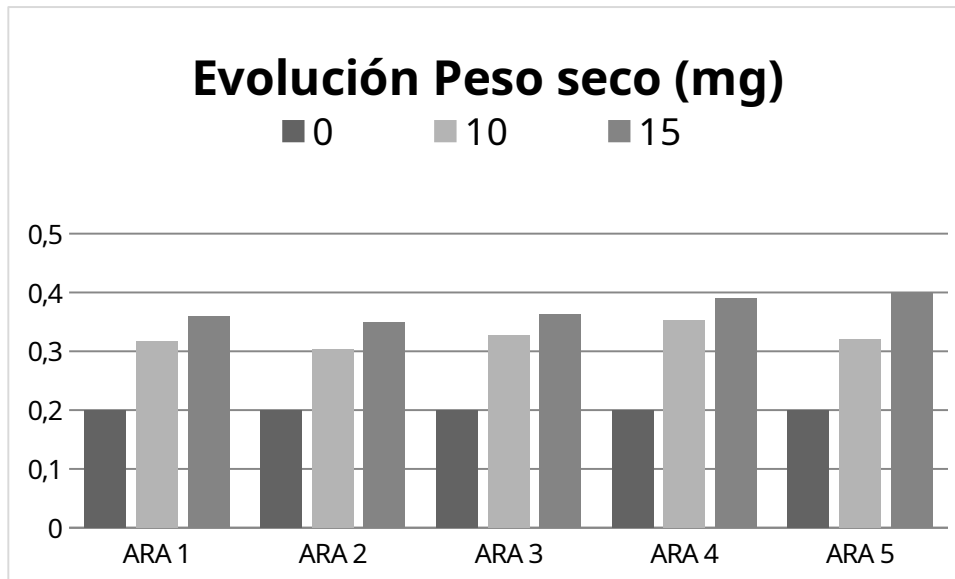


Figura 9. Evolución del peso seco de las paralarvas de pulpo alimentadas con *Artemia* Enriquecida con niveles crecientes de ARA.

#### CONCLUSIONES

- El efecto del enriquecimiento no ha aportado un resultado concluyente, puesto que no existen diferencias significativas en peso seco ni supervivencia entre los tratamientos ensayados

#### **Tarea 1.3.5. Análisis bioquímica de *Artemia* enriquecidas y paralarvas**

##### METODOLOGÍA

Los protocolos analíticos fueron los establecidos en la memoria del proyecto.

##### RESULTADOS

#### **1.3.5.1. Composición bioquímica de los productos empleados en el engorde de *Artemia* y de la *Artemia* engordada:**

##### **a) Productos: *Tetraselmis sp.*, y Ori-Culture**

Se han encontrado diferencias significativas en el contenido de lípidos totales y proteínas de *Tetraselmis sp.*, y Ori-Culture ( $P < 0,05$ ) (Tabla III). Así, el porcentaje de lípidos y proteínas de Ori-Culture, fue de  $23,07 \pm 0,05\%$  y  $59,88 \pm 0,01\%$  respectivamente, mientras que en el caso de *Tetraselmis sp.* fueron significativamente más bajos en ambos casos, con un valor de  $14,83 \pm 0,06\%$  y  $41,85 \pm 0,02\%$  en el contenido de lípidos totales y proteínas respectivamente.

**Tabla III:** Contenido y porcentaje de la fracción orgánica en Ori-Culture y *Tetraselmis*. Las proteínas y los lípidos están expresados en (% de peso seco). Los datos representan medias ( $n=3$ ) y desviación típica

	Humedad (%)	Lípidos totales (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
ORI-Culture	5,87 ± 0,56 <sup>a</sup>	23,07 ± 0,05 <sup>a</sup>	59,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,07 <sup>a</sup>
Tetraselmis sp.	6,78 ± 0,03 <sup>b</sup>	14,83 ± 0,06 <sup>b</sup>	41,85 ± 0,02 <sup>b</sup>	15,22 ± 0,04 <sup>b</sup>

**b) *Artemia* engordada con ORI-Culture y *Tetraselmis* sp. :**

En la tabla siguiente (Tabla IV) se muestran los resultados de análisis de la fracción orgánica de *Artemia* cultivada con Ori-Culture y Tetraselmis.

**Tabla IV:** Contenido y porcentaje de la fracción orgánica en *Artemia* cultivada con Ori-Culture y *Tetraselmis* sp.

	Humedad (%)	Lípidos totales (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
ARE	87,74 ± 0,68	17,88 ± 0,51	56,96 ± 0,04	0,85 ± 0,09
Art Ori-C 48H	84,75 ± 0,24 <sup>a</sup>	18,35 ± 0,03 <sup>a</sup>	59,18 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,02 <sup>a</sup>
Art Tetra 48H	87,65 ± 0,67 <sup>b</sup>	22,43 ± 0,09 <sup>b</sup>	57,72 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,02 <sup>b</sup>
Art Ori-C 72H	84,04 ± 1,10 <sup>a</sup>	17,05 ± 0,24 <sup>a</sup>	61,88 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,02 <sup>a</sup>
Art Tetra 72H	86,78 ± 0,1 <sup>b</sup>	18,44 ± 0,36 <sup>b</sup>	58,19 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>b</sup>
Art Ori-C 96H	84,74 ± 0,21 <sup>a</sup>	16,47 ± 0,47 <sup>a</sup>	64,97 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,05 <sup>a</sup>
Art Tetra 96H	86,29 ± 0,07 <sup>b</sup>	18,12 ± 0,23 <sup>b</sup>	58,83 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,05 <sup>b</sup>

En general, la *Artemia* reflejó la composición bioquímica de la dieta en proteínas. Así, la *Artemia* cultivada con Ori-Culture presentaron el mayor contenido de proteínas. Sin embargo, la *Artemia* cultivada con *Tetraselmis* sp. fué la que presentó un contenido significativamente más alto de lípidos entre los dos grupos (P<0,05).

**1.3.5.2. Composición bioquímica de los productos empleados y de la *Artemia* enriquecida con emulsiones comerciales**

**a) Enriquecedores comerciales: SELCO, ORI-Green, ORI-Prot**

La tabla siguiente, muestra la composición bioquímica proximal de los diferentes productos testados (Tabla V). Los resultados muestran que el porcentaje de los lípidos totales del Selco es significativamente más alto que el de ORI-Green y ORI-Prot, respectivamente (P<0,05). Mientras que, el Ori-Green tiene el porcentaje en proteínas significativamente más alto, seguido por el Ori-Prot y el Selco (P<0,05), En cuanto al contenido de cenizas, los tres productos también presentan una composición significativamente diferente.

**Tabla V:** Contenido y porcentaje de la fracción orgánica en los enriquecedores de *Artemia*. Las proteínas y los lípidos están expresados en (% de peso seco)

	Humedad (%)	Lípidos totales (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
SELCO	33,35 ± 0,23 <sup>a</sup>	91,65 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>a</sup>
ORI-Green	5,03 ± 0,07 <sup>b</sup>	36,91 ± 0,06 <sup>b</sup>	58,04 ± 0,06 <sup>b</sup>	10,85 ± 0,04 <sup>b</sup>
ORI-Prot	5,24 ± 0,13 <sup>b</sup>	29,4 ± 0,07 <sup>c</sup>	43,83 ± 0,03 <sup>c</sup>	6,65 ± 0,03 <sup>c</sup>

**b) *Artemia* enriquecida con emulsiones comerciales**

Los resultados relativos a los perfiles de lípidos y proteínas de *Artemia* recién eclosionada y *Artemia* cultivada 96 horas con Ori-Culture, ambos enriquecidas 24 horas con los diferentes productos citados se muestran en la tabla (Tabla VI). De forma general, en la *Artemia* de 24h enriquecida, se ha observado un aumento significativo

( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de proteínas con respecto a la *Artemia* recién eclosionada enriquecida con los tres productos. Siendo este valor más elevado en el caso de la *Artemia* enriquecida con Ori-Green y Ori-Prot respecto al Selco. También, se puede ver una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de lípidos totales de las *Artemia* de los tres grupos, siendo más elevada en el caso de *Artemia* enriquecida con Ori-Prot.

**Tabla VI:** Contenido y porcentaje de la fracción orgánica de la *Artemia* enriquecida. *Las proteínas y los lípidos están expresados en (% de peso seco)*

	Humedad (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)
ARE	$87,74 \pm 0,68$	$17,88 \pm 0,51$	$56,96 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,09$
Artemia recién eclosionada enriquecida 24 horas (1er día.....día 10)				
AE_S_24H	$73,42 \pm 0,02^a$	$16,69 \pm 0,14^a$	$57,42 \pm 0,02^a$	$2,72 \pm 0,07^a$
AE_OG_24H	$88,79 \pm 0,07^b$	$16,56 \pm 0,21^a$	$64,79 \pm 0,05^b$	$1,51 \pm 0,02^b$
AE_OP_24H	$89,24 \pm 0,1^c$	$12,92 \pm 0,37^b$	$64,11 \pm 0,04^b$	$1,51 \pm 0,08^b$
Artemia cultivada 96 horas en Ori-Culture y enriquecida 24 horas (Día 10.....día 20)				
AC-OC_ES	$82,77 \pm 0,18^a$	$23,24 \pm 0,27^a$	$51,09 \pm 0,01^a$	$2,76 \pm 0,05^a$
AC-OC_EOG	$84,76 \pm 0,26^b$	$12,53 \pm 0,3^b$	$60,11 \pm 0,03^b$	$2,59 \pm 0,07^b$
AC-OC_EOP	$84,59 \pm 0,32^b$	$14,74 \pm 0,36^c$	$67,24 \pm 0,04^c$	$2,49 \pm 0,07^c$

En el caso de *Artemia* cultivada con Ori-Culture 96h y enriquecida 24h con los tres productos, también se han observado diferencias significativas en el porcentaje de lípidos totales y proteínas entre los tres grupos. La *Artemia* (**AC-OC\_EOP**) es la que presenta el mayor contenido en proteínas con  $67,24 \pm 0,04$  %, y la *Artemia* (**AC-OC\_ES**) es la que presenta el mayor contenido en lípidos totales.

### Tarea 1.3.5.3. Análisis bioquímico de paralarvas

Los resultados de perfil lipídico de las larvas alimentadas con diferentes niveles de ARA en la *Artemia* mostraron que en todos los casos hay un claro aumento del contenido lipídico en las paralarvas. En particular, se detecta un ascenso de ácidos grasos monoinsaturados y en particular el ácido oleico, lo cual se correlaciona con el perfil lipídico de la *Artemia* enriquecida. Respecto al contenido de n-3 y n-3 HUFA no se ha podido establecer un patrón claro entre el contenido observado en las larvas y el suministrado en la dieta. De la misma manera el contenido de ARA en las larvas tampoco sigue un patrón fijo que se correlacione con el contenido de este en la *Artemia*, si bien en todos los casos se observa una reducción de ARA respecto al contenido inicial en las paralarvas.

Tabla VII: Lípidos totales (en % de peso seco) y perfil de los ácidos grasos de las paralarvas de pulpo común alimentadas con niveles crecientes de ARA durante 15 días.

	Eclosión	0% ARA	5% ARA	7.5% ARA	12.5% ARA	15% ARA
Lípidos (PS)	14.04	25.23	28.08	22.04	25.97	24.34
ΣSaturados	31.29	25.79	44.29	42.94	29.35	42.83
ΣMonoinsaturados	22.28	32.79	39.48	26.84	26.65	28.51
Σn-3	27.05	29.35	6.89	18.81	29.71	17.07
Σn-6	11.76	8.85	5.47	7.43	11.26	7.85

Σn-9	18.78	22.77	26.55	17.45	17.32	17.36
Σn-3HUFA	26.16	16.22	2.36	12.25	17.24	9.11
14:0	1.27	0.68	1.16	1.23	0.95	1.08
16:0	24.78	14.96	25.37	23.87	16.54	23.34
16:1 n-7	0.44	1.50	1.79	1.57	1.75	1.51
18:0	4.68	9.26	16.42	16.61	10.89	17.15
18:1 n-9	13.27	21.98	25.49	16.59	16.62	16.45
18:1 n-7	1.65	5.31	6.53	4.12	4.40	5.37
18:2 n-6	2.54	5.04	3.69	4.79	5.71	3.53
18:3 n-3	0.45	12.32	4.21	5.15	11.07	7.20
20:1 n-9	4.68	0.20	0.27	0.19	0.18	0.22
20:4n-6	6.81	2.41	0.83	1.74	4.36	3.08
20:5n-3	8.68	5.67	0.68	3.75	5.13	2.83
22: 6n-3	14.31	8.50	1.06	7.28	10.51	5.29
DHA/22:5 n-6	21.23	18.42	17.25	35.63	29.38	25.82
EPA/ARA	1.31	2.35	0.82	2.16	1.18	0.92
DHA/EPA	1.65	1.50	1.57	1.94	2.05	1.87
DHA/ARA	2.14	3.52	1.28	4.18	2.41	1.71
oleico/DHA	0.94	2.59	23.96	2.28	1.58	3.11
oleico/n-3HUFA	0.51	1.35	10.79	1.35	0.96	1.80
n-3/n-6	2.31	3.32	1.26	2.53	2.64	2.17

## CONCLUSIONES

- La *Artemia* cultivada con Ori-Culture presentaron el mayor contenido de proteínas. Sin embargo, la *Artemia* cultivada con *Tetraselmis sp.* fue la que presentó un contenido significativamente más alto de lípidos.
- En cuanto a los enriquecedores comerciales, la *Artemia* de 24h presenta un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de proteínas con respecto a la *Artemia* recién eclosionada, independientemente del productos utilizado. Sin embargo el valor es más elevado en el caso de la *Artemia* enriquecida con Ori-Green y Ori-Prot respecto al Selco. También, se puede ver una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de lípidos totales de las *Artemia* de los tres grupos, siendo más elevada en el caso de *Artemia* enriquecida con Ori-Prot.
- En cuanto a las paralarvas alimentados con *Artemia* enriquecida con niveles crecientes de ARA, los resultados de ácidos grasos no muestran una relación clara entre dieta y paralarva, a pesar del aumento significativo del contenido lipídico de las mismas, por lo tanto no es posible establecer conclusiones sobre este apartado.

### Tarea 1.3.6. Análisis histológicos de paralarvas.

Las muestras fueron recogidas a los 10 y 15 días de cultivo en el experimento de *Artemia* alimentada con enriquecedores experimentales con niveles crecientes de ARA.

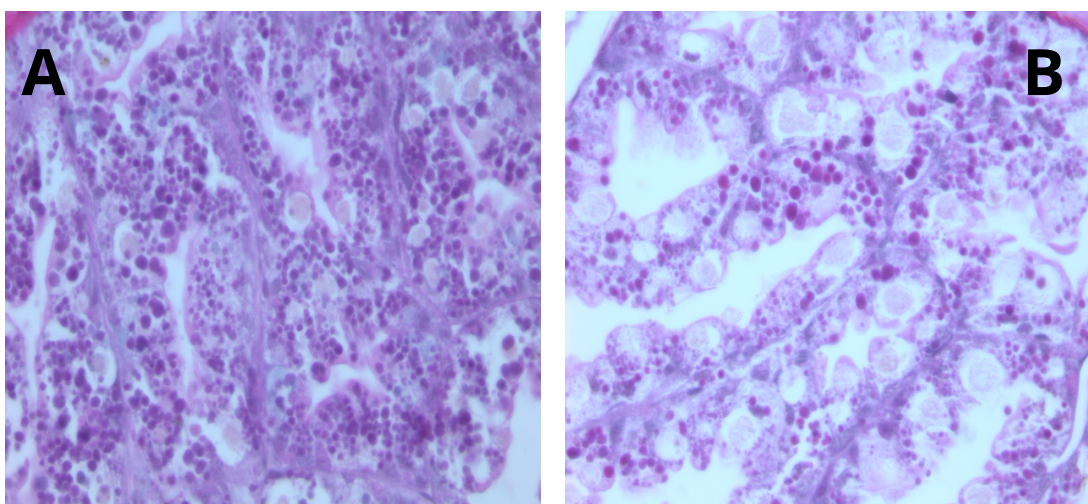


## METODOLOGÍA

Las paralarvas fueron fijadas en parafina y teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E), (Martoja y Pearson, 1970) para su evaluación visual.

## RESULTADOS

A día 10 de cultivo se observó un aumento de pequeñas vacuolas eosinófilas (vacuolas enzimáticas) (Budelmann *et al.* 1997) en la glándula digestiva de paralarvas alimentadas con Artemia enriquecida con los tratamientos ARA-7.5%, ARA-12.5% y ARA-15%, ausentes en aquellas en los tratamientos de ARA-0% y ARA-5%. Dicho aumento se observó a día 15 de cultivo únicamente en paralarvas alimentadas con los tratamientos de Artemia enriquecida con ARA 12.5% and ARA-15%.



**Figura 10:** Glándula digestiva en paralarvas alimentadas con *Artemia* 12,5 % ARA a día 10 (A) y a día 15 (B) de cultivo

## CONCLUSIONES

- El aumento de vacuolas digestivas en paralarvas alimentadas con Artemia enriquecida con 12,5% y 15% de ARA a día 15 de cultivo sugiere que el ARA favorece la fisiología digestiva de esta especie.

### **Línea 1.4.: Sistema de cultivo intensivo de paralarvas utilizando como presa *Artemia* y dietas inertes.**

#### OBJETIVOS INICIALES

Desarrollo de microdietas con el propósito de estudiar la aceptación por parte de las paralarvas y sus posibles efectos sobre la viabilidad del cultivo.

#### OBJETIVOS ALCANZADOS

Se desarrolló una microdieta específica para paralarvas con buena aceptación.

#### **Tarea 1.4.1.: Desarrollo y ensayo de micro-dietas inertes**

## METODOLOGÍA

De acuerdo al plan de trabajo inicial, durante la anualidad 2011 se han realizado las experiencias de formulación y desarrollo de microdietas para pulpo. En una segunda fase se han realizado los primeros test de estas microdietas en el cultivo larvario en condiciones intensivas. Al igual que en otras actividades en las que participa el grupo de Canarias-ICCM, la limitación en la obtención de paralarvas, ha limitado el desarrollo de una experiencia de cultivo larvario en esta línea de trabajo. Si bien, durante los meses de Julio/agosto la coordinación con el equipo de IEO-Vigo permitió la realización de un ensayo preliminar donde una microdieta formulada y elaborada por el grupo de Canarias (MD Vigo) se testó en comparación con una dieta comercial (Genma Micra Skretting).

Las condiciones de este ensayo y resultados se presentaron conjuntamente con el equipo del IEO de Vigo.

En el caso de los ensayos realizados en Canarias, estos han empleado una metodología similar a la de las experiencias de alimentación exclusiva con *Artemia* evaluando el efecto de las mismas microdietas que se enviaron al Grupo de IEO-VIGO. El protocolo de cultivo se describe a continuación: para determinar con mayor exactitud el efecto sobre la supervivencia larvaria se ha utilizado un protocolo de siembra donde se han contado individualmente el nº de paralarvas iniciales sembradas (100 indiv / tanque) utilizando larvas de 30 días de edad. Las paralarvas a las que se les ha suministrado artemia enriquecida a una densidad de 0.5 artemia/ml y 2 gramos de MD cada hora durante las horas de luz. Cada dieta se ha evaluado por cuadruplicado, en tanques de 200 litros, con fotoperiodo 12 h luz - 12 h oscuridad. La Artemia se ha suministrado 2 veces al día manteniendo la renovación en un 50% hora. Diariamente se ha sifonado el fondo de los tanques para evaluar la mortalidad. Se han recogido muestras para análisis bioquímico al comienzo y final del periodo de experimentación y se ha determinado el peso húmedo y seco de paralarvas recién eclosionadas y en los momentos de control en muestras de 15 paralarvas/ tanque. Para determinar el peso seco, estas mismas paralarvas se mantuvieron 24 horas en la estufa a 100°C, o hasta peso constante. Igualmente se han determinado la longitud Total, Longitud del Manto y anchura del manto los días 30 y 39.

## RESULTADOS

Los primeros resultados de esta experiencia demuestran que la MD experimental (MD Vigo) presentaron una mejor supervivencia larvaria en comparación con la MD comercial. Sin embargo esta relación se invierte sobre el efecto del crecimiento, lo cual se ha relacionado con una supervivencia en el caso de la MD comercial con aquellos ejemplares de mayor tamaño.

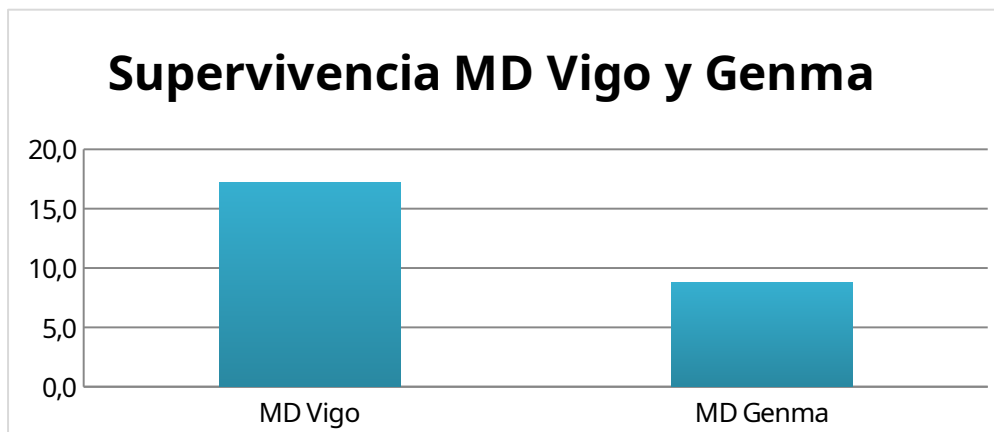


Figura 11. Supervivencia final de las paralarvas de pulpo alimentadas con Microdieta Vigo y Microdieta Genma.

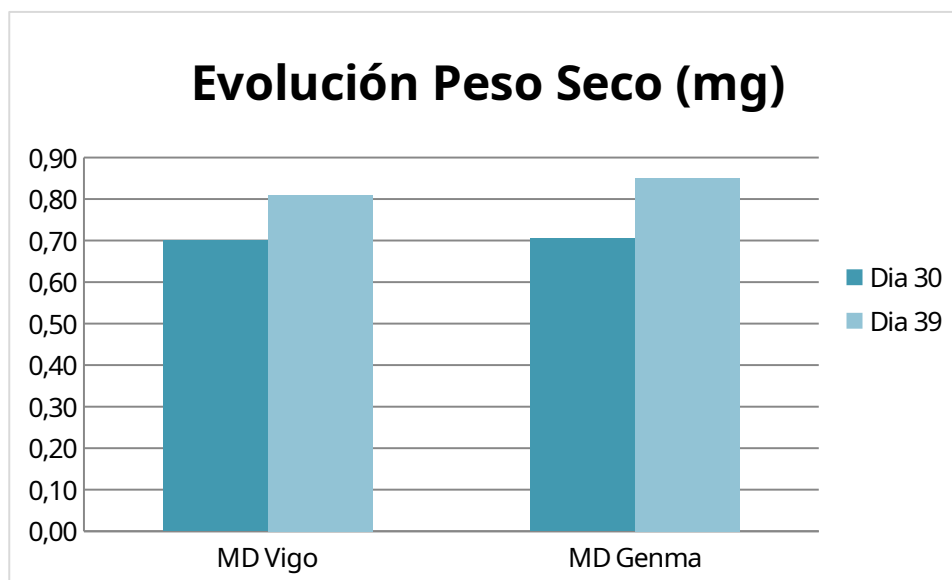


Figura 12. Evolución del peso seco (mg) de las paralarvas de pulpo alimentadas con Microdieta Vigo y Microdieta Genma.

#### CONCLUSIONES

- Las paralarvas alimentados con la microdieta experimental presentaron una mayor supervivencia.
- El mayor peso seco final de las paralarvas alimentadas con la microdieta comercial se relaciona con la mayor supervivencia de los ejemplares más grandes.

#### Línea 2.1. Requerimientos nutritivos del pulpo de roca.

##### Crecimiento de pulpo *O. vulgaris* con dietas alternativas.

#### OBJETIVOS INICIALES

Avanzar en el conocimiento general de los requerimientos de proteína y aminoácidos, de lípidos totales, clases de lípidos y ácidos grasos, y de minerales específicos en el pulpo de roca.

#### OBJETIVOS ALCANZADOS

Se obtuvo una primera aproximación al perfil ideal de lípidos y proteínas en una dieta formulada para pulpo común.

#### METODOLOGÍA

Se testaron 5 dietas frescas, cada una sobre 8 pulpos, mantenidos en compartimentos individuales de 200 l. La temperatura y oxígeno medio fue  $19.4 \pm 1.5^\circ\text{C}$  y  $6.9 \pm 0.5$  ppm respectivamente.

Las dietas fueron las siguientes:

1. Cangrejo azul *Portunus pelagicus*
2. Cangrejo azul *Portunus pelagicus* + Boga de descarte (60-40%)
3. Cangrejo Blanco *Plagusia depressa*
4. Cangrejo Blanco *Plagusia depressa* + Boga de descarte (60-40%)
5. Boga de descarte entera
6. Boga de descarte eviscerada

El Cangrejo Blanco *Plagusia depressa* fue proporcionado fresco por pescadores locales, mientras que el *Portunus pelagicus* fue comprado congelado.

Se calcularon los siguientes parámetros (Tabla XI): incremento de peso diario ( $IPD=(P_f-P_i)/t$ ) e ingesta diaria ( $ID=AI*100/(t*(P_f-P_i))$ ); donde “ $P_f$ ” es peso final, “ $P_i$ ” es peso inicial, “ $t$ ” es n° de días y “ $AI$ ” es alimento ingerido en g. La mortalidad, la temperatura y el oxígeno disuelto fueron se evaluaron diariamente.

Los piensos y los tejidos de pulpo (músculo y glándula digestiva) fueron analizados bioquímicamente siguiendo los criterios de la AOAC (1997): lípidos totales (Folch *et al.*, 1957), proteínas totales (método de Kjeldahl), humedad (peso constante a 105°C) y cenizas (combustión a 600°C).

## RESULTADOS

En general las dietas que incluían *P. pelagicus* generaron una mayor ingesta respecto a los demás tratamientos. Sin embargo no hubo diferencias estadísticas en cuanto al crecimiento entre ninguna de las dietas que contenían crustáceos (Tabla VIII). Las dietas mixtas (crustáceo+boga de descarte) siempre generaron un crecimiento superior al crustáceo o la boga sólo, lo que pone de manifiesto que la combinación cangrejo-boga posiblemente cubra mejor los requerimientos nutricional de esta especie.

**Tabla VIII:** *Peso inicial, IDE, IPD e IC tras 8 semanas de cultivo*

	Cangrejo azul	Cangrejo azul+BD	Cangrejo blanco	Cangrejo blanco+BD	BD entera	BD eviscerada
Peso inicial (g)	1232±303	1145±167	1107±241	1185±281	1150±182	1182±258
ID (%/día)	4.0±0.8 <sup>c</sup>	3.6±0.2 <sup>bc</sup>	2.9±0.4 <sup>ab</sup>	2.7±0.4 <sup>a</sup>	2.4±0.6 <sup>a</sup>	2.4±0.5 <sup>a</sup>
IPD (g/día)	17.2±3.7 <sup>bc</sup>	23.7±8.7 <sup>c</sup>	14.0±3.4 <sup>abc</sup>	17.5±3.5 <sup>abc</sup>	12.0±5.5 <sup>ab</sup>	10.1±4.0 <sup>a</sup>
Supervivenc. (%)	100	100	100	87.5	100	87.5

Los resultados de composición bioquímica de las dietas se reflejan en la tabla XIX. Ambas especies de cangrejo presentan casi el doble de proteínas que la boga de descarte, que a su vez presente un mayor contenido lipídico, 8 veces superior a los cangrejos. Debido a que la boga eviscerada no mejoró el crecimiento respecto a la boga entera, se decidió no analizar dicha dieta por no aportar datos significativos de cara al engorde de pulpo. La estimación de ambas dietas mixtas refleja un perfil similar, con un contenido proteico y lipídico intermedio entre las monodietas de cangrejos y boga de descarte.

**Tabla XIX:** *Composición bioquímica (% peso seco) de las dietas empleadas y estimación de las dietas mixtas (60-40% cangrejo-boga)*

	Cangrejo azul	Cangrejo blanco	BD entera	Cangrejo azul+BD	Cangrejo blanco+BD
Lípidos	7.0±0.4 <sup>a</sup>	6.8±1.3 <sup>a</sup>	47.3±2.2 <sup>b</sup>	23.1	23.0
Proteínas	83.0±2.2 <sup>b</sup>	83.6±3.7 <sup>b</sup>	46.8±3.4 <sup>a</sup>	68.5	68.9
Humeda	79.4±1.5 <sup>b</sup>	76.4±0.9 <sup>b</sup>	63.0±2.8 <sup>a</sup>	72.8	71.0

d						
Cenizas	2.4±0.2	2.3±0.2	2.2±0.5	2.3	2.2	

Finalmente, la composición bioquímica inicial de pulpos salvajes y final de los pulpos alimentados con las distintas dietas se muestran en la tabla X. La glándula digestiva refleja claramente el perfil lipídico de la dieta. El aumento de lípidos del 23% de las dietas mixtas al 47% de la dieta de boga de descarte sola no aumentó significativamente el contenido lipídico de la glándula digestiva, lo que sugiere que el máximo de deposición de este órgano debe ser del 23% o inferior. Por otro lado, el aumento de proteínas en el músculo de los pulpos alimentados con dietas mixtas sugiere un efecto beneficioso de la grasa sobre el crecimiento, así como una buena utilización de los lípidos en esta especie.

**Tabla X:** Composición bioquímica (% peso seco) de los tejidos de pulpo

	Salvajes (inicial)	Cangrejo azul	Cangrejo azul+BD	Cangrejo blanco	Cangrejo blanco+B D	BD entera	
Glándula digest.	Lípidos	21.5±4. 8 <sup>a</sup>	19.5±0.6 <sup>a</sup>	45.6±4. 4 <sup>b</sup>	25.6±1. 8 <sup>a</sup>	48.2±3.9 <sup>b</sup>	45.5±6.1 <sup>b</sup>
	Proteínas	67.6±7. 2 <sup>b</sup>	68.8±0. 4 <sup>b</sup>	43.0±3. 7 <sup>a</sup>	62.5±2. 4 <sup>b</sup>	39.4±5.0 <sup>a</sup>	42.3±5.5 <sup>a</sup>
	Humedad	70.7±4. 7 <sup>b</sup>	69.2±3. 9 <sup>b</sup>	57.0±2. 1 <sup>a</sup>	67.9±2. 4 <sup>b</sup>	57.4±3.0 <sup>a</sup>	64.7±3.7 <sup>ab</sup>
	Cenizas	1.8±0.1	2.0±0.1	1.5±0.2	1.7±0.2	1.5±0.1	1.6±0.2
Músculo	Lípidos	5.5±0.2	5.7±0.2	5.4±0.3	5.8±0.3	5.1±0.6	4.8±0.8
	Proteínas	77.8±3. 2 <sup>a</sup>	78.3±0. 9 <sup>ab</sup>	84.1±0. 3 <sup>c</sup>	78.0±3. 5 <sup>a</sup>	83.6±1.0 <sup>bc</sup>	81.3±1. 0 <sup>abc</sup>
	Humedad	83.6±2.2	85.9±0.4	84.0±0.9	85.2±0.6	84.4±0.9	84.7±1.1
	Cenizas	1.8±0.1	1.6±0.1	1.7±0.0	1.7±0.2	1.6±0.1	1.7±0.0

Sorprendentemente, el cangrejo congelado generó mejores crecimiento que el cangrejo fresco local, motivo por el cual se utilizará en futuros experimentos como base de la dieta control. La boga de descarte, tanto entera como eviscerada, generó un crecimiento peor del esperado. Esto sugiere que el confinamiento podría tener un efecto negativo sobre el crecimiento cuando se suministran dietas basadas exclusivamente en pescado, a diferencia de dietas mixtas o basadas en crustáceos.

## CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que la boga de descarte de acuicultura es un excelente alimento para sub-adultos de pulpo común.
- Sin embargo, la dieta mixta boga-cangrejo azul generó un mayor crecimiento, sugiriendo su mayor valor nutricional. Esta información es de gran utilidad para la formulación de dietas artificiales.

### Tarea 2.1.4. Determinación de la relación proteína-lípidos óptima

#### METODOLOGÍA

Los pulpos salvajes fueron capturados por pescadores profesionales de la Cofradía de Mogán (Sur de Gran Canaria) y transportados en tanques de 500 L hasta las

instalaciones del ICCM. La aclimatación a condiciones de cultivo tuvo una duración de 2 semanas en tanques rectangulares de 2 m<sup>3</sup>, mantenidos en circuito abierto, provistos de guaridas (“T” de PVC) y malla de sombreo. Durante este período, los pulpos fueron alimentados con una dieta mixta de cangrejo *Portunus pelagicus* y boga *Boops boops*.

El sistema de cultivo utilizado durante este estudio fue de tipo individual en tanques compartimentados. Cada tanque rectangular de aclimatación fue dividido en 4 compartimentos de 0.8x1x0.5 m, aprox. 0.4 m<sup>3</sup>, con malla negra de PVC de 1 cm de luz. Se seleccionaron 24 ejemplares macho (1062 ± 238 g), que fueron alojados individualmente en 6 grupos homogéneos de 4 pulpos por tanque. El sistema de cultivo fue en circuito abierto, manteniendo una renovación completa a la hora. En cada compartimento se incluyó una guarida (T de PVC) y cada tanque fue cubierto con malla de sombreo.

Se testaron 3 dietas, cada una suministrada en 2 tanques independientes (n = 8 pulpos por dieta). Las dietas fueron las siguientes:

1. Pienso de alto contenido lipídico (Pienso AL)
2. Pienso de bajo contenido lipídico (Pienso BL)
3. Dieta control: boga *Boops boops* subproducto de la acuicultura, fresca (BD)

Los piensos se basaron en filete de boga salvaje, al que se le añadieron diferentes niveles de varios aceites purificados en ARA, EPA y DHA, aglutinados con alginato y calcio. La formulación empleada se muestra en la Tabla XI.

Los pulpos fueron alimentados una vez al día (8:00 am) a saciedad (porciones individuales de 40-60 g, 5% de su peso diario) y los restos no ingeridos fueron retirados diariamente a las 13:00 y cada tanque sifonado para retirar las migas de pienso. Tanto los restos no ingeridos como las migas fueron secados hasta peso constante a 105° C para estimar la ingesta real y calcular el % de disgregación de cada dieta, que fue restado proporcionalmente de la ingesta de cada pulpo.

Al final del período de estudio (39 días) los pulpos fueron sacrificados mediante inmersión en agua-hielo, para ser posteriormente pesados y diseccionados. Se determinaron los siguientes parámetros biológicos: tasa de crecimiento absoluta (TCA, g/día), tasa de crecimiento estándar (TCE, %/día), tasa de ingesta estándar (TIE, %/día), índice de conversión (IC). Además se extrajo la glándula digestiva para calcular el índice de la glándula digestiva (IGD, %). Por último, se calcularon la tasa de disgregación (D, %) y el incremento de biomasa (IB, %) por tanque (n = 2 por dieta).

Se determinó la composición proximal de las dietas (un pool semanal, n = 6). Además también se analizó el músculo (brazo izquierdo II) y la glándula digestiva al final del período de estudio (n = 8).

**Tabla XI:** Formulación (g/kg) de los piensos AL y BL.

	Pienso AL	Pienso BL
Filete de Boga salvaje	573,5	592,0
Aceite de pescado	2,5	-
EPA50	5,0	1,9
ARA Vevodar)	11,0	4,5
DHA 70	5,0	0,7
Colesterol	3,0	0,9
Alginato	20,0	20,0
Agua destilada	370,0	370,0
Calcio	10,0	10,0
Total	1.000,0	1.000,0

Finalmente, los datos fueron comparados estadísticamente mediante un ANOVA de 1 vía, y cuando se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se aplicó el test de Tukey para determinar las diferencias entre grupos ( $p < 0.05$ ). En el caso del peso final y los parámetros biológicos se incluyó el peso inicial como covariable en el modelo, y cuando se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se aplicó el test de Bonferroni para determinar las diferencias entre grupos ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

El pienso AL presentó un mayor contenido lipídico y energético, y un menor contenido proteico y en humedad que el pienso BL (Tabla XII). La dieta control, la boga “subproducto de la acuicultura”, presentó un mayor contenido proteico y energético que los piensos, y un contenido lipídico similar al pienso AL (Tabla XII).

**Tabla XII:** Composición proximal (% en peso seco) y Energía (KJ/100 g en peso húmedo) de las dietas

	Pienso AL	Pienso BL	BD
Lípidos PS (%)	22,7 ± 0,9 <sup>b</sup>	13,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	22,1 ± 0,9 <sup>b</sup>
Proteínas PS (%)	63,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	71,2 ± 1,2 <sup>b</sup>	71,1 ± 1,2 <sup>b</sup>
Humedad (%)	79,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	81,4 ± 0,7 <sup>c</sup>	71,7 ± 0,9 <sup>a</sup>
Cenizas (%)	2,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
Energía (KJ/100 g PH)	496 ± 12 <sup>b</sup>	418 ± 15 <sup>a</sup>	724 ± 30 <sup>c</sup>

Los ácidos grasos principales de las dietas, que representaron el 92% del total, se muestran en la tabla XIII. Destaca el alto contenido en ARA, EPA y DHA en las dietas formuladas en comparación con la dieta control (boga).

Los pulpos alimentados con los piensos experimentales presentaron un crecimiento, un IB y un peso final similar a los alimentados con la dieta control (Tabla XIV). Estos resultados confirman el adecuado valor nutricional de los piensos experimentales, de acuerdo con estudios previos (Quintana *et al.*, 2008; Estefanell *et al.*, 2011b). Sin embargo, la ingesta fue mayor en los ejemplares alimentados con el pienso AL (Tabla XVII), posiblemente para compensar el menor contenido energético de la dieta. Al contrario que en estudios previos, el IC no presentó diferencias significativas entre la dieta control (fresca) y los piensos (Cerezo Valverde *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008; Estefanell *et al.*, 2011b) (Tabla 4).

**Tabla XIII:** Perfil de ácidos grasos de las dietas (% respecto al total de ácidos grasos)

	Pienso AL	Pienso BL	BD
14:0	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,2 <sup>c</sup>
16:0	14,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	18,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	19,1 ± 0,8 <sup>c</sup>
16:1 n-7	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,2 <sup>c</sup>
16:2n-4	0,6 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
17:0	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>b</sup>
18:0	5,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	5,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
18:1 n-9	15,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	22,8 ± 0,7 <sup>b</sup>
18:1 n-7	1,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>c</sup>
18:1n-5	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
18:2 n-6	4,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	18,4 ± 2,8 <sup>c</sup>

18:3 n-3	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>b</sup>
20:1 n-9	1,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>
20:2n-6	0,5 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>
20:4 n-6	13,1 ± 0,3 <sup>c</sup>	10,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
20:5 n-3	9,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	7,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
22:4 n-6	0,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>
22:5 n-6	1,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
22:5 n-3	1,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,0 <sup>b</sup>
22:6 n-3	17,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	15,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	7,8 ± 1,1 <sup>a</sup>
∑ Saturados	23,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	28,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	28,4 ± 1,1 <sup>b</sup>
∑ Monoenos	22,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	24,3 ± 0,5 <sup>b</sup>	33,4 ± 0,3 <sup>c</sup>
∑ n-3	30,7 ± 0,5 <sup>c</sup>	27,1 ± 0,7 <sup>b</sup>	16,4 ± 1,6 <sup>a</sup>
∑ n-6	21,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	18,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	20,8 ± 2,7 <sup>ab</sup>
∑ n-9	17,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	17,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	25,1 ± 0,5 <sup>b</sup>
∑ n-3 HUFA	29,0 ± 0,5 <sup>c</sup>	25,6 ± 0,7 <sup>b</sup>	13,3 ± 1,7 <sup>a</sup>
∑ n-6 HUFA	16,0 ± 0,3 <sup>c</sup>	12,9 ± 0,6 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
DHA/EPA	1,8 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,2 <sup>ab</sup>
DHA/ARA	1,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	10,1 ± 0,5 <sup>c</sup>
EPA/ARA	0,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,3 <sup>c</sup>

La disgregación fue mayor en los piensos en comparación con la dieta fresca, especialmente en la dieta AL (Tabla XVII), lo que pone de manifiesto la necesidad de mejorar la textura de los piensos, de modo que se maximice la ingesta y se minimicen los residuos orgánicos al medio. A pesar de no haber encontrado diferencias significativas en crecimiento en los pulpos alimentados con el pienso AL y BL, los resultados sugieren que posiblemente el óptimo de lípidos-proteínas podría estar más cercano al 13-71% que al 23-64% en peso seco, aunque son necesarios más experimentos con dietas formuladas con diferentes niveles de lípidos y proteínas para poder obtener un resultado concluyente.

**Tabla XIV:** Peso inicial, peso final, TCA, TCE, TIE, IC, IGD, D e IB en los pulpos tras 39 días de cultivo.

	Pienso AL	Pienso BL	Control: Boga troceada
Peso inicial (g)	847 ± 204	947 ± 286	913 ± 185
Peso final (g)	1269 ± 243	1563 ± 480	1515 ± 250
TCA (g/día)	10.8 ± 1.5	15.8 ± 5.6	15.4 ± 1.8
TCE (%/día)	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1
TIE (%/día)	2.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.2 <sup>b</sup>
IC	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.3	1.9 ± 0.1
IGD (%)	2.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.2 <sup>ab</sup>	3.4 ± 0.4 <sup>b</sup>
D (%)*	21.1 ± 0.9 <sup>c</sup>	16.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
IB (%)*	50 ± 8	65 ± 12	66 ± 1

\* Parámetros calculados por tanque

## CONCLUSIONES



- Los resultados sugieren que el óptimo de lípidos y proteínas en una dieta formulada para pulpo común estaría en torno al 13% de lípidos y el 70% de proteínas en peso seco. Sin embargo, son necesarios más experimentos para confirmar este dato.

**JACUMAR**  
**JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

**INFORME PARCIAL DE SEGUIMIENTO COMUNIDAD  
AUTÓNOMA DE CATALUÑA AÑO (2011)**

**Título: Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos  
del pulpo de roca (*Octopus vulgaris* L.).**

**AUTORES: Alicia Estévez García, Ignasi Gairín Deulofeu,  
Guillermo Guerao Serra, Josu Pérez Larruscain**

**1.-TITULO:** Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos del pulpo de roca (*Octopus vulgaris* L.).

## **2.- PARTICIPANTES**

CCAA de Andalucía, Asturias, Baleares, Canarias, Cataluña, Galicia, Murcia

## **3.- SITUACION FINANCIERA. PRESUPUESTO APROBADO, RECIBIDO Y EJECUTADO**

El presupuesto recibido en la anualidad 2011 ha sido el siguiente:

Total transferido	39.920
-------------------	--------

El presupuesto se ha ejecutado casi en su totalidad en el año 2011.

## **4.- DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

### **OBJETIVOS**

Los objetivos fijados en el proyecto son los siguientes:

- 1.- Mantenimiento de reproductores
- 2.- Cultivo larvario de pulpo utilizando Artemia enriquecida con distintas microalgas y/o emulsiones comerciales. Análisis bioquímico de los metanauplios de Artemia utilizados.
- 3.- Cultivo y nutrición de subadultos de pulpo. Pruebas de diferentes dietas con piensos extrusionados de distinta composición con diferentes atrayentes

### **Objetivo 1.- Mantenimiento de reproductores**

Los reproductores de pulpo se mantienen en el IRTA bajo las siguientes condiciones, especialmente cuando están fuera de la época de puesta natural (verano): fotoperiodo natural, circuito semiabierto y temperatura 18-20°C, con mediciones diarias de temperatura y oxígeno y semanales de nitritos, nitratos y amonio. Los machos se mantienen junto a las hembras durante una semana, y posteriormente se colocan estas últimas en parejas en tanques de 1.500 litros con sus respectivos refugios. La alimentación se basa en cangrejo y pescado 6 días/semana mientras no hay puesta, tras la puesta las hembras dejan de alimentarse, y se espera hasta que las larvas empiezan a eclosionar. Cada 7-10 días se vigilan los refugios para comprobar el estado de desarrollo de la puesta.

Usando estas condiciones se ha conseguido que pulpos estabulados en invierno del 2010 efectuaron la puesta en primavera del 2011 (5 y 20 de marzo) y verano (11,14 y 16 de Junio y 10 y 12 de agosto) con eclosiones en verano y otoño del 2011, respectivamente.

### **Objetivo 2.- Cultivo larvario del pulpo**

En relación al cultivo larvario de pulpo, en el año 2011 se llevaron a cabo 3 experimentos, dos de ellos en el mes de Mayo-Junio con una supervivencia muy baja y otro llevado a cabo en Octubre. En ambos experimentos se probaron distintas metodologías para enriquecer los metanauplios de *Artemia*, probando diferentes dietas tanto de enriquecedores comerciales (Easy selco –INVE-, Algamac –Aqua fauna- y Multigain –

Biomar-) como varias especies de microalgas (*Nannochloropsis sp.*, *Isochrysis galbana* y *Rhodomonas lens*) suministradas solas o mezcladas.

### **Experiencias de Primavera**

Se realizaron 2 pruebas usando las mismas condiciones. En el caso de la prueba A se realizó un especial seguimiento de la evolución de los cubiletes según condiciones de iluminación de cada uno. En la prueba B se centró más en los enriquecedores, ya que se procuró disponer de una iluminación similar en todos los cubiletes, en un rango comprendido entre los 80 y 150 lux.

Los experimentos se realizaron en 2 tanques de 1500L. Las larvas se mantuvieron en cubiletes de 30 y 60 L, en total 3 cubiletes de cada tipo en cada tanque usando 2 cubiletes por cada dieta. Se trabajó con dos intensidades de luz (en el caso de la experiencia A), tanque 1 en torno a 350-450 lux, y tanque 2 en torno a 100-150 lux. La densidad de paralarvas fue de 10 larvas/L (2.700 larvas/tanque)

Se trabajó con agua verde, *Nannochloropsis* concentrada a una densidad de 1,5 millones/ml. Como fuente de alimento se utilizó artemia de 48h. En total se establecieron 3 dietas diferentes;

- Enriquecimiento con Easy selco.
- Enriquecimiento con Algamac.
- Enriquecimiento con Multigain.

La artemia se suministraba en 2 tomas a las 10h y 16h enriquecida con cada uno de los productos comerciales al menos durante 2 horas. La densidad de las presas fue de 0,3 art/ml (9.000 artemias/cubilete).

El tanque se mantenía sin circulación durante el día, tan sólo con una suave aireación, y por la tarde a última hora se ponía en marcha el módulo, en sistema semiabierto usando un caudal de renovación de agua nueva de 200L/hora. Por la mañana a primera hora se paraba el módulo, antes de dar las tomas de comida y de suplementar las aguas verdes. La salida de agua era central. La Tª de cultivo 20°C. Se realizaron medidas diarias de Tª y O2, y semanales de pH, nitratos, nitritos y amonio.

### **Experiencia de Otoño**

En este caso la experiencia se realizó directamente en los tanques de 1.500 L sin usar cubiletes. La densidad de paralarvas fue de 3.33 larvas/L (5.000 larvas/tanque). En total 3 tanques (15.000 larvas).

Se trabajó con agua verde en los tanques nº 2 y 3, *Nannochloropsis* concentrada a una densidad de 1,5 millones/ml. El tanque nº 1 se mantuvo con agua cruda, sin agua verde.

La dieta estaba constituida por artemia de 48h. 3 pruebas diferentes;

- Tanque nº1: enriquecida Rhodo+Iso. Sin agua verde. Suplementos de zoea centolla congelada periódicamente.
- Tanque nº2: enriquecida Algamac. Con agua verde. Suplementos de zoea de centolla congelada periódicamente.
- Tanque nº3: enriquecida Rhodo+Iso. Con agua verde. Suplementos de zoea de centolla congelada periódicamente.

El suministro de Artemia (10 y 16 h), tiempo de enriquecimiento (min 2h) y densidad de presas (0,3 NA/ml) fue el mismo que en la experiencia de primavera (450.000 artemias/tanque). A partir del día 7 la densidad de presas se aumentó a 0,4 art/ml. Se enriquecía con fito (los señalados anteriormente) en cubos unas 2 horas antes de administrar la toma. Los quistes se ponían a eclosionar por la tarde, de forma que

coincidiera el enriquecimiento con la apertura del digestivo de los nauplios a las 36-38 horas.

Las condiciones de renovación del agua del tanque fueron también las mismas que en el experimento de primavera, durante el día sin circulación y renovación de 200L/h por la tarde-noche. La salida de agua era lateral (centro tubo ciego). Una malla de 300 micras evitaba que se escapasen las larvas, pero daba pie a la renovación de presas diariamente. La Tª de cultivo fue de 20°C. Se realizaron medidas diarias de Tª y O2, y semanales de pH, nitratos, nitritos y amonio.

Periódicamente se tomaban muestras de paralarvas para estimar el crecimiento en talla (lupa binocular Nikon SMZ80, fotografía y análisis de imagen) y peso (peso seco individual) y observación del desarrollo larvario.

### **Objetivo 3.- Cultivo y nutrición de subadultos de pulpo**

En el año 2011 se realizaron 2 experiencias (primavera –abril- y otoño – octubre/Noviembre-) de uso de saborizantes-atractivos en el pienso para engorde de pulpo. Los experimentos se realizaron con pulpos de 850-950 g utilizando piensos suministrados por la Universidad Politécnica de Valencia. La metodología empleada y los resultados obtenidos se indican en el apartado de resultados (pagina 8)

## **RESULTADOS OBTENIDOS. INDICADORES Y METAS. CONCLUSIONES**

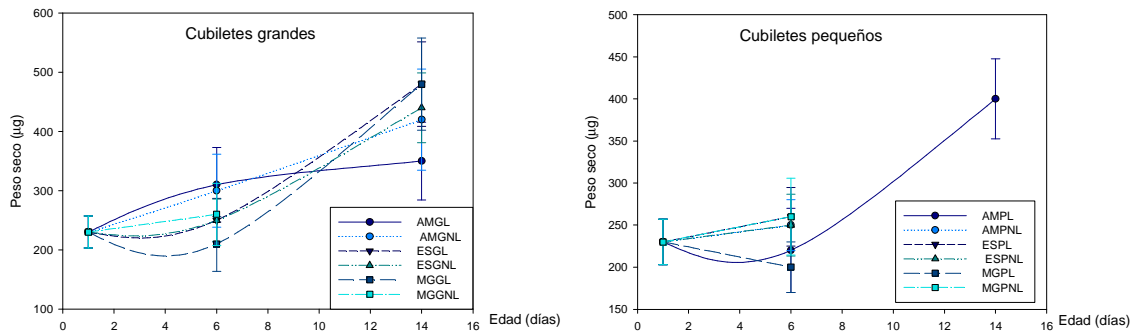
### **Objetivo 1.- Mantenimiento de reproductores**

Las condiciones utilizadas en el IRTA para mantenimiento de reproductores (temperatura constante, baja iluminación y buena alimentación) fueron adecuadas para obtener puestas en primavera, verano y otoño. Las puestas tuvieron lugar los días 11, 14 y 16 de Junio y 10 y 12 de Agosto.

### **Objetivo 2.- Cultivo larvario del pulpo**

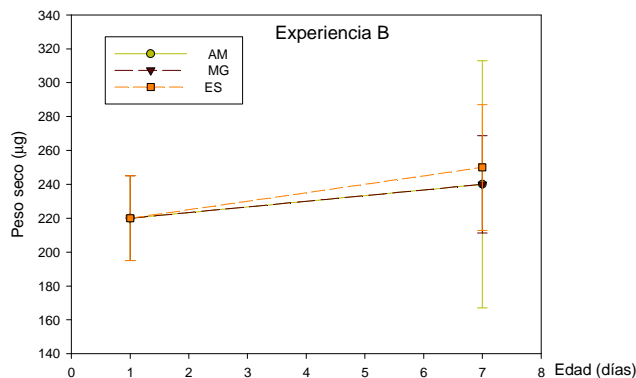
#### ***Experiencias de Primavera***

Los resultados de crecimiento y supervivencia larvaria en ambos experimentos (A y B) fueron muy malos, en ambos casos el crecimiento fue nulo durante la primera semana de vida lo que nos daba ya una idea de la mala calidad inicial de las larvas. De cualquier modo los experimentos fueron útiles para poder fijar las condiciones de luz y cultivo más idóneas para aplicar en experimentos posteriores (p.ej. volúmenes pequeños de cultivo no son adecuados para esta especie igual que condiciones de alta intensidad de luz). Los resultados de crecimiento se muestran en las figuras siguientes:



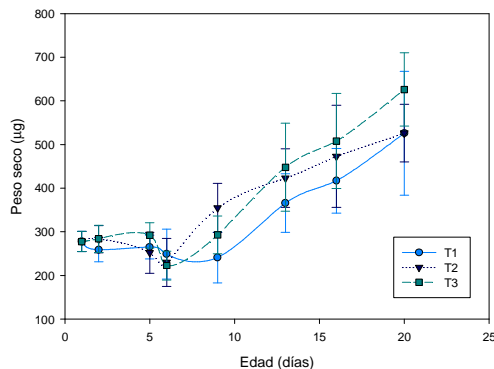
Donde AM, ES y MG indican el enriquecedor (Algamac, Easy Selco, Multigain), G y P indican el tamaño del cubilete (pequeño, grande) y L y NL la intensidad de luz (L aprox 380 lux, NL aprox 130 lux).

En el experimento B donde se usaron únicamente cubiletos grandes con baja intensidad de luz (80-150 lux) los resultados de crecimiento fueron incluso peores que en el experimento A, con una mala calidad de larvas inicial y sin registrar apenas crecimiento durante la primera semana, como se muestra en la siguiente figura:



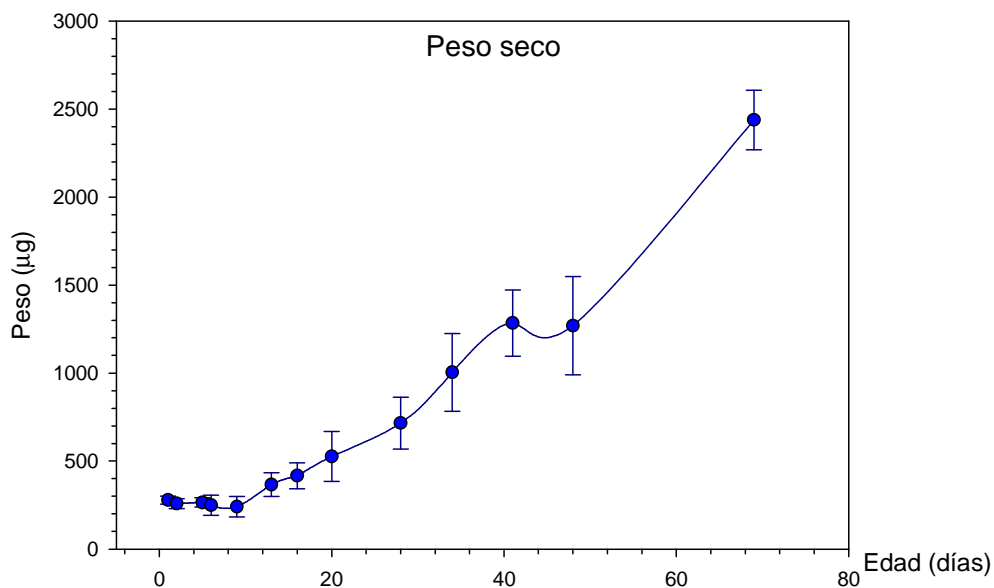
### Experiencia de Otoño

La experiencia de otoño fue similar a las anteriores realizadas en primavera pero en este caso elegimos como enriquecedores el tratamiento que nos dio mejores resultados en primavera (Algamac, T2) y el que nos dio mejores resultados en años anteriores (mezcla de *Rhodomonas* e *Isochrysis*, T1 y T3) introduciendo una diferencia que fue no usar agua verde (T1) en uno de los tratamientos. Los resultados de crecimiento se muestran a continuación. En este caso se partió de unas larvas iniciales de mejor calidad que las usadas en primavera, con un mayor peso seco inicial (278 µg) y una mayor movilidad y captura de presas vivas inicial. Los tres tratamientos crecieron relativamente bien los primeros 20 días de vida aunque la supervivencia fue muy distinta entre ellos, así el tanque 1 (artemia enriquecida con Rhodo+Iso y sin agua verde) hubo de ser eliminado a día 20 y el tanque 2 (artemia enriquecida con Algamac) el día 41.



A partir del día 23 comenzó el suministro de Artemia de 5 días junto con zoeas de centolla congeladas (a partir de día 55) y posteriormente artemia adulta y misidaceos (géneros Hemimysis y Siriella) a partir del día 72. Alrededor del día 100 las paralarvas/juveniles supervivientes comenzaron a irse al fondo por lo que se dispusieron una serie de refugios (pedazos de tubo corrugado como el que se usa en columnas desgasificadoras), para entonces teníamos alrededor de 25 animales supervivientes. El día 110 y debido a la acumulación de suciedad en el fondo sólo pudimos recuperar 1 juvenil. El crecimiento de los individuos supervivientes hasta día 70 se muestra en la figura siguiente (no se realizaron más medidas de peso para evitar manipular en exceso los pocos juveniles resultantes) que se ajusta a una curva de crecimiento exponencial

$$y = 288 e^{0.0314 \text{ edad}}$$



La supervivencia obtenida en esta experiencia se muestra en la tabla la siguiente:

Día	Larvas	Supervivencia
1	5000	
72	500	10
89	30	0,6
95	27	0,54
100	25	0,5
103	18	0,36
107	11	0,22
108	3	0,06
110	1	0,02

En la actualidad (7 de febrero de 2012) el juvenil superviviente sigue vivo y está siendo alimentado con misidáceos.

En cuanto a la composición en ácidos grasos de la Artemia enriquecida con los distintos productos comerciales los resultados son los siguientes

	ES	AM	MG
Total lipids (mg·g <sup>-1</sup> DW)	219.8±17.4	184.4±17.0	159.6±8.3
Total FA (mg·g <sup>-1</sup> DW)	155.9±54.8	124.0±43.0	116.1±24.1
14:0	0.7±0.1	0.8±0.4	0.6±0.3
16:0	9.9±0.4	10.3±1.7	10.7±0.4
18:0	4.2±0.2	4.5±0.2	3.8±0.7
Total saturated	14.9±0.3	15.9±2.6	15.1±0.7
16:1n-7	2.1±0.6	1.1±0.3	1.1±0.2
18:1n-9	33.3±2.6 <sup>ab</sup>	26.2±10.1 <sup>ab</sup>	17.8±6.1 <sup>b</sup>
18:1n-7	0.0±0.0	4.1±7.0	3.1±5.4
20:1n-9	2.5±0.2 <sup>a</sup>	1.1±0.2 <sup>b</sup>	1.2±0.2 <sup>b</sup>
Total monounsaturated	38.8±3.7 <sup>ab</sup>	32.7±3.2 <sup>ab</sup>	23.5±2.4 <sup>b</sup>
18:2n-6	8.28±0.04 <sup>a</sup>	5.2±1.0 <sup>b</sup>	5.5±0.5 <sup>ab</sup>
18:3n-6	0.56±0.03	0.5±0.2	0.4±0.1
20:4n-6	0.5±0.1 <sup>cd</sup>	0.7±0.1 <sup>bc</sup>	1.1±0.2 <sup>ab</sup>
22:5n-6	0.1±0.07	2.2±1.9	3.7±3.2
Total n-6 PUFA	9.5±0.2	8.6±2.3	10.8±3.7
18:3n-3	18.9±1.8	24.1±6.1	21.4±2.1
18:4n-3	2.3±0.3	2.9±0.6	2.9±0.4
20:4n-3	0.4±0.6	0.6±0.5	0.8±0.1
20:5n-3	7.6±0.6 <sup>a</sup>	3.1±0.4 <sup>cb</sup>	4.9±0.4 <sup>cb</sup>
22:5n-3	1.4±0.3	1.2±2.0	1.8±2.4
22:6n-3	5.5±1.5 <sup>cd</sup>	9.5±0.9 <sup>bc</sup>	16.9±2.0 <sup>a</sup>
Total n-3 PUFA	36.5±3.5 <sup>ab</sup>	42.5±4.6 <sup>a</sup>	50.4±2.3 <sup>a</sup>
Total polyunsaturated	46.0±3.7 <sup>ab</sup>	21.1±5.9 <sup>a</sup>	61.1±2.3 <sup>a</sup>
(n-3)/(n-6)	3.9±0.3	5.2±1.5	5.2±2.4



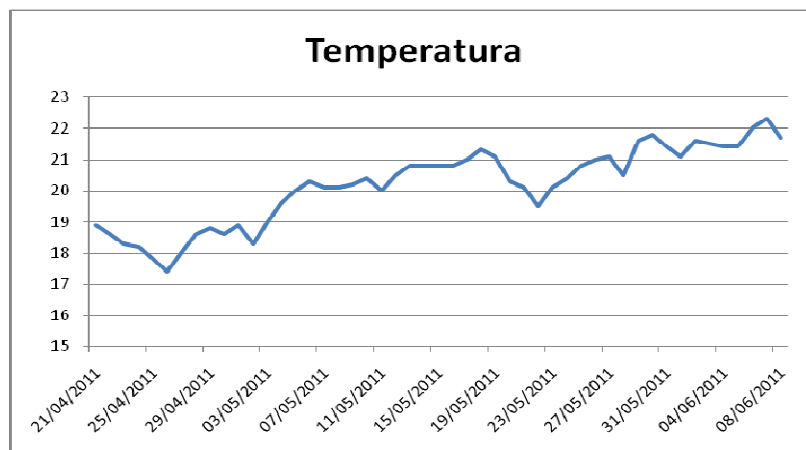
### Objetivo 3.- Engorde de subadultos

En el anterior proyecto "Optipulpo" se consiguió un pienso seco extrusionado con características físicas adecuadas para que el pulpo lo ingiriese con normalidad, aunque se plantea la necesidad de incrementar la ingestión y el crecimiento. Por ello se plantea esta primera prueba para estudiar el efecto sobre la aceptabilidad y consumo de alimento y crecimiento de diferentes atrayentes-saborizantes de origen marino.

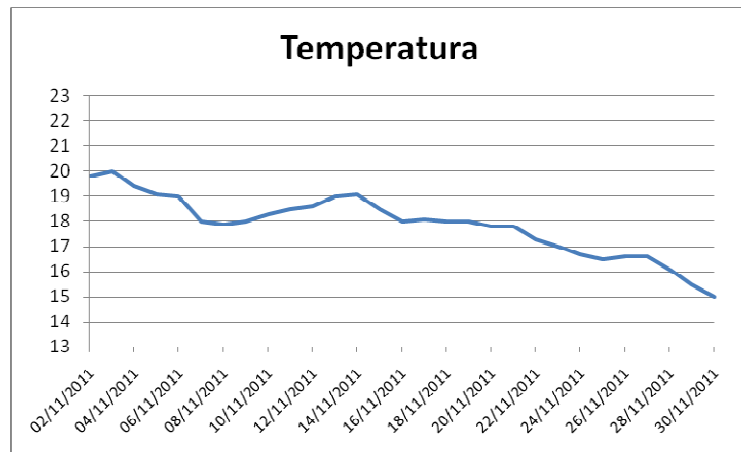
### Material y métodos

Los ejemplares de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) fueron capturados con métodos artesanales en las costas del Delta del Ebro y trasladados a las instalaciones del IRTA, donde se estabularon en tanques de 1.500 a 2.000 litros y se mantuvieron en circuito abierto.

Se realizaron dos experimentos: en el primero (experimento 1) se capturaron los ejemplares en primavera, concretamente entre los días 6 y 7 de abril. La temperatura media a la que llevó a cabo el experimento 1 fue de 20.2 °C; y la mínima concentración de oxígeno registrada fue de 5.2 ppm. El peso medio inicial de los lotes fue de 952 g por pulpo para el tanque control con un CV de 9.02%, y de 955 g con un CV de 10.96 % y 960 g y un CV de 8.4 % para los ensayos con pienso (HP/K y 3HP/K).



En el segundo experimento (experimento 2) se utilizaron ejemplares capturados en otoño, todos en una misma jornada coincidiendo con el 17 de octubre. La temperatura media a la que se realizó el experimento fue de 17.8 °C. y la concentración de oxígeno se mantuvo siempre por encima de los 5.8 ppm. El peso medio inicial de los pulpos para esta experiencia fue de 850 g para el tanque control con un CV del 20.6 %, y de 863 g con un CV del 22.8% y 870 con un CV del 20% para los ensayos con piensos (MR y CR).



Los experimentos comenzaron tras un periodo de adaptación de aproximadamente dos semanas, periodo en el cual se les alimentó básicamente con cangrejo (*Carcinus sp.*) y ocasionalmente lisa (*Liza sp.*).

Se ensayaron tres tipos de dietas: dos piensos extrusionados con distintos saborizantes (Tabla 2), y una dieta control a base de cangrejo y lisa.

Las dietas fueron elaboradas y suministradas por la Universidad Politécnica de Valencia (ver informe de la Comunidad Valenciana).

Los pulpos se distribuyeron en tres tanques (T8, T10 y TEsc.), divididos cada uno de ellos en seis compartimentos. En cada compartimento se ubicó un ejemplar (6 pulpos por tratamiento).



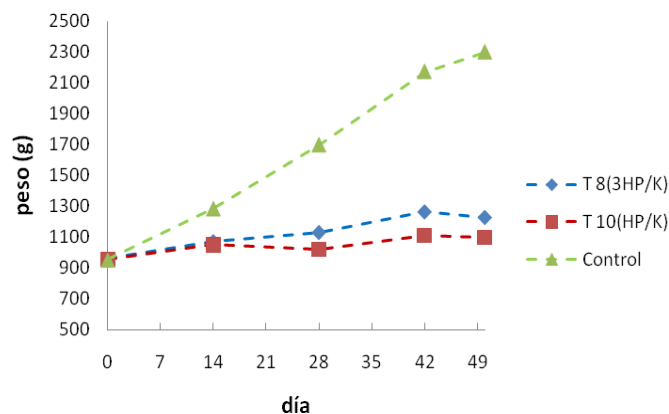
La alimentación se realizaba una vez al día (entre las 9 y las 10 de la mañana). En el caso de los ensayos con pienso y entre las 16 y las 17 horas se recogían los restos de alimento no consumido, para poder realizarse el cálculo de las ingestas. Las tasas de alimentación, en el caso de los pulpos que comían el alimento natural congelado (control) fue de un 10% cuando este consistía en pescado y de un 15% si era cangrejo. Cuatro días a la semana se suministraba pescado, dos días cangrejos y un día de ayuno. En el caso de los tratamientos con alimentación artificial (piensos extrusionados) la tasa de alimentación fue de 1-2 % y también ayunaban un día a la semana

## EXPERIMENTO 1

En cada uno de los tanques del ensayo se colocaron 3 hembras y 3 machos. Los muestreos de peso se realizan cada 2 semanas (14 días), pesando de forma individual cada uno de los pulpos de los tres tratamientos. Para ello, se sacaban los seis pulpos de cada compartimento, se introducían individualmente en una bolsa de malla y posteriormente se devolvían a su tanque. La temperatura al inicio de la prueba fue de 19 °C y de 23°C cuando se decidió finalizar la misma. La prueba tuvo una duración de 7 semanas. El experimento no se prolongó hasta la octava semana debido al aumento de la temperatura; si las temperaturas son elevadas (>23 Cº) las tasas de ingesta disminuyen significativamente.

## Resultados

La figura siguiente muestra los resultados de crecimiento obtenidos durante la prueba, donde se observa un crecimiento mayor y lógico, de los pulpos alimentados con alimento natural (cangrejo y lisa), mientras que las dos dietas extrusionadas presentan un comportamiento similar entre sí.



Las siguientes tablas muestran los pesos medios, la desviación estándar, el CV y el TEC (tasa de crecimiento específica) obtenidos de cada lote en los diferentes muestreos realizados a lo largo de la experiencia 1.

dia 0	3HP/K T 8 pienso	HP/K T 10 pienso	T Esc. Control
Promedio	960	955	952,5
desvest	80,68	104,69	85,89
CV	8,40%	10,96%	9,02%

dia 14	T 8 pienso	T 10 pienso	T ESC control
promedio	1073	1049	1285
desvest	110,32	112,36	96,70
CV	10,28%	10,71%	7,52%

dia 28	T 8 pienso	T 10 pienso	T ESC control
promedio	1132,5	1020	1698,75
desvest	105,55	116,38	210,28
CV	9,32%	11,41%	12,38%

dia 42	T 8 pienso	T 10 pienso	T ESC control
promedio	1266,25	1108,75	2172,5
desvest	65,37	109,62	237,32
CV	5,16%	9,89%	10,92%

dia 49	T 8 pienso	T 10 pienso	T ESC control
promedio	1230	1096,25	2300
desvest	123,09	84,82	314,19
CV	10,01%	7,74%	13,66%

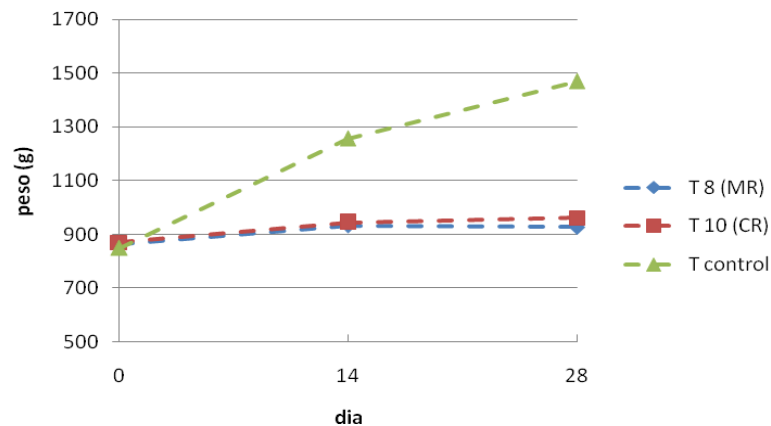
<b>TEC</b>	T8 (3HP/K)	0,47
<b>TEC</b>	T10 (HP/K)	0,23
<b>TEC</b>	Control	1,73

## EXPERIMENTO 2

La prueba tuvo una duración de 4 semanas y los muestreos de peso se realizaron cada 2 semanas, pesando de forma individual cada uno de los pulpos de los tres tratamientos. Para ello, se sacaban los seis pulpos de cada compartimento, se introducían individualmente en una bolsa de malla y posteriormente se devolvían a su tanque. El experimento no se prolongó hasta la sexta semana debido al descenso de la temperatura; si las temperaturas son inferiores a los 15-16 °C las tasas de ingesta disminuyen significativamente con lo que la tasa de crecimiento también se ve mermada de forma notable.

## Resultados

La siguiente figura muestra los resultados de crecimiento obtenidos durante la primera quincena de la prueba, donde se observa un crecimiento mayor de los pulpos alimentados con alimento natural (cangrejo y lisa), mientras que los pulpos alimentados con las dos dietas extrusionadas presentaron un crecimiento similar pero muy inferior al obtenido con dieta natural.



Las siguientes tablas muestra los pesos medios, la desviación estándar, el CV y el TCE (tasa de crecimiento específica) obtenidos de cada lote en los diferentes muestreos realizados a lo largo de la experiencia 2.

dia 0	MR T 8 pienso	CR T 10 pienso	T Esc control
promedio	863	870	850
desvest	197	174	175
C.V.	22,8%	20,0%	20,6%

dia 14	T 8 pienso	T 10 pienso	T Esc control
promedio	933	944	1256
desvest	303	114	428
C.V.	32,5%	12,1%	34,1%

dia 28	T 8 pienso	T 10 pienso	T Esc control
promedio	928	962	1470
desvest	321	89,0	822
C.V.	34,6%	9,3%	55,9%

	T 8 (MR)	T 10 (CR)	control
<b>C.V. inicial</b>	22.8 %	20 %	20.6 %
<b>C. V. final</b>	34.6 %	9.3 %	55.9 %

<b>TEC</b>	T8 (MR)	0,26
<b>TEC</b>	T10 (CR)	0,36
<b>TEC</b>	Control	1,95

## 5.- AJUSTE CON LOS OBJETIVOS PREVISTOS Y REPROGRAMACIONES

Todos los objetivos previstos en el proyecto se han visto cumplidos a lo largo del año 2011 tanto en tiempo como en programación.

## 6.- CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el año 2011 hemos extraído las siguientes conclusiones:

- 1.- La estabulación y alimentación de los reproductores antes de la puesta en las condiciones más óptimas es imprescindible para obtener unas larvas de buena calidad (véase la diferencia entre las larvas obtenidas en verano a partir de hembras recién estabuladas y las obtenidas en otoño con hembras que llevaban varios meses estabuladas)
- 2.- La pérdida de peso de las larvas en la primera semana de vida indica una deficiente calidad de las mismas, al igual que la deficiente o nula captura de presas por parte de las larvas en los primeros días de cultivo
- 3.- Los cambios en el tamaño (nauplio a metanauplio y luego a adulto) y tipo (Artemia, zoea de centolla, misidaceos) de presas vivas han de hacerse en el momento oportuno, ya que ello conlleva mantener el crecimiento y la supervivencia de las paralarvas
- 4.- Es necesario poner refugios cuando ocurre la metamorfosis, pero también es necesario mantener una buena higiene de los tanques
- 5.- Los valores de crecimiento, de los ejemplares adultos, que se han obtenido con las dietas extrusionadas han sido bajos en comparación con los resultados mostrados con la dieta natural. Las diferencias entre tipos de pienso no han sido significativas. Es necesario seguir investigando nuevas dietas artificiales que puedan proporcionar mejores resultados.

**JACUMAR**  
**JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

**INFORME PARCIAL DE SEGUIMIENTO COMUNIDAD**  
**AUTÓNOMA DE CATALUÑA AÑO (2012)**

**Título: Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos del pulpo de roca (*Octopus vulgaris* L.).**

**AUTORES: Alicia Estévez García, Ignasi Gairín Deulofeu, Guillermo Guerao Serra**

**1.-TITULO:** Nutrición y alimentación de paralarvas y subadultos del pulpo de roca (*Octopus vulgaris* L.).

## **2.- PARTICIPANTES**

CCAA de Andalucía, Asturias, Baleares, Canarias, Cataluña, Galicia, Murcia

## **3.- SITUACION FINANCIERA. PRESUPUESTO APROBADO, RECIBIDO Y EJECUTADO**

Dado el recorte presupuestario acordado por la Jacumar y los integrantes del proyecto el presupuesto recibido en la anualidad 2012 ha sido el siguiente:

Total transferido	28749,21€
-------------------	-----------

El presupuesto se ha ejecutado en su totalidad en el año 2012 en la realización de los experimentos de engorde de subadultos indicados a continuación.

## **4.- DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

### **OBJETIVOS**

El objetivo contemplado en esta anualidad es el indicado en el proyecto como objetivo 2.2 Optimización de los formatos de piensos para el pulpo de roca

### **Objetivo 2.2. Optimización de los formatos de piensos para el pulpo de roca**

En el año 2011 el proyecto "Nutripulpo" realizó dos ensayos de engorde uno utilizando un pienso seco extrusionado elaborado por la Universidad Politécnica de Valencia que contenía harina de pescado y krill y con unas características físicas adecuadas para que el pulpo lo ingiriese con normalidad y otro ensayo en el que se probaron 2 atractantes basados en esencia de marisco y calamar. Para el año 2012 se planteó la necesidad de modificar la composición para incrementar la ingestión y el crecimiento Por ello se plantearon 2 nuevos ensayos, uno realizado en primavera en el que se usaron dos piensos extrusionados con distintas proporciones de harina de calamar y de pescado y otro llevado a cabo en otoño en el que se probaron distintas proporciones de 3 harinas (pescado, calamar y krill).

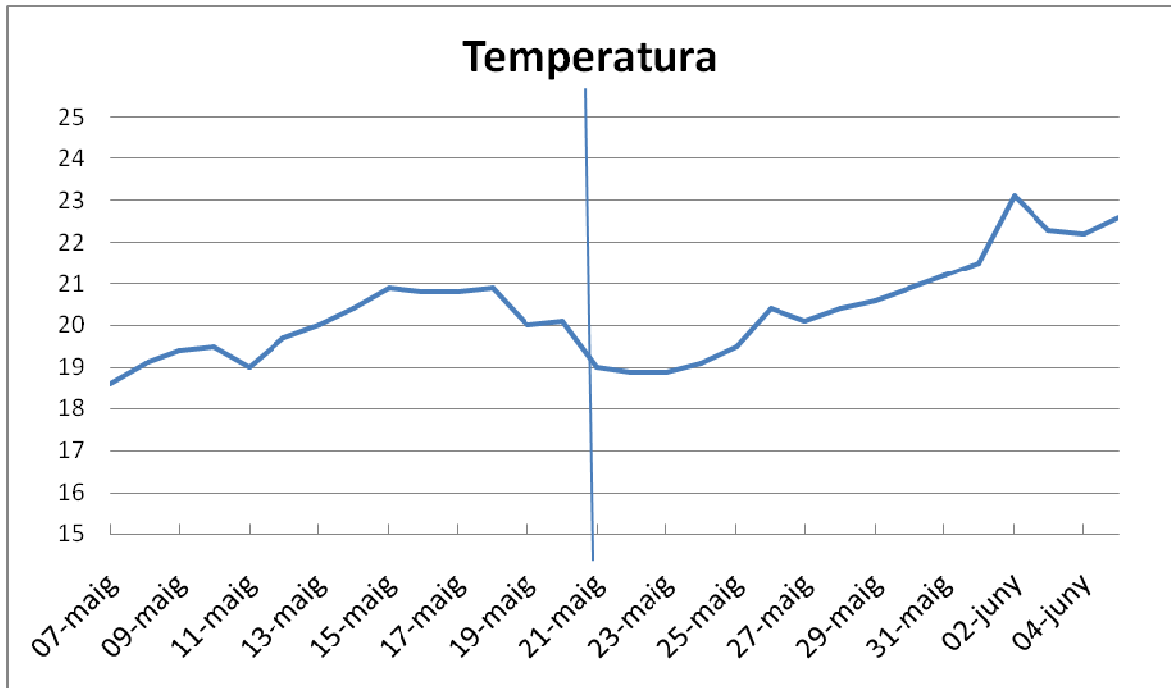
### **Material y métodos**

Los ejemplares de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) fueron capturados con métodos artesanales en las costas del Delta del Ebro y trasladados a las instalaciones del IRTA, donde se estabularon en tanques de 1.500 a 2.000 litros. Se mantuvieron en circuito abierto y durante la primera semana de cautividad fueron alimentados con cangrejo (*liocarcinus depurator*) para facilitar la adaptación a las nuevas condiciones de engorde.

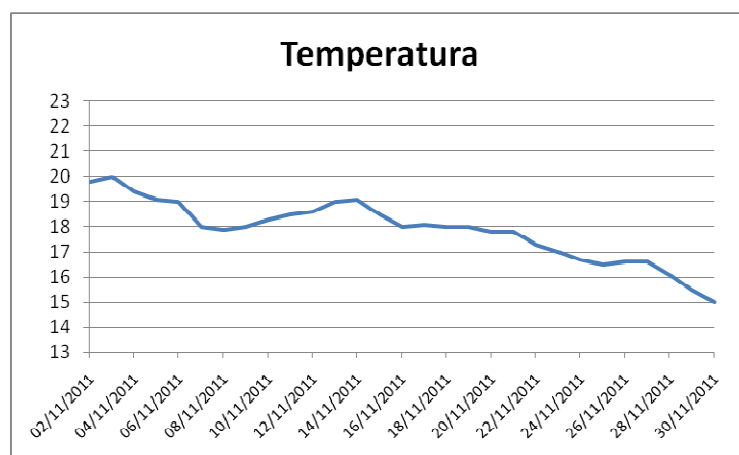
Se realizaron dos experimentos: El primero se llevó a cabo durante el mes de mayo e inicios de junio. Se capturaron los ejemplares durante la primera última semana de abril y se inició la experiencia el día 7 de Mayo, cuando la temperatura del agua era de 18,6 °C. La temperatura media a la que llevó a cabo el experimento 1 fue de 20.3 °C; y la mínima



concentración de oxígeno registrada fue de 5.2 ppm. El peso medio inicial de los lotes fue de 675 g por pulpo para el tanque control con un CV de 28.2%, y de 640 g con un CV de 40.5 % para el pienso 3 HPC (3 veces harina de pescado por 1 de harina de calamar) y 660 g y un CV de 25.1 % p para el pienso HPC (harina de pescado y calamar al 50% cada una).



En el segundo experimento se utilizaron ejemplares capturados en otoño, entre los días 3 i 5 de octubre. La temperatura media a la que se realizó el experimento fue de 17,8°C y la concentración de oxígeno se mantuvo siempre por encima de los 5,8 ppm. El peso medio inicial de los pulpos para esta experiencia fue de 792 g para el tanque control con un CV del 9,38%, de 806 g con un CV del 9.95% para el ensayo con pienso 50 CP (harinas de pescado, krill y calamar sumando un 50%) y 754 g con un CV del 8,25% para el pienso 45CP (harinas de pescado, krill y calamar sumando un 45%)



Los experimentos comenzaron tras un periodo de adaptación de aproximadamente una semana, periodo en el cual se les alimentó básicamente con cangrejo (*Carcinus sp.*) Se ensayaron tres tipos de dietas: dos piensos extrusionados con distintos tipos de harina elaboradas y suministradas por la Universidad Politécnica de Valencia y una dieta control a base de cangrejo y lisa.

La composición de las dietas ensayadas (en %) se muestra en las tablas siguientes

	Gelatina	Maltodextrina	Huevina	Harina Pescado	Harina Calamar	Taurina
<b>HPC</b>	19.6	9.8	29.4	19.6	19.6	2
<b>3HPC</b>	19.6	9.8	29.4	29.4	9.8	2

Tabla 1.- Composición del pienso extrusionado utilizado en la prueba de primavera

	Harina Pescado	Harina Krill	Harina Calamar	Maltodextrina	Gelatina	Huevina	Taurina	Complejo Vitmainico
45CP	15	20	20	10	10	20	2.5	2.5
50CP	15	25	25	10	10	10	2.5	2.5

Tabla 2.- Composición del pienso extrusionado utilizado en la prueba de otoño

Los pulpos se distribuyeron en tres tanques (T8, T10 y TEsc.), divididos cada uno de ellos en seis compartimentos. En cada compartimento se ubicó un ejemplar (6 pulpos por tratamiento).



La alimentación se realizaba una vez al día (entre las 9 y las 10 de la mañana) en el caso del tanque control y dos veces al día para poder recoger el alimento no ingerido en el caso de los tanques alimentados con el pienso extrusionado en los que se alimentaba a las 9 h, se recogían el alimento sobrante a las 13h, posteriormente se les suministraba la

segunda ración que se recogía a las 17h. El pienso sobrante fue secado en una estufa a 60 °C para poder igualar las humedades del pienso en el momento del suministro al del porcentaje de agua en el momento de la extracción y así poder obtener la cantidad real de pienso ingerido

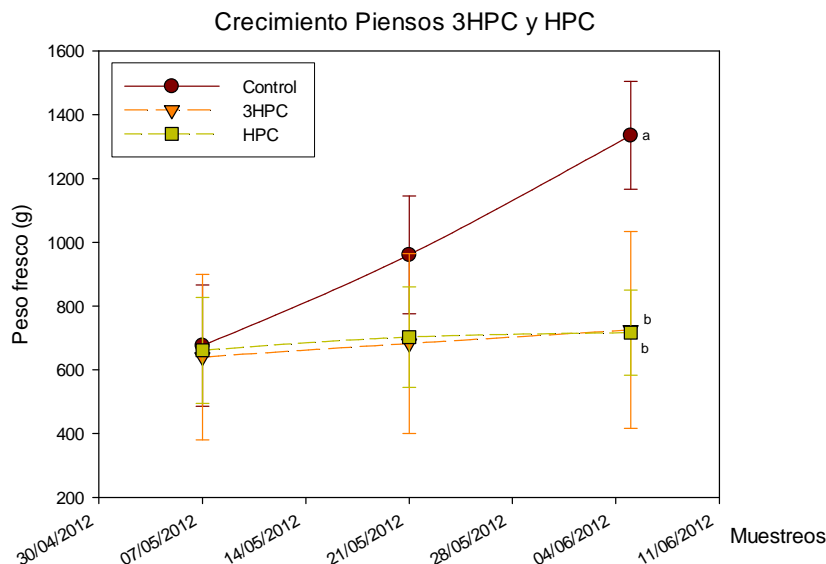
Las tasas de alimentación, en el caso de los pulpos que comían el alimento congelado (control) fué del 10% cuando este consistía en pescado blanco y del 15% cuando era cangrejo. Cuatro días a la semana se suministraba pescado, dos días cangrejo dejando el sábado como día de ayuno. En el caso de los tratamientos con alimentación artificial (piensos extrusionados) la tasa de alimentación fue de 1-1,5 % dejando también un día en ayuno.

## EXPERIMENTO 1

En cada uno de los tanques del ensayo se colocaron 3 hembras y 3 machos. Los muestreos de peso se realizan cada 2 semanas (14 días), pesando de forma individual cada uno de los pulpos de los tres tratamientos. Para ello, se sacaban los seis pulpos de cada compartimento, se introducían individualmente en una bolsa de malla y posteriormente se devolvían a su tanque. La temperatura al inicio de la prueba fue de 18.9 °C y de 22.6°C al final. La prueba tuvo una duración de 4 semanas.

## Resultados

La figura siguiente muestra los resultados de crecimiento obtenidos durante la prueba, donde se observa un crecimiento significativamente mayor (ANOVA  $P < 0.001$ ) de los pulpos alimentados con alimento natural (cangrejo y lisa), mientras que las dos dietas extrusionadas presentan un comportamiento similar entre sí, aunque en el muestreo intermedio las diferencias entre los 3 grupos no eran significativas (ANOVA,  $P = 0.073$ )



Las siguientes tablas muestran los pesos medios, la desviación estándar, el CV y el TEC (tasa de crecimiento específica) obtenidos de cada lote en los diferentes muestreos realizados a lo largo de la experiencia 1.

dia 0	3HPC T 10 pienso	HPC T 8 pienso	T Esc. Control
Promedio	640	660.83	675.83
desvest	259.54	166.63	190.51
CV	40.55%	25.21%	28.19%

dia 14	3HPC T 10 pienso	HPC T 8 pienso	T ESC control
promedio	682.50	702.50	960.83
desvest	281.86	157.98	184.94
CV	41.30%	22.49%	19.25%

dia 28	3HPC T 10 pienso	HPC T 8 pienso	T ESC control
promedio	725.00	716.67	1335.00
desvest	309.13	133.48	169.12
CV	42.64%	18.62%	12,67%

<b>TEC</b>	T8 (HPC)	0.29
<b>TEC</b>	T10 (3HPC)	0.34
<b>TEC</b>	Control	2.21

## EXPERIMENTO 2

La prueba tuvo una duración de 4 semanas (del 15 de Octubre al 12 de Noviembre de 2012) y los muestreos de peso se realizaron cada 2 semanas, pesando de forma individual cada uno de los pulpos de los tres tratamientos. Para ello, se sacaban los seis pulpos de cada compartimento, se introducían individualmente en una bolsa de malla y posteriormente se devolvían a su tanque. La temperatura inicial del ensayo fue de 21,6°C y la final 17,0°C

### Protocolo de recogida de heces

Se marcaron 4 botes de orina en los que se fueron acumulando las heces de cada uno de los 3 experimentos: 1, 2 y 3

1. Tanc Esc. (control) → dieta congelada: 2 botes
  - a) Heces de cangrejo (*Liocarcinus depurator*)

b) Heces depescado (*Boops boops*)

2. Tanc 10 → heces del pienso 50 CP
3. Tanc 8 → heces del pienso 45 CP

Las heces de cada ensayo se iban acumulando en los botes de orina que estaban en el congelador a -20°C

Pautas de recogida de heces en el tanque control:

Lunes: no se recogían. Se extraían todas las heces acumuladas del fin de semana y que correspondían a la ingesta del viernes y el domingo

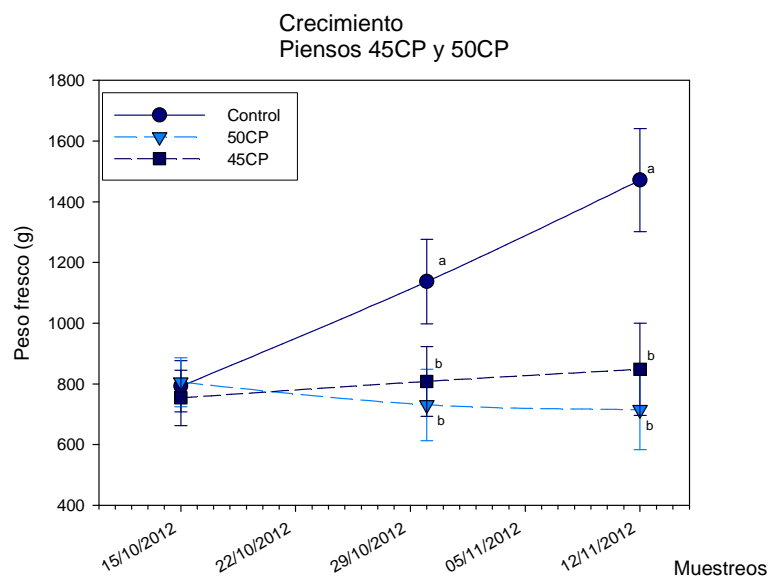
Miércoles: a primera hora, se recogían las heces que mayoritariamente eran del pescado ingerido el lunes y el martes

Jueves: a primera hora, se recogían las heces que correspondían al cangrejo ingerido los miércoles.

Viernes: NO se realizaba recogida.

## Resultados

La siguiente figura muestra los resultados de crecimiento obtenidos durante la primera quincena de la prueba, donde se observa un crecimiento mayor de los pulpos alimentados con alimento natural (cangrejo y lisa), mientras que los pulpos alimentados con las dos dietas extrusionadas presentaron un crecimiento significativamente menor al obtenido con dieta natural, tanto en el muestreo intermedio como en el final.



Las siguientes tablas muestra los pesos medios, la desviación estándar, el CV y el TCE (tasa de crecimiento específica) obtenidos de cada lote en los diferentes muestreos realizados a lo largo de la experiencia 2.

dia 0	45CP T 8 pienso	50 CP T 10 pienso	T Esc control
promedio	754,2	805,8	792,5
desvest	91,46	80,96	84,48
C.V.	8,25	9,95	9,38

dia 14	T 8 pienso	T 10 pienso	T Esc control
promedio	808,33	731	1137
desvest	114,48	117,71	138,86
C.V.	7,06	6,21	8,19

dia 28	T 8 pienso	T 10 pienso	T Esc control
promedio	848,33	715	1471
desvest	151,35	131,96	169,65
C.V.	5,61	5,42	8,67

	T 8 (45CP)	T 10 (50CP)	control
C.V. inicial	8,25%	9,95 %	9,38 %
C. V. final	5,61%	5,42 %	8,67 %

TEC	T8 (45CP)	0,37
TEC	T10 (50CP)	-0,45
TEC	Control	2,26

## 5.- AJUSTE CON LOS OBJETIVOS PREVISTOS Y REPROGRAMACIONES

Dado el recorte presupuestario del año 2012, de común acuerdo con el coordinador y los demás integrantes del proyecto, decidimos concentrar todo el esfuerzo y presupuesto en realizar los experimentos de engorde de subadultos para poder diseñar y optimizar piensos inertes. Se planearon 2 experimentos y se llevaron a cabo con éxito, lo que va a permitir en el futuro completar el diseño de estas dietas.

## 6.- CONCLUSIONES

Aunque los resultados siguen demostrando que el crecimiento del pulpo siempre es mejor utilizando una dieta fresca (cangrejo y pescado), los resultados de los dos experimentos llevados a cabo en el año 2012 nos permiten extraer las siguientes conclusiones, útiles para en un futuro no muy lejano terminar de diseñar un pienso extrusionado adecuado para el engorde de subadultos de pulpo.

1.- Los piensos formulados con harina de pescado y calamar (3HPC y HPC) dieron lugar a un crecimiento bajo pero positivo (en torno al 0,3% diario) sin diferencias estadísticas entre ellos.

2.- El uso de un 45% de proteína total (pienso 45CP, mezcla de harinas de pescado, krill y calamar) produjo un crecimiento positivo frente al uso del 50% de proteína (pienso 50CP)

**JACUMAR  
JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

**INFORME FINAL**

**Título: NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE PARALARVAS  
Y SUBADULTOS DEL PULPO DE ROCA (*Octopus  
vulgaris*).**

**COMUNIDAD AUTÓNOMA DE GALICIA.**



## Anexo 1. Informe anual 2010

### INFORME TECNICO ANUALIDAD 2010 del Proyecto PULPOJACUMAR

Título: **NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE PARALARVAS Y SUBADULTOS DEL PULPO DE ROCA (*Octopus vulgaris*).**

Coordinador: Benjamín García García (IMIDA - Murcia)

Investigador Principal Galicia (CIMA-IEO): José Iglesias Estévez. IEO-Vigo

#### INFORME

Aunque el proyecto fue aprobado a mediados del año 2010, la cuantía económica fue reducida, debido a que las tres anualidades completas solicitadas y aprobadas del proyecto fueron trasladadas por JACUMAR a los años 2011, 2012 y 2013. En consecuencia, para el año 2010 JACUMAR solamente subvencionó al IEO de Vigo con 4.300,00 euros.

Las actividades realizadas con esos fondos durante el año 2010 fueron las siguientes:

- Captura y establecimiento de dos stocks de reproductores de pulpo. Uno para obtener puestas en el año 2010 y otro (en noviembre) para el año 2011.
- Obtención de 10 puestas viables en 2010.
- Envío de muestras de paralarvas para su análisis bioquímico.
- Mantenimiento de hembras ovadas de centolla y nécora.
- Obtención de zoeas de centolla y nécora en cautividad.
- Envío de muestras de zoeas de centolla y nécora para su análisis bioquímico.

-Asistencia a la reunión de coordinación del proyecto convocada por la Secretaría del Mar en Madrid en el mes de junio (F.Javier Sánchez y José Iglesias)

-Asistencia al Congreso Europeo de Acuicultura en Porto (Portugal). (José Iglesias)

-Se actuó de “chairman” de mesa en la sesión de Diversificación del Congreso Europeo de Acuicultura en Porto (Portugal). José Iglesias.

-Se asistió a la presentación pública oficial de un vídeo-DVD sobre el 25º aniversario de la fundación de JACUMAR en Sevilla 1-2 de diciembre de 2010.

-Se han publicado dos artículos y un póster sobre el cultivo del pulpo y se encuentran en fase de manuscrito otros dos trabajos científicos elaborados en el IEO de Vigo sobre el cultivo de esta especie.

Vigo a 27 de enero de 2011

José iglesias Estévez

Investigador Principal PULPOJACUMAR

## Anexo 2. Informe anual 2011

### INFORME DE ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERIODO 2011 EN EL PROYECTO JACUMAR “ NUTRIPULPO” (NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE PARALARVAS Y SUBADULTOS DEL PULPO DE ROCA (*Octopus vulgaris*))

Centros participantes en Galicia: **IEO Vigo y CIMA**

Empresa participante: **REMAGRO S.L.**

Coordinador: Benjamín García García (IMIDA - Murcia)

Investigador Principal Galicia (CIMA-IEO): José Iglesias Estévez. IEO-Vigo

#### Actividades previstas para el año 2011 en el proyecto NUTRIPULPO y objetivos desarrollados

**Objetivo 1 ( Línea 1.5 del proyecto):** Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando zooplancton capturado en el medio natural, misidáceos cultivados y zoeas de crustáceos vivas o congeladas.

**OBJETIVOS:** Obtención de juveniles de pulpo a partir de zooplancton natural, aplicando tecnologías de cultivo innovadoras que permitan mejorar las tasas de crecimiento y supervivencia de las paralarvas.

Dichas tecnologías se resumen en las siguientes actividades y sistemas de cultivo:

- Acondicionamiento de reproductores de pulpo y obtención de puestas viables.
- Utilización de zooplancton natural capturado con filtros UNIK situados en tierra. Sin separar las especies presentes en el plancton, se seleccionarán dos tamaños de presas para alimentar a las paralarvas de pulpo .
- Utilización de estadios larvarios de crustáceos como dieta larvaria complementaria a la Artemia. Se utilizarán zoeas de centolla, cangrejo, buey o nécora de depuradoras.
- Cultivo de paralarvas de pulpo con las dietas vivas citadas anteriormente.
- Bioquímica e Histología de las paralarvas producidas.

**JUSTIFICACIÓN:** El conseguir presas vivas alternativas o complementarias de la Artemia, que cubran los requerimientos nutricionales de las paralarvas de pulpo será uno de los objetivos prioritarios de este proyecto. La disponibilidad de copépodos y misidáceos en toda la plataforma costera española debe ser testada como presa potencial de las paralarvas. Ya existen experiencias previas de mantenimiento de estos organismos en condiciones de laboratorio.

Los Copépodos pueden sobrepasar el 85 por ciento del zooplancton total en Canarias. Ello hace suponer que las paralarvas de pulpo consideren a esta especie como una presa común en su fase planctónica. Los copépodos son considerados una alternativa de alimentación en Acuicultura, donde se han logrado cultivos de Calanoideos (*Calanus* sp., *Acartia* sp., etc.) y de Harpacticoideos (*Tigriopus japonicus*) entre otros. El empleo de copépodos han demostrado incrementar la supervivencia y la calidad de las larvas y alevines que los consumen. Así, la supervivencia de larvas de diferentes especies como rodaballo (*Psetta maxima*), puede incrementarse de un 14 a un 45%, también gracias a este grupo se ha logrado el cultivo larvario en nuevas especies como Pargo dorado (*Lutjanus johnii*) o Mero (*Epinephelus coioides*).

Por otro lado, el agua oceánica que surte a la empresa Remagro (O Grove) y otras cetáreas donde van a realizarse diversas experiencias de este capítulo, es rica en organismos zooplanctónicos que pueden ser filtrados y seleccionados mediante sistemas de filtración del tipo UNIK, ya testados en Noruega para el suministro de presas vivas de otras especies marinas, como el rodaballo, el halibut o el bacalao.

El stock regular de crustáceos (cangrejo, centolla, nécora y buey) que se estabilizará en la empresa puede ser una fuente de producción de estadios larvarios potencialmente óptimos para la nutrición de las paralarvas de pulpo. Este método permitiría también tener acceso constante a estadios larvarios (zoeas) que se utilizarán de alimento para las paralarvas.

En paralelo, el fitoplancton producido en la empresa con regularidad mediante blooms industriales controlados, podría ser una fuente de alimento con mejor perfil nutricional para la Artemia utilizada en los cultivos de paralarvas (ver capítulo 1.3). Por otro lado, el fitoplancton presente en las instalaciones de cultivo

del resto de los integrantes del proyecto, con una relativa variedad de especies (*Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis* sp., *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas lens*) permitirá asegurar un medio de cultivo nutricionalmente adecuado para los metanuplios de *Artemia* que se utilizarán en la alimentación de las paralarvas.

## ACTIVIDADES:

### 1. Obtención de zoeas de decápodos (cangrejos autóctonos, nécora, buey, etc.).

La empresa Remagro S.L., donde se están realizando gran parte de los experimentos descritos, es comercializadora de crustáceos por lo cual a lo largo del año hay abundancia de decápodos de nécora (*Necora puber*), buey de mar (*Cancer pagurus*), centolla (*Maja brachydactyla*), cangrejo (*Carcinus maenas*) y bogavante (*Homarus gammarus*).

En Mayo de 2011, y continuando hasta el final de los experimentos, se dispusieron hembras ovadas de *Maja brachydactyla* en tanques redondos de 1000 L provistos de circuito abierto y se realizó un control del desarrollo embrionario de las puestas, separando las hembras en función del estado embrionario de las mismas en 3 tanques. Así, en el tanque 1 se estabularon las hembras en estado I y las correspondientes al estadio final (estado III) en el último de los tanques, con el fin de obtener un aporte continuo de zoeas. Una vez completadas las puestas se procedió a la renovación de los stocks de centollas como se muestra en Tabla 1.

<i>STOCK</i>	<i>ESTADIO I</i>	<i>ESTADIO II</i>	<i>ESTADIO III</i>
13/05/2011	14	6	0
30/06/2011	0	8	7
22/07/2011	0	8	5
05/08/2011	6	5	4
24/08/2011	1	5	3
02/09/2011	5	0	0

Tabla 1: N° de ejemplares de *Maja brachydactyla* según su estadio.

Una vez eclosionadas, las zoeas se suministraban directamente al tanque de paralarvas de pulpo procedentes del IEO de Vigo, en el cual se estaba desarrollando los experimentos de cultivo de las mismas, previo contaje estimado del n° de zoeas aportado. Coincidiendo con el fin de semana, se mantenían las zoeas de centollas en tanques de 100L con aireación y aporte de *Artemia salina* hasta su utilización como presa de paralarvas. De esta forma se pudo disponer de zoeas y megalopas durante periodos prolongados, evitando la dependencia de puestas continuas.

Las puestas fueron continuas, coincidiendo con los experimentos de cultivo de paralarvas desarrolladas en Remagro. El número de puestas obtenidos a lo largo de los distintos experimentos se muestra en Tabla 2.

<i>Experimento paralarvas</i>	<i>Nº puestas centolla</i>
Experimento 1	8
Experimento 2	8
Experimento 3	3
Experimento 4	7

Tabla 2: Nº de puestas obtenidos en cada experimento de cultivo de paralarvas

Paralelamente se llevó a cabo un experimento de cultivo de zoeas de centolla (*Maja brachydactyla*) en un tanque ( T-4) de 1000L en dichas instalaciones, la cual comenzó el 6 de Junio de 2011 con la siembra de aproximadamente  $1.10^5$  zoeas a las que se le suministró como alimento inicial Artemia (*Artemia salina*) y zooplancton procedente de la captación realizada con el filtro Unik, en los primeros estadios y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) a partir del día 60. Dicho experimento continúa en la actualidad con 23 ejemplares ( 13 machos y 10 hembras) cuyas tallas a día 190 están entre los 3.5 y los 6.8 cm. Cabe destacar la ausencia de mortalidad de las centollas a partir de los 100 días de vida.

Los parámetros físico-químicos ( $T^a$  y  $O_2$ ) obtenidos durante la estabulación de las centollas aparecen reflejados a continuación en la Figura 1.

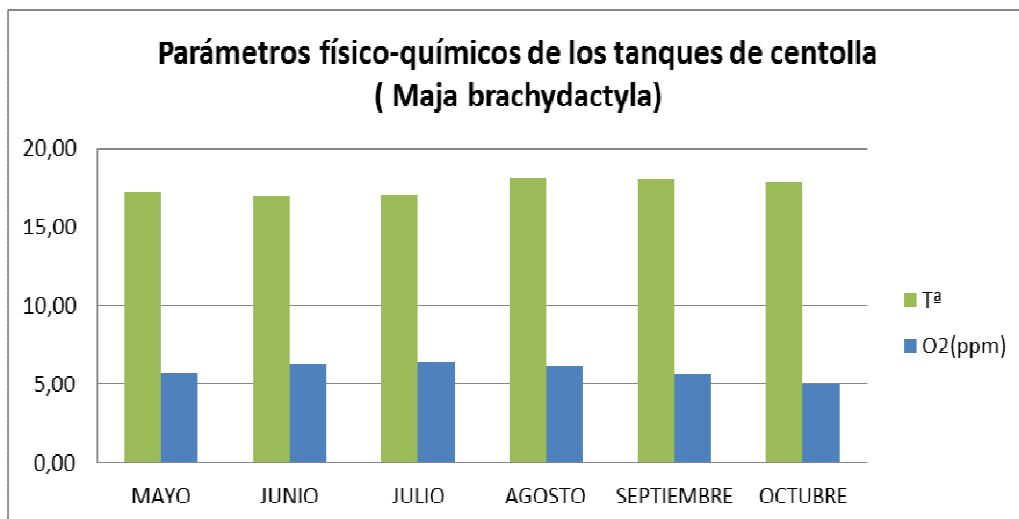


Figura 1: Variación de los parámetros físico-químicos de los tanques de estabulación de hembras de centolla.

## 2. Obtención de zooplancton del medio natural.

Se planteó el siguiente experimento con el fin de comprobar la viabilidad de la obtención de zooplancton procedente del medio natural a través de la filtración del mismo para aporte alimenticio de los cultivos de paralarvas de pulpo. La situación geográfica de la empresa Remagro parecía la idónea para la

obtención de una gran cantidad y variedad del mismo, al estar situada en un lugar donde las corrientes juegan un papel muy importante.

El zooplancton fue capturado mediante un filtro especia (UNIK<sup>®</sup>) 1 instalado en la toma de agua principal de la empresa Remagro S.L. Este filtro está compuesto de aros con malla de plancton provistos de movimiento giratorio y un sistema de auto-limpieza mediante agua a presión. El zooplancton queda retenido en diferentes compartimentos según su tamaño y es conducido a recipientes donde puede ser cosechado.

Se realizaron captaciones aleatorias en fecha y tiempos del agua de mar procedente del tanque de cabecera que suministra agua a la empresa Remagro, la cual pasa previamente por un filtro donde quedan retenidas las partículas más gruesas, agua captada directamente del mar y agua procedente del Bloom fitoplanctónico exterior de la empresa, el cual está formado principalmente por diatomeas, pero que puede contener zooplancton en su composición.

Se probaron dos tipos de aros, cuyos filtros tenían una luz de maya de 200 y 1000  $\mu\text{m}$ , para seleccionar posibles presas que tuviesen un tamaño adecuado para la alimentación de las paralarvas y descartar aquellas que por su tamaño serían rechazadas. El volumen de agua correspondiente a la filtración fue de 21'6  $\text{m}^3$  /día. Las muestras, una vez recogidas y procesadas, fueron conservadas en frío hasta su traslado al IEO para posterior identificación.

Los resultados de las especies obtenidas en este experimento se muestran a continuación en la Tabla 3.

ESPECIES	MALLA <1000 $\mu\text{m}$	MALLA 200 $\mu\text{m}$
<i>Euterpina acutifrons</i>	+	+
Anfípodos sp.	+	+
Bivalvos sp.	+	+
Gasterópodos	+	+
Copépodos	+	-
Poliquetos	+	-

Tabla 3: Organismos obtenidos en la filtración de zooplancton procedente del medio natural con distinta luz de maya.

En las distintas filtraciones realizadas se encontró gran cantidad de materia orgánica así como pequeñas algas, lo cual supuso un problema a la hora de seleccionar el zooplancton presente como aporte alimenticio a los cultivos, ya que dicha materia terminaba sedimentando en el fondo de los tanques de paralarvas produciendo problemas en el cultivo de las mismas.

En sucesivas captaciones se procederá a optimizar el sistema de filtración que permita seleccionar el zooplancton discriminando en la recolección la materia susceptible de dañar los cultivos.

### 3. Cultivo de paralarvas.

Los distintos experimentos desarrollados en la empresa Remagro para el cultivo de paralarvas se realizaron en tanques de 1000L, en circuito abierto de agua (salvo el experimento n° 3 que se realizó en circuito cerrado y cuya duración fue de 9 días).

El rango de temperatura osciló entre los 15 y los 20°C en el primero de los experimentos, utilizando calentadores para estabilizar la temperatura en los posteriores, cuyo rango de temperatura osciló entre los 18 y los 21°C.

La densidad larvaria fué de 15 ind./litro en los 3 primeros experimentos y de 30 ind/L en el último.

Se realizaron controles diarios de alimento, siendo la densidad de Artemia y zoeas suministradas de 0.6 ind/ml, aumentando o disminuyendo estas últimas en función de la escasez o abundancia de las mismas.

La luz fue natural con sombra parcial. Se utilizaron limpiadores de superficie. Controles diarios de temperatura, oxígeno y concentración de alimento, y quincenales calidad del agua de cultivo ( pH, nitritos, amonio...).

Se realizaron muestreos periódicos de talla, peso seco y recogida de muestras para análisis bioquímico (días 0, 15 y 30 de post-eclosión) y supervivencia al final del cultivo.

Los pesos secos obtenidos en los distintos experimentos aparecen reflejados en la tabla que se muestra a continuación:

EXPERIMENTO/DÍAS	Eclosión ( 0 días)	15 días	30 días
Experimento 1		0.57±0.06	-----
Experimento 2	0.31±0.02	0.90±0.14	-----
Experimento 3	0.34±0.02	-----	-----
Experimento 4	0.31±0.01	0.73±0.15	3.00±0.56

Tabla 4: Pesos secos de paralarvas de pulpo a distintas edades de cultivo

Dentro de los distintos experimentos desarrollados en este periodo, se trataba de comprobar cuál era el aporte de alimento idóneo para la consecución de un cultivo viable, por lo que se probaron distintos métodos que aparecen desarrollados a continuación:

**3.1 Cultivo con bloom de fitoplancton: los tanques de cultivo recibirán un aporte en continuo de fitoplancton producido en bloom artificial. Este fitoplancton está compuesto en su mayor parte de diatomeas y pequeños flagelados.**

En los experimentos 1 y 2 se mantuvo aporte en circuito abierto del Bloom fitoplanctónico de la empresa, que estaba formado mayoritariamente por diatomeas, encontrándose esporádicamente zooplancton en su composición.

En el experimento nº 1 se añadió además parte de la captación recogida en el filtro Unik.

Los experimentos 3 y 4 se realizaron con circuito abierto de la mezcla de fitoplancton cultivado en la empresa para aporte alimentario de las larvas de moluscos allí cultivadas.

En estos dos últimos experimentos se descartó mantener el aporte de Bloom natural dado los problemas que originó en los dos primeros, generando muchos residuos en el fondo del tanque que afectaban a la calidad del agua y del cultivo.

**3.2 Cultivo con Artemia complementada con zoeas de crustáceos. Se desarrollarán los cultivos igual que 3.1, pero se añadirán zoeas de crustáceos a una densidad de 0.6 ind./ml, como dieta complementaria de Artemia, en función de su disponibilidad.**

La Artemia suministrada a las paralarvas de pulpo fué eclosionada en el IEO de Vigo y trasladada a Remagro donde era suministrada a las paralarvas *ad libitum*. Ocasionalmente fué mantenidas en tanques de 100L con mezcla de fitoplancton y añadidas al tanque en la concentración 0.6 Art/ind.

Los aportes de zoeas de centolla fueron casi constantes, siendo más abundantes en los dos últimos experimentos.

**4. Análisis bioquímicos de paralarvas y presas**

Se tomaron muestras por triplicado para el análisis de paralarvas procedentes de los diferentes cultivos desarrollados los días 0, 15 y 30 de vida en el Centro de Investigaciones Maríneas. Asimismo se tomaron muestras de las presas utilizadas como alimento de las larvas en cada uno de los sistemas de cultivo: *Artemia* (*Artemia salina*) de 1 día de vida y zoeas de centolla (*Maja brachydactyla*) recién eclosionada.

Se realizaron análisis de proteínas y lípidos totales, clases de lípidos (ésteres y ceras, triglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides y fosfolípidos) y ácidos grasos de las muestras recogidas.

Las muestras de paralarvas del pulpo recogidas para la realización de los análisis bioquímicos fueron las que se detallan a continuación:

Experimento 1: Inicio 15/06/2011 y Final 13/07/2011. Recogidas muestras a día 0 y 15.

Experimento 2: Inicio 05/07/2011 y Final 31/07/2011. Recogidas muestras a día 0 y 15.

Experimento 3: Inicio 19/07/2011 y Final 28/07/2011. Recogidas muestras día 0 (Circuito cerrado)

Experimento 4: Inicio 29/07/2011 y Final 29/09/2011. Recogidas muestras a día 0, 14 y 31.

En la actualidad se está procediendo al tratamiento de los resultados obtenidos en los análisis bioquímicos correspondientes a los diferentes experimentos realizados.

## 5. Artículos científicos

Viciano, E., Iglesias, J., Lago, M.J., Sánchez F.J., Otero, J.J. y Navarro, J.C. 2011. Fatty acid composition of polar and neutral lipid fractions of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae reared with enriched on-grown *Artemia*. *Aquaculture Research* 42, 704-709.

Fuentes, L., F.J. Sánchez, M.J. Lago, J. Iglesias, G. Pazos, F. Linares. 2011. Growth and survival of *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) paralarvae fed on three *Artemia*-based diets complemented with frozen fish flakes, crushed zooplankton and marine microalgae. *Scientia Marina* 75(4), 771-777.

Sánchez, F.J., Fuentes, L., Otero, J.J., Lago, M.J., Linares, F., Pazos, G., Iglesias, J. 2011. Effect of tank volume on the growth and survival of reared *Octopus vulgaris* paralarvae *Aquaculture Research*. DOI:10.1111/j.1365-2109.2011.03049.x

Uriarte, I., J. Iglesias, C. Rosas, M.T. Viana, J. C. Navarro, P. Seixas, E. Vidal, A. Ausburger, S. Pereda, F. Godoy, K. Paschke, A. Farías, A. Olivares and O. Zuñiga. 2011. Current status and bottle neck of octopod aquaculture: the case of American species. *Journal of the World Aquaculture Society* 42 (6): 735-752.

## 6. Congresos y reuniones

Reunion anual de coordinación proyecto Nutripulpo Jacumar. IRTA. San Carles de la Rápita. Febrero 2011.

Aquaculture Europe 2011, evento organizado por la European Aquaculture Society (EAS) en Rodas, Grecia, 18-21 octubre 2011.

XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Universitat Politècnica de Catalunya - Castelldefels (Barcelona). 21-24 noviembre 2011.

## Anexo 3. Informe anual 2012

### INFORME GALICIA, ANUALIDAD 2012

#### PLAN NACIONAL JACUMAR NUTRIPULPO

#### Título: NUTRICION Y ALIMENTACION DE PARALARVAS Y SUBADULTOS DEL PULPO DE ROCA (OCTOPUS VULGARIS).

Investigador Principal Galicia (CIMA-IEO): José Iglesias Estévez. IEO-Vigo

#### INFORME DE ACTIVIDADES REALIZADAS

##### 1. Obtención de zoeas de decápodos (cangrejos autóctonos, nécora, buey, etc.).

La empresa Remagro S.L., donde se estaban realizando gran parte de los experimentos descritos, era comercializadora de crustáceos por lo cual a lo largo del año había abundancia de decápodos de nécora (*Necora puber*), buey de mar (*Cancer pagurus*), centolla (*Maja brachydactyla*), cangrejo (*Carcinus maenas*) y bogavante (*Homarus gammarus*) seleccionados en el proyecto como presas para el cultivo de paralarvas de *Octopus vulgaris*.

En 2012 el cierre de la cetárea perteneciente a dicha empresa ha hecho imposible la obtención de reproductores capaces de suministrar las zoeas necesarias para llevar a cabo los experimentos previstos en dichas instalaciones, por lo que las mismas han tenido que ser desarrolladas en las instalaciones de la Planta de Cultivos del Oceanográfico de Vigo.

En los meses de Mayo y Junio de 2012, se dispusieron hembras ovadas de *Maja brachydactyla*, procedentes de cetáreas del área de Vigo, en tanques redondos de 1000 L provistos de circuito abierto y se realizó un control del desarrollo embrionario de las puestas, siguiendo el mismo protocolo utilizado en el año 2011. Las hembras eran separadas en función del estado embrionario de las mismas en 3 tanques. Así, en el tanque 1 se estabularon las hembras en estado I y las correspondientes al estadio final (estado III) en el último de los tanques, con el fin de obtener un aporte continuo de zoeas. Una vez completadas las puestas se procedió a la renovación de los stocks de centollas.

Una vez eclosionadas, las zoeas eran suministraban directamente al tanque de paralarvas de pulpo estabuladas en el IEO de Vigo, donde se estaba desarrollando uno de los experimentos de cultivo de las mismas, previo contaje estimado del nº de zoeas aportado. Las puestas fueron continuas, coincidiendo con el experimento de cultivo de paralarvas.

El experimento de cultivo de centolla (*Maja brachydactyla*) comenzó el 6 de junio del año 2011 en las instalaciones de la empresa Remagro S.L., y continúa en la actualidad con 18 ejemplares (10 machos y 8 hembras) destacando la escasa mortalidad de las centollas a partir de los 100 días de vida y el rápido crecimiento de las mismas en la fase de engorde. El alimento suministrado constó de mejillón fresco (*Mytilus galloprovincialis*), lirio congelado (*Micromesistius poutassou*), erizos (*Paracentrotus lividus*) y macroalgas.



Los parámetros físico-químicos (temperatura y O<sub>2</sub>) obtenidos durante la estabulación de las centollas aparecen reflejados a continuación en la Figura 1.

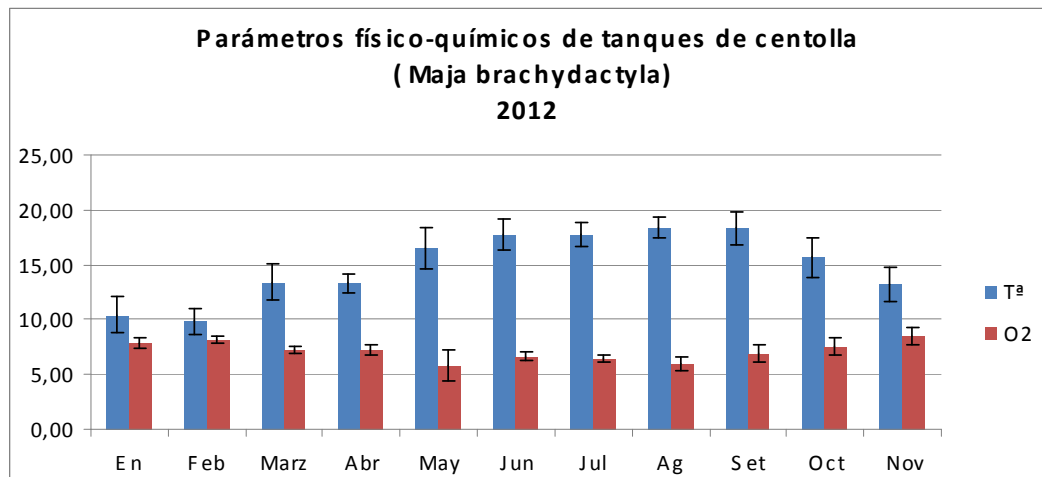


Figura 1: Variación de los parámetros físico-químicos de los tanques de estabulación de centolla.

De los 18 ejemplares estabulados, cinco hembras han realizado ya la muda terminal. Una vez que se produzca su maduración en cautividad se podrá completar por primera vez el ciclo de esta especie bajo condiciones de cultivo y se procederá a la publicación de este importante proceso de cultivo.

Al no financiar JACUMAR este proyecto el próximo año 2013, todos los ejemplares fueron trasladados desde la empresa REMAGRO S.L. hasta las instalaciones de la Planta de Cultivo del IEO de Vigo.

## 2. Obtención de zooplancton del medio natural y de los afloramientos artificiales en los tanques exteriores

El objetivo fue analizar la viabilidad de la obtención de zooplancton procedente del medio natural a través de la filtración del mismo para aporte alimenticio de los cultivos de paralarvas de pulpo. La situación geográfica de la empresa Remagro S.L. parecía la idónea para la obtención a través de la toma principal de agua de una gran cantidad y variedad del mismo, al estar situada en un lugar donde las corrientes juegan un papel muy importante.

El zooplancton fue capturado mediante un filtro especial (UNIK<sup>®</sup>) instalado en la toma de agua principal de la empresa Remagro S.L. Este filtro está compuesto de aros con malla de plancton provistos de movimiento giratorio y un sistema de auto-limpieza mediante agua a presión. El zooplancton queda retenido en diferentes compartimentos según su tamaño y es conducido a recipientes donde puede ser cosechado.

Se realizaron captaciones aleatorias, durante los meses de mayo a junio del 2012, del agua de mar procedente del tanque de cabecera que suministra agua a la empresa

Remagro S.L., la cual pasa previamente por un filtro donde quedan retenidas las partículas más gruesas, agua captada directamente del mar. Se probaron dos tipos de aros, cuyos filtros tenían una luz de maya de 200 y 1000  $\mu\text{m}$ , para seleccionar posibles presas que tuviesen un tamaño adecuado para la alimentación de las paralarvas y descartar aquellas que por su tamaño serían rechazadas. El volumen de agua correspondiente a la filtración fue de 21'6 m<sup>3</sup> /día. Las muestras, una vez recogidas y procesadas, fueron conservadas en frío hasta su traslado al IEO de Vigo para su posterior identificación. Los resultados de las especies obtenidas en este experimento se muestran a continuación en la Tabla 3.

Otro método de recolección de zooplancton y fue filtrando agua procedente de los afloramientos fitoplanctónicos y zooplanctónicos que la empresa realiza con regularidad en grandes tanques rectangulares exteriores para alimento de larvas de ostras y almejas de su criadero. Un volumen determinado de agua se filtraba a través de un tamiz de 25  $\mu\text{m}$  y a continuación se realizaba un análisis cualitativo (especies zooplanctónicas presentes) y cuantitativo (individuos por metro cúbico) de la muestra. Se realizaron diversos muestreos en primavera y verano. En la Tabla 3 se resumen los resultados

Tabla 3: Listado de grupos zooplanctónicos obtenidos por filtración de zooplancton procedente del medio natural y de los afloramientos fitoplanctónicos exteriores. Las cruces indican abundancia relativa.

ESPECIES	Depósito principal		Bloom exterior
	MALLA >1000 $\mu\text{m}$	MALLA <1000 $\mu\text{m}$	MALLA 25 $\mu\text{m}$
Cladóceros	+		
Anfípodos	+	+	
Misidáceos	+	+	
Ciliados	++	++	
Copépodos	+	+++	++
Gasterópodos (larvas)	+	++	+
Cirrípedos (larvas)	+	+++	+
Poliquetos		+	
Decápodos (larvas)		+	
Apendicularias			+
(Diatomeas: fitoplancton)			+++

En las distintas filtraciones realizadas se encontró gran cantidad de materia orgánica así como pequeñas trozos de macroalgas lo cual supuso un problema a la hora de seleccionar el zooplancton presente como aporte alimenticio a los cultivos, ya que dicha materia terminaba sedimentando en el fondo de los tanques de paralarvas produciendo problemas en el cultivo de las mismas al descomponerse. En las captaciones realizadas en

el año 2012 se corroboró finalmente que, a pesar de que los organismos de zooplancton existentes poseían unas características bioquímicas óptimas para el cultivo larvario del pulpo, su escasez tanto en el agua de la toma principal como en los afloramientos exteriores impide cosechar una cantidad suficiente como para poder llevar a cabo el cultivo larvario a escala industrial. En consecuencia, se concluye que uno de los objetivos del proyecto, que consistía en utilizar el zooplancton bombeado para el cultivo larvario del pulpo se descarta como método viable de aplicación industrial.

### 3. Cultivo de paralarvas.

En la empresa REMAGRO S.L. se llevaron a cabo en el año 2012 dos experimentos de cultivo de paralarvas en tanques de 1000L, en circuito abierto de agua. Paralelamente se llevó a cabo otro experimento en la Planta de Cultivos del IEO de Vigo hasta el mes de vida y con las mismas condiciones de cultivo que en la empresa REMAGRO S.L.

El rango de temperatura osciló entre los 18 y los 21°C utilizando para ello calentadores industriales utilizados para acuarios. La densidad larvaria fue de 10-15 ind./litro y se realizaron controles diarios de alimento, siendo la densidad de Artemia y zoeas suministradas de 0.3-0.6 ind/ml, aumentando o disminuyendo estas últimas en función de la escasez o abundancia de las mismas. Se utilizó fotoperiodo natural con sombra parcial. Se utilizaron limpiadores de superficie. Controles diarios de temperatura, oxígeno y concentración de alimento, y quincenales de calidad del agua de cultivo (pH, nitritos y amonio). Se realizaron muestreos de talla, peso seco y recogida de muestras para análisis bioquímico al principio, medio y al final de las experiencias. Los pesos secos medios obtenidos en los distintos experimentos aparecen reflejados en la tabla que se muestra a continuación:

Tabla 4: Peso seco (mg) a lo largo de un mes de paralarvas de pulpo en los experimentos desarrollados en Remagro (O Grove) e IEO de Vigo.

	Día 0 (eclosión)	Día 15	Día30
Experimento 1 Remagro	0.36±0.02	0.77±0.09	-
Experimento 2 Remagro	0.36±0.02	0.82±0.09	-
Experimento 3 IEO	0.36±0.02	1.30±0.26	-
Experimento 4 IEO	0.36±0.02	1.41±0.11	2.90±0.59

### 4. Análisis bioquímicos de paralarvas y presas

Se tomaron muestras por triplicado para el análisis de paralarvas procedentes de los diferentes cultivos desarrollados los días 0, 15 y 30 de vida en el Centro de Investigaciones Mariñas. Asimismo se tomaron muestras de las presas utilizadas como alimento de las larvas en cada uno de los sistemas de cultivo: Artemia (*Artemia salina*) de 1 día de vida y zoeas de centolla (*Maja brachydactyla*) recién eclosionada, así como del fitoplancton utilizado en Remagro: procedente de las bolsas de cultivo interiores de la nave o bien los obtenidos por “bloom” artificial exterior.

Asimismo se realizaron análisis de zoeas de nécora (*Necora puber*) y buey de mar (*Cancer pagurus*) con el fin de conocer la composición bioquímica de las mismas y su posible utilización como presas.

Los análisis realizados fueron: proteínas y lípidos totales, clases de lípidos (ésteres y ceras, triglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides y fosfolípidos) y ácidos grasos de las muestras recogidas.

Las muestras de paralarvas del pulpo recogidas para la realización de los análisis bioquímicos fueron las que se detallan a continuación:

Experimento 1: Recogidas muestras a día 0 y 15.

Experimento 2: Recogidas muestras a día 0 y 15.

Experimento 3: Recogidas muestras a día 0 y 15.

Experimento 4: Recogidas muestras a día 0, 15 y 30.

En la actualidad se está procediendo al tratamiento de los resultados obtenidos en los análisis bioquímicos correspondientes a los diferentes experimentos realizados.

## 5. Artículos científicos

Domingues, P.; Sánchez, F.J.; Iglesias J.; Otero J.J.; Pazos, G. y Linares F. (2012). Variaciones en peso, lípidos y proteínas totales de paralarvas recién eclosionadas de *Octopus vulgaris* (Cuvier1797) durante la puesta. Poster nº 18 presentado en el Foro Iberoamericano de Recursos Marinos y Acuicultura (FIRMA 2012).Cádiz.

Iglesias J, G. Pazos, J. Fernández, F.J. Sánchez, J.J. Otero, P. Domingues, M.J. Lago and F. Linares (2012). The use of crab zoeae on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris* paralarvae. Aqua 2012 Prague. Poster nº 1053.

## 6. Congresos y reuniones

Aquaculture Europe 2012, evento organizado por la European Aquaculture Society (EAS) en Praga (República Checa): 2 al 5 septiembre 2012.(presentación poster).

Cephalopod International Advisory Council Symposium (CIAC 2012). Florianópolis. Brasil. 27 septiembre- 2 de octubre (presentación de posters y chairman de sesión Cultivos).

Foro Iberoamericano de Recursos Marinos y Acuicultura (FIRMA 2012). Noviembre Cádiz. (Presentación de un poster).

## ANEXO 4.- Resultados preliminares obtenidos con el uso de enriquecedor preparado por ICCM.

### Ensayos con enriquecedor elaborado por el ICCM

Se ponen cuatro tanques: dos de control alimentados con artemia de 1 día de vida alimentada con Ig, y otros dos con artemia de 1 día enriquecida 6 horas con un producto elaborado por el ICCM elaborado en el Instituto Canario de Ciencias Marinas. La supervivencia en la primera fase (hasta día 23) es mayor con el enriquecedor, pero en peso no se aprecian diferencias significativas. Están pendientes de análisis las muestras de composición bioquímica.

Tabla 5:- Cultivo de paralarvas de pulpo comparando dieta control y uso de enriquecedor de Artemia elaborado por el ICCM.

Edad (días)	CONTROL			Enriquecedor de Artemia ICCM		
	Peso seco (g)	DESVEST	Superv.	Peso seco (g)	DESVEST	Superv.
0	0,286	0,008	-	0,286	0,008	-
10	0,425	0,064	-	0,399	0,063	-
23	0,709	0,199	21%	0,682	0,187	47%

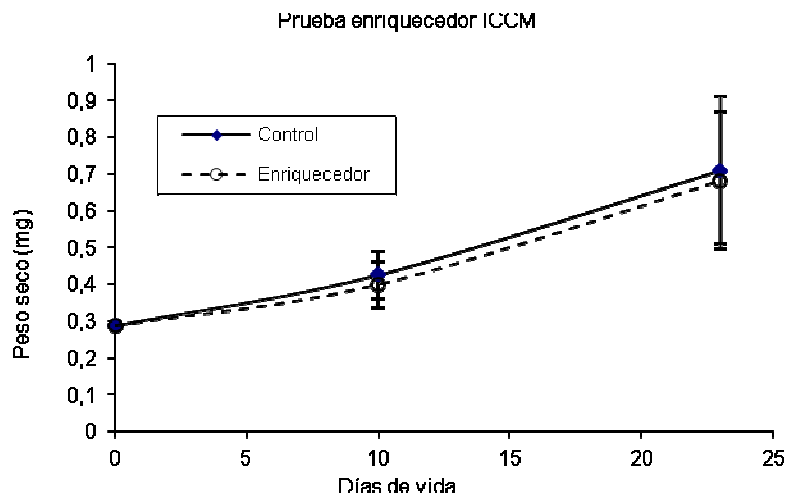


Figura 1.- Crecimiento en peso seco (mg) de paralarvas de pulpo con Artemia enriquecida con microalgas (control) o enriquecedor ICCM.

## ANEXO 5.- COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE PARALARVAS DE PULPO.

Días	Día 0				Día 15			Día 30
	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C4	C4
<b>Experimentos</b>								
<b>% Proteínas</b>	44,77±0,26	46,51±1,78	45,00±1,32	42,28±1,79	44,17±1,63	50,87±0,44	41,47±1,69	44,55±1,12
<b>% Lípidos</b>	11,64±0,44	12,95±0,52	13,17±0,61	10,85±0,48	18,28±1,28	15,11±0,81	12,93±0,15	9,83±0,20
<b>CLASES DE LÍPIDOS (% líp.totales)</b>								
<b>E+C</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,37±0,59	2,93±0,09	1,09±0,32	0,17±0,30
<b>TAG</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,77±0,81	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<b>Ácidos</b>	5,32±1,20	4,95±0,27	3,74±0,24	2,99±0,23	4,75±0,74	3,27±0,32	3,55±0,24	3,90±0,20
<b>Esteroles</b>	18,03±2,48	16,87±1,61	19,57±1,41	19,84±0,79	12,02±0,25	14,10±0,41	14,36±1,16	16,54±0,80
<b>Fosfolípidos</b>	36,65±3,67	38,18±1,87	36,69±1,57	37,16±0,80	49,29±3,31	43,34±2,92	40,99±1,71	39,39±1,07
<b>ÁCIDOS GRASOS (%total)</b>								
<b>PUFAs</b>	55,34±0,68	51,93±3,85	54,13±1,35	54,91±0,27	35,00±1,06	46,52±2,32	45,60±2,95	51,67±0,61
<b>SAFAs</b>	33,00±0,49	32,88±0,05	34,26±1,17	34,02±0,70	29,79±0,84	34,13±0,72	33,41±0,58	33,33±0,37
<b>MUFAs</b>	11,66±0,20	15,19±3,89	11,62±0,22	11,07±0,44	35,20±1,67	19,34±2,29	20,99±2,57	14,99±0,98
<b>Sum,W3</b>	41,54±0,92	39,47±0,67	42,45±1,44	40,92±0,37	24,77±0,79	33,88±1,99	33,40±2,97	38,79±0,77
<b>Sum,W6</b>	8,34±0,12	7,58±0,20	6,89±0,10	8,67±0,22	7,23±0,25	7,48±0,29	8,29±0,09	7,36±0,22
<b>W3/W6</b>	4,98±0,17	5,22±0,63	6,16±0,18	4,72±0,15	3,42±0,09	4,53±0,12	4,03±0,34	5,27±0,18
<b>DHA/EPA</b>	1,47±0,03	1,09±0,34	1,38±0,07	1,36±0,02	0,83±0,05	0,80±0,05	0,91±0,05	0,75±0,00
<b>EPA/DHA</b>	0,68±0,02	0,97±0,26	0,73±0,04	0,74±0,01	1,21±0,08	1,25±0,08	1,10±0,06	1,33±0,01
<b>EPA</b>	16,16±0,17	18,03±0,97	17,07±0,18	16,64±0,17	12,85±0,45	17,61±0,66	15,59±0,53	20,79±0,44
<b>DHA</b>	23,69±0,80	19,44±4,92	23,49±1,30	22,57±0,31	10,62±0,59	14,16±1,38	14,21±1,30	15,67±0,38
<b>ARA</b>	7,84±0,10	6,86±0,06	6,43±0,09	8,17±0,23	5,85±0,19	6,58±0,35	6,78±0,14	6,71±0,24

E+C- Ésteres+ceras

TAG-triglicéridos

PUFAs- ácidos grasos poliinsaturados

MUFAs-ácidos grasos monoinsaturados

Sum.  $\omega$ 3- PUFA $\omega$ 3

Sum.  $\omega$ 6- PUFA $\omega$ 6

EPA- ácido eicosapentaenoico

DHA- ácido docosahexaenoico

## COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE PRESAS DE PULPO

PRESAS	AC	Alg	AM	AB	AR	AIEO	ZN	ZB	ZC
%Lípidos	19,74±1,09	17,98±0,82	16,53±0,39	17,49±0,71	14,50±0,65	17,82±0,72	14,34±0,71	9,99±0,15	10,44±1,03
%Proteínas	49,29±0,66	43,22±0,31	47,30±2,74	38,02±3,13	38,33±1,73	34,74±2,33	43,44±3,40	27,16±0,53	33,28±1,49

### CLASES LIPÍDICAS ( % Lípidos Totales)

E+C	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,19±0,57	2,34±0,04	0,00±0,00
TAG	56,94±5,69	25,52±3,64	29,30±0,96	35,66±2,41	9,37±1,66	16,89±1,18	17,36±1,24	9,46±0,34	20,17±1,91
Ácidos	1,78±0,15	3,42±0,04	3,42±0,41	8,18±0,81	2,48±0,47	2,09±0,11	1,23±0,28	3,45±0,30	3,99±0,34
Esteroles	2,58±0,17	5,94±1,09	5,25±0,22	4,38±0,26	9,25±0,40	3,67±0,12	9,28±0,40	6,70±0,45	7,45±0,68
Fosfolípidos	10,49±1,55	25,24±2,31	29,42±8,66	30,82±9,13	38,90±0,92	44,56±6,01	30,94±0,63	38,05±1,02	42,05±3,33

### ÁCIDOS GRASOS (% Total)

PUFAs	52,40±0,21	44,45±2,24	45,61±1,13	47,23±0,52	42,77±0,31	48,41±0,26	47,94±0,49	48,85±0,50	46,70±0,30
SAFAs	18,97±0,20	22,59±0,35	22,38±0,73	20,94±0,25	25,70±0,17	24,30±0,19	25,06±0,13	23,48±0,36	26,13±0,13
MUFAs	28,63±0,11	32,96±1,90	32,01±0,41	31,83±0,50	31,53±0,31	27,29±0,07	27,00±0,36	27,62±0,22	27,09±0,20
Σω3	44,06±0,21	35,05±2,68	38,10±0,23	39,09±0,28	34,38±0,40	26,50±0,11	38,48±0,51	42,95±0,38	38,06±0,26
Σω6	8,16±0,02	9,06±0,46	7,31±0,97	7,80±0,28	7,81±0,15	21,42±0,33	6,90±0,09	4,55±0,13	6,80±0,02
EPA	0,98±0,01	2,06±0,12	2,77±1,47	2,62±0,69	12,37±0,19	5,79±0,06	24,28±0,22	24,92±0,23	19,74±0,11
DHA	0,01±0,02	0,18±0,09	0,06±0,05	0,14±0,07	1,35±0,01	2,96±0,02	10,74±0,16	14,07±0,11	16,63±0,18
ARA	1,73±0,03	2,51±0,21	1,76±0,96	2,23±0,04	2,39±0,09	1,85±0,21	6,11±0,08	4,26±0,07	6,31±0,05

AC- Artemia recién eclosionada

Alg- Artemia enriquecida con l.galgana

AM- Artemia enriquecida con la mezcla de fitoplancton (Remagro)

AB- Artemia enriquecida con el bloom de fitoplancton

AR- Artemia de 8 días alimentada con la mezcla de fitoplancton

AIEO Artemia de 8 días alimentada con l.galgana

ZN- zoeas de nécora

ZB- zoeas de buey

ZC- zoeas de centolla

## PLAN NACIONAL DE JACUMAR:

NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE PARALARVAS Y SUBADULTOS DE PULPO DE ROCA (*Octopus vulgaris*).  
NUTRIPULPO.

Subproyecto: Nutrición y Alimentación de subadultos de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).

Informe Final



**Región de Murcia**  
Consejería de Agricultura y Agua



**Unión Europea**  
Fondo Europeo de Desarrollo Regional



Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo  
Agrario y Alimentario

**Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.**

**Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. IMIDA.**

**Investigador Principal: Jesús Cerezo Valverde.**

**Investigadores: María Piedad Sánchez-Morillo Velarde.  
Benjamin García García.**



## ÍNDICE:

<b>Línea 2.1.: Requerimientos nutritivos del pulpo de roca.</b>	<b>3</b>
Tarea 2.1.3. Requerimientos nutritivos de las diferentes clases lipídicas.	3
Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en el pulpo común ( <i>Octopus vulgaris</i> ).	3
Requerimientos lipídicos de pulpo común ( <i>Octopus vulgaris</i> ) obtenidos a partir de dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.	17
Tarea 2.1.6. Requerimientos de carbohidratos	39
Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común ( <i>Octopus vulgaris</i> ).	39
<b>Línea 2.2: Optimización de los formatos de pienso para el pulpo de roca</b>	<b>45</b>
Tarea 2.2.1 Digestibilidad “ <i>in vivo</i> ” de los piensos elaborados con gelatinas	45
Crecimiento y digestibilidad de dietas formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados en el pulpo común ( <i>Octopus vulgaris</i> ).	45
Tarea 2.2.2. Mejora de la textura y estabilidad de los piensos	61
Inclusión de gomas y gelatinas comerciales.	61
Aceptabilidad de distintos ingredientes para la formulación de piensos para el pulpo común ( <i>O. vulgaris</i> ).	64

## **LÍNEA 2.1: REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS DEL PULPO DE ROCA.**

### **Tarea 2.1.3. Requerimientos nutritivos de las diferentes clases lipídicas.**

#### ***Variación en la composición lipídica durante el ayuno a corto plazo en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).***

##### **Introducción**

Actualmente, existe cierta controversia sobre la capacidad de la utilización de los lípidos como fuente de energía en los cefalópodos. Éstos presentan en su composición corporal menos de un 2% en peso húmedo de lípidos (Lee, 1994), mostrando altos niveles de fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de la serie n-3, (Sinanoglou y Miniadis-Meimaroglou, 1998; Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Almansa et al., 2006), por lo que se ha sugerido un predominio del papel estructural sobre el energético (O'Dor et al., 1984; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006). Apoyando esta hipótesis, se han detectado bajos niveles de actividad enzimática y una capacidad limitada para la oxidación de sustratos lipídicos en el tejido muscular (Mommensen y Hochachka, 1981).

Por el contrario, existen evidencias sobre su utilización energética, tal y como se deriva de la relación O/N observada en varias especies de cefalópodos (Segawa y Hanlon, 1988), especialmente elevada en situaciones de ayuno (Boucher-Rodoni y Mangold, 1985, 1988), o la liberación gradual de carbono marcado radiactivamente procedente de ácidos grasos previamente suministrados (O'Dor et al., 1984). Además, los cefalópodos presentan enzimas lipasas a lo largo del tracto digestivo (Caruso et al., 2004), y aunque la digestibilidad de los lípidos no es alta en comparación con la proteínas (Petza et al., 2006; Mazón et al., 2007), son capaces de almacenarlos en cantidades importantes a nivel de la glándula digestiva y de movilizarlos en situaciones de ayuno (O'Dor y Wells, 1987; Castro et al., 1992). Igualmente, la amplia variabilidad observada en este órgano tanto en el contenido lipídico como en la distribución de sus clases sugieren papeles distintos de los lípidos asociados al estilo de vida y la estrategia alimentaria de la especie (Rosa et al., 2005).

Al respecto, los experimentos de ayuno han resultado de utilidad en el estudio de los requerimientos lipídicos, tanto en peces (Jezierska et al., 1982; Vigliano, 2002) como en cefalópodos, observándose una dependencia de la utilización de las reservas energéticas según el período de ayuno considerado (O'Dor et al., 1984; Boucher-Rodoni y Mangold, 1985; Castro et al., 1992). Puesto que el fin de la acuicultura es desarrollar las máximas prestaciones de crecimiento y aprovechamiento nutritivo es poco habitual que los animales estén sometidos a largos periodos de ayuno, pudiendo ser más útil estudiar los cambios bioquímicos que se producen en los primeros días de inanición. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar la variación en el contenido lipídico y de sus distintas clases en los distintos tejidos de *O. vulgaris* durante el ayuno a corto plazo. Estos

datos pueden ser útiles no sólo en la comprensión de los requerimientos lipídicos de los cefalópodos sino en la mejora de la formulación de dietas artificiales destinadas a su producción.

## Material y métodos

### *Animales de experimentación: captura y aclimatación.*

Los pulpos se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) mediante arte de arrastre y se mantuvieron en tanques de 2000 l en el laboratorio. Los ensayos comenzaron cuando los animales se aclimataron, entre una y dos semanas después, comprobándose que se alimentaban de forma regular con la ración calculada según García García y Cerezo Valverde (2006). Finalizado el periodo de aclimatación, los animales se pesaron y sexaron con el fin de formar grupos experimentales con un peso medio inicial similar. En total se emplearon 20 ejemplares macho de entre 957,00 y 1099,25g ( $1022,75 \pm 163,96$  g) de peso para configurar un total de 5 grupos experimentales de 4 individuos cada uno (ver Tabla 1). Cuatro grupos se sacrificaron a los días 1, 2, 4 y 8 después de suministrar la última comida. Además, se dispuso de un Grupo Control Final (CF) que fue alimentado durante los 8 días de duración de la experiencia. El día del sacrificio los pulpos se pesaron y se procedió a su disección separando el tejido muscular (animal sin vísceras) y la glándula digestiva.

### *Determinación de las clases lipídicas*

Se determinaron en el tejido muscular (animal eviscerado) y la glándula digestiva. Con este fin cada una de estas partes se trituró y mezcló repetidamente hasta obtener una mezcla homogénea, se envasó al vacío y se congeló posteriormente a  $-20^{\circ}$  C antes de proceder a la extracción de grasa. Los lípidos fueron extraídos por duplicado en cada fracción del animal usando el método de Folch et al. (1957) y se conservaron disueltos en hexano en ultracongelador a  $-80^{\circ}$  C. La separación de las distintas clases de lípidos se realizó mediante cromatografía de alta resolución de capa fina (HPTLC) siguiendo el método de Olsen y Henderson (1989). Para ello primero se secaron las muestras con  $N_2$  y se les añadió un volumen específico de cloroformo:metanol (2:1) para obtener una concentración final de 10 mg/ml. Se usaron placas de gel de sílice de HPTLC 20 x 10 cm (Merck) sometidas a un pre-tratamiento con cloroformo:metanol (2:1). Posteriormente en las placas se aplicaron 15  $\mu$ g de lípidos totales (1,5  $\mu$ l de la disolución) de cada extracción y por duplicado con un autoinyector Linomat 5 (CAMAG). Para el desarrollo de las placas se empleó un primer solvente para lípidos polares (LP: metilacetato, isopropanol, cloroformo, metanol y KCl; 10:10:10:4:3.6) y posteriormente un segundo para lípidos neutros (LN: hexano, dietil eter y ácido acético glacial; 32:8:0.8). Las bandas de los distintas clases de lípidos se visualizaron con el reactivo de Fewster (mezcla de acetato de cobre (3% p/v) en ácido ortofosfórico (8% v/v)) e introduciendo las placas en estufa a  $160^{\circ}$  C durante 15 min. La lectura de las placas se llevó a cabo por densitometría mediante un scanner TLC 3 (CAMAG) a una longitud de onda de 254 nm. Los lípidos detectados fueron lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiélna (SM); fosfatidilcolina (PC); lisofosfatidiletanolamina (LPE); fosfatidilserina (PS); fosfatidilinositol (PI); ácido fosfatídico. cardiolipina. y fosfatidilglicerol (PA);

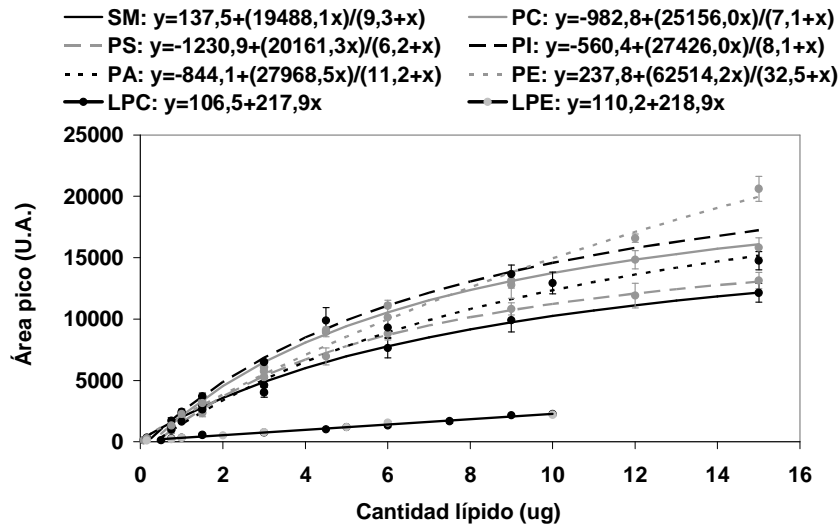
fosfatidiletanolamina (PE); sulfolípidos (SL); pigmentos (PIG); monoglicéridos (MG); diglicéridos (DG); colesterol (CHO); ácidos grasos libres (FFA); triglicéridos (TG); esteroides de colesterol y ceras (CE).

#### *Calibración para la cuantificación de las clases lipídicas*

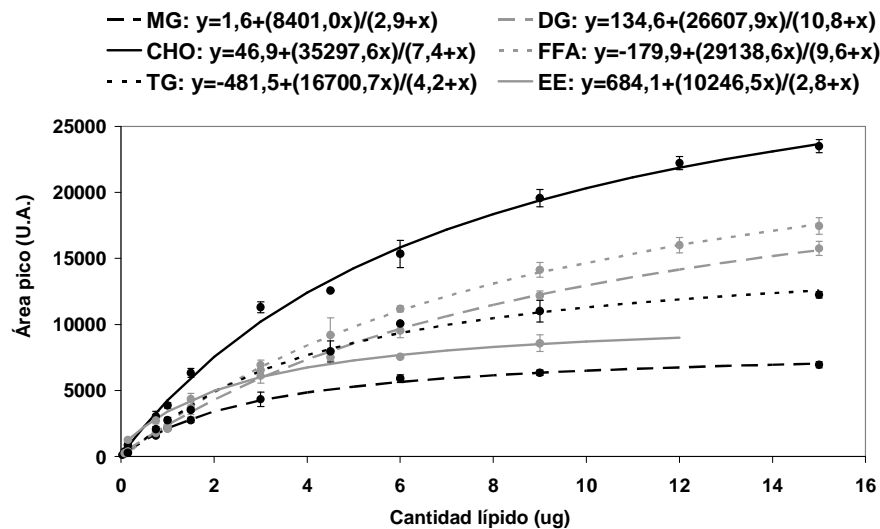
En primer lugar se determinó el orden de aparición y la posición de referencia de cada una de las clases lipídicas aplicando cada una de ellas por separado y a partir de disoluciones elaboradas con patrones puros (Larodan Fine Chemicals). Posteriormente, se obtuvo el área expresada en unidades arbitrarias (U.A.) correspondiente a la aplicación de entre 0,1 y 15 ug de cada clase lipídica y por triplicado. Con estos datos se elaboró una recta patrón compuesta de 6 a 12 puntos, dependiendo de los límites de detección de la sustancia. Los valores obtenidos se ajustaron a la ecuación de una recta ( $y = a + bx$ ) para LPC y LPE, o a una función no lineal del tipo saturación ( $y = y_0 + ax / (b+x)$ ) para el resto de clases lipídicas. Todas las rectas elaboradas se ajustaron de forma muy significativa a los valores obtenidos ( $P < 0,001$ ) y explicaron más del 99 % de la variabilidad observada. La representación de las rectas de calibración se muestra en las Figuras 1A (lípidos polares) y 1B (lípidos neutros).

#### *Análisis de los datos*

La concentración total de lípidos en los tejidos se expresó en g por cada 100 g de muestra y la concentración de las distintas clases lipídicas en mg por cada 100 g de muestra, en ambos casos en peso húmedo. Para evitar una interpretación errónea de las variaciones en las concentraciones de lípidos debido a posibles cambios en el tamaño de las distintas partes de los animales se obtuvo además el contenido en lípidos en cada fracción de cada ejemplar según la ecuación: Contenido en lípidos de la fracción analizada (mg/ind) = Peso de la fracción (mg) x Concentración en lípidos de la fracción (mg/100g). Todos los resultados obtenidos se expresaron como la media y la desviación estándar de las replicas. Las diferencias entre las concentraciones o el contenido por individuo de las distintas clases lipídicas fueron evaluadas mediante análisis de la varianza ANOVA de una vía, con los datos previamente transformados en  $\ln(x+1)$ . La normalidad y la homogeneidad de las varianzas se comprobaron con el test de Kolmogorov y el de Levene's, respectivamente. Para todos los análisis se estableció un nivel de significación  $P < 0,05$ .



A



B

**Figuras 1(A-B).** Curvas de calibración para la cuantificación de los lípidos polares (A) y neutros (B). LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomiélna; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA: Ácido fosfatídico; PE: Fosfatidiletanolamina; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; EE: Ésteres de estero

## Resultados

No existieron diferencias significativas entre los pesos medios de los distintos grupos al inicio del experimento ( $P>0,05$ ). Los grupos sometidos a ayuno perdieron entre 66 (2 días de ayuno) y 120 g de peso (8 días de ayuno), mientras que los animales que fueron alimentados durante el periodo experimental ganaron una media de 68 g, mostrando un peso mayor de la glándula digestiva ( $P<0,05$ ). No existieron diferencias significativas en la concentración de grasa en el tejido muscular (0,08-0,10 g/100 g) ni en la glándula digestiva (6,4-8,4 g/100 g), aunque el contenido de grasa individual de este órgano fue significativamente menor (1,4 g/ind.) respecto de los animales alimentados (3,6 g/ind.) (Tabla 1).

No existieron diferencias significativas en la concentración (g/100g) ni en el contenido (mg/ind.) de los lípidos polares como consecuencia del ayuno en el tejido muscular. Sí se detectó un contenido menor de monoglicéridos y colesterol en los animales alimentados (18,7 y 58,0 mg/ind., respectivamente) respecto de los que ayunaron durante 8 días (40,2 y 101,1 mg/ind., respectivamente; Tablas 2 y 3). En la glándula digestiva se detectó un aumento progresivo en la concentración de la mayoría de los lípidos polares con el ayuno, aunque sólo fue significativa para la PE (Tabla 4). No existieron diferencias en el contenido de ninguno de los lípidos polares a nivel de la glándula digestiva como consecuencia del ayuno, aunque los animales que fueron alimentados mostraron valores mayores de PC, LPE, PA y PE respecto de todos los grupos que ayunaron (Tabla 5). En referencia a los lípidos neutros, se observaron mayores concentraciones de MG en los grupos que ayunaron (462-773 mg/100 g) respecto de los que fueron alimentados (222 mg/100g), aunque estas diferencias desaparecieron al expresar los valores como contenido a nivel de la glándula digestiva. La concentración de TG fue significativamente menor en el grupo sometido a 8 días de ayuno (526 mg/100 g) respecto del resto de grupos experimentales (1949-2996 mg/100 g), traduciéndose también en un contenido significativamente menor (104 mg/ind.) respecto de los grupos que ayunaron un solo día (904 mg/ind.) o los que fueron alimentados (1342 mg/ind.).

## Discusión

### *Sobre las variaciones en la composición lipídica del tejido muscular*

Las concentraciones y contenidos en lípidos del tejido muscular en *O. vulgaris* han sido poco relevantes, coincidiendo con los resultados obtenidos en la musculatura de otros octópodos (Suryanarayanan y Alexander, 1971; Fujii, 1960). Considerando todo el tejido muscular de un ejemplar de 1 Kg de peso los lípidos polares no superaron los 622 mg/ind. y los neutros los 191 mg/ind., destacando el mayor contenido en PC, PE y CHO, al igual que los resultados obtenidos en trabajos previos (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Almansa et al., 2006). Según nuestros resultados, el ayuno no afectó a la concentración ni al contenido de ninguno de los lípidos polares a nivel del tejido muscular. Por el contrario, el aumento en la concentración y contenido en MG en los animales sometidos a 8 días de ayuno podría estar relacionado con la utilización o transformación de otras clases lipídicas como los TG, aunque en todo caso la contribución de éstos últimos sería poco relevante puesto que no han mostrado cambios significativos.

**Tabla 1.** Peso inicial (PI), peso final (PF), incremento de peso (IP), peso eviscerado (PE) y de la glándula digestiva (PGD), índice de la glándula digestiva (DGI), concentraciones (%) de agua y grasa en el músculo (M) y en la glándula digestiva (GD) y contenido total de grasa por individuo (g) en ambas fracciones.

GRUPO	1 día de ayuno (n = 4)	2 días de ayuno (n = 4)	4 días de ayuno (n = 4)	8 días de ayuno (n = 4)	Control Alimentados (n = 4)	ANOVA
PI (g)	986 ± 101	1034 ± 166	1050 ± 163	1099 ± 182	998 ± 157	n.s.
PF (g)	918 ± 121	968 ± 164	959 ± 169	979 ± 177	1066 ± 154	n.s.
IP (g)	-68 ± 25 <sup>a</sup>	-66 ± 28 <sup>a</sup>	-91 ± 14 <sup>a</sup>	-120 ± 31 <sup>a</sup>	68 ± 62 <sup>b</sup>	*
PE (g)	819 ± 111	879 ± 150	882 ± 148	912 ± 150	921 ± 117	n.s.
PGD (g)	36,5 ± 8,1 <sup>ab</sup>	31,9 ± 7,9 <sup>bc</sup>	24,1 ± 6,4 <sup>cd</sup>	21,5 ± 4,7 <sup>d</sup>	44,0 ± 6,52 <sup>a</sup>	*
DGI (%)	3,9 ± 0,4 <sup>ab</sup>	3,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	4,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	*
Humedad M (%)	79,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	79,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	79,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	79,6 ± 0,2 <sup>ab</sup>	80,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	*
Grasa M (%)	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,2	0,08 ± 0,03	n.s.
Grasa M (g)	0,87 ± 0,28	0,81 ± 0,43	0,89 ± 0,30	0,73 ± 0,30	0,76 ± 0,43	n.s.
Humedad GD (%)	60,6 ± 2,3 <sup>a</sup>	65,3 ± 4,7 <sup>ab</sup>	66,3 ± 5,5 <sup>ab</sup>	70,2 ± 3,3 <sup>b</sup>	62,3 ± 1,9 <sup>a</sup>	*
Grasa GD (%)	8,4 ± 1,7	8,0 ± 4,3	7,5 ± 5,2	6,4 ± 4,6	8,1 ± 1,7	n.s.
Grasa GD (g)	3,1 ± 1,02 <sup>ab</sup>	2,6 ± 1,3 <sup>ab</sup>	2,0 ± 1,7 <sup>ab</sup>	1,4 ± 1,1 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	*

n.s. = no significativo ( $P > 0,05$ ); \* $P < 0,05$   
Superíndices distintos indican diferencias significativas entre grupos.

**Tabla 2.** Concentración (mg/ 100g de muestra en peso húmedo) de las distintas clases de lípidos en el músculo de *O. vulgaris*.

GRUPO	1 día de ayuno (n = 4)	2 días de ayuno (n = 4)	4 días de ayuno (n = 4)	8 días de ayuno (n = 4)	Control Alimentados (n = 4)	ANOVA
<b>Lípidos polares (LP)</b>						
LPC	2,9 ± 4,2	1,5 ± 1,3	2,1 ± 4,2	n.d.	n.d.	n.s.
SM	1,0 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,9 ± 0,6	0,9 ± 0,7	n.s.
PC	24,9 ± 4,7	21,3 ± 6,9	21,5 ± 5,4	20,5 ± 6,2	21,3 ± 12,1	n.s.
LPE	3,4 ± 1,6	3,6 ± 3,7	4,9 ± 2,5	3,6 ± 0,1	2,2 ± 2,2	n.s.
PS	6,0 ± 0,9	5,9 ± 0,3	6,8 ± 1,8	6,5 ± 1,4	4,4 ± 2,4	n.s.
PI	6,0 ± 0,9	8,6 ± 4,2	8,4 ± 3,5	6,7 ± 1,5	3,4 ± 2,0	n.s.
PA/PG/CL	4,8 ± 1,3	4,4 ± 1,2	5,0 ± 1,7	3,4 ± 0,9	3,7 ± 1,3	n.s.
PE	18,3 ± 1,8	19,5 ± 6,8	19,6 ± 5,3	14,0 ± 3,1	16,3 ± 9,1	n.s.
SL	1,4 ± 1,0	0,4 ± 0,8	n.d.	0,4 ± 0,4	0,7 ± 0,6	n.s.
PIG	n.d.	n.d.	n.d.	0,3 ± 0,3	n.d.	n.s.
<b>Lípidos neutros (LN)</b>						
MG	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,7 <sup>ab</sup>	3,6 ± 0,4 <sup>bc</sup>	4,4 ± 0,9 <sup>c</sup>	2,0 ± 1,6 <sup>a</sup>	*
DG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.
CHO	12,0 ± 3,9 <sup>a</sup>	10,4 ± 2,7 <sup>ab</sup>	12,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	9,2 ± 4,1 <sup>ab</sup>	6,3 ± 2,4 <sup>b</sup>	*
FFA	2,8 ± 0,4	3,0 ± 0,9	3,6 ± 2,1	3,2 ± 1,9	3,3 ± 4,3	n.s.
TG	0,8 ± 0,5	0,4 ± 0,4	1,3 ± 1,8	1,1 ± 0,8	0,9 ± 0,5	n.s.
SE	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,6	0,4 ± 0,7	1,6 ± 1,1	0,7 ± 1,3	n.s.
LP (Total)	68,8 ± 6,5	65,7 ± 19,9	69,8 ± 19,9	57,4 ± 13,1	53,2 ± 28,5	n.s.
LN (Total)	18,4 ± 4,1	17,0 ± 3,0	21,7 ± 4,5	19,4 ± 8,6	13,3 ± 9,9	n.s.

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA/CL/PG: Ácido fosfatídico. Cardiolipina. y Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; PIG: Pigmentos; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de esteroles y Ceras. n.d. = no detectado; n.s. = no significativo; \* $p < 0,05$



**Tabla 3.** Contenido medio (mg) de las distintas clases de lípidos considerando todo el tejido muscular de un ejemplar de *O. vulgaris*.

GRUPO	1 día de ayuno (n = 4)	2 días de ayuno (n = 4)	4 días de ayuno (n = 4)	8 días de ayuno (n = 4)	Control Alimentados (n = 4)	ANOVA
<b>Lípidos polares (LP)</b>						
LPC	20,9 ± 29,6	14,1 ± 13,8	19,8 ± 39,6	n.d.	n.d.	n.s.
SM	8,7 ± 4,6	11,9 ± 5,2	12,2 ± 5,6	17,6 ± 8,6	8,3 ± 6,7	n.s.
PC	208,5 ± 65,7	192,6 ± 96,5	192,3 ± 65,0	191,7 ± 90,8	196,4 ± 112,2	n.s.
LPE	27,2 ± 11,8	30,8 ± 28,9	41,7 ± 19,1	32,3 ± 5,2	20,0 ± 20,2	n.s.
PS	50,4 ± 14,0	51,3 ± 9,2	60,6 ± 20,1	59,7 ± 23,0	41,9 ± 23,4	n.s.
PI	50,1 ± 11,6	79,3 ± 54,0	73,7 ± 33,6	61,5 ± 23,9	34,1 ± 19,7	n.s.
PA/PG/CL	39,4 ± 11,5	39,4 ± 17,3	45,1 ± 19,5	31,8 ± 13,2	34,6 ± 13,2	n.s.
PE	151,7 ± 33,8	177,3 ± 93,7	175,87 ± 65,5	129,5 ± 49,3	151,2 ± 84,8	n.s.
SL	12,4 ± 8,9	4,5 ± 8,8	n.d.	3,8 ± 4,1	7,0 ± 6,0	n.s.
PIG	n.d.	n.d.	n.d.	2,8 ± 3,9	n.d.	n.s.
<b>Lípidos neutros (LN)</b>						
MG	20,0 ± 3,9 <sup>a</sup>	22,0 ± 7,5 <sup>a</sup>	31,0 ± 3,0 <sup>ab</sup>	40,2 ± 15,1 <sup>b</sup>	18,7 ± 14,7 <sup>a</sup>	*
DG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.
CHO	96,7 ± 28,2 <sup>ab</sup>	92,9 ± 38,8 <sup>ab</sup>	115,1 ± 35,4 <sup>b</sup>	101,1 ± 30,2 <sup>b</sup>	58,0 ± 23,3 <sup>a</sup>	*
FFA	23,1 ± 5,9	26,4 ± 10,4	30,1 ± 14,4	31,4 ± 22,9	30,4 ± 39,3	n.s.
TG	5,8 ± 4,2	2,9 ± 3,3	12,1 ± 17,0	10,8 ± 9,1	8,3 ± 4,9	n.s.
SE	5,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,1 ± 2,7 <sup>a</sup>	2,7 ± 5,4 <sup>a</sup>	17,9 ± 12,7 <sup>b</sup>	6,3 ± 12,5 <sup>a</sup>	n.s.
LP (g/ 100)	569,4 ± 122,4	593,4 ± 288,8	621,5 ± 227,3	530,8 ± 211,2	493,6 ± 266,6	n.s.
LN (g/ 100)	149,0 ± 29,0	151,0 ± 51,0	191,0 ± 51,2	185,5 ± 104,7	123,5 ± 90,9	n.s.

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA/CL/PG: Ácido fosfatídico. Cardiolipina. y Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; PIG: Pigmentos; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de esteroles y ceras. n.d. = no detectado; n.s. = no significativo; \*p<0,05.

**Tabla 4.** Concentración (mg/ 100g de muestra en peso húmedo) de las distintas clases de lípidos en la glándula digestiva de *O. vulgaris*.

GRUPO	1 día de ayuno (n = 4)	2 días de ayuno (n = 4)	4 días de ayuno (n = 4)	8 días de ayuno (n = 4)	Control Alimentados (n = 4)	ANOVA
<b>Lípidos polares (LP)</b>						
LPC	121,3 ± 19,2	79,9 ± 74,2	107, ± 74,1	113,6 ± 70,0	105,3 ± 39,3	n.s.
SM	n.d.	n.d.	7,3 ± 8,5	13,3 ± 18,8	5,8 ± 11,5	n.s.
PC	321,8 ± 51,4	327,5 ± 74,2	570,6 ± 290,9	576,8 ± 167,6	585,1 ± 280,8	n.s.
LPE	74,6 ± 32,3	93,6 ± 47,5	87,2 ± 60,6	78,3 ± 34,2	109,7 ± 23,2	n.s.
PS	266,6 ± 52,3	293,7 ± 88,0	346,5 ± 120,2	367,5 ± 171,9	301,3 ± 96,6	n.s.
PI	158,2 ± 26,8	228,2 ± 162,7	199,1 ± 122,9	205,7 ± 64,8	164,1 ± 56,0	n.s.
PA/PG/CL	161,9 ± 25,9	194,2 ± 62,6	109,5 ± 43,3	200,4 ± 149,3	265,2 ± 37,5	n.s.
PE	148,4 ± 59,3 <sup>a</sup>	201,3 ± 47,9 <sup>ab</sup>	243,2 ± 110,1 <sup>ab</sup>	391,6 ± 216,6 <sup>b</sup>	366,6 ± 181,9 <sup>ab</sup>	*
SL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.
PIG	39,4 ± 55,7	210,8 ± 196,6	96,3 ± 124,0	80,3 <sup>a</sup> ± 120,5	120,5 ± 81,2	n.s.
<b>Lípidos neutros (LN)</b>						
MG	462,3 ± 80,9 <sup>a</sup>	498,5 ± 320,5 <sup>a</sup>	490,89 ± 333,5 <sup>a</sup>	772,8 ± 478,9 <sup>a</sup>	221,7 ± 67,6 <sup>b</sup>	*
DG	274,4 ± 107,3	184,6 ± 94,3	284,7 ± 94,5	365,0 ± 506,7	152,6 ± 53,6	n.s.
CHO	263,0 ± 22,3	432,8 ± 381,9	327,1 ± 169,5	602,4 ± 532,6	196,6 ± 76,2	n.s.
FFA	1433,3 ± 162,6	1691,4 ± 789,3	1296,1 ± 958,8	1728,8 ± 1824,2	1068,0 ± 324,9	n.s.
TG	2356,0 ± 553,4 <sup>a</sup>	1949,6 ± 234,4 <sup>a</sup>	2282,2 ± 2091,8 <sup>a</sup>	526,5 ± 299,1 <sup>b</sup>	2995,7 ± 719,9 <sup>a</sup>	*
SE	416,8 ± 110,6	224,2 ± 96,9	372,9 ± 463,7	304,2 ± 421,1	246,2 ± 29,08	n.s.
LP (g/ 100)	1238,1 ± 149,1	1580,7 ± 530,4	1739,8 ± 962,1	1960,8 ± 700,6	1908,8 ± 969,9	n.s.
LN (g/ 100)	5329,3 ± 655,5	4925,1 ± 1598,9	4818,4 ± 2663,4	4394,2 ± 2926,8	4865,1 ± 733,4	n.s.

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA/CL/PG: Ácido fosfatídico, Cardiopina, y Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; PIG: Pigmentos; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Ésteres de esteroles y Ceras. n.d. = no detectado; n,s, = no significativo; \*p<0,05.

**Tabla 5.** Contenido medio (mg) de las distintas clases de lípidos en la glándula digestiva de un ejemplar de *O. vulgaris*.

GRUPO	1 día de ayuno (n = 4)	2 días de ayuno (n = 4)	4 días de ayuno (n = 4)	8 días de ayuno (n = 4)	Control Alimentados (n = 4)	ANOVA
<b>Lípidos polares (LP)</b>						
LPC	43,6 ± 8,7	25,1 ± 20,4	28,8 ± 25,1	24,3 ± 18,1	44,5 ± 9,6	n.s.
SM	n.d.	n.d.	1,4 ± 1,7	3,1 ± 1,9	2,8 ± 0,9	n.s.
PC	113,3 ± 8,1 <sup>a</sup>	108,5 ± 51,2 <sup>a</sup>	149,6 ± 113,1 <sup>ab</sup>	115,9 ± 42,2 <sup>a</sup>	259,8 ± 130,6 <sup>b</sup>	*
LPE	27,2 ± 11,6 <sup>ab</sup>	29,6 ± 14,1 <sup>ab</sup>	23,4 ± 20,6 <sup>a</sup>	15,6 ± 6,9 <sup>a</sup>	48,4 ± 12,6 <sup>b</sup>	*
PS	96,3 ± 22,7	98,5 ± 55,0	92,6 ± 78,8	76,9 ± 44,9	131,8 ± 44,0	n.s.
PI	58,6 ± 17,9	71,8 ± 46,3	53,3 ± 45,6	42,1 ± 18,5	72,3 ± 27,9	n.s.
PA/PG/CL	58,3 ± 5,9 <sup>a</sup>	68,4 ± 40,5 <sup>a</sup>	26,4 ± 11,9 <sup>a</sup>	45,5 ± 37,0 <sup>a</sup>	120,5 ± 4,3 <sup>b</sup>	*
PE	50,8 ± 12,6 <sup>a</sup>	66,8 ± 31,5 <sup>a</sup>	63,7 ± 46,5 <sup>a</sup>	75,1 ± 39,4 <sup>a</sup>	169,3 ± 99,8 <sup>b</sup>	*
SL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.
PIG	10,9 ± 15,5	66,0 ± 55,5	28,0 ± 41,7	19,0 ± 26,8	51,9 ± 37,6	n.s.
<b>Lípidos neutros (LN)</b>						
MG	164,0 ± 23,4	165,1 ± 116,2	118,1 ± 74,3	168,6 ± 145,2	95,3 ± 24,2	n.s.
DG	108,8 ± 64,2	57,5 ± 29,5	84,2 ± 46,4	85,9 ± 119,8	68,4 ± 31,2	n.s.
CHO	96,4 ± 23,6	144,8 ± 130,8	83,4 ± 55,1	133,7 ± 131,2	84,1 ± 27,8	n.s.
FFA	536,1 ± 180,7	558,6 ± 321,0	331,3 ± 259,9	391,3 ± 441,9	456,5 ± 101,9	n.s.
TG	903,7 ± 402,3 <sup>ab</sup>	627,8 ± 194,4 <sup>bc</sup>	642,2 ± 698,9 <sup>bc</sup>	104,2 ± 56,7 <sup>c</sup>	1341,6 ± 460,8 <sup>a</sup>	*
CE/WE	143,4 ± 8,4	80,2 ± 56,01	116,8 ± 159,8	71,5 ± 99,5	109,4 ± 13,3	n.s.
LP (g/ 100)	439,3 ± 42,9 <sup>ab</sup>	517,7 ± 246,9 <sup>ab</sup>	460,6 ± 371,4 <sup>ab</sup>	402,4 ± 187,5 <sup>a</sup>	843,8 ± 353,2 <sup>b</sup>	*
LN (g/ 100)	1994 ± 668,6 <sup>ab</sup>	1613,9 ± 762,2 <sup>ab</sup>	1304,8 ± 905,1 <sup>ab</sup>	976,6 ± 765,3 <sup>a</sup>	2146,9 ± 480,2 <sup>b</sup>	*

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PA/CL/PG: Ácido fosfatídico, Cardiolipina, y Fosfatidilglicerol; PE: Fosfatidiletanolamina; SL: Sulfolípidos; PIG: Pigmentos; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE: Esteres de esteroles y ceras. n.d. = no detectado; n.s. = no significativo; \*p<0,05.

Igualmente, en estudios in Vitro se ha encontrado a nivel muscular una baja capacidad oxidativa de lípidos (Ballantyne et al, 1981; Mommsen y Hochachka, 1981; Storey y Storey, 1983). Cabe destacar también la menor concentración y contenido de CHO en los ejemplares alimentados en comparación con los animales que ayunaron, sugiriendo la implicación de esta clase lipídica en los procesos de crecimiento así como una elevada demanda que no ha quedado cubierta con la dieta suministrada. Estudios recientes de Almansa et al. (2006) en sepia (*Sepia officinalis*) observaron un incremento de CHO en músculo a medida que los individuos envejecían, pudiendo estar implicado en las propiedades fisiológicas de las células del músculo.

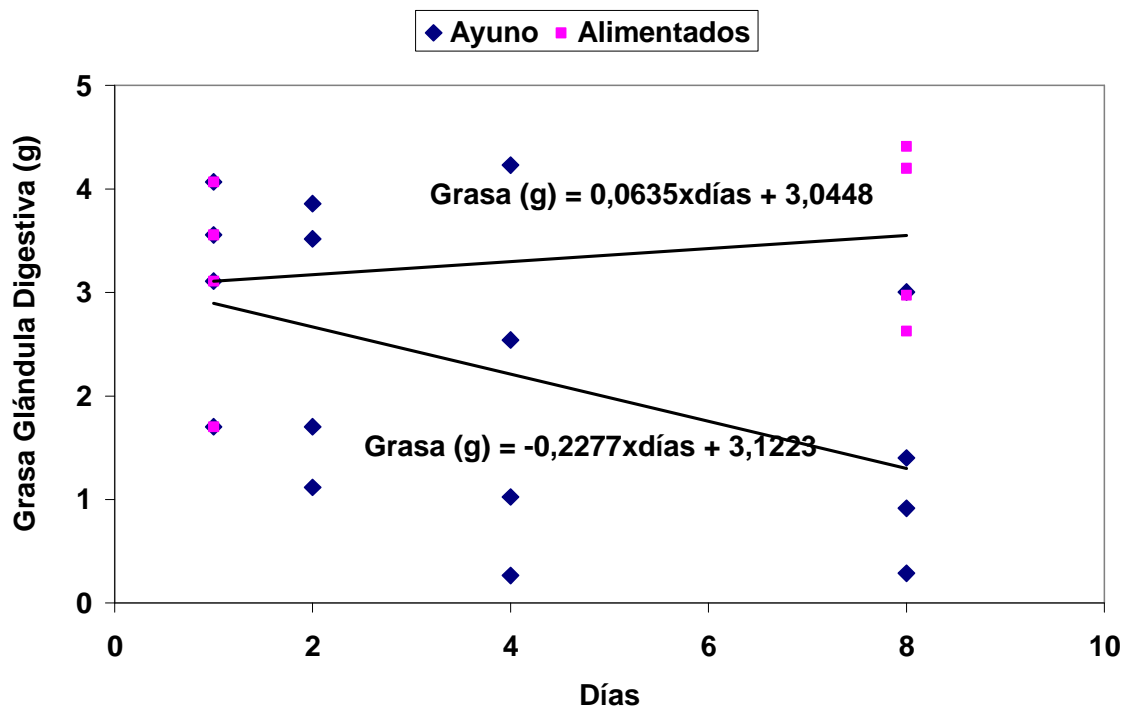
#### *Sobre las variaciones en la composición lipídica de la glándula digestiva*

Durante el ayuno, los lípidos almacenados en la glándula digestiva pueden contribuir energéticamente al metabolismo provocando un incremento en la relación atómica O: N (principalmente debido a disminuir la excreción del amoníaco). Esto es más evidente al comienzo del periodo de ayunas (Boucher-Rodoni y Mangold, 1985). Al igual que en otros estudios (O'Dor et al. 1984; O'Dor y Wells, 1987; Castro et al. 1992) se ha demostrado la capacidad del pulpo de roca para movilizar lípidos en situaciones de ayuno. Según nuestros resultados el contenido lipídico en la glándula digestiva disminuyó de 3,1 g/ind. a 1,4 g/ind en los 8 días de ayuno, detectándose una disminución significativa en los TG. El contenido de otros LN como los DG, FFA y SE también disminuyó, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas. La alta variabilidad y movilidad de las distintas clases de LN (principalmente FFA, TG y SE) en la glándula digestiva durante el periodo de ayuno avala el papel energético de este órgano. En otros cefalópodos, como el calamar *Euprymna tasmanica* la mayoría de los lípidos presentes en la glándula digestiva eran componentes estructurales de las membranas (LP) o productos derivados de la digestión como SE y FFA (Moltschaniwsky y Johnston, 2006). Por lo tanto, el contenido en lípidos en la glándula digestiva como su distribución en las diferentes clases varía con la especie y suelen ser un reflejo de su estrategia alimentaria (Rosa et al. 2005). En el caso concreto de los lípidos polares, el aumento de su concentración y el mantenimiento de su contenido conforme aumentaba el período de ayuno fue indicativo de la ausencia de su utilización durante esta situación. No obstante, los animales alimentados y en período de crecimiento sí mostraron una elevada capacidad para su almacenamiento, especialmente para la PC, LPE, PA y PE. La carencia de algunas de estas clases lipídicas podría representar un factor limitante para un desarrollo apropiado o una menor eficiencia energética de la dieta.

#### *Consideraciones bioenergéticas*

Los resultados obtenidos en el presente estudio avalan la pobre contribución de los lípidos al metabolismo energético del pulpo, tal y como sugieren otros autores (Lee, 1994). A partir nuestros resultados sólo se ha detectado una contribución significativa de los lípidos a partir de glándula digestiva a razón de 0,23 g/día de ayuno (Figura 2). A partir de los coeficientes oxalóricos propuestos por Miglavs y Jobling (1989) 1 g de lípidos proporcionaría 38,9 kJ, lo que supondría un aporte calórico de unos 8,9 kJ/día a partir de la glándula digestiva y principalmente en

forma de triglicéridos. En este sentido, Wells y Clarke (1996) estimaron un gasto metabólico en ayunas de 13 kJ al día para un ejemplar de *O. vulgaris* de 0,5 kg a 22 °C, y de 18 kJ para mantenimiento (animal alimentado pero con crecimiento cero). En el caso de un ejemplar de 1 Kg a 18 °C –condiciones experimentales similares a las del presente estudio–, Cerezo Valverde y García García (2004) estimaron un consumo de oxígeno de 2,6 g de O<sub>2</sub>/día en situación de rutina y de 37,4 kJ/día. Finalmente, se podría estimar que los lípidos podrían contribuir con el 24 % (8,9/37,4\*100) del gasto energético de los animales en situación de ayuno y el resto debería de ser suministrado por otras fuentes como las proteínas o los hidratos de carbono.



**Figura 2.** Variación en el contenido de grasa de la glándula digestiva en animales alimentados y sometidos a distintos periodos de ayuno.

#### Bibliografía

- Almansa, E., Domingues, P.M., Sykes, A., Tejera, N., Lorenzo, A., Andrade, J.P., 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid compositor of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture* 256, 403-413.
- Boucher-Rodoni, R., Mangold K., 1985. Ammonia excretion during feeding and starvation in *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.* 86, 193-197.
- Boucher-Rodoni, R., Mangold K., 1988. Comparative aspects of ammonia excretion in cephalopods. *Malacología* 29, 145-151.
- Caruso, G., Giordano, D., Mancuso, M., Genovese, L. 2004. Studio preliminare degli enzimi digestivi di *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 ed *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca:Cephalopoda). *Biol. Mar. Medit.* 11, 367-369.

- Cerezo Valverde, J., García García, B. 2004. Influence of body weight and temperature on post-prandial oxygen consumption of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*. 233, 599-613.
- Folch, J., Lees N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fujii, T., 1960. Comparative Biochemical studies on the egg yolk protein of various animals species. *Acta. Embryol. Morph. Exp.* 3, 250-6.
- García García, B., Cerezo Valverde, J., 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Ocotpus vulgaris*) on growing. *Aquaculture* 253, 502-511.
- Jezierska, B., Hazel, J. R., Gerking, S. D., 1982. Lipid metabolism during starvation in the rainbow trout, *Salmon gairdneri* Richardson, with attention to fatty acids. *Journal of Fish Biology* 21, 681-692.
- Lee, P.G., 1994. Metabolic substrates in cephalopods. In: Pörtner, H.O., O'Dor, R.K., MacMillan, D.L. (Eds.), *Physiology of Cephalopod Mollusc. Lifestyle and Performance Adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, Switzerland, pp. 35-51.
- Mazón, M.J., Piedecausa, M.A., Hernández, M.D., García García, B., 2007. Evaluation of environmental nitrogen and phosphorus contributions as a result of intensive on growing of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 266, 226-235.
- Miglavs, I., Jobling, M., 1989. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish. Biol.* 35, 1-11.
- Moltschanivskyj, N. A., Johnston, D., 2006. Evidence that lipid can be digested by the dumpling squid *Euprymna tasmanica*, but is not stored in the digestive gland. *Mar. Biol.* 149, 565-572.
- Mommsen, T.P., Hochachka, P.W., 1981. Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 120, 345-350.
- Navarro, J.C., Villanueva, R., 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183, 161-177.
- Navarro, J.C., Villanueva, R., 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture* 219, 613-631.
- O'Dor, R.K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M.J., Wells, J., 1984. Nutrient Absorption, Storage and Remobilization in *Octopus vulgaris*. *Mar. Behav. Physiol.* 11, 239-258.
- O'Dor, R.K., Wells, M.J., 1987. Energy and nutrient flow. In: Boyle, P.R. (Ed.). *Comparative Reviews, Cephalopod Life Cycles, Vol II*. Academic Press, London, pp. 109-134.
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129, 189-197.
- Petza, D., Katsanevakis, S., Verriopoulos, G., 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed ad libitum on a high-lipid diet. *Mar. Biol.*, 148, 827-832.

- Rosa, R., Pereira, J., Nunes, M. L., 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to a giant squid, *Architeuthis* sp. *Mar. Biol.* 146, 739-751.
- Segawa, S., Hanlon, R.T., 1988. Oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Octopus maya*, *Loligo forbesi* and *Lolliguncula brevis* (Mollusca: Cephalopoda). *Mar. Behav. Physiol.* 13, 389-400.
- Sinanoglou, V.J., Miniadis-Meimaroglou, S., 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Res. Int.* 31, 467-473.
- Storey, K., Storey, J., 1983. Carbohydrate metabolism in cephalopod molluscs. In: *The Mollusca. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics*. Ed. P. Hochachka, Academic Press Inc., New York (USA). 1, 91-136.
- Suryanarayanan, H., Alexander, K. M., 1971. Fuel reserves of mollusca muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 40A, 55-60
- Vigliano, F. A.; Quiroga. M. I. y Nieto, J. M. 2002. Adaptaciones metabólicas al ayuno y realimentación en peces. *Rev. Ictiol.* 10(1/2): 79-108.
- Wells, M.J, Clarke, A., 1996. Energetics: the cost of living and reproducing form an individual cephalopod. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 351, 1083-1104.

## **Requerimientos lipídicos de pulpo común (*Octopus vulgaris*) obtenidos a partir de dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.**

### **Resumen**

El objetivo de este trabajo fue conocer los requerimientos lipídicos de *O. vulgaris* suministrando dietas semihúmedas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado (deducido del contenido en agua): 0 % (A0, 13,8 % lípidos SS), 10 % (A10, 28,6 % lípidos SS) y 20 % (A20, 38,8 % lípidos SS) . El resto de ingredientes se mantuvo constante en las tres dietas: 20 % de gelatina, 10 % de yema de huevo en polvo, 15 % liofilizado de *Todarodes sagittatus* y 5 % liofilizado de *Sardinella aurita*). Las dietas presentaron una textura firme al introducirlas en agua y una buena aceptabilidad, observándose una supervivencia del 100 %. La mayor tasa absoluta de ingesta ( $15,8 \pm 1,2$  g/ día), crecimiento ( $9,6 \pm 1,4$  g/ día; 0,91 %P/día) y eficacia alimentaria (60,3 %) se observó con la dieta A0. En ésta la tasa de ingesta de lípidos (1,0 g/día) fue menor respecto de las dietas A10 (2,1 g/día) y A20 (3,3 g/día;  $P < 0,05$ ), mostrando además una mayor retención de lípidos y proteína. La digestibilidad de la proteína se mantuvo por encima del 95 % en todas de las dietas. Sólo la dieta A0 obtuvo un alto coeficiente de digestibilidad de lípidos (81,25 %), disminuyendo drásticamente hasta el 12,3 % en la A20. Fue destacable la elevada digestibilidad de los lípidos polares (83-89 %) respecto de los neutros (2-87 %) en todas las dietas. Estos resultados proponen tasas de ingesta de lípidos óptimas alrededor de 1 g/día y porcentajes de grasa apropiados del 13-14 % SS en dietas formuladas para el engorde de *O. vulgaris*, aunque estos valores podrían variar en estudios futuros según la proporción de .lípidos polares y neutros de la dieta.

### **1. Introducción**

Los nuevos formatos de pienso desarrollados que son aceptados por el pulpo común (*Octopus vulgaris*) permiten elaborar dietas formuladas de composición conocida para avanzar en el conocimiento de sus requerimientos nutricionales (Quintana et al., 2008; Cerezo Valverde et al., 2008, 2012a; García et al., 2010; Estefanell et al., 2011a; Morillo-Velarde et al., 2012a).

Actualmente se admite que los cefalópodos son exclusivamente carnívoros, y a diferencia de lo ocurrido con las proteínas, raramente utilizan carbohidratos o lípidos como fuente de energía (Lee, 1994). Los cefalópodos presentan en su composición corporal menos de un 2 % en peso húmedo de lípidos, mostrando altos niveles de fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de la serie n-3 (Sinanoglou y Miniadis-Meimaroglou, 1998; Navarro y Villanueva, 2000, 2003), por lo que se ha sugerido un predominio del papel estructural sobre el energético (O'Dor et al., 1984; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006). No obstante, los cefalópodos presentan enzimas lipasas a lo largo del tracto digestivo (Boucher-Rodoni, 1982; Caruso et al., 2004; Moltschaniwskyj y Johnston, 2006) y son capaces de almacenar los lípidos en forma de triglicéridos en cantidades importantes en la glándula digestiva (Sieiro et al., 2006; Cerezo Valverde et al., 2012b). Recientemente, Morillo-Velarde et al. (2012a) han



estimado que los lípidos contribuyen con el 26 % del gasto energético diario de *Octopus vulgaris* durante el ayuno a corto plazo y el resto debería de ser suministrado por otras fuentes como las proteínas (Lee, 1994; García-Garrido et al., 2012) o los hidratos de carbono (Morillo-Velarde et al., 2011). Las reservas de lípidos en *O. vulgaris* durante el ayuno son movilizadas eficazmente, principalmente los lípidos neutros, incluyendo ésteres de esteroles, triglicéridos, y ácidos grasos libres (García Garrido et al., 2010; Morillo-Velarde et al., 2012a). El uso de lípidos como una potencial fuente de energía también ha sido sugerido en otras especies de cefalópodos (Semmens, 1998; Motlschaniwskyj y Johnston, 2006).

Algunos grupos de investigación han obtenido recientemente buenos crecimientos y altos índices de eficacia alimentaria al utilizar dietas con alto contenido en grasa. Estefanell et al. (2011a) han obtenido excelentes resultados en *O. vulgaris* usando boga (*Boops boops*) fresca de descarte o incluida en dietas formuladas (18,7-26,3 % de grasa peso seco), sugiriendo una eficaz utilización de los lípidos de la dieta. Estos mismos autores detectaron peores resultados al emplear boga de contenido lipídico muy alto (46,5 %; Estefanell et al., 2011b), lo que parece confirmar la existencia de un rango óptimo en el contenido lipídico de la dieta. Cerezo Valverde et al. (2012a) obtuvieron mejor crecimiento, eficacia alimentaria y valor productivo de la proteína en dietas formuladas con un 30-33 % de lípidos (peso seco) respecto de otras con un 4-5 %. Previamente, García García y Aguado Giménez (2002) también comprobaron en dietas naturales la influencia del contenido lipídico, observando mejor crecimiento e índice de conversión en pulpos alimentados con *B. boops* (20,1% lípidos, peso seco) que con *Sardina pilchardus* (49,7 % lípidos, peso seco). Posteriormente también en dietas naturales se sugería un contenido de lípidos para *O. vulgaris* entre el 7-10 % en peso seco (García García y Cerezo Valverde, 2006).

El objetivo de este trabajo es conocer los requerimientos lipídicos de *O. vulgaris* comprobando los cambios que se producen en el crecimiento, aprovechamiento y digestibilidad de la dieta, así como en la composición nutricional de los animales después de suministrar dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado utilizando el formato de pienso propuesto por Morillo-Velarde et al. (2012b).

## 2. Material y métodos

### 2.1. Captura y aclimatación de los animales.

Los ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) mediante arte de arrastre y se mantuvieron en tanques de 2000 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante 2 semanas y se alimentaron con alacha (*Sardinella aurita*) y cangrejo (*Carcinus mediterraneus*) en días alternativos, según el patrón descrito por García García y Cerezo Valverde (2006). Posteriormente los animales se trasladaron y mantuvieron individualmente en tanques circulares de 262 l donde se llevaría a cabo la experiencia, con un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura (Air Energy, Heat Pump Inc., Model 400 Ti) y filtración mecánica y biológica. Éstos contenían tubos

de PVC como refugio, una red externa para evitar que se escaparan y una tela de rafia para evitar la luz directa. La temperatura se mantuvo constante ( $18,4 \pm 0,7$  °C) dentro del rango óptimo para esta especie (Aguado Giménez y García García, 2002), oxígeno superior al 80 % de saturación para que este factor no fuera limitante (Cerezo Valverde y García García, 2005), lámpara UV, fotoperiodo 12L: 12D, salinidad 37‰, pH entre 7 y 8 y nitrógeno amoniacal total (TAN) inferior a 0,2 mg/l.

## 2.2. Elaboración y estabilidad de las dietas formuladas.

Se prepararon tres dietas diferentes con distinto contenido en aceite de pescado, representando en cada una de ellas el 0 % (grupo A0), 10 % (grupo A10) y 20 % (grupo A20) en peso de la dieta y deduciéndose del contenido en agua (Tabla 1). El resto de ingredientes se mantuvo constante en las tres dietas y estuvo constituido por 20 % de gelatina como aglomerante, 10 % de yema de huevo en polvo, 10 % de liofilizado de pota (*Todarodes sagittatus*) y 5 % de liofilizado de alacha (*S. aurita*). La pota y la alacha procedían de pesquerías artesanales de la misma zona que los pulpos. Ambas fueron limpiadas de espinas y vísceras, y posteriormente trituradas. Estos ingredientes se liofilizaron y se trituraron en un molinillo de café hasta obtener una textura de polvo fino ( $<200\mu\text{m}$ ), se envasaron y conservaron al vacío. La yema de huevo, la gelatina y el aceite de pescado se adquirieron en su forma comercial (Tabla 1). Para la elaboración de los piensos todos los ingredientes se mezclaron en un robot de cocina (Mycook® 1.8, Electrodomésticos Taurus, S.L. Lleida, Spain). Primero se disolvió la gelatina en agua y aceite a 40 °C, y posteriormente se fueron añadiendo los ingredientes restantes hasta su completa homogenización. La mezcla obtenida se dejó enfriar a 4° C en bandejas de aluminio durante 24 h, congelándose posteriormente hasta su uso.

La estabilidad en agua de las dietas se determinó a partir de la pérdida de la materia seca del pienso después de la inmersión en agua durante 24 horas. Con estos datos se obtuvo la media de los valores de los siguientes índices calculados:

$VP (\%) = (P_f - P_i) / P_i * 100$ , expresa la variación del peso seco de las dietas después de ser sumergidas en agua, donde  $P_i$  y  $P_f$  son el peso seco inicial y final, respectivamente.

$F = P_i / P_f$ , representa un factor de corrección. El peso seco del alimento no ingerido de las dietas fue multiplicado por este valor de corrección para tener en cuenta la disgregación del pienso.

**Tabla 1.** Composición porcentual (%) de las dietas formuladas con distinto contenido en aceite de pescado.

Dietas	Agua	Gelatina <sup>a</sup>	Yema <sup>b</sup> (Huevina)	Alacha <sup>c</sup> ( <i>Sardinella aurita</i> )	Pota <sup>c</sup> ( <i>Todarodes sagittatus</i> )	Aceite <sup>d</sup>	Total (%)
A0	50	20	10	5	15	0	100
A10	40	20	10	5	15	10	100
A20	30	20	10	5	15	20	100

<sup>a</sup> Gelatina granulada Bloom 220. Productos Sur, S. A. (Polígono Industrial Oeste, San Ginés, Murcia, España).

<sup>b</sup> Yema de huevo atomizada, Avícola San Isidro S.L. (Los Belones, Cartagena, Murcia, España).

<sup>c</sup> Ingredientes liofilizados.

<sup>d</sup> Aceite de hígado de bacalao, Acofarma (Terrassa, Barcelona, España).

### 2.3. *Diseño experimental.*

Finalizado el periodo de aclimatación, los animales se pesaron y sexaron formando 4 grupos: CI o control inicial (3 individuos sacrificados al inicio del experimento), grupo A0 (4 individuos alimentados con dieta A0), grupo A10 (6 individuos con dieta A10) y grupo A20 (6 individuos con dieta A20). Todos los individuos fueron machos con el fin de evitar la influencia de los procesos reproductivos. Las dietas fueron suministradas durante 56 días (noviembre 2011 hasta febrero 2012). Los pesos medios iniciales fueron de  $803 \pm 91$  g (719-922 g) para la dieta A0,  $817 \pm 79$  g (738-956 g) para la dieta A10 y  $802 \pm 88$  g (714-946 g) para la dieta A20. La temperatura del agua osciló entre 17,0 y 20,8 °C durante el periodo experimental ( $18,4 \pm 0,7$  °C). Los piensos se pesaron y se administraron a saciedad, en un único trozo de forma cúbica, correspondiendo la primera toma al 5 % del peso corporal de cada individuo, y posteriormente, reajustándose para que sobrepasase las demandas de cada ejemplar. Los pulpos eran alimentados a las 09:00 h, 6 días a la semana (García García y Cerezo Valverde, 2004, 2006), y el alimento sobrante se recogía a las 24 h con la ayuda de un pequeño salabre. El alimento sobrante fue desecado a  $105 \pm 1$  °C durante 48 h hasta peso constante (AOAC 1997; Method n°. 930.15) para calcular la ingesta diaria de cada individuo. El último día de experimentación todos los animales fueron pesados y anestesiados por inmersión en agua de mar helada antes del sacrificio conforme con los principios éticos en concordancia con la Directiva 2010/63/EU.

### 2.4. *Recogida y conservación de las muestras.*

Una vez finalizado el experimento se procedió a la disección de los ejemplares de cada grupo, obteniendo la glándula digestiva y la carcasa (resto del individuo menos la glándula digestiva), con sus correspondientes pesos. Este procedimiento fue necesario para obtener las analíticas de la composición de los animales completos, a partir de los resultados de la glándula digestiva y la carcasa. Cada una de estas partes se trituró y mezcló hasta obtener una mezcla homogénea, se envasó al vacío y se congeló a -20 °C antes de proceder a los análisis bioquímicos.

Las heces fueron recogidas diariamente con la ayuda de un pequeño salabre y se conservaron en el ultracongelador a -80 °C. Posteriormente se liofilizaron (Heto, PowerDry LL3000, Allerød, Dinamarca). Las heces de cada grupo experimental fueron recogidas conjuntamente para conseguir la cantidad necesaria para su análisis.

### 2.5. *Método Analítico.*

Se analizaron por triplicado tanto las dietas formuladas como las muestras de pulpo. Se utilizó 1 g de muestra para la ceniza, humedad y proteína y 2 g de muestra en el caso de los lípidos. La humedad fue obtenida por desecación a  $105 \pm 1$  °C durante 24 h hasta peso constante (AOAC 1997; Method n°. 930.15) y las

cenizas por incineración a  $450 \pm 1$  °C durante 24 h en un horno Mufla (HOBERSAL, HD-230). El contenido de lípidos fue obtenido mediante eter etílico en un extractor SOXTEC AVANTI 2058 (AOAC, 1997; Método nº 920.39). El contenido proteico fue determinado por el método Kjeldhal usando un factor de conversión de 6,25 y el material extraíble libre de nitrógeno (MELN) por diferencia. La energía y la relación proteína energía (P/E en MJ) fueron estimados usando los coeficientes de energía de Miglavs y Jobling (1989): Proteína 23,6 KJ/g, lípidos 38,9 KJ/g y carbohidratos 16,7 KJ/g.

Los macronutrientes en el animal completo se calcularon sumando el contenido del nutriente (N) en la glándula digestiva con el contenido en la carcasa:

$N \text{ total} = [(PGD * \%NGD) + (PCA * \%NCA)] * 100 / PT$ , donde N es el % de nutriente considerando el animal completo, PGD el peso de la glándula digestiva, PCA el peso de la carcasa, NGD el porcentaje del nutriente en la glándula digestiva, NCA el porcentaje del nutriente en la carcasa y PT el peso total del individuo.

### 2.6. Determinación e identificación de las clases lipídicas.

A partir del contenido en lípidos totales de las dietas, la carcasa y la glándula digestiva de *O. vulgaris* se estimó la cantidad de muestra necesaria para extraer 10 mg de lípidos según Folch et al. (1957). Los lípidos se conservaron disueltos en cloroformo:metanol (2:1 v/v) y butilhidroxitolueno (0,01 %) como antioxidante en ultracongelador a -80 °C (Christie, 1982), ajustando la concentración a 10 µg/µl de lípidos antes de los análisis. La separación de las clases lipídicas se realizó mediante cromatografía de alta resolución en capa fina (HPTLC) siguiendo el método de Olsen y Henderson (1989). Los lípidos (15 µg) se aplicaron en placas de gel de sílice de HPTLC 20 x 10 cm (Merck, Darmstadt, Germany) con un autoinyector (Linomat 5 CAMAG) de acuerdo con Cerezo Valverde et al. (2012a). Posteriormente, se obtuvo el porcentaje del área detectada correspondiente a cada clase lipídica. Se detectaron lípidos polares (LP): lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), fosfatidilserina y fosfatidilinositol (PS/PI) y fosfatidiletanolamina (PE); y lípidos neutros (LN): monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG), colesterol (CHO), ácidos grasos libres (FFA), triglicéridos (TG) y ésteres de esteroles y ceras (SE/WE).

### 2.7. Determinación de la digestibilidad.

El coeficiente de digestibilidad aparente fue calculado para la materia seca (CDAMS), la proteína (CDAPROT), los lípidos (CDALIP) y para cada clase lipídica usando la ecuación estándar de Maynard y Loosli (1969):

$CDA = 100 - (100 * \%M_{dieta} / \%M_{heces}) * (\%N_{heces} / \%N_{dieta})$ , donde M es el marcador inerte y N los nutrientes. Como marcador inerte se emplearon las cenizas insolubles en ácido (CIA), determinadas según el método descrito por Atkinson et al. (1984). El porcentaje final de cada clase lipídica en la muestra se obtuvo como el producto entre el porcentaje de lípidos totales y el que representaba cada clase lipídica. Tanto para las heces como para las dietas liofilizadas se utilizaron 5 g para la obtención de las cenizas insolubles en ácido y 0,2 g para lípidos. Para las proteínas se utilizaron 0,2 y 0,5 gr para la dieta y las heces, respectivamente, realizando los análisis por triplicado en todos los casos.

### 2.8. Parámetros calculados y análisis de los datos.

Todos los ejemplares fueron pesados al inicio ( $P_i$  es el peso inicial en g) y al final del experimento ( $P_f$  es el peso final en g). Los parámetros calculados fueron los siguientes: Peso medio:  $P_m$  (g) =  $(P_i + P_f)/2$ ; Incremento de peso:  $IP$  (g) =  $P_f - P_i$ ; Tasa de alimentación absoluta:  $TAA$  (g/día) =  $(AC/días)$ ; Tasa de alimentación relativa:  $TAR$  (%P/día) =  $(TAA/P_m) * 100$ ; Tasa de crecimiento diario:  $TCA$  (g/día) =  $(IP/días)$ ; Tasa específica de crecimiento:  $TEC$  (%P/día) =  $[(\ln P_f - \ln P_i)/días] * 100$ ; Índice de eficacia alimentaria:  $IEA$  (%) =  $(IP/AC) * 100$ ; Índice de conversión:  $IC$  =  $AC/IP$ ; Tasa de alimentación absoluta de proteína:  $TAAP$  (g/día) =  $(TAA * \%Proteína\ dieta)/100$ ; Tasa de alimentación absoluta de lípidos:  $TAAL$  (g/día) =  $(TAA * \%Lípidos\ dieta)/100$ ; Valor productivo de la proteína:  $PPV$  (%) =  $(Proteína\ retenida / Proteína\ ingerida) * 100$ ; Valor productivo de los lípidos:  $LPV$  (%) =  $(Lípidos\ retenidos / Lípidos\ ingeridos) * 100$ ; Índice de la glándula digestiva:  $IGD$  (%) =  $(PGD/P_f) * 100$ , donde  $PGD$  es el peso de la glándula digestiva en g y  $AC$  es el alimento consumido en g corregido teniendo en cuenta la tasa de disgregación en el agua y calculado según la fórmula:

$AC = (Alimento\ suministrado\ ss - Alimento\ sobrante\ ss * F) + Alimento\ suministrado\ ss * \%Humedad\ dieta$ , con valores de  $F$  entorno a 1 (0,99-1,02) para todas las dietas formuladas.

Los resultados obtenidos de todos los análisis fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.). Para analizar las diferencias se llevó a cabo un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias significativas obtenidas entre los valores medios fueron analizadas por el test de Duncan que permite comparar grupos con distinto número de muestras, estableciendo un nivel de significación  $P < 0,05$ . Los porcentajes y los índices fueron transformados aplicando el logaritmo neperiano antes de hacer el ANOVA.

### 3. Resultados.

Las dietas presentaron una textura firme antes de sumergirlas en agua. La dieta A0 perdió un 1,75 %, la dieta A10 perdió un 0,0 % y la dieta A20 un 0,22 % de su peso seco después de permanecer 24 h en agua, demostrando una gran estabilidad. Existieron diferencias significativas en los porcentajes de todos los macronutrientes analizados, con menores porcentajes de humedad, proteína y cenizas y mayor de lípidos conforme aumentó el contenido de aceite en la dieta ( $P < 0,05$ ; Tabla 2). Al analizar las clases lipídicas no hubo diferencias significativas ni en los LN totales ni en los LP totales, aunque se observó un aumento en el porcentaje de DG, TG, SE/WE y una disminución en el porcentaje de SM, PE, CHO y FFA significativos, al incrementar el porcentaje de aceite en la dieta ( $P < 0,05$ ). El contenido energético fue mayor en las dietas A10 y A20 respecto de la dieta A0, mientras que, la relación P/E (g/MJ) fue menor en las dietas A10 y A20 respecto a la dieta A0 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Composición (% peso seco) en macronutrientes y clases lipídicas (% del total de lípidos detectados) de las dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	A0	A10	A20	P
Humedad	53,66 ± 0,80 <sup>a</sup>	44,47 ± 0,33 <sup>b</sup>	34,80 ± 0,09 <sup>c</sup>	*
Proteínas	81,57 ± 0,61 <sup>a</sup>	66,73 ± 8,77 <sup>b</sup>	56,83 ± 0,23 <sup>c</sup>	*
Lípidos	13,77 ± 0,62 <sup>a</sup>	28,64 ± 8,15 <sup>b</sup>	38,83 ± 0,18 <sup>c</sup>	*
Lípidos Polares (Totales)	13,89 ± 0,27	14,73 ± 2,43	11,70 ± 0,91	n.s.
LPC	2,25 ± 0,12	1,73 ± 0,87	1,20 ± 0,21	n.s.
SM	1,15 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,40 <sup>ab</sup>	0,55 ± 0,11 <sup>b</sup>	*
PC	5,49 ± 0,06	6,81 ± 1,12	6,26 ± 0,92	n.s.
LPE	1,31 ± 0,21	1,00 ± 0,01	0,89 ± 0,29	n.s.
PS/PI	1,15 ± 0,11	0,93 ± 0,16	0,61 ± 0,17	n.s.
PE	3,22 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,18 <sup>b</sup>	2,15 ± 0,02 <sup>b</sup>	*
Lípidos Neutros (Totales)	86,12 ± 0,26	85,27 ± 2,45	88,32 ± 0,90	n.s.
MG	4,88 ± 0,83	4,03 ± 0,07	4,28 ± 0,18	n.s.
DG	2,37 ± 0,09 <sup>a</sup>	4,30 ± 0,48 <sup>b</sup>	5,03 ± 0,51 <sup>b</sup>	*
CHO	12,32 ± 0,11 <sup>a</sup>	9,50 ± 0,72 <sup>b</sup>	8,54 ± 0,59 <sup>b</sup>	*
FFA	24,84 ± 0,44 <sup>a</sup>	15,63 ± 0,54 <sup>b</sup>	13,44 ± 0,62 <sup>c</sup>	*
TG	37,48 ± 0,52 <sup>a</sup>	45,07 ± 2,01 <sup>b</sup>	49,07 ± 0,96 <sup>b</sup>	*
SE/WE	4,76 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,23 ± 0,16 <sup>b</sup>	7,96 ± 0,04 <sup>c</sup>	*
Cenizas	4,38 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,43 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,97 ± 0,03 <sup>c</sup>	*
MELN <sup>a</sup>	0,63 ± 0,41	1,21 ± 1,18	1,36 ± 0,04	n.s.
CIA <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,00 <sup>b</sup>	*
Energía( KJ/100g)	2471	2709	2874	-
P/E (g/MJ) <sup>c</sup>	33,00	24,63	19,77	-

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomielina; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS/PI: Fosfatidilserina y Fosfatidilinositol PE: Fosfatidiletanolamina; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE/ WE: Esteroles de colesterol y Ceras.

<sup>a</sup> MELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculadas por diferencia.

<sup>b</sup> CIA = Cenizas insolubles en ácido.

<sup>c</sup> P/E = Relación proteína/energía. Datos expresados como la media ± D.E.; valores en la misma línea con superíndices diferentes son significativamente diferentes (n.s.= no significativo (P>0,05)).

Al comienzo del experimento no hubo diferencias significativas entre los pesos medios iniciales de los 3 grupos y la supervivencia fue del 100 % en todos los grupos. Durante el primer mes (días 1-28) la dieta mejor aceptada fue la dieta A0, con una TAR de 1,78 ± 0,15 % P/día (P<0,05). No obstante, no llegaron a detectarse diferencias significativas en el crecimiento (10-11 g/día) ni aprovechamiento de la dieta entre grupos. El grupo alimentado con dieta A0 mostró una TAAL significativamente menor respecto de los grupos alimentados con la dietas A10 y A20 (P<0,05; Tabla 3). Durante el segundo mes (días 29-56)

no hubo diferencias significativas en la aceptabilidad de las dietas, con TAR similares ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, los animales alimentados con la dieta A0 mostraron índices significativamente mejores de crecimiento, con una TCA de  $8,11 \pm 1,32$  g/ día, dos y cuatro veces mayor respecto de los grupos alimentados con la dieta A10 y A20 ( $4,38 \pm 1,56$  g/ día y  $2,65 \pm 1,88$  g/ día, respectivamente; Tabla 3). Igualmente, los índices de aprovechamiento nutritivo (IEA, IC) fueron significativamente mejores con la dieta A0 al compararlos con la dieta A10 ( $P < 0,05$ ). Los valores medios de IEA e IC para la dieta A20 en este 2º mes no se calcularon por aparecer un ejemplar con valor negativo. Al comparar el periodo completo (días 1-56), los animales alimentados con la dieta A0 mostraron índices significativamente mejores de crecimiento (IP, TCA, TEC), destacando un mayor IP ( $535 \pm 77$  g) respecto de los alimentados con las dietas A10 y A20 ( $408 \pm 95$  g y  $361 \pm 63$  g, respectivamente;  $P < 0,05$ ). La TAAL fue significativamente menor en la dieta A0 (1,01 g/día), siendo el doble con A10 y el triple con A20. El mejor aprovechamiento de la dieta se detectó en el grupo A0, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas ( $P > 0,05$  para IEA, IC y PPV). Tampoco hubo diferencias en el IGD. El valor productivo de los lípidos (LPV) fue significativamente mayor en el grupo A0 ( $P < 0,05$ ; Tabla 3).

Los valores de CDAMS y CDALIP para la dieta A0 fueron superiores respecto de las dietas A10 y A20, detectándose en esta última los valores más bajos. Los CDAPROT fueron similares en las tres dietas (95-98 %; Tabla 4). Los lípidos polares presentaron coeficientes de digestibilidad mayores ( $> 83$  % en las tres dietas) respecto de los lípidos neutros (2-87 %), cuya digestibilidad fue disminuyendo conforme aumentó el porcentaje de grasa en la dieta, llegando a ser del 0 % en MG y FFA en las dietas con aceite. Este patrón se observó en todos los lípidos neutros analizados (Fig. 1). Por el contrario, no se detectó una disminución de la digestibilidad en ninguno de los lípidos polares al aumentar el contenido de grasa en la dieta (Fig. 1).

**Tabla 3.** Índices de crecimiento y aprovechamiento nutritivo de los pulpos alimentados con las dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	Días 1 - 28				Días 29 - 56				Periodo Total (Días 1- 56)			
	Dieta A0 (n=4)	Dieta A10 (n=6)	Dieta A20 (n=6)	P	Dieta A0 (n=4)	Dieta A10 (n=6)	Dieta A20 (n=6)	P	Dieta A0 (n=4)	Dieta A10 (n=6)	Dieta A20 (n=6)	P
Pi (g)	803 ± 91	817 ± 79	802 ± 88	n.s.	1111 ± 173	1102 ± 117	1089 ± 152	n.s.	802 ± 91	817 ± 79	802 ± 88	n.s.
Pf (g)	1111 ± 173	1102 ± 117	1089 ± 152	n.s.	1338 ± 140	1225 ± 152	1163 ± 132	n.s.	1338 ± 140	1225 ± 152	1163 ± 132	n.s.
IP (g)	308 ± 105	285 ± 59	287 ± 67	n.s.	227 ± 37	123 ± 44	74 ± 53	n.s.	535 ± 77 <sup>a</sup>	408 ± 95 <sup>b</sup>	361 ± 63 <sup>b</sup>	*
TAA (g/día)	16,97 ± 2,13	13,96 ± 1,52	14,03 ± 3,85	n.s.	14,60 ± 0,90	12,33 ± 1,16	12,13 ± 3,17	n.s.	15,79 ± 1,19	13,14 ± 1,32	13,08 ± 3,15	n.s.
TAAP (g/día)	6,42 ± 0,80	5,17 ± 0,56	5,20 ± 1,43	n.s.	5,52 ± 0,34	4,57 ± 0,43	4,49 ± 1,18	n.s.	5,97 ± 0,45	4,87 ± 0,49	4,85 ± 1,17	n.s.
TAAL (g/día)	1,08 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,22 ± 0,24 <sup>b</sup>	3,55 ± 0,97 <sup>c</sup>	*	0,93 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,18 <sup>b</sup>	3,07 ± 0,80 <sup>c</sup>	*	1,01 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,21 <sup>b</sup>	3,31 ± 0,80 <sup>c</sup>	*
TAR (%P/día)	1,78 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,25 <sup>b</sup>	*	1,20 ± 0,15	1,07 ± 0,10	1,08 ± 0,29	n.s.	1,48 ± 0,09	1,29 ± 0,13	1,32 ± 0,24	n.s.
TCA (g/día)	11,01 ± 3,73	10,19 ± 2,10	10,26 ± 2,40	n.s.	8,11 ± 1,32 <sup>a</sup>	4,38 ± 1,56 <sup>b</sup>	2,65 ± 1,88 <sup>b</sup>	*	9,56 ± 1,37 <sup>a</sup>	7,29 ± 1,70 <sup>b</sup>	6,45 ± 1,12 <sup>b</sup>	*
TEC (%P/día)	1,15 ± 0,29	1,07 ± 0,18	1,08 ± 0,12	n.s.	0,68 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,19 <sup>b</sup>	*	0,91 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,09 <sup>b</sup>	*
IEA (%)	63,58 ± 13,81	72,57 ± 9,65	74,24 ± 10,16	n.s.	55,65 ± 0,80 <sup>a</sup>	35,12 ± 10,10 <sup>b</sup>	n.c. <sup>1</sup>	*	60,34 ± 4,68	54,99 ± 8,52	50,29 ± 7,59	n.s.
IC	1,63 ± 0,35	1,40 ± 0,21	1,37 ± 0,19	n.s.	1,84 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,05 ± 0,87 <sup>b</sup>	n.c. <sup>1</sup>	*	1,67 ± 0,14	1,86 ± 0,31	2,02 ± 0,28	n.s.
PPV(%)	-	-	-		-	-	-		27,39 ± 3,29	23,39 ± 6,56	21,81 ± 4,16	n.s.
LPV(%)	-	-	-		-	-	-		14,09 ± 3,62 <sup>a</sup>	9,83 ± 5,06 <sup>ab</sup>	6,48 ± 4,01 <sup>b</sup>	*
IGD(%)	-	-	-		-	-	-		5,57 ± 0,93	5,11 ± 1,08	5,23 ± 0,68	n.s.

Pi = peso inicial; Pf, = peso final; IP = incremento de peso; TAA = tasa de alimentación absoluta; TAR = tasa de alimentación relativa; TCA = tasa de crecimiento absoluta; TEC = tasa específica de crecimiento; IEA = índice de eficacia alimentaria; IC = índice de conversión absoluta; TAAP = tasa de alimentación absoluta de proteínas; TAAL= tasa de alimentación absoluta de lípidos; PPV = valor productivo de la proteína; LPV = valor productivo de los lípidos; IGD = índice de la glándula digestiva.

<sup>1</sup> N.c.: no calculado por detectar valores negativos en 1 ejemplar. Valores en la misma línea con superíndices diferentes son significativamente diferentes (n.s.= no significativo (P>0,05), \*P<0,05).



**Tabla 4.** Coeficientes de digestibilidad de las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	A0	A10	A20
CDAPROT <sup>a</sup>	95,16	97,48	96,22
CDALIP <sup>b</sup>	81,25	26,78	12,27
CDAMS <sup>c</sup>	87,78	70,98	57,44

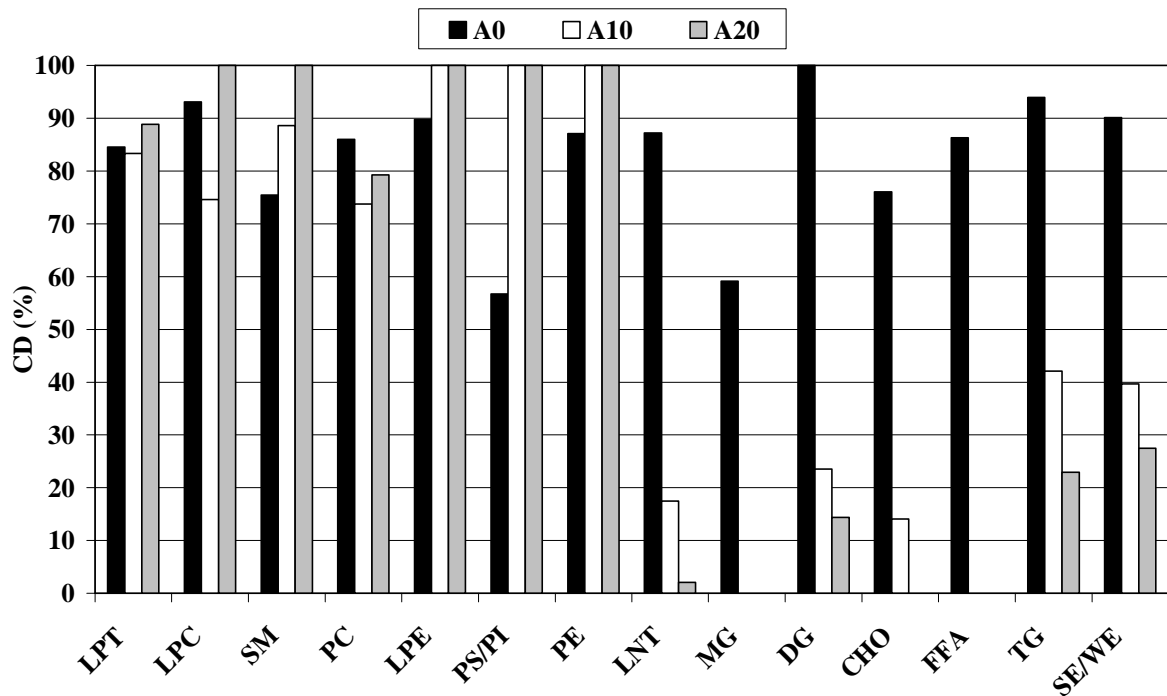
<sup>a</sup> CDAPROT= Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína.

<sup>b</sup> CDALIP= Coeficiente de digestibilidad aparente de los lípidos.

<sup>c</sup> CDAMS= coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca .

Datos expresados como la Media ± D. E.; n.s.= no diferencias significativas (P>0,05);

\*P<0,05.



**Figura 1.** Coeficientes de digestibilidad aparente de las distintas clases lipídicas obtenidas para las dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10 % (A10) y con un 20 % (A20). LPT: Lípidos Polares Totales; LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomiélin; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS/PI: Fosfatidilserina y Fosfatidilinositol; PE: Fosfatidiletanolamina; LNT: Lípidos Neutros Totales; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE/ WE: Esteroles de colesterol y Ceras.

Las principales diferencias en cuanto a la composición nutricional de los animales se dieron en la glándula digestiva. En este órgano, todos los grupos experimentales presentaron porcentajes mayores en lípidos y menores en proteína y cenizas respecto del CI ( $p < 0,05$ ). Los grupos alimentados con las dietas A10 y A20 mostraron porcentajes significativamente mayores en lípidos y menores en proteínas respecto del alimentado con la dieta A0 ( $P < 0,05$ ; Tabla 5). No se obtuvieron diferencias significativas en la composición nutricional de la carcasa ( $p > 0,05$ ). En el animal completo el porcentaje de proteínas fue menor en los grupos alimentados con la dieta A10 (73,02 %) y A20 (74,04 %) respecto al grupo CI (77,28 %). El contenido lipídico fue mayor en aquellos animales que se alimentaron con dietas experimentales respecto al grupo CI (Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición en macronutrientes de las distintas fracciones del pulpo (% peso seco) alimentados con dietas naturales (CI) y con dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	CI (N = 3)	A0 (N = 4)	A10 (N = 6)	A20 (N = 6)	P
<b>Glándula Digestiva</b>					
Humedad	65,82 ± 4,02	62,25 ± 3,67	58,49 ± 4,76	59,54 ± 5,64	n.s.
Cenizas	5,75 ± 1,60	<sup>§</sup> 3,50 ± 0,17	<sup>§</sup> 3,33 ± 0,73	<sup>§</sup> 2,96 ± 0,57	n.s.
Proteínas	58,20 ± 7,86	49,11 ± 5,20 <sup>a</sup>	<sup>§</sup> 36,40 ± 4,74 <sup>b</sup>	<sup>§</sup> 38,02 ± 7,91 <sup>b</sup>	*
Lípidos	21,35 ± 6,46	<sup>§</sup> 36,69 ± 4,61 <sup>a</sup>	<sup>§</sup> 51,65 ± 5,14 <sup>b</sup>	<sup>§</sup> 51,26 ± 7,59 <sup>b</sup>	*
MELN <sup>a</sup>	14,70 ± 1,66	10,70 ± 1,24	8,80 ± 3,33	7,79 ± 3,32	n.s.
<b>Carcasa</b>					
Humedad	81,79 ± 1,21	80,59 ± 0,66	80,33 ± 1,09	80,82 ± 0,66	n.s.
Cenizas	11,79 ± 1,56	9,85 ± 0,89	10,76 ± 0,99	11,19 ± 0,70	n.s.
Proteínas	78,61 ± 2,04	79,72 ± 1,47	76,34 ± 1,84	78,40 ± 2,01	n.s.
Lípidos	0,70 ± 0,29	0,38 ± 0,27	0,41 ± 0,15	0,55 ± 0,43	n.s.
MELN <sup>a</sup>	8,90 ± 0,21	10,05 ± 0,89	12,49 ± 1,84	9,86 ± 2,50	n.s.
<b>Animal completo</b>					
Humedad	81,12 ± 0,94	79,59 ± 0,66	79,19 ± 1,29	79,678 ± 0,96	n.s.
Cenizas	11,29 ± 1,33	9,21 ± 0,88	9,99 ± 1,01	10,33 ± 0,86	n.s.
Proteínas	77,28 ± 1,83	76,59 ± 0,84	<sup>§</sup> 73,02 ± 2,36	<sup>§</sup> 74,04 ± 2,92	n.s.
Lípidos	2,11 ± 0,55	<sup>§</sup> 4,08 ± 0,69	<sup>§</sup> 5,72 ± 1,83	<sup>§</sup> 6,04 ± 2,15	n.s.
MELN <sup>a</sup>	9,31 ± 0,35	10,11 ± 0,75	12,11 ± 1,94	9,59 ± 2,19	n.s.

<sup>a</sup>MELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculados por diferencia.

Datos expresados como la media ± D.E.; valores en la misma línea con superíndices diferentes son significativamente diferentes (n.s.= no significativo ( $P > 0,05$ ), \* $P < 0,05$ );

<sup>§</sup> $P < 0,05$  con respecto a los animales control (CI).

En la glándula digestiva predominaron los LN (87,7-91,9 %) frente a los LP (8,1-13,3 %), siendo los TG, FFA y SE/WE las clases lipídicas mayoritarias. En la carcasa predominaron los LP frente a los LN, destacando la PC, PE y CHO como las clases lipídicas mayoritarias (Tabla 6). Tanto en la glándula digestiva como en la carcasa se detectó un aumento en el porcentaje de LN y un descenso en el de LP conforme aumentó el porcentaje de aceite en la dieta ( $P < 0,05$ ). Principalmente estos cambios se atribuyeron a un mayor porcentaje de TG en la glándula digestiva y en CHO, FFA y TG en la carcasa ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 6.** Porcentaje de las diferentes clases lipídicas en la carcasa y en la glándula digestiva de *O. vulgaris* alimentados con dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20).

	A0 (N=4)	A10 (N=6)	A20 (N=6)	P
<b>Glándula Digestiva</b>				
Lípidos Polares (Totales)	12,30 ± 0,77 <sup>a</sup>	13,30 ± 2,93 <sup>a</sup>	8,14 ± 2,39 <sup>b</sup>	*
LPC	0,98 ± 0,14	0,87 ± 0,34	n.d.	n.s.
PC	4,44 ± 0,27	5,20 ± 1,43	4,23 ± 1,74	n.s.
LPE	0,82 ± 0,68	0,79 ± 0,40	0,81 ± 0,48	n.s.
PS/PI	3,34 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,90 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,77 <sup>b</sup>	*
PE	3,57 ± 0,29	2,88 ± 0,99	2,73 ± 0,83	n.s.
Lípidos Neutros (Totales)	87,70 ± 0,77 <sup>a</sup>	87,79 ± 2,97 <sup>a</sup>	91,86 ± 2,39 <sup>b</sup>	*
MG	3,32 ± 0,42	3,81 ± 0,70	4,23 ± 1,16	n.s.
DG	4,51 ± 0,33	5,37 ± 1,01	4,43 ± 0,70	n.s.
CHO	5,28 ± 0,55 <sup>a</sup>	3,95 ± 1,15 <sup>b</sup>	4,26 ± 0,45 <sup>ab</sup>	*
FFA	15,50 ± 1,19	11,99 ± 2,40	15,16 ± 4,16	n.s.
TG	46,10 ± 3,04 <sup>a</sup>	52,23 ± 6,55 <sup>ab</sup>	58,87 ± 6,44 <sup>b</sup>	*
SE/WE	12,47 ± 1,24	12,47 ± 1,38	10,67 ± 2,12	n.s.
<b>Carcasa</b>				
Lípidos Polares (Totales)	67,10 ± 1,64 <sup>a</sup>	63,50 ± 1,16 <sup>b</sup>	61,64 ± 2,20 <sup>b</sup>	*
LPC	1,25 ± 0,47 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,23 <sup>ab</sup>	0,75 ± 0,17 <sup>b</sup>	*
SM	2,11 ± 0,45	2,27 ± 0,20	2,52 ± 0,14	n.s.
PC	24,41 ± 1,03 <sup>a</sup>	22,40 ± 1,92 <sup>ab</sup>	21,32 ± 1,32 <sup>b</sup>	*
LPE	1,45 ± 0,53	1,39 ± 0,51	1,43 ± 0,16	n.s.
PS	8,30 ± 0,23	7,98 ± 0,72	8,46 ± 0,76	n.s.
PI	12,46 ± 0,71	12,50 ± 0,54	12,24 ± 0,81	n.s.
PE	17,13 ± 0,82	16,58 ± 0,80	16,25 ± 0,66	n.s.
Lípidos Neutros (Totales)	32,90 ± 1,64 <sup>a</sup>	36,50 ± 1,16 <sup>b</sup>	38,36 ± 2,19 <sup>b</sup>	*
MG	2,99 ± 0,42	3,37 ± 0,37	2,99 ± 0,25	n.s.
CHO	15,88 ± 0,46 <sup>a</sup>	15,79 ± 0,57 <sup>a</sup>	17,33 ± 0,22 <sup>b</sup>	*
FFA	5,22 ± 0,49 <sup>a</sup>	6,03 ± 0,87 <sup>a</sup>	7,50 ± 1,30 <sup>b</sup>	*
TG	1,10 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,92 ± 0,91 <sup>b</sup>	*
SE/WE	6,28 ± 0,87 <sup>a</sup>	9,60 ± 1,65 <sup>b</sup>	7,79 ± 0,66 <sup>ab</sup>	*

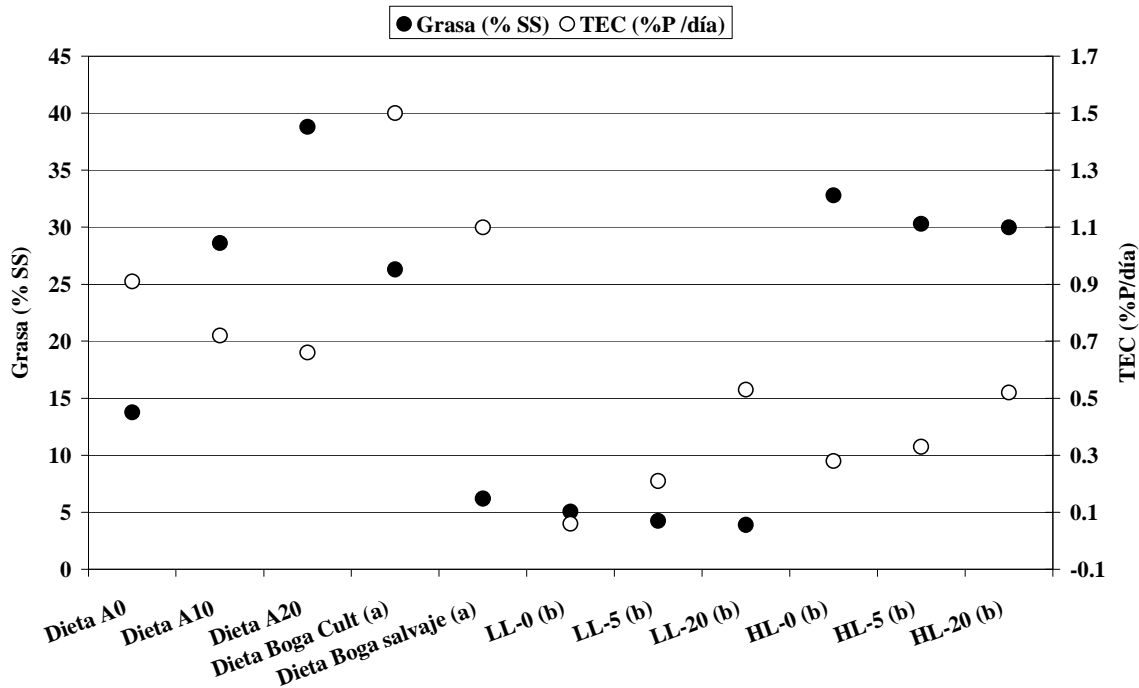
LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: Esfingomiélica; PC: Fosfatidilcolina; LPE: Lisofosfatidiletanolamina; PS: Fosfatidilserina; PI: Fosfatidilinositol; PS/PI: Fosfatidilserina y Fosfatidilinositol; PE: Fosfatidiletanolamina; MG: Monoglicéridos; DG: Diglicéridos; CHO: Colesterol; FFA: Ácidos grasos libres; TG: Triglicéridos; SE/WE: Esteroles de colesterol y Ceras. N.d. = no detectado; n.s. = no significativo; \* $p < 0,05$ .

#### 4. Discusión

Se utilizaron tres dietas formuladas exclusivamente a base de ingredientes secos o liofilizados para la alimentación de *O. vulgaris*. Las dietas se formularon a partir de la misma base (Morillo-Velarde et al., 2012a) y se diferenciaron en el porcentaje de aceite, por lo que las diferencias obtenidas en las tres dietas pueden atribuirse a este último. Se utilizó aceite de hígado de bacalao por ser una fuente rica en ácidos grasos esenciales de la serie omega 3 (EPA y DHA), componentes fundamentales de los peces y moluscos (Turchini et al., 2009).

Las tres dietas mostraron una buena aceptabilidad, a pesar de que su composición en macronutrientes fue diferente, correspondiéndose la mayor tasa absoluta de ingesta y crecimiento con la dieta A0. Los valores de ingesta en peso seco obtenidos para la dieta A0 también fueron superiores respecto de otras dietas experimentales (Cerezo Valverde et al., 2008; Estefanell et al. 2011a, Morillo-Velarde et al., 2012b) y a las estimadas en condiciones similares para dietas naturales a base de pescado (Aguado Giménez y García García, 2002; García García y Aguado Giménez, 2002), sugiriendo la utilidad del formato empleado para este tipo de experimentos. No obstante, fue destacable la importante disminución de la ingesta y crecimiento durante el segundo mes del experimento, hecho que se acentúa en las dos dietas con mayor contenido lipídico. Estos resultados pueden sugerir un mal balance nutritivo o bien un efecto progresivo de rechazo/aversión hacia el pienso. Este fenómeno ya se ha observado en otros trabajos que emplean dietas artificiales, donde los animales tienden a disminuir su tasa de ingesta después de varias semanas cuando son alimentados con un solo tipo de pienso (Domingues et al., 2007; Quintana et al., 2008) y sugiriendo la necesidad de alternar distintas dietas para obtener mejores resultados durante el engorde.

En referencia al efecto del distinto contenido de grasa sobre el crecimiento, se observaron peores resultados en individuos alimentados con las dietas formuladas con mayor contenido de grasa (28,6 y 38,6 % lípidos SS y TAAL de 2,1 y 3,3 g/día para las dietas A10 y A20, respectivamente; ver Fig. 2) en comparación con la dieta A0 (13,8 % lípidos SS; TAAL 1,0 g/día). Cerezo Valverde et al (2012a) obtuvieron mejor crecimiento en dietas formuladas con un 30-33 % de lípidos SS con TAAL similares (1,2-1,4 g/ día) respecto de otras con un 4-5 % lípidos SS (TAAL 0,2 g/día). Estefanell et al (2011a) obtuvieron excelentes resultados usando *B. boops* de descarte de jaulas marinas aglutinada con alginatos (26,3 % lípidos SS; TAAL de 1,5 g/ día) en comparación con una dieta que empleaba *B. boops* de pesquerías artesanales (6,2 % SS lípidos SS; TAAL de 0,2 g/ día; Fig. 2) y sugiriendo una elevada eficacia en la utilización de los lípidos de la dieta. Por lo tanto, estos estudios coinciden en que aunque los porcentajes de grasa de la dieta puedan variar, las TAAL finales donde se obtienen los mejores resultados están comprendidos entre 1 y 1,5 g/día para dietas formuladas, correspondiéndose con porcentajes del 13-27 % lípidos SS. Igualmente, estos resultados sugieren la necesidad de tener en cuenta el grado de aceptabilidad de la dieta para fijar los porcentajes de grasa.

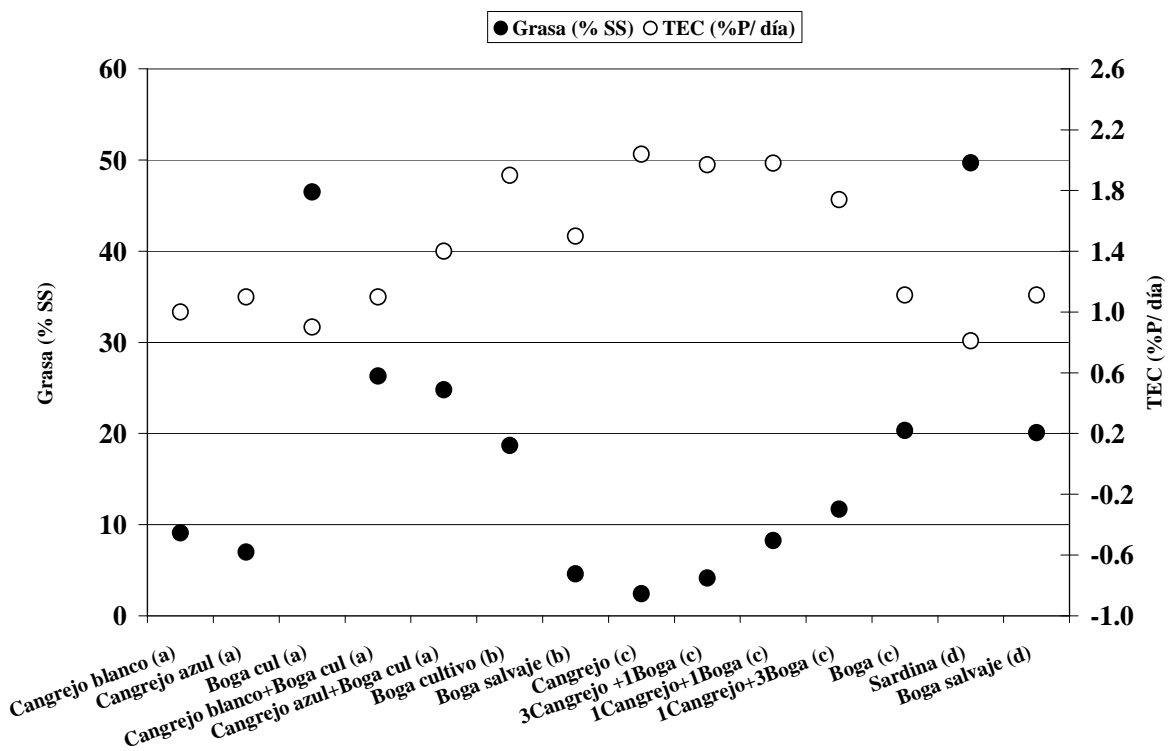


**Figura 2.** Contenido de grasa (% SS) y tasa específica de crecimiento (TEC, % P/día) en las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales: (a) Estefanell et al, 2011a, (b) Cerezo Valverde et al., 2012a.

El efecto en dietas naturales fue variable. Los mejores crecimientos fueron obtenidos con dietas bajas o moderadas en grasa (2,4-18,7 % SS; ver Fig. 3), pero que sin embargo mostraron tasas de ingesta elevadas y por lo tanto TAAL moderadas (0,2-1,8 g/ día). Los mejores resultados de crecimiento fueron obtenidos por García García y Cerezo Valverde et al., 2006 con dietas naturales de cangrejo (2,4 % lípidos S; TAAL 0,5 g/ día) y con dietas mixtas de pescado y cangrejo (4,1-11,7 % lípidos SS; TAAL 0,7-1,3 g/ día), coincidiendo con los parámetros descritos para dietas formuladas. Estefanell et al. (2011a) obtuvo también buenos resultados con boga salvaje (4,6 % lípidos SS; TAAL 0,2 g/día) y boga de descarte (18,7 % lípidos SS; 1,8 g/día), pero con peores valores al aumentar el contenido lipídico de la boga (46,5 % lípidos SS; TAAL 5,4 g/d; Estefanell et al., 2011b). Estas diferencias podrían ser debidas a las distinta composición lipídicas y al contenido en proteína que poseen las dietas naturales según su procedencia (Estefanell et al., 2010b).

En nuestros resultados destacó el elevado aprovechamiento nutritivo de la dieta A0 (IEA del 60,3 %) respecto de otras dietas naturales y experimentales (<55 % en dietas naturales; i.e. García García y Cerezo Valverde et al., 2006; Biandolino et al., 2010; Prato et al., 2010; Estefanell et al., 2011b; <28 % en dietas experimentales; i.e. Cerezo Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; Cerezo Valverde et al., 2012a). Los valores de PPV y de LPV para la dieta A0 fueron moderados (27,39 y 14,09%, respectivamente) con valores de PPV similares a los obtenidos con cangrejo (28%) pero inferiores a los de dietas mixtas de boga y

cangrejo (33%) y boga (36%) (García García y Cerezo Valverde, 2006). Estos resultados pueden ser debido a que la principal fuente proteica de nuestros piensos formulados fue la gelatina, cuya proteína es deficiente en la mayoría de aminoácidos esenciales y no esenciales (Karim y Bhat et al., 2009) en comparación con el contenido de aminoácidos de *O. vulgaris* (Cerezo Valverde et al., 2012c). Por lo tanto, se podría continuar investigando en la línea de formulación de estos piensos suplementados con aminoácidos puros o materia primas concretas para mejorar el rendimiento de la proteína (Cerezo Valverde et al., 2012c).



**Figura 3.** Contenido de grasa (% SS) y tasa específica de crecimiento (TEC, %P/día) en distintas dietas naturales: (a) Estefanell et al., 2011b, (b) Estefanell et al., 2011a, (c) García García y Cerezo Valverde, 2006, (d) García García y Aguado Giménez, 2002.

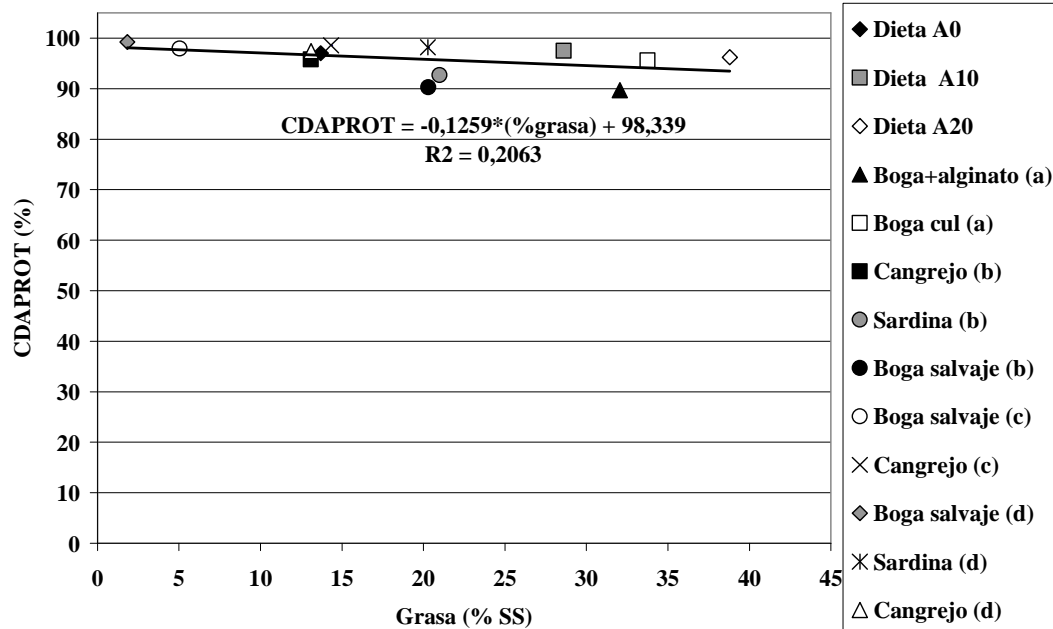
La digestibilidad de la proteína de las dietas se mantuvo por encima del 95 % en todos los casos, coincidiendo con los valores obtenidos para dietas naturales (Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007; Sánchez et al., 2009) y experimentales (Seiça Neves et al., 2010; Morillo-Velarde et al., 2012b), e indicando la elevada capacidad enzimática de *O. vulgaris* para la digestión de estos nutrientes (Boucher-Rodoni, 1982; Aguila et al., 2007; Hamdan et al., 2007). Estos resultados apuntan a que los CDAPROT no se vieron afectados de forma significativa por el porcentaje lipídico que contenía la dieta (Fig. 4). Por el contrario, los CD de los lípidos fueron variables. Sólo la dieta A0 con un contenido de 13,7 % lípidos SS obtuvo altos CDALIP (81,25 %), disminuyendo

drásticamente hasta el 12,3 % cuando la dieta contiene un 38,8 % lípidos (Fig. 5) y provocando también la disminución de la CDAMS (Fig. 6). Estos resultados apuntan a que los pulpos tienen una capacidad limitada para la digestión y catabolización de lípidos coincidiendo con otros estudios previos en cefalópodos (Ballantyne et al., 1981; Mommsen y Hochachka, 1981; O'Dor et al., 1984; Lee, 1994).

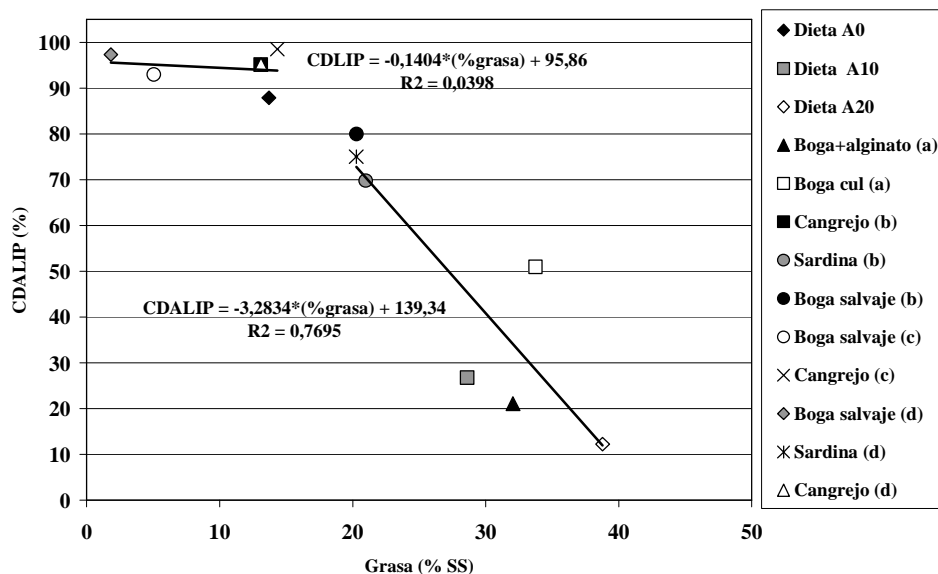
Además, fue destacable que conforme aumentó el contenido de grasa en la dieta disminuyó el coeficiente de digestibilidad de los lípidos neutros, llegando incluso a ser nula en MG y FFA en las dietas A10 y A20 (Fig. 1). Esta nula digestibilidad requiere una consideración más profunda y sugiere que la mayor parte de los triglicéridos de la dieta se habrían desdoblado en ácidos grasos libres y monoglicéridos, resultando su contenido en las heces superior al ingerido en las dietas. Por el contrario, los coeficientes de digestibilidad de los lípidos polares fueron elevados, pudiéndose atribuir a la presencia de los fosfolípidos en la dieta. Éstos podrían mejorar la emulsión lipídica e incrementar la eficacia del transporte de los ácidos grasos y lípidos del intestino al resto del organismo aumentando la síntesis de lipoproteínas de *O. vulgaris* como se ha sugerido en estudios con peces (Craig y Gatlin, 1997; Kasper y Brown, 2003; Tocher et al., 2008), por lo que la capacidad digestiva para estos nutrientes no se vio limitada. El papel predominante de los fosfolípidos en los tejidos de los cefalópodos (Sinanoglou y Miniadis-Meimaroglou, 1998; Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Cerezo Valverde et al., 2012b) y su movilización especialmente durante las fases de crecimiento (Morillo-Velarde et al., 2012a) sugiere que futuros estudios de engorde para *O. vulgaris* podría usar dietas formuladas suplementadas con estas clases lipídicas. Según nuestros resultados y comparándolos con los de otros autores (Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007; Sánchez et al., 2009; Seiça Neves et al., 2010) los mejores CDALIP se obtienen con una dieta entre el 2-14 % de grasa SS, ya que si aumentamos este porcentaje el CDALIP disminuye drásticamente. Estos resultados coinciden con los derivados del crecimiento observado en nuestro estudio, de donde se deduce que las dietas experimentales deberían contener menos del 14 % lípidos SS para que el CDAMS no fuese menor del 90% provocando la pérdida de gran cantidad de nutrientes por las heces (Figs. 5 y 6).

A diferencia de la ocurrido en otros trabajos donde la composición en la carcasa y en el animal completo de los pulpos fue más constante que en la glándula digestiva (Almansa et al., 2006; García Garrido et al 2011; Morillo-Velarde et al., 2012b), en este trabajo el porcentaje de las diferentes clases lipídicas en la carcasa sí se vio modificado con la dieta. En este estudio, aumentaron los LN de la carcasa, principalmente debido a la acumulación de colesterol, ácidos grasos libres y triglicéridos, y disminuyeron los LP como consecuencia de un aumento en la ingestión de lípidos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Morillo-Velarde et al (2012a) donde se sugiere un transporte simultáneo de TG y CHO de la glándula digestiva hacia las células musculares durante el ayuno. Estos resultados sugieren también que dietas con altos contenidos en lípidos pueden producir un trastorno metabólico y provocar modificaciones en la composición de los tejidos o una alteración en la forma de almacenamiento o transporte de los lípidos El mayor contenido de grasa de las dietas A10 y A20 también quedó

reflejado en el alto porcentaje de grasa en la glándula digestiva de los pulpos, resaltando el uso de este órgano como almacén de lípidos y energía (Sieiro et al., 2006; Cerezo Valverde et al 2012a; Morillo-Velarde et al., 2012a).

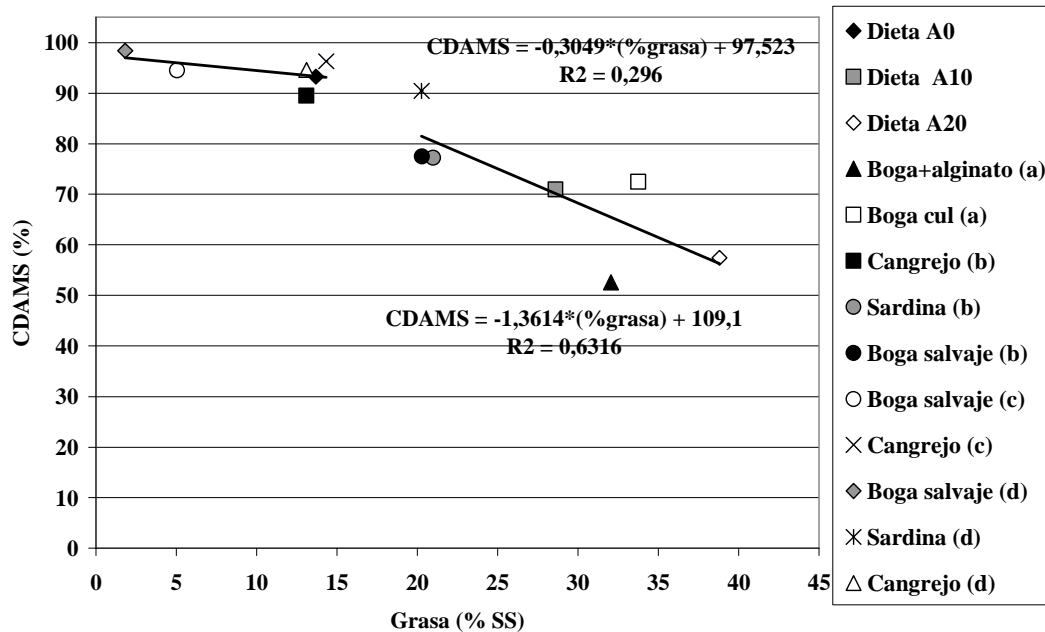


**Figura 4.** Coeficientes de digestibilidad de las proteínas (CDAPROT %) en función del porcentaje de grasa de la dieta (% SS) para las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales: (a) Seíça Neves et al., 2010, (b) Sánchez et al., 2009 (c) Mazón et al., 2007, (d) Hernández y García García, 2004.



**Figura 5.** Coeficientes de digestibilidad de los lípidos (CDALIP %) en función del porcentaje de grasa de la dieta (%SS) para las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales: (a) Seíça Neves et al., 2010, (b) Sánchez et al., 2009 (c) Mazón et al., 2007, (d) Hernández y García García, 2004.





**Figura 6.** Coeficientes de digestibilidad de la materia seca (CDAMS %) en función del porcentaje de grasa de la dieta (% SS) para las distintas dietas formuladas sin aceite (A0), con un 10% (A10) y con un 20% (A20) y otras dietas experimentales (a) Seíça Neves et al., 2010, (b) Sánchez et al., 2009 (c) Mazón et al., 2007, (d) Hernández y García García, 2004.

Los resultados del presente estudio dan un gran paso en la elaboración de dietas formulada con fines comerciales para *O. vulgaris*. Por un lado, el formato empleado en este estudio ha tenido una alta aceptabilidad, correspondiéndose con altas tasa de ingesta y crecimiento. Por otro lado se proponen tasas de ingesta de lípidos óptimas alrededor de 1 g/día y porcentajes apropiados de grasa alrededor del 13 - 14 % SS en dietas formuladas. Un menor porcentaje de grasa en la dieta podría disminuir el rendimiento de la dieta y aumentar la utilización de proteína mientras que, un mayor porcentaje haría disminuir la digestibilidad de la dieta y podría ocasionar trastornos metabólicos asociados con un excesivo consumo de lípidos. Del presente estudio también se deriva el interés de llevara a cabo estudios futuros con dietas formuladas suplementadas con fosfolípidos, justificados por su elevada digestibilidad y su papel predominante en la composición de los tejidos de los cefalópodos. En este sentido, los porcentajes de grasa en la dieta de esta especie podrían variar en función de las clases lipídicas presentes en su composición.

## 5. Bibliografía

- Aguado Giménez, F., García García, B., 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquacult. Int.* 10, 361-377.
- Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domínguez, P.M., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., Rosas, C., 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273, 641-655.
- Almansa, E., Domingues, P.M., Sykes, A., Tejera, N., Lorenzo, A., Andrade, J.P., 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture* 256, 403-413.
- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis, 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington.
- Atkinson, J.L., Hilton, J.W., Slinger, S. J., 1984. Evaluation of acid insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 1384-1386.
- Ballantyne, J.S., Hochachka, P.W., Mommsen, T.P., 1981. Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Mar. Biol. Letts.* 2, 75-85.
- Biandolino, F., Portacci, G., Prato, E., 2010. Influence of natural diets on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris*, Cuvier 1797. *Aquacult. Int.* 18, 1163-1175.
- Boucher-Rodoni, R., 1982. La glande digestive des céphalopodes, organe de synthèse et de sécrétion d'enzymes digestives. *Cah. Biol. Mar.* 23, 299-318.
- Caruso, G., Giordano, D., Mancuso, M., Genovese, L., 2004. Studio preliminare degli enzimi digestivi di *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 ed *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca:Cephalopoda). *Biol. Mar. Medit.* 11, 367-369.
- Cerezo Valverde, J., García García, B., 2005. Suitable dissolved oxygen levels for common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) at different weights and temperatures: analysis of respiratory behaviour. *Aquaculture* 244, 303-314.
- Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., García García, B., 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture* 275, 266-273.
- Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Guiménez, F., Morillo-Velarde, P.S., García García, B., 2012a. Performance of formulated diets with different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*. *Aquaculture Research*. doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03201.x.
- Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., García-Garrido, S., Rodríguez, C., Estefanell, J., Gairín, J.I., Rodríguez, C.J., Tomás, A., García García, B., 2012b. Lipid classes from marine species and meals intended for cephalopod feeding. *Aquac. Int.* 20, 71-89.
- Cerezo Valverde, J., Martínez-Llorens, S., Tomás Vidal, A., Jover, M., Rodríguez, C., Estefanell, J., Gairín, J.I., Domingues, P.M., Rodríguez, C.J., García García, B., 2012c. Amino acids composition and protein quality evaluation

- of marine species and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquacult Int.* Doi: 10.1007/s10499-012-9569-6
- Craig, S.R., Gatlin, D. M., 1997. Growth and body composition of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) fed diets containing lecithin and supplemental choline. *Aquaculture* 151, 259-267.
- Christie, W.W., 1982. *Lipid Analysis*, 2nd ed. Pergamon, Oxford. 209 pp.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF>.
- Domingues, P.M., López, N., Muñoz, J.A., Maldonado, T., Gaxiola, G., Rosas, C., 2007. Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquacult. Nutr.* 13A, 273-280.
- Estefanell, J., Socorro, J., Guirao, R., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Roo, J., 2010b. First data on *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) on-growing in benthic cages. *Aquaculture Europe. Book of abstracts*. Porto, Portugal, pp. 427-428.
- Estefanell, J., Roo, J., Guirao, R., Alfonso, J.M., Fernández-Palacios, H., Izquierdo M., Socorro, J., 2011a. Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed fresh and agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and low price trash species. *Aquaculture Research*, doi:10.1111/j.1365-2109.2011.03014.x.
- Estefanell, J., Socorro, J., Tuya, F., Izquierdo, M., Roo, J. 2011b. Growth, protein retention and biochemical composition in *Octopus vulgaris* fed on different diets based on crustaceans and aquaculture by-products. *Aquaculture* 322-323, 91-98.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-507
- García García, B., Aguado Giménez, F., 2002. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211, 171-182.
- García García, B., Cerezo Valverde, J., 2004. Influencia del número de días de ayuno a la semana sobre el crecimiento, el índice de conversión y la supervivencia en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797). *Revista AquaTIC*, nº 21, Julio – Diciembre. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=177>].
- García García, B., Cerezo Valverde, J., 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on-growing. *Aquaculture* 253, 502-511.
- García, S., Domingues, P., Navarro, J.C., Hachero, I., Garrido, D., Rosas, C., 2010. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquacult. Nutr.* 17 (2), 174-187.
- García-Garrido, S., Hachero-Cruzado, I., Garrido, D., Rosas, C., Domingues, P., 2010. Lipid composition of the mantle and digestive gland of *Octopus*

- vulgaris* juveniles (Cuvier, 1797) exposed to prolonged starvation. *Aquaculture Int.* 18, 1223-1241.
- García-Garrido, S., Hachero-Cruzado, I., Rosas, C., Domingues, P., 2012. Protein and amino acid composition from the mantle of juvenile *Octopus vulgaris* exposed to prolonged starvation. *Aquaculture Research*, doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03180.x
- Hamdan, M., Cerezo Valverde, J., Moyano, F.J., García García, B., Jover, M., 2007. Estudio de la bioquímica digestiva del pulpo (*Octopus vulgaris*) como herramienta para la modelización in vitro de su digestión. In: Cerviño, A., Guerra, A., Pérez, C. (Eds.). *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura (Tomo I)*. Vigo, España, pp. 663-666.
- Hernández, M.D., García García, B., 2004. Digestibility of natural foods in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Biotechnologies for Quality. Aquaculture Europe*. Barcelona, Spain, pp. 414-415.
- Karim, A.A., Rajeev, B., 2009. Fish gelatine: properties, challenges, and prospect as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloid*. 23, 563-576.
- Kasper, C.S., Brown, P.B., 2003. Growth improved in juvenile Nile tilapia fed phosphatidylcholine. *N. Am. J. Aquac.* 65, 39-43.
- Lee, P.G., 1994. Metabolic substrates in cephalopods. In: Pörtner, H.O., O'Dor, R.K., MacMillan, D.L. (Eds.), *Physiology of Cephalopod Mollusc. Lifestyle and Performance Adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, Switzerland, pp. 35-51.
- Maynard, L.A., Loosli, L.K., 1969. *Animal Nutrition*, 7<sup>th</sup> Ed. MacGrawHill Book Company, New York, pp. 613.
- Mazón, M.J., Piedecausa, M.A., Hernández, M.D., García García, B., 2007. Evaluation of environmental nitrogen and phosphorus contributions as a result of intensive ongrowing of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 266, 226-235.
- Miglavs, I., Jobling, M., 1989. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 35, 1-11.
- Mommsen, T.P., Hochachka, P.W., 1981. Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 120, 345-350.
- Moltschaniwskyj, N.A., Johnston, D., 2006. Evidence that lipid can be digested by the dumpling squid *Euprymna tasmanica*, but is not stored in the digestive gland. *Mar. Biol.* 149, 565-572.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García B., 2011. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Molluscan Stud.* 77, 318-320.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Serra Llinares, R.M., García García, B., 2012a. Changes in lipid composition of different tissues of common octopus (*Octopus vulgaris*) during short-term starvation. *Aquaculture Research*, 1-13 doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03131.x.
- Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde, J., Hernández M.D., Aguado-Giménez, F., García García B., 2012b. Growth and digestibility of formulated diets based on dry and freeze-dried ingredients in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 368-369: 139-144.

- Navarro, J.C., Villanueva, R., 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183, 161-177.
- Navarro, J.C., Villanueva, R., 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture* 219, 613-631.
- O'Dor, R.K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M.J., Wells, J., 1984. Nutrient Absorption, Storage and Remobilization in *Octopus vulgaris*. *Mar. Behav. Physiol.* 11, 239-258.
- Olsen, R.E., Henderson, R.J., 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double- development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129, 189-197.
- Prato, E., Portacci, G., Biandolino, F., 2010. Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture* 309, 203-211.
- Quintana, D., Domingues, P.M., García, S., 2008. Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture* 280, 161-164.
- Rodríguez-Dominguez, H., Soto-Búa, M., Iglesias Blanco, R., Crespo-González, C., Arias-Fernández, C., García Estevez, J., 2006. Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro. *Aquaculture* 254, 563–570.
- Sánchez, M., Hernández, M.D., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2009. Protein and lipid digestibility in common octopus (*Octopus vulgaris*). In: *Cephalopod International Advisory Council Symposium (CIAC'09)*. Vigo, Spain, pp. 86.
- Seiça Neves, M.M., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2010. Digestibility of a formulated diet with alginate as binder in octopus. In: *EAS Aquaculture Europe 2010. Book of abstracts*. Porto, Portugal, pp. 500-501.
- Semmens, 1998. An examination of the role of the digestive gland of two loliginid squids, with respect to lipid: storage or excretion?. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265, 1685-1690.
- Sieiro, M.P., Aubourg, S.P., Rocha, F., 2006. Seasonal study of the lipid composition in different tissues of the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 479-487.
- Sinanoglou, V.J., Miniadis-Meimaroglou, S., 1998. Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Res. Int.* 31, 467-473.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E. A., Campbell, P.J., Bell., J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280, 21-34.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquaculture* 1, 10-57.

## **Tarea 2.1.6. Requerimientos de carbohidratos**

### **Contribución energética de los carbohidratos durante el ayuno en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).**

#### **Introducción**

El conocimiento de los requerimientos nutricionales en cefalópodos se encuentra aún en su fase incipiente y ha estado limitado por la escasa disponibilidad de dietas formuladas de apropiada aceptabilidad y/o composición nutritiva (Domingues et al., 2007; Cerezo Valverde et al., 2008). La mayoría de las hipótesis sobre estos requerimientos se han generado al suministrar dietas naturales, a partir de sus análisis bioquímicos y de los propios cefalópodos (García García y Cerezo Valverde, 2006), mediante la utilización de sustratos energéticos marcados (O'Dor et al., 1984) o en experimentos de ayuno (Castro et al., 1992). De ellos se deduce que los cefalópodos son especies exclusivamente carnívoras, y a diferencia de lo ocurrido con los proteínas, raramente utilizan carbohidratos (CH) o lípidos como fuente de energía (Lee, 1994). No obstante, se ha demostrado que tienen la capacidad de digerir, almacenar y utilizar CH, proporcionando energía preferentemente para las actividades explosivas de carácter anaeróbico (Wells y Clarke, 1996). Según O'Dor et al. (1984) los CH después de una comida son rápidamente catabolizados y sólo una pequeña cantidad sería acumulada como glucógeno muscular, siendo prácticamente inmune a su movilización en situaciones de ayuno. Según Hochachka y Fields (1982) el glucógeno podría ser también recuperado rápidamente directamente de la glucosa en circulación o de aminoácidos glucogénicos. En contraste, se han encontrado cantidades variables y significativas de CH en todos los tejidos de numerosas especies de cefalópodos, incluyendo la gónada (1-9 % materia seca), la glándula digestiva (3-13 % materia seca) y músculo (1-8 % materia seca) (Rosa et al., 2005a). A pesar de ello, los estudios sobre la contribución de estos sustratos al metabolismo energético en cefalópodos son escasos en comparación con los dedicados a proteínas o lípidos. El objetivo de este estudio fue conocer la variación en el contenido de CH en el tejido muscular, glándula digestiva y gónada de *Octopus vulgaris*, así como su contribución al gasto energético total durante el ayuno.

#### **Material y Métodos**

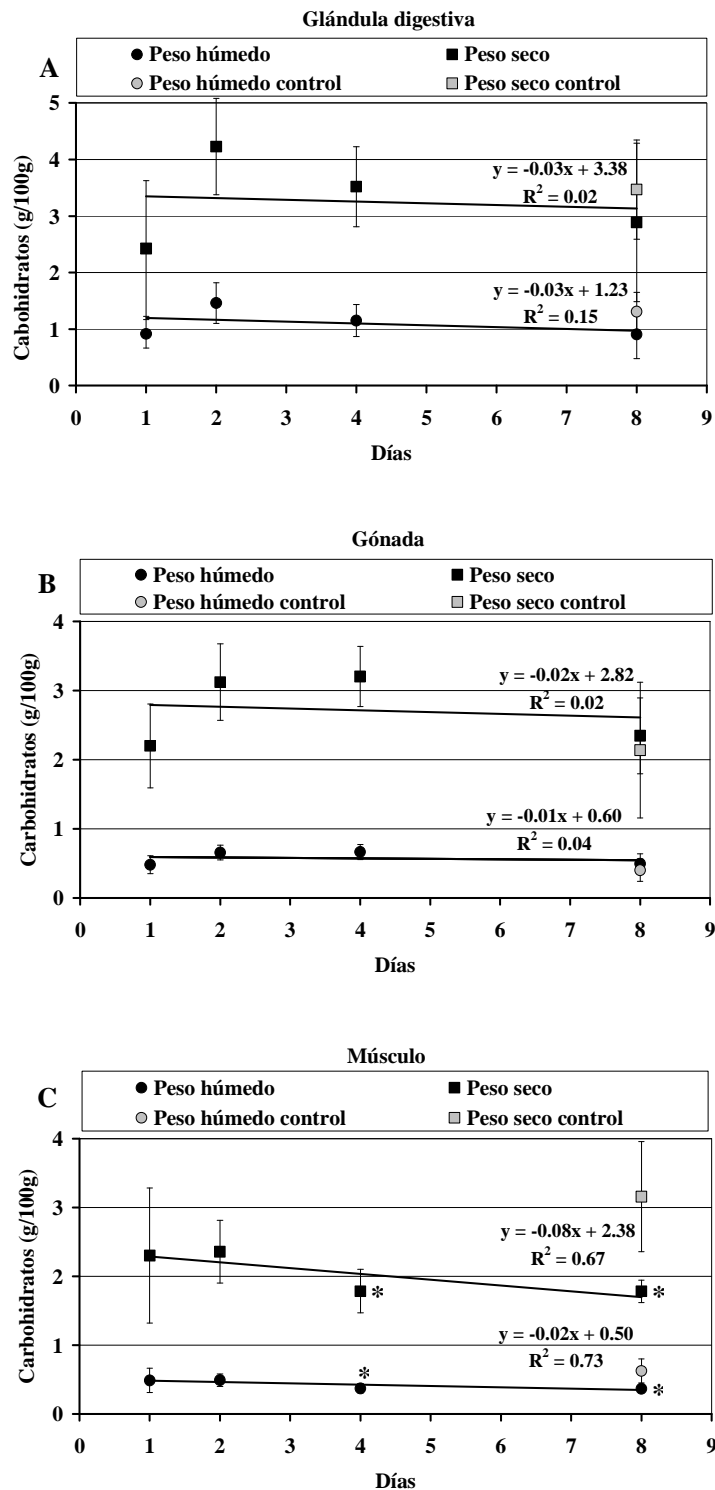
Ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) y se trasladaron individualmente a tanques circulares de 216 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante 2 semanas, y se alimentaron con boga (*Boops boops*) y cangrejo (*Carcinus mediterraneus*) en días alternativos. Se mantuvieron en un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura ( $18,19 \pm 1,13^{\circ}\text{C}$ ) y sistemas de filtración mecánica y biológica. Finalizado el periodo de aclimatación, los animales se pesaron y sexaron, formando 5 grupos experimentales de 4 individuos macho cada uno con un peso medio inicial similar ( $957-1099$  g;  $1022,75 \pm 163,96$  g). Cuatro de estos grupos se sacrificaron a los

días 1, 2, 4 y 8 después de suministrar la última comida. Se dispuso además de un grupo control que fue alimentado durante los 8 días de la experiencia. Todos los animales se anestesiaron por inmersión en etanol al 2,5 % en agua de mar helada antes del sacrificio (Rodríguez et al., 2006), se diseccionaron y se pesaron el tejido muscular (animal completo sin vísceras), la glándula digestiva y la gónada (incluyendo el testículo y la bolsa de Needham). La humedad de cada tejido se determinó en estufa a 105 °C durante 24 h hasta peso constante y los CH totales por el método de Michel Dubois et al. (1956) y por triplicado, expresándose en g/100g de tejido tanto en peso húmedo (ww) como en peso seco (dw). Se llevó a cabo un análisis de regresión simple para determinar la variación de la concentración de CH en función de los días de ayuno. Un test t-Student se empleó para comparar la concentración de CH entre los grupos que ayunaron y el control (alimentados), estableciendo un nivel de significación de  $P < 0,05$ .

## Resultados

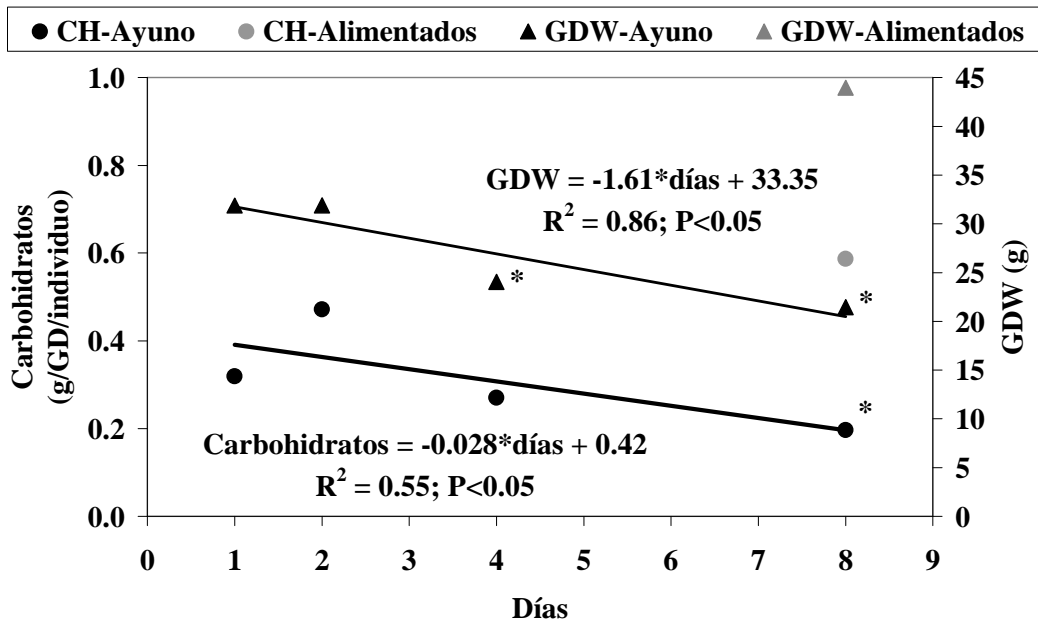
Los animales mostraron una pérdida significativa en el peso total y en el de la glándula digestiva a partir del 4º día de ayuno ( $P < 0,05$ ), aunque no se detectaron en el peso muscular ni en la gónada. Considerando todos los ejemplares analizados, la concentración de CH varió entre 2,42 y 4,23 g/100g dw en la glándula digestiva, 2,14-3,20 g/100g dw en la gónada y 1,78-3,16 g/100g dw en el músculo (Fig. 1). La concentración de CH permaneció constante durante los 8 días de ayuno en la glándula digestiva (Fig. 1A) y en la gónada (Fig. 1B), tanto en peso seco como en húmedo ( $P < 0,05$ ). Igualmente no existieron diferencias en estos tejidos entre los animales que ayunaron y los alimentados ( $P > 0,05$ ).

No obstante, a pesar de la concentración similar de CH en la glándula digestiva de los animales que ayunaron 8 días y los control alimentados, el mayor tamaño de este órgano en éstos últimos se tradujo en una mayor contenido de CH almacenado ( $0,59 \pm 0,20$  vs.  $0,20 \pm 0,09$  g/glándula digestiva/individuo a los 8 días de ayuno;  $P < 0,05$ ; Fig. 2)), detectándose un descenso de 0,028 g CH/glándula digestiva/individuo/día. Además, se observó una correlación positiva entre el contenido de agua y el de CH, lo que contribuyó a mantener constante la concentración de CH en la glándula digestiva (ver Fig. 3). En el músculo se detectó una tendencia negativa y significativa en la concentración de CH ( $-0,02$  g/100g ww y  $-0,11$  g/100 dw de CH por día de ayuno;  $P < 0,05$ ; Fig. 1C). Además, todos los animales mostraron en el músculo concentraciones de CH significativamente menores a partir del 4º u 8º día de ayuno ( $1,78$  g/100g dw) respecto de los ejemplares alimentados ( $3,16 \pm 0,90$  g/100g dw).

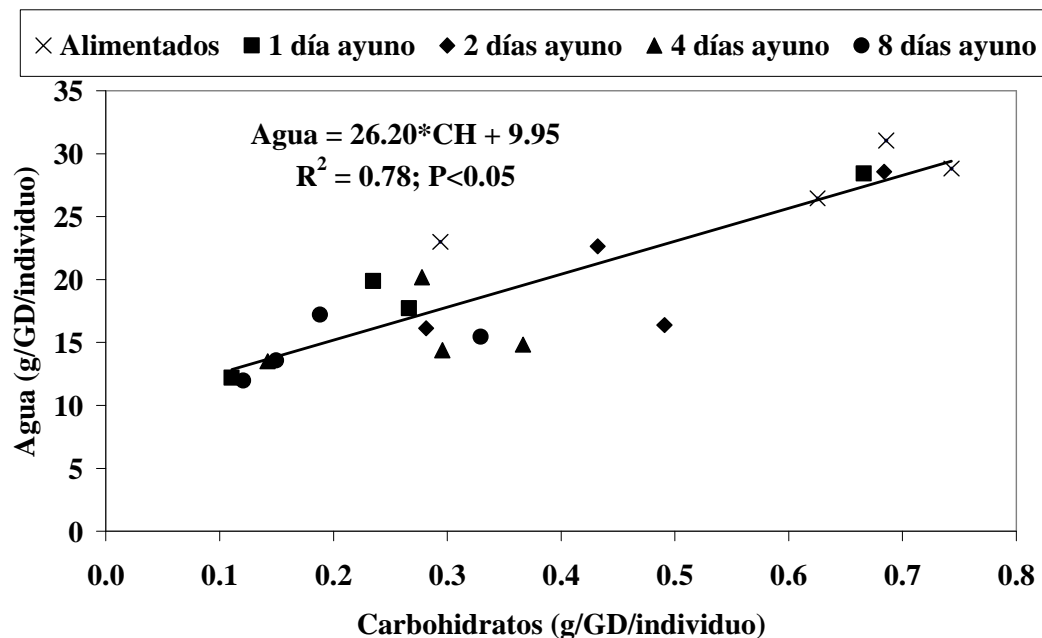


**Figura 1(A-C).** Variación en la concentración de carbohidratos en peso húmedo y peso seco (g/ 100g), en la glándula digestiva (A), gónada (B) y músculo (C) de *Octopus vulgaris* durante 8 días de ayuno. Los valores indican la media  $\pm$  desviación estándar (n=4); \*P<0,05 entre animales en ayuno y alimentados.





**Figura 2.** Contenido en carbohidratos en la glándula digestiva (g/GD/individuo) y peso de la glándula digestiva (GDW) en ejemplares de *O. vulgaris* alimentados y en ayuno. Cada punto representa la media de cuatro ejemplares. \*P<0.05 entre animales en ayuno y alimentados.



**Figura 3.** Contenido de agua (g/DG/individual) en función del contenido en carbohidratos en la glándula digestiva en ejemplares alimentados y en ayuno de *O. vulgaris*.

Discusión

En base a los resultados obtenidos se ha comprobado la capacidad de almacenamiento de CH a nivel muscular y de la glándula digestiva cuando los animales se alimentan con una dieta mixta de crustáceos y pescado. En este estudio, las reservas de CH de la gónada permanecieron intactas, a diferencia de lo ocurrido en el músculo y la glándula digestiva. Seguramente, el glucógeno de la gónada sea preservado para otros fines como la maduración o síntesis de tejidos reproductivos. Rosa et al. (2005b) detectó incrementos en los niveles de glucógeno en la gónada de ambos sexos conforme los cefalópodos maduraban. En nuestro estudio solo se emplearon machos en estado de madurez similar para evitar la influencia de procesos reproductivos.

Los cambios más evidentes se observaron en el tejido muscular, con un descenso en la concentración de CH a razón de 0,02 g/100g/día para un ejemplar de 1 Kg (85-90 % es tejido muscular), representando un consumo total de 0,18 g de CH. Considerando un coeficiente calórico de 16,7 kJ/g de CH esto representaría un aporte energético de 3 kJ/día. Una contribución menor se detectó para la glándula digestiva (0,028 g/glándula digestiva/día o 0,47 kJ/día). Son necesarios más estudios para discernir si estas reservas son empleadas para cubrir los requerimientos de la propia glándula o para abastecer al tejido muscular. Para un ejemplar de 1 Kg a 18 °C –condiciones experimentales similares a las del presente estudio-, Cerezo Valverde y García García (2004) estimaron un consumo de oxígeno de 2,6 g de O<sub>2</sub>/día en situación de rutina y un gasto metabólico de 35 kJ/día. Como conclusión se puede asumir una contribución de los CH del 9,9 % al gasto energético diario en situación de ayuno (8,6 % y 1,3 % procedente del músculo y de la glándula digestiva, respectivamente). Igualmente, Castro et al. (1992) observaron una baja contribución de los CH, inferior al 3 % del total de energía movilizada por la glándula digestiva en *Sepia officinalis* durante el ayuno.

El pulpo común sería por lo tanto capaz de consumir las reservas de CH en situaciones más explosivas, como la captura de presas o la huida de depredadores, pero también en períodos de inanición de más de 3 días. Una alimentación regular también permite aumentar el contenido de CH en la glándula digestiva y mantener su concentración en el músculo. Por lo tanto, aunque se haya demostrado un papel secundario de los CH en *O. vulgaris*, éstos contribuirían al metabolismo energético en situaciones concretas y no deberían menospreciarse en el contexto de sus requerimientos nutritivos ni en la formulación futura de dietas para cefalópodos. Las pequeñas cantidades de CH acumulados en el músculo pueden ser consecuencia de una capacidad limitada para la gluconeogénesis pero también por una baja disponibilidad de CH en su dieta. Estudios adicionales son necesarios para determinar el efecto de dietas formuladas con diferentes niveles de CH.

## Bibliografía

- CASTRO, B.G., GARRIDO, J.L. & SOTELO, C.G. 1992. Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation. *Marine Biology*, 114: 11-20.
- CEREZO VALVERDE, J. & GARCÍA GARCÍA, B. 2004. Influence of body weight and temperature on post-prandial oxygen consumption of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 233: 599-613.
- CEREZO VALVERDE, J., HERNÁNDEZ, M.D., AGUADO GIMÉNEZ, F. & GARCÍA GARCÍA, B. 2008. Growth, feed efficiency, and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, 275: 266-273.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS P.A. & SMITH F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- GARCÍA GARCÍA, B. & CEREZO VALVERDE, J. 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on growing. *Aquaculture*, 253: 502-511.
- HOCHACHKA, P. W. & FIELDS, J. H. A. 1982. Arginine, glutamate, and proline as substrates for oxidation and glycogenesis in cephalopod tissues. *Pacific Science*, 36: 325-336.
- LEE, P.G. 1994. Metabolic substrates in cephalopods. In: *Physiology of Cephalopod Mollusc* (H.O. Pörtner, R.K. O'Dor, D.L. MacMillan, eds.), pp. 35-51. *Lifestyle and Performance Adaptations*. Gordon and Breach Publishers, Basel, Switzerland.
- O'DOR, R.K., MANGOLD, K., BOUCHER-RODONI, R., WELLS, M.J. & WELLS, J. 1984. Nutrient Absorption, Storage and Remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine Behavior & Physiology*, 11: 239-258.
- RODRÍGUEZ- DOMÍNGUEZ, H., SOTO-BÚA, M., IGLESIAS BLANCO, R., CRESPO-GONZÁLEZ, C., ARIAS-FERNÁNDEZ, C., GARCÍA ESTÉVEZ, J. 2006. Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro. *Aquaculture*, 254: 563-570.
- ROSA, R., PEREIRA, J. & NUNES, M. L. 2005a. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to a giant squid, *Architeuthis* sp. *Marine Biology*, 146: 739-751.
- ROSA, R., COSTA P.R., BANDARRA, N. & NUNES, M.L. 2005b. Changes in Tissue Biochemical Composition and Energy Reserves Associated With Sexual Maturation in the Ommastrephid Squids *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae*. *Biological Bulletin*, 208: 100-113.
- WELLS, M.J. & CLARKE, A. 1996. Energetics: the cost of living and reproducing for an individual cephalopod. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 351: 1083-1104.

## **Línea 2.2: Optimización de los formatos de pienso para el pulpo de roca**

### **Tarea 2.2.1 Digestibilidad “in vivo” de los piensos elaborados con gelatinas**

#### **Crecimiento y digestibilidad de dietas formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados en el pulpo común (*Octopus vulgaris*).**

##### Resumen

En este trabajo se muestra el crecimiento y la digestibilidad de dos dietas semi-húmedas (50 % de agua) formuladas a base de ingredientes secos y liofilizados en *O. vulgaris* (Dieta P: 20% gelatina, 10% yema de huevo, 5% *Sardinella aurita* y 15% *Todarodes sagittatus*; Dieta G: Igual que la anterior pero sustituyendo *T. sagittatus* por guisante). Ambas dietas presentaron una textura firme al introducirlas en agua, una composición similar en macronutrientes (70-73% proteínas peso seco, 12-13% lípidos peso seco) y una buena aceptabilidad, con una supervivencia del 100%. Las tasas de alimentación relativas fueron similares para las dos dietas (0,96-1,04 %/día;  $P > 0,05$ ), sin embargo, los mejores resultados fueron obtenidos con la dieta P, mostrando una tasa absoluta de crecimiento e índice de conversión de 9,56 g/día y 1,04, respectivamente (2,16 g/día y 3,88 para la dieta G;  $p < 0,05$ ). Los valores productivos de proteína y lípidos fueron significativamente superiores para la dieta P (43,58 y 13,28% vs. 20,16 y 0,49% para la dieta G, respectivamente). Los buenos resultados obtenidos para la dieta P pueden justificarse por la elevada digestibilidad de ésta (93,25% para la materia seca, 97,03% para proteínas y 87,89% para lípidos) en comparación con la dieta G (73,83%, 92,05% y 85,00%, respectivamente) más que a la aceptabilidad de las dietas. Estos resultados demostraron que *O. vulgaris* puede alimentarse con ingredientes secos y liofilizados que han sufrido un tratamiento térmico suave con buenas tasas de crecimiento, aprovechamiento nutritivo y digestibilidad. Por esta razón, estudios futuros de engorde para pulpos podrían usar una base similar al formato propuesto en este trabajo para obtener dietas destinadas a fines comerciales.

##### Introducción

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) es un excelente candidato para el desarrollo de su producción a escala comercial (Vaz-Pires et al., 2004; García García et al., 2011). Sin embargo, hoy en día, el desarrollo industrial de cefalópodos está limitado al engorde de sub-adultos capturados de su medio natural (Chapela et al., 2006; Rodríguez et al., 2006; García García et al., 2009), debido a la elevada mortalidad durante la cría larvaria (Navarro y Villanueva, 2003; Iglesias et al., 2007) y al escaso desarrollo de los piensos formulados (Lee et al., 1991; Castro y Lee, 1994; Cerezo Valverde et al., 2008). Las dietas basadas exclusivamente en peces y crustáceos no son una propuesta comercialmente viable debido al precio de éstos en el mercado y a su variable disponibilidad (García García et al., 2004), de ahí la necesidad de buscar una alimentación alternativa. En todo caso, el desarrollo industrial de una especie necesita de una dieta formulada, tal y como

ocurre con dorada y lubina (Cho y Bureau, 2001; Davies et al., 2009). Los piensos secos que se utilizan para estas especies se conservan y almacenan mejor que los semi-húmedos o húmedos al tener un porcentaje menor de agua, normalmente poseen un menor coste por kg de animal producido, presentan mayor regularidad en el suministro y composición, son más fáciles de almacenar y distribuir, su manipulación es mínima en las instalaciones de acuicultura, reducen el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y poseen una mejor estabilidad en agua y mejor digestibilidad.

Hasta la fecha, los mejores resultados en cefalópodos se han obtenido con mezclas de pasta de pescado, crustáceos o moluscos, que suelen formar parte de las dietas naturales que los pulpos consumen habitualmente, aglomerados con gelatina o alginatos para evitar su disgregación (Quintana et al., 2008; Rosas et al. 2008). Peores resultados se han obtenido con piensos secos o formulados con ingredientes puros (Castro y Lee, 1994; Domingues et al., 2005, 2007). La gelatina en la elaboración de dietas artificiales ha proporcionado una adecuada palatabilidad en pulpos sub-adultos, generando además un crecimiento significativo y elevada digestibilidad (Rosas et al., 2008). No obstante, las tasas de disgregación de estos piensos son elevadas sobre todo cuando no se aplica calor a la mezcla. Por el contrario, la elaboración de piensos con alginatos origina mayor estabilidad en el agua, aunque este tipo de piensos presenta peor aceptabilidad y digestibilidad (Rosas et al., 2008), aunque presentan la ventaja de poder elaborarse en frío. Al respecto, Cerezo Valverde et al. (2008) y Domingues et al. (2009) comprobaron una influencia negativa del tratamiento térmico sobre el crecimiento en *O. vulgaris* y *Sepia officinalis*. Estos resultados se atribuyeron a la posible desnaturalización de proteínas y pérdida de aminoácidos, mostrando mejores resultados con los alimentos frescos, descongelados o liofilizados. La principal ventaja de los alimentos liofilizados radica en que el agua se les ha extraído sin tratamiento térmico, pasando directamente de la fase congelada o sólida al estado gaseoso, ayudando a conservar intactas sus propiedades nutritivas y estructura molecular. Paralelamente, en base a resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de investigación (Morillo-Velarde et al., 2011) hemos podido comprobar que los peores resultados en cuanto aceptabilidad y crecimiento en *O. vulgaris* fueron obtenidos con la incorporación de harinas, coincidiendo con los resultados previos obtenidos por Estefanell et al. (2009). No obstante, obtuvimos muy buenos resultados al incluir en las dietas productos liofilizados y yema de huevo, sugiriendo que estos ingredientes podrían usarse para mejorar la textura y palatabilidad de las dietas formuladas para cefalópodos. Además, la incorporación de estos ingredientes podría presentar un paso previo a la elaboración de piensos con fines comerciales con menor humedad y mejor conservación.

En este trabajo se han utilizado dos dietas artificiales semi-húmedas basadas exclusivamente en una mezcla de ingredientes secos y liofilizados, sin usar productos frescos y aplicándoles un tratamiento térmico suave para mejorar su estabilidad en agua. El objetivo de este estudio fue comparar las tasas de alimentación y crecimiento del pulpo común alimentado con estas dietas,

comprobando los cambios que se producen en la composición nutricional de los animales y la digestibilidad de la dieta.

## Material y Métodos

### *Captura y aclimatación de los animales.*

Los ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) mediante arte de arrastre y se mantuvieron en tanques de 2000 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante 2 semanas y se alimentaron con alacha (*Sardinella aurita*) y cangrejo (*Carcinus mediterraneus*) en días alternativos. Posteriormente los animales se trasladaron y mantuvieron individualmente en tanques circulares de 262 l en un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura (Air Energy, Heat Pump Inc., Model 400 Ti) y filtración mecánica y biológica. Éstos contenían tubos de PVC como refugio y una red externa para evitar que se escaparan. La temperatura se mantuvo constante ( $18,75 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$ ) dentro del rango óptimo para esta especie (Aguado Giménez y García García, 2002), oxígeno superior al 80 % de saturación para que este factor no fuera limitante (Cerezo Valverde y García García, 2005), lámpara UV, fotoperiodo 12L: 12D, salinidad 37‰, pH entre 7 y 8 y nitrógeno amoniacal total (TAN) inferior a 0,2 mg/l.

### *Elaboración y estabilidad de las dietas formuladas.*

Se prepararon dos dietas diferentes usando el liofilizado de guisante (dieta G) o de pota (*Todarodes sagittatus*; dieta P) como ingredientes a testar, representando cada uno de ellos el 15 % en peso de la dieta (ver Tabla 1). El resto de ingredientes se mantuvo constante en ambas dietas y estuvo constituido por 50 % de agua, un 20 % de gelatina como aglomerante, 10 % de yema de huevo en polvo y 5 % de liofilizado de alacha (*S. aurita*). La pota y la alacha procedían de pesquerías artesanales de la misma zona que los pulpos y el guisante se compró congelado. La pota y la alacha fueron limpiados de espinas y vísceras, y posteriormente triturados. Todos estos ingredientes se liofilizaron y se trituraron en un molinillo de café hasta obtener una textura de polvo fino ( $<200\mu\text{m}$ ), se envasaron al vacío y se conservaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La yema de huevo y la gelatina se adquirieron en su forma comercial (Tabla 1). Para la elaboración de los piensos todos los ingredientes se mezclaron a  $45^{\circ}\text{C}$ . Primero se disolvió la gelatina en agua y posteriormente se fueron añadiendo los ingredientes restantes hasta su completa homogenización. La mezcla obtenida se dejó enfriar a  $4^{\circ}\text{C}$  en bandejas de aluminio durante 24 h, congelándose posteriormente hasta su uso.

La estabilidad en agua de ambas dietas se determinó a partir de la pérdida de la materia seca del pienso después de la inmersión en agua durante 4 y 24 horas. Para ello, se pesaron 3 replicas de cada dieta antes y después de introducirlas en agua. Con estos datos se obtuvo la media de los valores de los siguientes índices calculados:

VP (%) =  $(P_f - P_i) / P_i * 100$ , expresa la variación del peso seco de las dietas después de ser sumergidas en agua, donde  $P_i$  y  $P_f$  son el peso seco inicial y final, respectivamente.

$F = P_i / P_f$ , representa un factor de corrección. El peso seco del alimento no ingerido de las dietas fue multiplicado por este valor de corrección para tener en cuenta la disgregación del pienso.

**Tabla 1.** Composición en peso (%) de las dietas experimentales formuladas con guisante (G) o pota (P) como ingredientes a testar.

Dietas	Agua	Gelatina <sup>a</sup>	Yema de huevo <sup>b</sup>	Alacha <sup>c</sup> ( <i>S. aurita</i> )	Pota <sup>c</sup> ( <i>T. sagittatus</i> )	Guisante <sup>c</sup>	Total (%)
G	50	20	10	5	-	15	100
P	50	20	10	5	15	-	100

<sup>a</sup>Gelatina granulada Bloom 220. Proporcionada por Productos Sur, S. A. (Polígono Industrial Oeste, San Ginés, Murcia, España).

<sup>b</sup>Yema de huevo atomizada, proporcionada por Avícola San Isidro S.L. (Los Belones, Cartagena, Murcia, España).

<sup>c</sup>Ingredientes liofilizados.

### *Diseño experimental.*

Finalizado el periodo de aclimatación, los animales se pesaron y sexaron formando 2 grupos experimentales de 8 individuos macho cada uno, con el fin de evitar la influencia de los procesos reproductivos. A un grupo se le suministró la dieta G (guisante, n=8) y a otro la dieta P (pota, n=8) durante 42 días (abril – mayo, 2011). Los pesos medios iniciales fueron de  $770 \pm 101$  g (634-902g) para la dieta G y  $742 \pm 103$  g (637-891g) para la dieta P. La temperatura del agua osciló entre 18,2 y 19,8°C durante el periodo experimental ( $18,75 \pm 0,37^\circ\text{C}$ ). Los piensos se pesaron y se administraron a saciedad, en un único trozo de forma cúbica, correspondiendo la primera toma al 5% del peso corporal de cada individuo, y posteriormente, reajustándose para que sobrepasase las demandas de cada ejemplar. Los pulpos eran alimentados a las 09:00 h, 6 días a la semana (García García y Cerezo Valverde, 2004, 2006), y el alimento sobrante se recogía a la 13:00 h con la ayuda de un pequeño salabre. El alimento sobrante fue secado con papel absorbente y pesado para calcular la ingesta diaria de cada individuo. El último día de experimentación todos los animales fueron pesados y anestesiados por inmersión en agua de mar helada antes del sacrificio (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006).

### *Recogida y conservación de las muestras.*

Una vez finalizado el experimento, se procedió a la disección de los 8 ejemplares de cada grupo. En cuatro de ellos se obtuvo la glándula digestiva y la carcasa (resto del individuo menos la glándula digestiva), y de los 4 restantes la glándula digestiva y el tejido muscular (tres patas y parte del manto) con sus correspondientes pesos. Este procedimiento fue necesario para obtener las analíticas de la composición de los animales completos, a partir de los resultados de la glándula digestiva y la carcasa. Cada una de estas partes se trituró y mezcló

hasta obtener una mezcla homogénea, se envasó al vacío y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de proceder a los análisis bioquímicos.

Las heces de cada grupo experimental fueron recogidas diariamente con la ayuda de un pequeño salabre y se conservaron en el ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se liofilizaron, obteniendo un total de 11,8 g y 5,4 g de heces de los animales alimentados con las dietas G y P, respectivamente. Todas las heces de cada grupo fueron recogidas conjuntamente para conseguir la cantidad necesaria para su análisis.

### *Método Analítico*

Se analizaron por triplicado tanto las dietas formuladas como las muestras de pulpo, obteniendo la humedad, cenizas, lípidos y proteínas. Se utilizó un g de muestra para la ceniza, humedad y proteína y 2 g de muestra en el caso de los lípidos. La humedad fue obtenida por desecación a  $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h hasta peso constante (AOAC 1997; Method nº. 930.15) y las cenizas por incineración a  $450 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h en un horno Mufla (HOBERSAL, HD-230). El contenido de lípidos fue obtenido mediante eter etílico en un extractor SOXTEC AVANTI 2058 (AOAC, 1997; Método nº 920.39). El contenido proteico fue determinado por el método Kjeldhal usando un factor de conversión de 6,25 y el material extraíble libre de nitrógeno (MELN) por diferencia. La energía y la relación proteína energía (P/E en MJ) fueron estimados usando los coeficientes de energía de Miglavs y Jobling (1989): Proteína 23,6 KJ/g, lípidos 38,9 KJ/g y carbohidratos 16,7 KJ/g. Los macronutrientes en el animal completo se calcularon sumando el contenido del nutriente (N) en la glándula digestiva con el contenido en la carcasa:

$$N \text{ total} = [((\text{PGD} \times \% \text{NGD}) + (\text{PCA} \times \% \text{NCA})) \times 100] / \text{PT}$$
, donde N es el % de nutriente considerando el animal completo, PGD el peso de la glándula digestiva, PCA el peso de la carcasa, NGD el porcentaje del nutriente en la glándula digestiva, NCA el porcentaje del nutriente en la carcasa y PT el peso total del individuo.

### *Determinación de la digestibilidad.*

El coeficiente de digestibilidad aparente fue calculado para la materia seca (CDAMS), la proteína (CDAPROT) y los lípidos (CDALIP) usando la ecuación estándar de Maynard y Loosli (1969):

$$\text{CDA} = 100 - (100 \times \% \text{Mdieta} / \% \text{Mheces}) \times (\% \text{Nheces} / \% \text{Ndieta})$$
, donde M es el marcador inerte y N los nutrientes. Como marcador inerte se emplearon las cenizas insolubles en ácido (CIA), determinadas según el método descrito por Atkinson et al. (1984). En el caso de las heces liofilizadas se utilizaron entre 2 y 3 g para obtener la humedad, cenizas y cenizas insolubles en ácido (C.I.A), 0,1 g para proteínas y 0,2 g para lípidos, realizando los análisis por duplicado. Las dietas liofilizadas se analizaron por triplicado, utilizando 5 g para la obtención de las C.I.A.

### *Parámetros calculados y análisis de los datos.*



Todos los ejemplares fueron pesados al inicio ( $P_i$  es el peso inicial en g) y al final del experimento ( $P_f$  es el peso final en g). Los parámetros calculados fueron los siguientes: Peso medio:  $P_m$  (g) =  $(P_i + P_f)/2$ ; Incremento de peso:  $IP$  (g) =  $P_f - P_i$ ; Tasa de alimentación absoluta:  $TAA$  (g/día) =  $(AC/días)$ ; Tasa de alimentación relativa:  $TAR$  (%P/día) =  $(TAA/P_m) * 100$ ; Tasa de crecimiento diario:  $TCA$  (g/día) =  $(IP/días)$ ; Tasa específica de crecimiento:  $TEC$  (%P/día) =  $[(\ln P_f - \ln P_i)/días] * 100$ ; Índice de eficacia alimentaria:  $IEA$  (%) =  $(IP/AC) * 100$ ; Índice de conversión:  $IC$  =  $AC/IP$ ; Tasa de alimentación absoluta de proteína:  $TAAP$  (g/día) =  $(TAA * \%Proteína\ dieta)/100$ ; Tasa de alimentación absoluta de lípidos:  $TAAL$  (g/día) =  $(TAA * \%Lípidos\ dieta)/100$ ; Valor productivo de la proteína:  $PPV$  (%) =  $(Proteína\ retenida / Proteína\ ingerida) * 100$ ; Valor productivo de los lípidos:  $LPV$  (%) =  $(Lípidos\ retenidos / Lípidos\ ingeridos) * 100$ ; Índice de la glándula digestiva:  $IGD(\%) = PGD/P_f * 100$ , donde  $PGD$  es el peso de la glándula digestiva en g y  $AC$  es el alimento consumido en g corregido teniendo en cuenta la tasa de disgregación en el agua y calculado según la fórmula:

$AC = (Alimento\ suministrado\ ss - Alimento\ sobrante\ ss * F) + Alimento\ suministrado\ ss * \%Humedad\ dieta$ , con valores de  $F$  de 0,80 y 0,67 para las dietas G y P, respectivamente)

Los resultados obtenidos de todos los análisis fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (D.E.). Para analizar las diferencias se llevó a cabo un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Los porcentajes y los índices fueron transformados aplicando el logaritmo neperiano antes de hacer el ANOVA.

## Resultados

Ambas dietas presentaron una textura firme antes de sumergirlas en agua. La dieta G perdió un 11,4% de su peso seco y la dieta P un 18,1% después de permanecer 4 h en agua. La dieta G presentó una humedad del 52,77% y la dieta P del 48,63%, existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). No existieron diferencias significativas en los porcentajes de proteínas, lípidos, minerales o MELN de las dos dietas experimentales ( $p > 0,05$ ). El contenido energético (2375-2396 KJ/100g) y la relación P/E (29,11-30,91 g/MJ) fueron similares en ambas dietas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Composición (% peso seco) en macronutrientes de las dietas formuladas con guisante (G) o pota (P).

	G	P	p
Humedad	52,77 $\pm$ 0,43	48,63 $\pm$ 1,12	*
Proteínas	69,76 $\pm$ 2,58	73,39 $\pm$ 1,12	n.d.
Lípidos	13,02 $\pm$ 0,69	11,79 $\pm$ 0,75	n.d.
Cenizas	2,66 $\pm$ 0,06	3,80 $\pm$ 1,31	n.d.
MELN <sup>a</sup>	14,57 $\pm$ 2,57	11,02 $\pm$ 2,34	n.d.
CIA <sup>b</sup>	0,038 $\pm$ 0,009	0,078 $\pm$ 0,008	*
Energía( KJ/100g)	2396	2375	-
P/E (g/MJ) <sup>c</sup>	29,11	30,91	-

Datos expresados como la Media  $\pm$  D. E.; n.s.= no significativo ( $P > 0,05$ ); \* $P < 0,05$

<sup>a</sup>MELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculado por diferencia; <sup>b</sup>CIA = Cenizas insolubles en ácido; <sup>c</sup> P/E = Relación proteína/energía.

Al comienzo del experimento, no hubo diferencias significativas entre los pesos medios iniciales de los dos grupos. Ambos grupos aceptaron las dietas, con TAR similares ( $p > 0,05$ ) y una supervivencia del 100%. No obstante, el grupo alimentado con dieta P mostró tasas absolutas de ingesta (TAA, TAAP, TAAL) significativamente mejores respecto del grupo alimentado con la dieta G ( $p < 0,05$ ; Tabla 3). Los animales alimentados con la dieta P mostraron índices significativamente mejores de crecimiento (IP, TCA, TEC), siendo el IP cuatro veces mayor en éstos ( $401 \pm 78$  g) respecto de los alimentados con la dieta G ( $91 \pm 27$  g; Tabla 3). Igualmente, los índices de aprovechamiento nutritivo (IEA, IC, PPV y PPL) fueron significativamente mejores en la dieta P, destacando un IC próximo a 1 en esta dieta. Ambas dietas mostraron valores positivos en el PPV (20,16% dieta G y 43,58% dieta P), mientras que el LPV fue negativo en animales alimentados con la dieta G (-0,49%) y positivo en los alimentados con la dieta P (13,28%;  $P < 0,05$ ). El IGD fue significativamente superior para la dieta P (5,60%) respecto de la dieta G (4,16%;  $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Medias  $\pm$  D.E. de los parámetros medidos en cada grupo experimental para las dietas formuladas con guisante (G) o pota (P).

	G	P	p
N	8	8	
Pi (g)	770 $\pm$ 110	742 $\pm$ 103	n.s.
Pf (g)	861 $\pm$ 102	1143 $\pm$ 167	*
IP (g)	91 $\pm$ 27	401 $\pm$ 78	*
TAA (g/día)	7,70 $\pm$ 0,54	9,72 $\pm$ 0,93	*
TAAP (g/día)	2,55 $\pm$ 0,18	3,71 $\pm$ 0,35	*
TAAL (g/día)	0,47 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,23	*
TAR (%P/día)	0,96 $\pm$ 0,13	1,04 $\pm$ 0,10	n.s.
TCA (g/día)	2,16 $\pm$ 0,64	9,56 $\pm$ 1,88	*
TEC (%P/día)	0,27 $\pm$ 0,10	1,03 $\pm$ 0,13	*
IEA (%)	27,81 $\pm$ 7,64	97,79 $\pm$ 13,52	*
IC	3,88 $\pm$ 1,27	1,04 $\pm$ 0,14	*
PPV (%)	20,16 $\pm$ 7,50	43,58 $\pm$ 7,36	*
LPV (%)	-0,49 $\pm$ 5,25	13,28 $\pm$ 5,17	*
IGD (%)	4,16 $\pm$ 1,12	5,60 $\pm$ 0,92	*

n.s.=no significativo ( $p > 0,05$ ); \* $P < 0,05$ . Pi = peso inicial; Pf, = peso final; IP = incremento de peso; TAAs = tasa de alimentación absoluta en peso seco; TAR = tasa de alimentación relativa; TCA = tasa de crecimiento absoluta; TEC = tasa específica de crecimiento; IEA = índice de eficacia alimentaria; IC = índice de conversión; TAAP = tasa de alimentación absoluta de proteínas; TAAL, tasa de alimentación absoluta de lípidos; PPV = valor productivo de la proteína; LPV = valor productivo de los lípidos; IGD = índice de la glándula digestiva.

Las diferencias entre las heces de los dos grupos fueron significativas para todos los macronutrientes analizados ( $p < 0,05$ ), destacando el elevado porcentaje de lípidos y proteínas en las heces de la dieta P frente a la dieta G y el elevado porcentaje de MELN en las heces de la dieta G (45,78%) frente a la dieta P (15,68%; Tabla 4). Los valores obtenidos de CDAMS, CDAPROT y CDALIP para la dieta P (93,25, 97,03 y 87,89 %, respectivamente) fueron superiores en comparación con los obtenidos para la dieta G (73,83%, 92,05% y 85,00%, respectivamente).

**Tabla 4.** Composición de las heces liofilizadas (% peso seco) de y coeficientes de digestibilidad de las dietas formuladas con guisante (G) o pota (P).

	G	P	p
Humedad	4,37 ± 0,12	7,91 ± 0,39	*
Proteínas	21,20 ± 1,72	32,33 ± 1,00	*
Lípidos	7,46 ± 0,21	21,14 ± 0,19	*
Cenizas	27,82 ± 0,11	30,85 ± 0,11	*
MELN <sup>a</sup>	45,78	15,68	-
CIA <sup>b</sup>	0,052 ± 0,004	1,079 ± 0,367	*
CDAMS <sup>c</sup>	73,83	93,25	-
CDAPROT <sup>d</sup>	92,05	97,03	-
CDALIP <sup>e</sup>	85,00	87,89	-

<sup>a</sup>MELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculado por diferencia; <sup>b</sup>CIA = Cenizas insolubles en ácido ; <sup>c</sup> CDAMS = Coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca.; <sup>d</sup> CDAMS = Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína; <sup>e</sup> CDAMS = Coeficiente de digestibilidad aparente de los lípidos.

n.s.= no diferencias significativas ( $P > 0,05$ ); \* $P < 0,05$ . CIA = cenizas insolubles en ácido.

Las principales diferencias en cuanto a la composición nutricional de los animales se dieron en la glándula digestiva. En este órgano, el grupo alimentado con la dieta G mostró porcentajes significativamente mayores en humedad, proteínas, cenizas y MELN respecto del alimentado con la dieta P ( $p < 0,05$ ; Tabla 5). No obstante, el porcentaje de lípidos fue significativamente mayor en los animales alimentados con la dieta P (34,97%) respecto de los alimentados con la dieta G (5,51%;  $P < 0,05$ ). En el músculo se obtuvieron valores significativamente más altos de humedad y de cenizas en los animales alimentados con la dieta G que con la dieta P ( $p < 0,05$ ). No se obtuvieron diferencias significativas en la composición nutricional de la carcasa ( $p > 0,05$ ). En el animal completo, solo se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de lípidos, siendo mayor en aquellos animales que se alimentaron con la dieta P (3,35%) que con la dieta G (1,43%; Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición (%peso seco) en macronutrientes de las distintas fracciones del pulpo (% peso seco) alimentados con las dietas formuladas con guisante (G) o pota (P).

	G	P	p
Glándula Digestiva (N = 8)			
Humedad	71,39 ± 2,09	60,86 ± 2,66	*
Proteínas	63,48 ± 4,62	50,39 ± 8,98	*
Lípidos	5,51 ± 2,92	34,97 ± 10,86	*
Cenizas	6,62 ± 1,34	3,45 ± 0,56	*
MELN <sup>a</sup>	24,45 ± 4,41	13,14 ± 4,06	*
Músculo (N = 4)			
Humedad	81,46 ± 0,66	80,13 ± 0,43	*
Proteínas	79,57 ± 1,18	80,35 ± 1,64	n.s.
Lípidos	1,01 ± 0,43	1,47 ± 0,55	n.s.
Cenizas	11,76 ± 0,61	10,27 ± 0,47	*
MELN <sup>a</sup>	7,66 ± 1,83	7,19 ± 1,63	n.s.
Carcasa (N = 4)			
Humedad	80,60 ± 1,17	81,02 ± 0,57	n.s.
Proteínas	80,66 ± 1,80	80,04 ± 3,34	n.s.
Lípidos	1,14 ± 0,36	0,75 ± 0,07	n.s.
Cenizas	11,42 ± 1,00	11,20 ± 0,56	n.s.
MELN <sup>a</sup>	6,78 ± 2,15	8,00 ± 3,45	n.s.
Animal Completo (N = 4)			
Humedad	80,25 ± 1,12	79,95 ± 0,55	n.s.
Proteínas	79,70 ± 1,90	77,46 ± 3,51	n.s.
Lípidos	1,43 ± 0,60	3,35 ± 0,83	*
Cenizas	11,13 ± 0,94	10,25 ± 0,47	n.s.
MELN <sup>a</sup>	22,35 ± 1,35	21,97 ± 0,64	n.s.

<sup>a</sup>MELN = Material extraíble libre de nitrógeno, calculadas por diferencia. n.s.= no significativo (P>0,05); \*P<0,05.

## Discusión

En este trabajo se describe el uso de las dos primeras dietas formuladas exclusivamente a base de ingredientes secos o liofilizados para la alimentación de *O. vulgaris*. Ambas dietas se formularon a partir de la misma base (Morillo-Velarde et al., 2011) y se diferenciaron en un único ingrediente, por lo que las diferencias obtenidas entre ambas pueden atribuirse a este último. La pota (*T. sagittatus*) se seleccionó por ser una especie de calamar abundante en la zona de estudio y de poco valor comercial. Además, presenta un elevado contenido proteico (Rosa et al., 2005) y un buen perfil de clases lipídicas (Cerezo Valverde et al., 2011). El guisante fue seleccionado por su elevado contenido proteico pero también por su elevada aceptabilidad en el pulpo en ensayos preliminares (Morillo-Velarde et al., 2011).

Ambas dietas mostraron una buena aceptabilidad y una composición similar en macronutrientes, aunque sólo la dieta que empleó pota como ingrediente principal ofreció un buen crecimiento y digestibilidad. Las mayores tasas absolutas de ingesta correspondientes a la dieta P se pueden atribuir al mayor tamaño y crecimiento de los animales de este grupo, pero no indican una mayor aceptabilidad respecto de la dieta G porque las tasas relativas al peso corporal fueron similares. Si transformamos las tasas absolutas de ingesta de la dieta P en peso seco (4,99 gSS/día) para poder compararlas con dietas naturales, observamos que los valores se aproximan a los estimados en condiciones experimentales similares de peso y temperatura al suministrar boga *B. boops* (5,77 gSS/día; Aguado Giménez y García García, 2002), e inferiores respecto de la sardina *Sardina pilchardus* (9,59 gSS/día; García García y Aguado Giménez, 2002) o el cangrejo *C. mediterraneus* (15,90 gSS/día; Aguado y García García, 2002). Al comparar nuestros resultados con otras dietas experimentales aceptadas por *O. vulgaris*, observamos valores similares a los obtenidos por Cerezo Valverde et al. (2008), 3,24-6,97 gSS/día, y Estefanell et al. (2011a), 4,23-6,84 gSS/día, e inferiores respecto de los obtenidos por Quintana et al. (2008), 11,52-16,11 gSS/día, y García et al. (2010), 24,34-29,98 gSS/día. En todo caso, parte de estas diferencias se pueden atribuir a las distintas formas de evaluar las tasas de disgregación de los piensos, lo que hace estos resultados difícilmente comparables. Según nuestros resultados, la ingesta de estos piensos es todavía un aspecto con amplio margen de mejora, y se debe seguir investigando en la línea de formulaciones y atrayentes que mejoren su palatabilidad.

En referencia a las tasas de crecimiento, los valores para los individuos alimentados con la dieta P (9-10 g/día; 1,03 %P/día) no superaron a los estimados con *C. mediterraneus* (17 g/día), aunque fueron similares a los estimados con *B. boops*, (9 g/día; Aguado y García García, 2002) y mejores que con *S. pilchardus* (7-8 g/día; García García y Aguado Giménez, 2002) y otros estudios con dietas experimentales (Cerezo-Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; García et al., 2011). Hasta la fecha, los mejores resultados con dietas experimentales han sido obtenidos por Estefanell et al (2011a), suministrando *B. boops* de descarte de elevado contenido lipídico aglutinada con alginatos (17 g/día; 1,5 %P/día). Estos excelentes resultados se atribuyeron a una eficaz utilización de los lípidos y un efecto de ahorro de la proteína. No obstante, otros ensayos han demostrado una pobre digestibilidad de los lípidos procedentes de la boga de cultivo (Sánchez et al. 2009; Seïça Neves et al. 2010) y un efecto negativo sobre la absorción de proteínas (Sánchez et al., 2009) sugiriendo que tanto el contenido lipídico como el tipo de grasa (Cerezo Valverde et al., 2011) de las dietas experimentales debería establecerse en futuros estudios para optimizar el rendimiento de la dieta.

En nuestros resultados destacó el elevado aprovechamiento nutritivo de la dieta P respecto a todas las dietas naturales (i.e. García García y Cerezo Valverde et al., 2006; Biandolino et al., 2010; Prato et al., 2010; Estefanell et al., 2001b), así como experimentales (i.e. Cerezo Valverde et al., 2008; Quintana et al., 2008; García et al., 2010; Estefanell et al., 2011) , con índices de conversión próximos a 1,

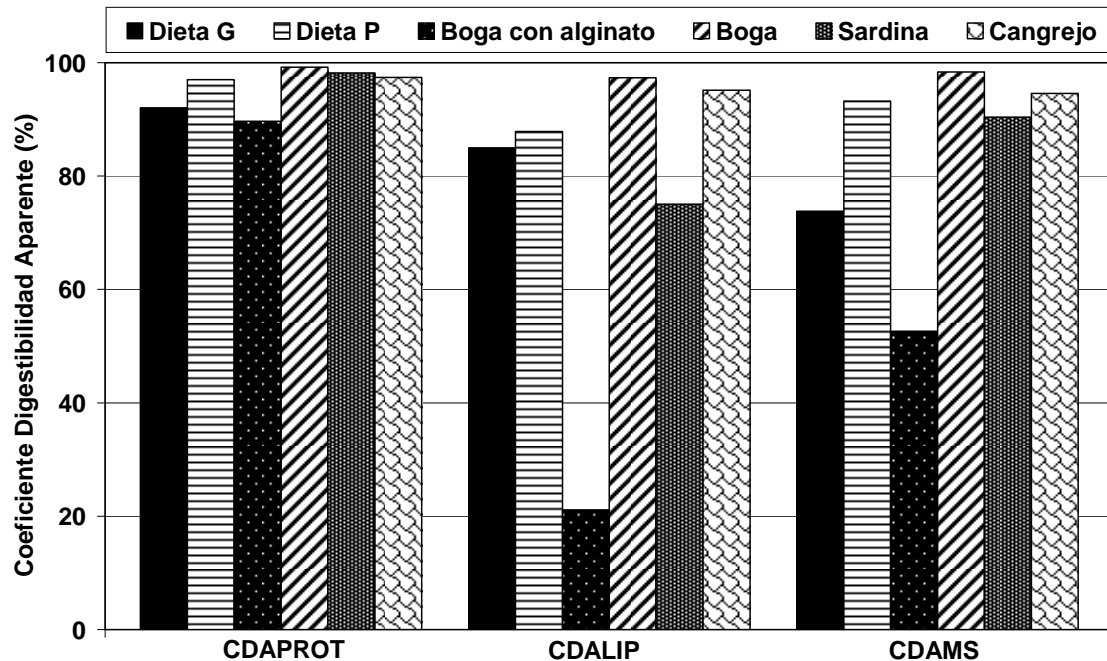
elevados valores de PPV y moderados de LPV (43,58% y 13,28 %, respectivamente). Los valores de PPV para la dieta P fueron incluso mejores que los obtenidos con dietas a base de cangrejo (28%), dietas mixtas de peces y cangrejo (33%) y peces (36%) (García García y Cerezo Valverde, 2006), sugiriendo un buen balance nutricional de la dieta P respecto de las dietas naturales. Estos resultados fueron acompañados de elevados coeficientes de digestibilidad en la dieta P, coincidiendo con los valores obtenidos para dietas naturales de boga, sardina y cangrejo (Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007), pero superiores respecto de otras dietas experimentales (Seiça Neves et al., 2010), donde usan la misma metodología que en este trabajo (ver Figura 1). Sin embargo, cuando los pulpos se alimentaron con la dieta G, se obtuvo una fuerte reducción en el coeficiente de digestibilidad de la materia seca (93 % al 74%), sugiriendo que el guisante interfiere en el proceso digestivo en *O. vulgaris*. Las leguminosas y el guisante entre ellas, presentan ciertos factores antinutricionales tales como los inhibidores de proteasas, amilasas, lectinas, fitatos y ciertos compuestos fenólicos (Carmona et al., 1991; Trago et al., 2000), que podrían haber afectado a las enzimas digestivas del pulpo. Igualmente, se detectó una disminución de los coeficientes de digestibilidad de la proteína (97 al 92 %) y los lípidos (88 al 85 %) al sustituir la pota por guisante. A pesar de que el tratamiento con calor permite la inactivación de estos factores antinutricionales, nuestros resultados sugieren que las bajas temperaturas empleadas en el proceso de fabricación de este pienso podrían no haber sido suficientemente elevadas.

Por otra parte, los menores CD para proteínas y lípidos no fueron suficientes para explicar la baja digestibilidad de la dieta G. Estos resultados apuntan a que la digestibilidad del resto de componentes de la dieta G, concretamente los hidratos de carbono, habría sido prácticamente nula para el caso del guisante. Aunque las amilasas están presentes a lo largo del tracto digestivo de los cefalópodos, tanto en la glándulas salivares (Caruso et al., 2004) como en la glándula digestiva (Boucher-Rodoni, 1982), podrían haber sido insuficientes o haber quedado inactivadas por la presencia de factores antinutricionales. O'Dor et al. (1984) observaron una digestibilidad de la glucosa pura del 98 %, y puesto que los carbohidratos incluidos en el guisante son mayoritariamente almidones, el grado de complejidad de los carbohidratos también podría ser un factor a tener en cuenta en el diseño de estas dietas experimentales.

La digestibilidad que nosotros observamos para la proteína de las dietas P y G, así como en dietas naturales y otras experimentales se mantiene por encima del 90 % en todos los casos, indicando la elevada capacidad enzimática para la digestión de estos nutrientes (Boucher-Rodoni, 1982). Hamdan et al. (2007) confirmaron mediante estudios de digestión *in vitro* la importancia de las proteasas en las glándulas salivares y glándula digestiva del pulpo, con distintos perfiles de actividad en función del pH que evidenciaban un equipo de proteasas complejo, en el que probablemente se combina la acción de enzimas que actúan a nivel intra y extracelular. Por el contrario, los resultados para los coeficientes de digestibilidad de los lípidos fueron variables. Aunque los coeficientes de las dietas G y P no superaron a los de dietas naturales a base de cangrejo y de boga,

ambos bajas en lípidos (<15 % grasa peso seco; Hernández y García García, 2004; Mazón et al., 2007), sí lo hicieron para la sardina, boga y otras dietas experimentales de mayor contenido lipídico (20-34 % grasa peso seco; Hernández y García García, 2004; Seiça Neves et al., 2010; Fig. 1). Estas diferencias se pueden atribuir al distinto contenido en grasa de las dietas, habiéndose demostrado una disminución en la capacidad de digestión de éstas conforme aumenta su contenido en la dieta (Sánchez et al., 2009). Estos resultados coinciden con estudios previos que demostraron una capacidad limitada para la digestión y catabolización de lípidos en cefalópodos (Ballantyne et al., 1981; Mommsen y Hochachka, 1981; O'Dor et al., 1984; Lee, 1994).

En cuanto a la composición nutricional en *O. vulgaris*, los cambios más relevantes fueron observados a nivel de la glándula digestiva. De acuerdo con Almansa et al. (2006) y Sierio et al. (2006), tampoco en este estudio encontramos diferencias significativas en el tejido muscular ni en la carcasa como consecuencia de la dieta suministrada. Sin embargo, el porcentaje lipídico de la glándula digestiva en animales alimentados con dieta P (34,97 %) fue mucho mayor que en los animales alimentados con dieta G (5,51 %), sugiriendo un pero balance nutricional en esta última y una mayor contribución de los lípidos al metabolismo energético. Estos resultados también quedaron reflejados en los valores de LPV, con una retención de 13,18 % de los lípidos ingeridos totales con la dieta P y de -0,49 % para la dieta G. Estudios previos han demostrado que las reservas de lípidos en pulpos se encuentran principalmente en la glándula digestiva (Sieiro et al., 2006; Cerezo et al., 2011), esencialmente triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol, los cuales pueden ser movilizadas en situaciones de ayuno (Garrido et al., 2010). Esta es la primera vez que dietas semi-húmedas elaboradas exclusivamente con ingredientes secos y liofilizados son aceptadas por *O. vulgaris* llevando consigo buenas tasas de crecimiento, aprovechamiento nutritivo y digestibilidad. Los resultados del presente estudio dan un gran paso en las investigaciones para conseguir una dieta formulada con fines comerciales para *O. vulgaris*. Estudios futuros de engorde en pulpos podrían usar una base similar al formato propuesto para obtener piensos secos con mayor aceptabilidad y estabilidad.



**Figura 1.** Comparación de los coeficientes de digestibilidad de los lípidos (CDALIP), proteínas (CDAPROT) y materia seca (CDAMS) obtenidos para las dietas experimentales formuladas con guisante (G) o pota (P) como ingredientes a testar, para la dieta experimental de boga aglutinada con alginato (Seiça Neves et al., 2010), y para las dietas naturales (boga, sardina y cangrejo) en similares condiciones de experimentación (Hernández y García García., 2004).

## Referencias

- Aguado Giménez, F., García García, B., 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquacult. Int.* 10, 361-377.
- Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domínguez, P. M., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., Rosas, C. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273, 641-655.
- Almansa, E., Dominguez, P.M., Sykes, A., Tejera, N., Lorenzo, A., Andrade, J.P., 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture* 256, 403-413.
- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis, 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington.
- Atkinson, J.L., Hilton, J.W., Slinger, S. J., 1984. Evaluation of acid insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 1384-1386.
- Biandolino, F., Portacci, G., Prato, E., 2010. Influence of natural diets on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris*, Cuvier 1797. *Aquacult. Int.* 18, 1163-1175.



- Boucher-Rodoni, R. 1982. La glande digestive des céphalopodes, organe de synthèse et de sécrétion d'enzymes digestives. Cah. Biol. Mar. 23, 299-318.
- Carmona, A., Seidl, D.S., Jaffé, W.G., 1991. Comparison of extraction methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans. J. Sci. Food Agric. 56, 291-301.
- Castro, B.G., Lee, P.G., 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). Comp. Biochem. Physiol. 109A, 1007- 1016.
- Caruso, G., Giordano, D., Mancuso, M., Genovese, L., 2004. Studio preliminare degli enzimi digestivi di *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 ed *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca:Cephalopoda). Biol. Mar. Med. 11, 367-369.
- Cerezo Valverde, J., García García, B., 2005. Suitable dissolved oxygen levels for common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) at different weights and temperatures: analysis of respiratory behaviour. Aquaculture 244, 303-314.
- Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., García García, B., 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. Aquaculture 275, 266-273.
- Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., García-Garrido, S., Rodríguez, C., Estefanell, J., Gairín, J.I., Rodríguez, C.J., Tomás, A., García García, B., 2011. Lipid classes from marine species and meals intended for cephalopod feeding. Aquacult. Int. DOI: 10.1007/s10499-011-9442-z
- Chapela, A., González, A.F., Dawe, E.G., Rocha, F., Guerra, A., 2006. Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. Sci. Mar. 70, 121-129.
- Cho, C.Y., Bureau, D.P., 2001. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. Aquacult. Res. 32, 349-360.
- Davies, S.J., Gouveia, A., Laporte, J., Woodgate, S.L., Nates, S., 2009. Nutrient digestibility profile of premium (category III grade) animal protein by-products for temperate marine fish species (European sea bass, gilthead sea bream and turbot). Aquacult. Res. 40, 1759-1769.
- Domingues, P.M., DiMarco, F.P., Andrade, J.P., Lee, P.G., 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Aquac Int. 13:423–440.
- Domingues, P.M., López, N., Muñoz, J.A., Maldonado, T., Gaxiola, G., Rosas, C., 2007. Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. Aquacult. Nutr. 13A, 273-280.
- Domingues, P.M., García, S., Hachero-Cruzado, I., Lopez N., Rosas C., 2009. The use of alternative prey (crayfish, *Procambarus clarki*, and hake, *Merluccius gayi*) to culture *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797). Aquacult. Int. 18, 487-499.
- Estefanell, J., Socorro, J., Roo, J., Naranjo, D., Martín, A., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., 2009. Utilización de cangrejo y harina en el pienso para pulpo común *Octopus vulgaris*. XII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid, Spain.
- Estefanell, J., Roo, J., Guirao, R., Alfonso, J. M., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Socorro, J., 2011a. Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) fed fresh and agglutinated moist diets

- based on aquaculture by-products and low price trash species. *Aquacult. Res.* DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.03014.x.
- Estefanell, J., Socorro, J., Tuya, F., Izquierdo, M., Roo, J. 2011b. Growth, protein retention and biochemical composition in *Octopus vulgaris* fed on different diets based on crustaceans and aquaculture by-products. *Aquaculture* 322-323, 91-98.
- García, S., Domingues, P., Navarro, J.C., Hachero, I., Garrido, D., Rosas, C., 2010. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquacult. Nutr.* 17 (2), 174-187.
- García García, B., Aguado Giménez, F., 2002. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211, 171-182.
- García García, B., Cerezo Valverde, J., 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Ocotpus vulgaris*) on-growing. *Aquaculture* 253, 502-511.
- García García, B., Cerezo Valverde, J., Aguado-Giménez, F., García García, J., 2009. Growth and mortality of common octopus *Octopus vulgaris* reared at different stocking densities in Mediterranean offshore cages. *Aquacult. Res.* 40, 1202-1212.
- García García, J., García García, B., 2011. Econometric model of viability/profitability of octopus (*Octopus vulgaris*) on-growing in sea cages. *Aquacult. Int.*, DOI: 10.1007/s10499-011-9432-1.
- García García, J., Rodríguez González, L. M., García García, B., 2004. Cost analysis of octopus on-growing installation in Galicia. Spain. *J. Agric. Res.* 2, 531-537.
- Hernández, M.D., García García, B., 2004. Digestibility of natural foods in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Biotechnologies for Quality. Aquaculture Europe 2004.* Barcelona Spain, pp. 414-415.
- Iglesias, J., Sánchez, F.J., Bersano, J.G.F., Carrasco, J.F., Dhont J., Fuentes L., Linares F., Muñoz J.L., Okumura S., Roo F.J., Van der Meeren T., Vidal E.A.G., Villanueva R., 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture* 266, 1-15.
- Lee, P.G., Forsythe, J.W., DiMarco, F.P., DeRusha, R., Hanlon, R.T., 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bull. Mar. Sci.* 49, 362-372.
- Lee, P.G., 1994. Metabolic substrates in cephalopods. In: (Pörtner H.O., O'Dor R.K. & MacMillan D.L. (Eds.), *Physiology of Cephalopod Mollusc. Lifestyle and Performance Adaptations.* Gordon and Breach Publishers, Basel, Switzerland, pp 35-51
- Maynard, L.A., Loosli, L.K., 1969. *Animal Nutrition*, 7<sup>th</sup> Ed. MacGrawHill Book Company, New York. pp. 613.
- Mazón, M.J., Piedecausa, M.A., Hernández, M.D., García García, B., 2007. Evaluation of environmental nitrogen and phosphorus contributions as a result of intensive on-growing of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 266, 226-235.

- Miglavs, I., Jobling, M., 1989. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. J. Fish Biol. 35, 1-11.
- Morillo-Velarde, P.S., Cerezo Valverde, J., Hernández, M.D., Aguado-Giménez, F., García García, B., 2011. Aceptabilidad de distintos ingredientes para la formulación de piensos para el pulpo común (*O. vulgaris*). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Castelldefels, Barcelona.
- Navarro, J.C., Villanueva, R., 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. Aquaculture 219, 613-631.
- O'Dor, R.K., Mangold, K., Boucher-Rodoni, R., Wells, M.J., Wells, J., 1984. Nutrient Absorption, Storage and Remobilization in *Octopus vulgaris*. Mar. Behav. Physiol. 11, 239-258.
- Petza, D., Katsanevakis, S., Verriopoulos, G., 2006. Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed ad libitum on a high-lipid diet. Mar. Biol. 148, 827-832.
- Prato, E., Portacci, G., Biandolino, F., 2010. Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. Aquaculture 309, 203-211.
- Quintana, D., Domingues, P.M., García, S., 2008. Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. Aquaculture 280, 161-164.
- Rodríguez, C., Carrasco, J.F., Arronte, J.C., Rodríguez, M., 2006. Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile ongrowing in floating cages. Aquaculture 254, 293-300.
- Rodríguez-Dominguez, H., Soto-Búa, M., Iglesias Blanco, R., Crespo-González, C., Arias-Fernández, C., García Estevez, J., 2006. Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro. Aquaculture 254, 563-570.
- Rosa, R., Pereira, J., Nunes, M.L., 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to a giant squid, *Architeuthis* sp. Mar. Biol. 146, 739-751.
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa V., Pascual, C., Arena L., Domingues, P.M., Cuzon, G., 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. Aquaculture 275, 291-297.
- Sánchez, M., Hernández, M.D., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2009. Protein and lipid digestibility in common octopus (*Octopus vulgaris*). Cephalopod International Advisory Council. Vigo, Spain.
- Seiça Neves, M.M., Cerezo Valverde, J., García García, B., 2010. Digestibility of a formulated diet with alginate as binder in octopus. In: EAS Aquaculture Europe 2010. Book of abstracts. Porto, Portugal. pp. 500-501.
- Trago, L.C., Donangelo, C.M., Trugo, N.M.F., Knudsen, K.E., 2000. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. J. Agric. Food Chem. 48, 2082-2086.
- Vaz-Pires, P., Seixas, P., Barbosa, A., 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. Aquaculture 238, 221-238

## Tarea 2.2.2. Mejora de la textura y estabilidad de los piensos

### Inclusión de gomas comerciales

Para la preparación de este tipo de piensos se disolvieron dos tipos de gomas comerciales en agua templada (50°C), posteriormente se añadió pasta de pescado (*Boops boops*) y se mezcló con batidora hasta obtener una mezcla homogénea. Ésta se dejó enfriar a 4 °C durante 24 h. Las proporciones de pasta de pescado oscilaron entre el 0 y 30 % y las de gomas entre el 0 y 7,2 % (Tabla 1). En general, con las gomas se consigue un efecto espesante importante de la mezcla y ligeramente gelificante, pero en ningún caso se obtiene un pienso estable en agua y cohesionado. La concentración óptima de gomas se obtuvo entorno al 4 % de la mezcla. Por encima del 7 % y por debajo del 2 % la consistencia de los piensos empeora, quedando con una textura blanda que se deshace con facilidad. Al emplear el 4 % de gomas los mejores resultados se obtiene con un 10 % de pasta de pescado, pero empeoraron al aumentar la proporción al 20 o 30 %. Las gomas, por lo tanto, podrían ser útiles para dar consistencia a ciertas mezclas pero no son apropiadas por sí solas para la elaboración de este tipo de piensos. La sustitución de pasta de pescado por harina de cangrejo no mejoró los resultados.

### Inclusión de gelatina comercial (Bloom 220)

Distintos porcentajes de gelatina y pasta de pescado.

Para su preparación se disolvió la gelatina en agua al baño María (60-70° C) durante cinco minutos, posteriormente se añadió la pasta de pescado y se batió todo hasta obtener una mezcla homogénea. Se dejó enfriar a 4 °C durante 24 horas. La composición porcentual de los piensos se presenta en la Tabla 2. Los mejores resultados se obtuvieron con un 15 y un 25 % de gelatina, admitiendo hasta un 50 % de pasta de pescado con buenos resultados de cohesión y aceptables de estabilidad en agua. Cuando el porcentaje de pescado es del 75 % disminuye la cohesión. La estabilidad de las mezclas y la cohesión mejora al pasar de un 13 a un 24% de agua.

**Tabla 1.** Ingredientes empleados en la elaboración de piensos incluyendo gomas comerciales.

**Pasta de pescado + Gomas**

Nº		Agua	Goma PRS-30 KT	Goma PRS-T	Pescado	Total	ESP	GEL	EST	CH
1	gr	100,0	2,0	2,0	0,0	104,0	+	-	-	-
	%	<b>96,15</b>	<b>1,9</b>	<b>1,9</b>	<b>0,0</b>	<b>100,0</b>				
2	gr	30,0	0,6	0,6	170,0	201,2	+	-	-	-
	%	<b>14,91</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>84,5</b>	<b>100,0</b>				
3	gr	60,0	1,2	1,2	140,0	202,4	+	-	-	-
	%	<b>29,64</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>69,2</b>	<b>100,0</b>				
4	gr	86,4	1,8	1,8	10,0	100,0	++	-	-	-
	%	<b>86,40</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>10,0</b>	<b>100,0</b>				
5	gr	76,8	1,6	1,6	20,0	100,0	+	-	-	-
	%	<b>76,80</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>20,0</b>	<b>100,0</b>				
6	gr	67,2	1,4	1,4	30,0	100,0	+	-	-	-
	%	<b>67,20</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>30,0</b>	<b>100,0</b>				
7	gr	82,8	3,6	3,6	10,0	100,0	++	+	-	-
	%	<b>82,80</b>	<b>3,6</b>	<b>3,6</b>	<b>10,0</b>	<b>100,0</b>				
8	gr	73,6	3,2	3,2	20,0	100,0	+	+	-	-
	%	<b>73,60</b>	<b>3,2</b>	<b>3,2</b>	<b>20,0</b>	<b>100,0</b>				
9	gr	64,4	2,8	2,8	30,0	100,0	+	-	-	-
	%	<b>64,40</b>	<b>2,8</b>	<b>2,8</b>	<b>30,0</b>	<b>100,0</b>				
10	gr	86,4	1,2	2,4	10,0	100,0	++	+	-	-
	%	<b>86,40</b>	<b>1,2</b>	<b>2,4</b>	<b>10,0</b>	<b>100,0</b>				
11	gr	76,8	1,1	2,1	20,0	100,0	+	+	-	-
	%	<b>76,80</b>	<b>1,1</b>	<b>2,1</b>	<b>20,0</b>	<b>100,0</b>				
12	gr	67,2	0,9	1,9	30,0	100,0	+	-	-	-
	%	<b>67,21</b>	<b>0,9</b>	<b>1,9</b>	<b>30,0</b>	<b>100,0</b>				
13	gr	86,4	2,4	1,2	10,0	100,0	++	+	-	-
	%	<b>86,40</b>	<b>2,4</b>	<b>1,2</b>	<b>10,0</b>	<b>100,0</b>				
14	gr	76,8	2,1	1,1	20,0	100,0	+	+	-	-
	%	<b>76,78</b>	<b>2,1</b>	<b>1,1</b>	<b>20,0</b>	<b>100,0</b>				
15	gr	67,2	1,9	0,9	30,0	100,0	+	-	-	-
	%	<b>67,21</b>	<b>1,9</b>	<b>0,9</b>	<b>30,0</b>	<b>100,0</b>				

ESP = Espesante; GEL = Gelificante; EST = Estabilidad en agua;  
CH = Cohesión (Fragil-Flexible-Elástico)

**Tabla 2.** Composición de piensos elaborados con distintos porcentajes de gelatina y pasta de pescado.

**Pasta de pescado + Gelatinas**

Nº		Gelatina	Agua	Azucar	Pescado	Total	ESP	GEL	EST	CH
1	gr	15,0	12,5	18,8	15,4	61,7	-	-	++	+++
	%	<b>24,32</b>	<b>20,27</b>	<b>30,40</b>	<b>25,00</b>	<b>100,0</b>				
2	gr	15,0	12,5	18,8	46,3	92,5	-	-	+	++
	%	<b>16,22</b>	<b>13,51</b>	<b>20,27</b>	<b>50,00</b>	<b>100,0</b>				
3	gr	15,0	25,0	18,8	46,3	105,0	-	-	++	+++
	%	<b>14,29</b>	<b>23,81</b>	<b>17,86</b>	<b>44,05</b>	<b>100,0</b>				
4	gr	15,0	12,5	18,8	138,9	185,2	-	-	+	+
	%	<b>8,10</b>	<b>6,75</b>	<b>10,15</b>	<b>75,00</b>	<b>100,0</b>				

ESP = Espesante; GEL = Gelificante; EST = Estabilidad en agua;  
CH = Cohesión (Fragil-Flexible-Elástico)

### Distintos porcentajes de gelatina y harina de cangrejo

La forma de elaboración fue similar al apartado anterior. En este caso la gelatina permitió aglomerar la harina de cangrejo hasta en un 25 % del total de la mezcla generando una elevada cohesión (pienso elástico que no se disgrega) y una estabilidad apropiada en agua (Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición de piensos elaborados con distintos porcentajes de gelatina y harina de cangrejo.

#### Harina de cangrejo + Gelatinas

Nº		Gelatina	Agua	Azucar	H. cangrejo	Total	ESP	GEL	EST	CH
1	gr	30,0	25,0	37,5	10,3	102,8	-	-	++	+++
	%	<b>29,19</b>	<b>24,32</b>	<b>36,49</b>	<b>10,00</b>	<b>100,0</b>				
2	gr	30,0	25,0	37,5	30,8	123,3	-	-	++	+++
	%	<b>24,32</b>	<b>20,27</b>	<b>30,41</b>	<b>25,00</b>	<b>100,0</b>				

ESP = Espesante; GEL = Gelificante; EST = Estabilidad en agua;  
CH = Cohesión (Fragil-Flexible-Elástico)

### Distintos porcentajes de gelatina y harina de trigo.

La forma de elaboración fue similar al apartado anterior, pero eliminando el azúcar en la composición de la mezcla. En este caso la gelatina permitió aglomerar la harina de trigo a un porcentaje óptimo del 25 % del total de la mezcla generando una elevada cohesión (pienso elástico que no se disgrega, de textura gomosa) y una estabilidad apropiada en agua (Tabla 4). Al aumentar el porcentaje de harina al 37,5 % se obtiene una mezcla homogénea pero menos cohesionada que se agrieta con más facilidad y se reseca rápidamente. Con un 50 % de harina la mezcla es imposible de amasar.

**Tabla 4.** Composición de piensos elaborados con distintos porcentajes de gelatina y harina de cangrejo.

#### Harina de trigo + Gelatinas

Nº		Gelatina	Agua	Azucar	H. trigo	Total	ESP	GEL	EST	CH
1	gr	50,0	100,0	0,0	50,0	200,0	-	-	++	+++
	%	<b>25,00</b>	<b>50,00</b>	<b>0,00</b>	<b>25,00</b>	<b>100,0</b>				
2	gr	25,0	100,0	0,0	75,0	200,0	-	-	++	++
	%	<b>12,50</b>	<b>50,00</b>	<b>0,00</b>	<b>37,50</b>	<b>100,0</b>				
3	gr	50,0	50,0	0,0	100,0	200,0	-	-	+	+
	%	<b>25,00</b>	<b>25,00</b>	<b>0,00</b>	<b>50,00</b>	<b>100,0</b>				

ESP = Espesante; GEL = Gelificante; EST = Estabilidad en agua;  
CH = Cohesión (Fragil-Flexible-Elástico)

## Aceptabilidad de distintos ingredientes para la formulación de piensos para el pulpo común (*O. vulgaris*).

### Resumen

Se ha estudiado la aceptabilidad de 19 dietas semihúmedas diferenciadas en un único ingrediente con el fin de comprobar su grado de aceptabilidad. Estaban compuestas por un ingrediente prueba (30 %), gelatina como aglomerante (20 %) y agua (50 %), siguiendo el formato propuesto por el IMIDA durante el año 2010. Los mejores resultados se obtuvieron con la dieta que contenía yema de huevo en polvo y liofilizados de pescado (*Sardinella aurita* o *Boops boops*), con tasas absolutas de alimentación expresadas en peso seco (TAAss) y tasas de crecimiento absolutas (TCA) para la primera de ellas similares a las estimadas para una dieta natural a base de boga *B. boops*. Las TAAss al incluir peces liofilizados fueron similares respecto a la dieta natural de *B. boops*, aunque con menores TCA. Ninguna dieta alcanzó los valores de TAAss o TCA obtenidos con dietas naturales de cangrejo. Los peores resultados se obtuvieron con las harinas animales o vegetales. Los resultados sugieren que la inclusión de yema de huevo en polvo o los liofilizados de pescado en la formulación de dietas podrían servir como atrayente para mejorar la aceptabilidad y el crecimiento del pulpo. Igualmente podrían servir de agente enmascarante para ayudar a la ingesta de otros ingredientes de pobre aceptabilidad pero apropiada composición nutritiva.

### Justificación

Para el pulpo de roca, los piensos artificiales húmedos o semi-húmedos basados en el uso de alginatos o gelatinas como aglomerantes han sido consumidos en cantidades similares o incluso superiores que cuando se suministran dietas naturales como pescado o calamar, no obstante, siguen siendo inferiores a las tasas de ingesta observadas con crustáceos. En cuanto al crecimiento obtenido, los resultados son dispares según el tipo de aglomerante, la materia prima, ingredientes utilizados o especie considerada. Por lo tanto, uno de los pasos clave para lograr crecimientos óptimos en el pulpo es conocer que ingredientes son mejor aceptados por el pulpo, para poder usarlos como atrayentes y mejorar la textura y palatabilidad de las dietas artificiales. Con este estudio se pretende conocer la aceptabilidad de *O. vulgaris* a dietas artificiales semi-húmedas diferenciadas exclusivamente en un ingrediente a probar (harina o ingrediente en polvo o liofilizado), aglomerado con gelatina por su mejor digestibilidad respecto al alginato.

### Material y Métodos

Los ejemplares de *O. vulgaris* se capturaron en el Mar Mediterráneo (Murcia, S.E. España) y se trasladaron individualmente a tanques circulares de 216 l en el laboratorio. Los animales se aclimataron durante 2 semanas, y se alimentaron con boga (*B. boops*) y cangrejo (*C. mediterraneus*) en días alternativos. Se mantuvieron en un sistema de recirculación de agua con control de la temperatura ( $18,2 \pm 1,1^{\circ}$  C) y sistemas de filtración mecánica y biológica. Se prepararon 19 dietas

formuladas con un ingrediente a testar (30 %; Tabla 1), gelatina como aglomerante (20 %), y agua (50%). Los ingredientes de la dieta se mezclaron al Baño María a 45° C y se dejaron enfriar a 4° C. Se utilizaron grupos experimentales de entre 6 y 8 individuos macho. A cada grupo (887, ± 274,2) se le suministro una dieta distinta entre 3 días - caso de no ser aceptada desde el inicio- y 15 días. Los pulpos eran alimentados de 09:00 -13:00 h. El alimento no ingerido fue pesado diariamente y multiplicado por un factor de corrección para descontar el agua absorbida o la disgregación del pienso subsanando los cambios de peso. Se calculó: TAAss (g/día) = (ACss/días), TCA (g/día)= (IP/días) e IEA (%)= (IP/AC)\*100, donde ACss y AC son el alimento consumido en peso seco y húmedo respectivamente, e IP el incremento de peso en g.

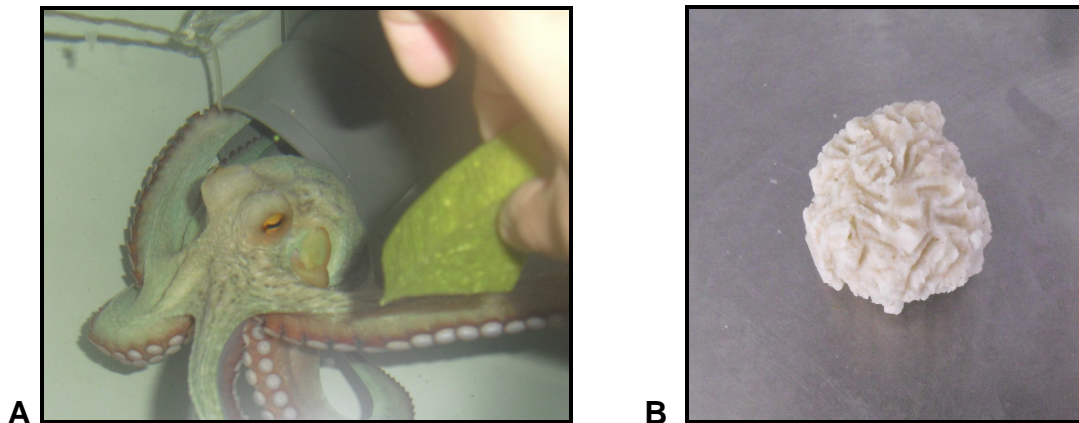
**Tabla 1.** Ingredientes usados en la elaboración de dietas para *O. vulgaris*.

Ingredientes	Compañía
Harinas Vegetales	
Arroz	Arrocería Pons S.A., Massanassa, Valencia, España
Avena	Agricultura de Conreu Ecológic, Maresme, Barcelona, España
Garbanzo	Panadería Rincón del Segura S.L., Elche de la Sierra, Albacete, España
Garrofin	Pienso y Cereales Desco S.L., Valencia, España
Gluten	Pienso y Cereales Desco S.L., Valencia, España
Maíz	Harina de maíz blanco precocinado, proporcionada por Alimentos Polar Colombia S.A. Colombia.
Soja	COCERVA, Náquera, Valencia, Spain.
Trigo	Marinera del Mar S.L., Almenara, Castellón, España.
Harinas Animales	
Cangrejo	<i>Polybius henslowii</i> , procedente de pesquerías artesanales, Galicia, España
Pescado	Skretting, Modúbar de la Emparedada, Burgos, España
Liofilizados	
Alacha	<i>Sardinella aurita</i> , procedente de la pesca artesanal, Santa Pola, Alicante, España
Boga Salvaje	<i>Boops boops</i> , procedente de la pesca artesanal, Santa Pola, Alicante, España
Boga Cultivo	<i>Boops boops</i> , procedente del descarte de la acuicultura. Santa Pola, Alicante, España
Guisante	Ultracongelados Virto S.A, Azagra Navarra, España.
Mejillón	<i>Mytilus sp</i> , procedente de la pesca artesanal, Galicia, España.
Sangre	Sangre de pollo congelada y liofilizada. Hijos de Pujante S.A., Beniel, Murcia
Atomizados	
Clara de huevo	Clara de huevo atomizada, Avícola San Isidro S.L. Los Belones, Cartagena, Murcia, España.
Huevo Entero	Huevo entero atomizada, Avícola San Isidro S.L. Los Belones, Cartagena, Murcia, España.
Yema Huevo	Yema de huevo atomizada, Avícola San Isidro S.L. Los Belones, Cartagena, Murcia, España.
Aglomerante	
Gelatina	Gelatina granulada Bloom 220, Productos Sur, S. A., San Ginés, Murcia, España.



## Resultados y Discusión

Todas las dietas tuvieron una textura firme antes y después de introducirlas en el agua, sin evidencias de desintegración al ser manipuladas por los pulpos. Esto demuestra la estabilidad de las dietas que contienen gelatina como aglomerante haciéndolas más aceptables para los pulpos. La composición nutricional de las dietas se presenta en la Tabla 2. La supervivencia fue del 100% en todos los experimentos. En la Tabla 3 se comparan los datos obtenidos de las diferentes dietas testadas en este estudio con los valores estimados para dietas naturales de *B. boops* y *C. mediterraneus* bajo condiciones similares de experimentación (Aguado y García-García, 2002). El grado de aceptación de las dietas con liofilizados de pescado y yema de huevo fueron muy similares a las estimados con alimentación de *B. boops*, aunque las dietas a base de *C. mediterraneus* duplicaron los valores de dichas dietas. En general, las TCA de las dietas testadas fueron bajas comparadas con las estimadas para dietas naturales, a excepción de cuando se usaron los liofilizados de boga de descarte ( $5,1 \pm 2,6$  g/día), boga salvaje ( $5,0 \pm 3,9$  g/día) y yema de huevo (8,89 g/día). Estos resultados podrían servir de herramienta para mejorar la composición de los piensos al suministrar otros nutrientes adecuados para la alimentación del pulpo.



**Figura 1(A-B).** Suministro del pienso a los pulpos (A) y pienso experimental después de ser manipulado por los pulpos (B).

**Tabla 2.** Composición en macronutrientes (% peso seco) de las dietas suministradas.

<b>Dietas</b>	<b>Humedad</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Lípidos</b>	<b>MELN</b>
H. Arroz	51,32 ± 2,99	1,00 ± 0,03	43,42 ± 0,47	0,45 ± 0,11	55,13 ± 0,48
H. Avena	55,67 ± 0,65	1,30 ± 0,06	42,28 ± 2,57	2,26 ± 0,64	54,15 ± 2,79
H. Garbanzo	53,46 ± 0,05	2,57 ± 0,13	49,75 ± 0,92	1,52 ± 0,14	46,17 ± 1,11
H. Garrofin	51,30 ± 2,04	4,60 ± 0,17	62,03 ± 1,60	0,49 ± 0,08	32,89 ± 1,62
H. Gluten	52,22 ± 2,06	0,86 ± 0,04	79,70 ± 0,81	0,39 ± 0,06	19,05 ± 0,83
H. Maíz	51,28 ± 1,45	0,77 ± 0,06	42,28 ± 0,48	0,40 ± 0,11	56,56 ± 0,54
H. Soja	53,58 ± 1,28	4,01 ± 0,14	61,12 ± 2,38	2,76 ± 0,43	32,07 ± 2,13
H. Trigo	51,81 ± 1,62	0,89 ± 0,06	40,20 ± 0,63	0,25 ± 0,16	57,18 ± 2,74
H. Cangrejo	51,73 ± 0,85	12,61 ± 0,40	54,91 ± 0,08	4,20 ± 0,52	28,24 ± 0,45
H. Pescado	56,40 ± 2,70	12,11 ± 1,52	84,02 ± 1,30	4,20 ± 0,37	0,00 ± 0,00
L. Alacha	48,93 ± 1,76	5,61 ± 0,61	73,32 ± 2,06	8,82 ± 0,24	14,96 ± 2,35
L. Boga Salvaje	49,93 ± 0,78	4,54 ± 0,62	79,12 ± 1,11	4,22 ± 0,32	12,13 ± 0,90
L. Boga Cultivada	51,37 ± 0,88	2,40 ± 0,20	59,80 ± 2,24	27,33 ± 1,09	10,48 ± 2,04
L. Guisante	53,94 ± 1,98	2,44 ± 0,02	51,57 ± 0,40	0,86 ± 0,09	46,97 ± 3,21
L. Mejillón	51,47 ± 1,75	6,93 ± 0,26	70,08 ± 3,26	1,15 ± 0,18	21,84 ± 2,84
L. Sangre	49,35 ± 1,06	4,09 ± 0,07	94,47 ± 0,46	0,38 ± 0,12	1,06 ± 0,61
P. Clara Huevo	50,20 ± 1,47	2,74 ± 0,08	83,60 ± 1,09	0,63 ± 0,08	13,03 ± 1,14
P. Huevo Entero	51,82 ± 0,93	2,91 ± 0,07	64,49 ± 0,71	21,48 ± 0,71	11,12 ± 0,96
P. Yema Huevo	51,79 ± 1,47	2,93 ± 0,06	63,14 ± 1,73	26,81 ± 1,04	7,32 ± 1,27

**Tabla 3.** Tasa de Alimentación Absoluta en sustancia seca (TAAss), Tasa de Crecimiento diaria (TCA) e Índice de Eficacia Alimentaria (IEA). Valor medio  $\pm$  D.E. de las dietas testadas (Ingrediente) y Estimación  $\pm$  E.E. de las dietas naturales de boga (B. boops) y cangrejo (C) en condiciones experimentales similares.

	Ingrediente	N	Días	TAAss			TCA			IEA (%)
				Ingrediente	Boga	Cangrejo	Ingrediente	Boga	Cangrejo	Ingrediente
HARINAS	Arroz	7	9	1,5 $\pm$ 1,4	5,8 $\pm$ 1,4	11,4 $\pm$ 1,4	-4,7 $\pm$ 4,1	8,7 $\pm$ 1,4	16,7 $\pm$ 1,4	<0,00
	Avena	14	4	1,2 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 1,4	9,1 $\pm$ 1,4	-2,6 $\pm$ 4,4	8,1 $\pm$ 1,4	15,9 $\pm$ 1,4	<0,00
	Cangrejo	6	4	3,2 $\pm$ 1,0	5,3 $\pm$ 1,4	10,5 $\pm$ 1,4	-12,7 $\pm$ 9,71	8,0 $\pm$ 1,4	15,7 $\pm$ 1,4	<0,00
	Garbanzo	8	14	2,1 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 1,4	11,3 $\pm$ 1,4	-3,3 $\pm$ 2,7	9,1 $\pm$ 1,4	17,2 $\pm$ 1,4	<0,00
	Garrofin	8	10	1,0 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 1,4	11,7 $\pm$ 1,4	-6,4 $\pm$ 2,9	9,2 $\pm$ 1,4	17,4 $\pm$ 1,4	<0,00
	Gluten	7	15	3,1 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 1,4	12,5 $\pm$ 1,4	3,9 $\pm$ 1,5	9,2 $\pm$ 1,4	17,4 $\pm$ 1,4	56,85 $\pm$ 20,75
	Maíz	8	9	1,6 $\pm$ 1,4	7,3 $\pm$ 1,4	14,4 $\pm$ 1,4	-8,1 $\pm$ 3,7	10,1 $\pm$ 1,4	18,5 $\pm$ 1,4	<0,00
	Pescado	6	3	1,6 $\pm$ 1,4	5,7 $\pm$ 1,4	11,2 $\pm$ 1,4	-21,4 $\pm$ 6,7	8,9 $\pm$ 1,4	17,0 $\pm$ 1,4	<0,00
	Soja	7	4	1,6 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 1,4	11,2 $\pm$ 1,4	-7,0 $\pm$ 3,8	8,9 $\pm$ 1,4	16,9 $\pm$ 1,4	<0,00
	Trigo	8	3	2,0 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 1,4	8,7 $\pm$ 1,4	0,7 $\pm$ 3,2	7,6 $\pm$ 1,4	15,2 $\pm$ 1,4	3,02 $\pm$ 110,60
LIOFILIZADOS	Alacha	6	9	8,0 $\pm$ 0,9	6,5 $\pm$ 1,4	12,7 $\pm$ 1,4	3,9 $\pm$ 2,5	9,1 $\pm$ 1,4	17,1 $\pm$ 1,4	23,30 $\pm$ 15,16
	Boga Cultivo	5	15	4,6 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 1,4	10,6 $\pm$ 1,4	5,0 $\pm$ 3,9	8,7 $\pm$ 1,4	16,6 $\pm$ 1,4	44,44 $\pm$ 30,92
	Boga Salvaje	6	14	5,4 $\pm$ 1,0	6,9 $\pm$ 1,4	13,6 $\pm$ 1,4	5,1 $\pm$ 2,6	9,9 $\pm$ 1,4	18,2 $\pm$ 1,4	47,38 $\pm$ 16,62
	Guisante	7	14	3,5 $\pm$ 0,7	6,2 $\pm$ 1,4	12,1 $\pm$ 1,4	1,9 $\pm$ 1,6	9,4 $\pm$ 1,4	17,6 $\pm$ 1,4	24,22 $\pm$ 19,00
	Mejillón	8	4	1,8 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 1,4	14,7 $\pm$ 1,4	-8,1 $\pm$ 6,9	10,2 $\pm$ 1,4	18,6 $\pm$ 1,4	<0,00
	Sangre	7	7	5,3 $\pm$ 1,1	6,5 $\pm$ 1,4	12,8 $\pm$ 1,4	2,4 $\pm$ 2,6	9,3 $\pm$ 1,4	17,4 $\pm$ 1,4	24,55 $\pm$ 27,97
POLVO	Clara Huevo	6	9	2,6 $\pm$ 1,6	6,8 $\pm$ 1,4	13,4 $\pm$ 1,4	-4,0 $\pm$ 7,7	9,8 $\pm$ 1,4	18,1 $\pm$ 1,4	<0,00
	Entero Huevo	8	15	1,9 $\pm$ 1,3	5,7 $\pm$ 1,4	11,1 $\pm$ 1,4	-2,2 $\pm$ 5,9	8,7 $\pm$ 1,4	16,7 $\pm$ 1,4	<0,00
	Yema Huevo	6	15	6,0 $\pm$ 1,7	7,2 $\pm$ 1,4	14,1 $\pm$ 1,4	8,9 $\pm$ 4,7	10 $\pm$ 1,4	18,4 $\pm$ 1,4	65,77 $\pm$ 20,48

## Bibliografía

Aguado Giménez F. y García García B. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*. 10: 361-377.



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

---

**“MEJORA DEL VALOR NUTRITIVO DE LAS PRESAS  
VIVAS UTILIZADAS EN PARALARVAS Y  
OPTIMIZACIÓN DE LOS PIENSOS EXTRUSIONADOS  
ACTUALES PARA EL ENGORDE DEL PULPO DE ROCA  
(*Octopus vulgaris*)”**

---



## INDICE

**0.- INTRODUCCIÓN**

**1.- PERSONAL PARTICIPANTE**

**2.- GASTOS**

**3. PLAN DE TRABAJO**

**4.- TRABAJOS REALIZADOS**

**5.- RESULTADOS OBTENIDOS**

## **0.- INTRODUCCIÓN**

Tal como prevé la Cláusula Segunda del Contrato, se presenta el informe de ejecución del proyecto, conteniendo el plan de trabajo, los trabajos realizados y los resultados obtenidos desde Julio de 2011 hasta Noviembre de 2013, además de otra información relevante para el seguimiento del proyecto, como personal participante, gastos, reprogramaciones, etc.

Con motivo de la reducción del Presupuesto del Proyecto, aprobada en la reunión de APROMAR de Mayo de 2012 (65%), se han modificado las actividades presentes en el proyecto original, reduciendo las pruebas de Biomarcadores de estrés, y eliminando las de Digestibilidad “*in vitro*” durante el 2012.

## 1.- PERSONAL PARTICIPANTE

### Universidad Politécnica de Valencia

- + Miguel Jover Cerdá – Catedrático de Universidad  
Doctor Ingeniero Agrónomo
- + Ana Tomas Vidal – Profesora Titular de Universidad  
Doctor Ingeniero Agrónomo
- + Silvia Martínez Llorens - Profesora Titular de Universidad  
Doctora en Ciencias Ambientales
- + Andrés Moñino López – Técnico de Laboratorio  
Ingeniero T. Agrícola
- + Pablo Querol – Becario a cargo de proyecto  
Ingeniero T. Agrícola – Máster en Acuicultura
- + Rosa Baeza Ariño  
Ingeniero T. Agrícola – Máster en Acuicultura

### Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC)

- + Juan Carlos Navarro Tárrega – Investigador Científico  
Doctor en Biología
- + Francisco Amat Doménech – Profesor de Investigación  
Doctor en Biología
- + Francisco Hontoria Danés – Científico Titular  
Doctor en Biología
- + Inmaculada Varó Vaello – Científico Titular  
Doctor en Biología
- + Óscar Monroig Marzá – Doctor Contratado. Programa Juan de la Cierva
- + Diana Guinot Redondo – Becaria-contratada CSIC-Bancaja  
Licenciada en Ciencias del Mar y Ambientales

## **2.- GASTOS**

### **Año 1**

<b>CONCEPTO GASTO</b>	<b>COSTE (€)</b>
Reactivos de análisis cultivo de Artemia	6000
Reactivos de análisis ingredientes y piensos	2333
Material desinfección acuarios, tanques y sistema	438
Agua de Mar	944
Foro Recursos Mariños Rias Baixas	550
Ingredientes piensos	1000
Muestras IRTA	250
Muestras IMIDA	750
<b>TOTAL</b>	<b>12265</b>

### **Año 2**

<b>CONCEPTO GASTO</b>	<b>COSTE (€)</b>
Personal	20.039,0
Viajes muestreos y reuniones	1.619,6
Material Fungible	3.682,4
Reparaciones equipos	10.751,9
Mensajería	220,5
Gastos IATS-CSIC	18.203,0
<b>TOTAL</b>	<b>54.516.4</b>

## **3.- PLAN DE TRABAJO**

El cronograma del plan de trabajo para la realización del proyecto es el siguiente:



Actividad	Invest. Respon.	2011		2012				2013	
		Trimestre		Trimestre				Trimestre	
		3	4	1	2	3	4	1	2
<b>1.-Subproyecto Paralarvas</b>	<b>J.C. Navarro</b>								
1.1. Enriquecimiento Artemia	F. Hontoria	x	x	x	x	x			
1.2. Bio-marcadores estrés	I. Varó								
1.3. Análisis bioquímico	J.C. Navarro	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>2.- Subproyecto Sub-adultos</b>	<b>M. Jover</b>								
2.1. Optimización piensos extrusionados	A. Tomás	x	x	x	x	x	x	x	x
2.2. Digestibilidad “in vitro”	S. Martínez								

## **4.- TRABAJOS REALIZADOS**

### **SUB-PROYECTO 1: PARALARVAS**

- Estandarización de un sistema de cultivo de metanauplios de *Artemia* de 5 días para su posterior enriquecimiento. Cambios estructurales de las clases de lípidos tras el enriquecimiento.
- Enriquecimiento de metanauplios de *Artemia* en fosfolípidos y ácidos grasos esenciales como dieta de paralarvas de pulpo común (*O. vulgaris*)
- Puesta a punto de biomarcadores bioquímicos y de estrés de paralarvas de pulpos: RNA/DNA, proteínas de estrés (hsp)

### **SUB-PROYECTO 2: SUBADULTOS**

- Efecto del uso de saborizantes marinos en la aceptabilidad y crecimiento del pulpo.
- Prueba de Aceptación en Sistema de recirculación.
- Efecto del uso de harina de calamar en la aceptabilidad y crecimiento del pulpo.
- Disminución de aglutinantes y atrayentes en la dieta con harina de calamar para conseguir mayores crecimientos.

## **5.- RESULTADOS Y OBTENIDOS**

### **5.1. Estandarización de un sistema de cultivo de metanauplios de Artemia de 5 días para su posterior enriquecimiento. Cambios estructurales de las clases de lípidos tras el enriquecimiento.**

De los experimentos realizados en la primera anualidad del proyecto, se desprende que es posible enriquecer metanauplios de *Artemia* en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) y en fosfolípidos, de modo sincrónico. A partir de aquí, los estudios se han encaminado a estudiar la forma molecular en la que los HUFA se concentran en los nauplios tras un enriquecimiento en fosfolípidos ricos en estos

compuestos. De entre los HUFA, se ha prestado énfasis especial en el destino del ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA). Los resultados apuntan a que los metanauplios convierten activamente los ácidos grasos de los fosfolípidos, con un traslado preferente del DHA desde dichos fosfolípidos, a los triglicéridos.

El planteamiento experimental se basó en el enriquecimiento de metanauplios de Artemia de 5 días de edad, durante 4 horas, con los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 1: mezcla de lecitina de soja y Easy DHA Selco (producto comercial) (SL+SS)
- Tratamiento 2: dispersión del producto LC60 constituido por fosfolípidos de krill ricos en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, especialmente DHA.

Al final del periodo de enriquecimiento, los metanauplios enriquecidos fueron recolectados, lavados y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se analizaron. La analítica consistió en extracciones de lípidos totales que se fraccionaron en polares, y neutros, dividiéndose a su vez éstos en triglicéridos por un lado, y en monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres, por otro. De cada fracción se analizaron los perfiles de ácidos grasos. Algunos de los resultados de los perfiles de ácidos grasos de los productos enriquecedores y de los de los metanauplios enriquecidos, se recogen en las tablas 1, 2 y 3.

Los patrones de ácidos grasos resultantes se integraron en modelos quimiométricos (Análisis de Componentes Principales), que junto con los datos presentados en las mencionadas tablas, permitieron concluir lo siguiente:

Se obtuvo claramente una distribución diferencial de patrones de ácidos grasos correspondientes a los lípidos totales, neutros y polares respectivamente. Los lípidos polares se asociaban a los siguientes ácidos grasos: 18:0, 18:4n-3, 18:3n-3, 20:0, 20:3n-3 y 22:0, presentaban baja dispersión y eran remarcablemente similares entre tratamientos. Los perfiles de los lípidos neutros se correspondían con las siguientes variables: DHA, 16:1n-7, 18:2n-6, 20:4n-3 y 22:1n-11. Además, estos patrones estaban menos agregados, reflejando el efecto del enriquecimiento, frente a los perfiles

estructurales propios de la composición corporal metanaupliar. Los patrones de los ácidos grasos totales mostraban una distribución intermedia reflejando el efecto de los polares y neutros de la dieta.

Los metanauplios de Artemia, convierten activamente los ácidos grasos de los lípidos polares de las dietas enriquecedoras traslocándolos en los triglicéridos, siendo este proceso mucho más patente para el DHA, que es el ácido graso poliinsaturado de cadena larga esencial por excelencia. La asimilación y metabolismo de los ácidos grasos de los enriquecedores por parte de los metanauplios supone pues un notable inconveniente en el intento de vehicular ácidos grasos esenciales en los fosfolípidos de las presas vivas, por lo que se requieren más estudios tendentes a dilucidar las causas de las conversiones aquí expuestas si se desea optimizar los protocolos enriquecedores correspondientes.

**Tabla 1. Ácidos grasos (en porcentaje del total de los ácidos grasos) de los lípidos totales, polares y neutros de los productos (Marine Lecithin LC60 y Lecitina de Soja) utilizados en las dietas enriquecedoras**

	Marine Lecithin LC60			Lecitina de soja		
	Lípidos totales	Lípidos polares	Lípidos neutros	Lípidos totales	Lípidos polares	Lípidos neutros
14:0	1.5	1.4	3.3	0.1	0.1	0.6
15:0	0.6	0.6	0.8	0.1	0.1	0.4
16:0	31.2	33.0	20.1	21.7	22.8	15.9
16:1n-7	0.5	0.1	2.5	0.1	0.1	ND
16:2	0.9	0.9	1.9	0.1	0.2	2.0
18:0	4.1	4.0	6.4	3.7	3.8	5.8
18:1	2.1	3.7	24.3	15.2	15.6	28.4
18:2n-6	0.5	0.2	4.1	52.0	51.5	31.6
18:3n-3	ND	0.1	3.1	4.1	4.1	2.9
18:4n-3	0.1	0.1	1.1	ND	0.0	ND
20:0	ND	0.1	ND	0.1	0.2	0.5
20:1n-9	4.9	4.4	4.4	ND	0.1	ND
20:4n-6	1.8	1.8	0.7	ND	ND	ND
20:5n-3	13.7	13.1	6.1	ND	0.0	ND
22:0	ND	0.5	ND	0.4	0.4	ND
22:1n-11	0.7	0.8	0.6	ND	ND	ND
22:6n-3	33.0	26.5	7.8	ND	0.0	ND

N.D.: no detectados

*Tabla 2. Ácidos grasos (en porcentaje del total de los ácidos grasos) de los lípidos totales, polares (PL) y neutros (NL) de los metanauplios de Artemia enriquecidos con el Tratamiento 1. NL incluye dos fracciones, una corresponde a los triglicéridos (TAG), y la segunda a la combinación de monoglicéridos (MAG), diglicéridos (DAG) y ácidos grasos libres (FFA). Los datos son medias  $\pm$  SD (n=3).*

	SL +SS			
	Lípidos totales	PL	NL	
			TAG	MAG, DAG y FFA
14:0	0.9 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1
15:0	0.4 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 1.5
16:0	14.2 $\pm$ 0.2	12.9 $\pm$ 0.4	13.6 $\pm$ 0.90	11.0 $\pm$ 0.7
16:1n-7	3.6 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 1.4
16:2	0.6 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.8
16:3	0.5 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	ND
18:0	7.2 $\pm$ 0.1	10.1 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.3
18:1	26.2 $\pm$ 0.5	30.1 $\pm$ 0.6	20.4 $\pm$ 0.7	25.4 $\pm$ 1.0
18:2n-6	9.1 $\pm$ 0.9	6.8 $\pm$ 0.4	10.9 $\pm$ 1.1	14.1 $\pm$ 1.6
18:3n-3	11.2 $\pm$ 0.5	16.3 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 1.0	9.9 $\pm$ 0.5
18:4n-3	2.2 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 0.1
20:0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.2
20:1n-9	1.8 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	ND	ND
20:4n-6	1.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1
20:3n-3	0.4 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	ND
20:4n-3	0.4 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.1
20:5n-3	7.6 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 0.8
22:0	0.4 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.8	ND
22:1n-11	0.5 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.1
22:5n-3	0.5 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
22:6n-3	5.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.1	10.4 $\pm$ 0.7	12.7 $\pm$ 1.2

N.D.: no detectados

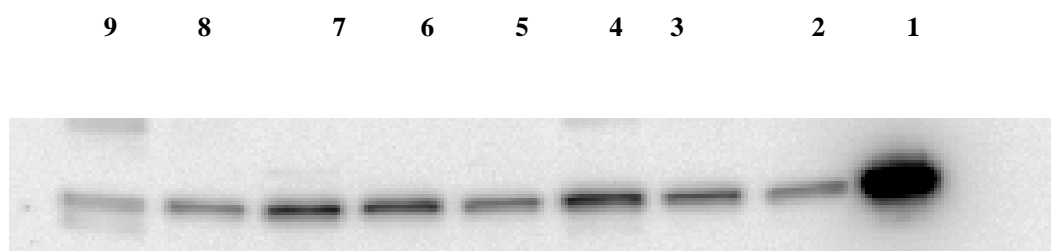
*Tabla 3. Ácidos grasos (en porcentaje del total de los ácidos grasos) de los lípidos totales, polares (PL) y neutros (NL) de los metanauplios de Artemia enriquecidos con el Tratamiento 2. NL incluye dos fracciones, una corresponde a los triglicéridos (TAG), y la segunda a la combinación de monoglicéridos (MAG), diglicéridos (DAG) y ácidos grasos libres (FFA). Los datos son medias  $\pm$  SD (n=3).*

	Lípidos totales	PL	NL	
			TAG	MAG, DAG y FFA
14:0	0.7 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2
15:0	0.4 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.6
16:0	19.4 $\pm$ 0.4	15.6 $\pm$ 0.5	20.6 $\pm$ 1.8	16.3 $\pm$ 2.8
16:1n-7	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	ND
16:2	0.4 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.1
16:3	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	ND
18:0	7.6 $\pm$ 0.1	10.3 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 3.0	4.8 $\pm$ 1.0
18:1	17.8 $\pm$ 0.1	25.9 $\pm$ 1.9	10.2 $\pm$ 1.0	12.3 $\pm$ 3.8
18:2n-6	2.8 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.6
18:3n-3	11.2 $\pm$ 0.5	16.5 $\pm$ 0.5	6.6 $\pm$ 1.5	9.1 $\pm$ 1.3
18:4n-3	2.0 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2
20:0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	3.9 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.1
20:1n-9	2.4 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.1	ND	ND
20:4n-6	1.8 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.1
20:3n-3	0.4 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	ND
20:4n-3	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	ND
20:5n-3	12.6 $\pm$ 0.4	10.2 $\pm$ 0.7	14.7 $\pm$ 2.8	18.3 $\pm$ 1.8
22:0	0.4 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.2	ND	ND
22:1n-11	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	ND
22:5n-3	0.2 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.10	ND
22:6n-3	13.1 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.1	22.2 $\pm$ 4.6	26.0 $\pm$ 2.3

N.D.: no detectados

Se continúa trabajando en la puesta a punto de biomarcadores bioquímicos y de estrés de para-larvas de pulpos: RNA/DNA, proteínas de estrés (HSP).

En la Fig. 1 se muestra una imagen correspondiente a un análisis de proteínas HSP70 en paralarvas de cultivo. Analíticamente, la puesta a punto de estas metodologías supone un reto que está dando los primeros frutos.



*Figura 1: Inmunodetección de HSP70 en paralarvas de pulpo alimentadas con diferentes dietas, a lo largo del cultivo. 1= patrón hsp70; 2 y 5= ayuno; 0 días, 3= zoea, 5 días; 4=Artemia,5 días; 6= ayuno, 5 días; 7=zoea, 16 días; 8=Artemia,30 días, 9= zoea, 30 días*

## **5.2. Enriquecimiento de metanauplios de *Artemia* en fosfolípidos y ácidos grasos esenciales como dieta de paralarvas de pulpo común (*O. vulgaris*)**

### Introducción

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) es un excelente candidato para diversificar las especies de la acuicultura mediterránea. Sin embargo, su cultivo está limitado por las altas mortalidades que se dan durante la fase paralarvaria. Diversos estudios nutricionales han destacado que algunos componentes de la dieta tienen gran importancia en la prevención de estas mortalidades. Los fosfolípidos (PL) y algunos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), como el docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) y el eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), que se consideran nutrientes esenciales para paralarvas de pulpo, no se encuentran en cantidades suficientes en la composición de los nauplios y metanauplios de *Artemia*, la presa viva que se utilizan normalmente. Pese a que se usan protocolos de enriquecimiento para aumentar el contenido de PL y PUFA en nauplios de *Artemia*, se desconocen las condiciones específicas para enriquecer sus

fases más avanzadas (metanauplios), que son de un tamaño más adecuado para las paralarvas de pulpo.

### Resultados

Se consiguió incrementar la fracción de PL de los metanauplios de Artemia en sólo 2 h, de enriquecimiento, utilizando liposomas de lecitina de soja, pero ello iba en detrimento del aporte de PUFAs, en comparación con los metanauplios enriquecidos con emulsión comercial. Estos resultados indicaron que era necesario un enriquecimiento simultáneo con liposomas y emulsión comercial para vehicular ambos nutrientes (PL y PUFAs). En pruebas posteriores, se consiguió aumentar el contenido de PL y PUFAs esenciales simultáneamente en los metanauplios de Artemia, combinando emulsiones con PUFAs y liposomas. No se observaron mejoras en el contenido de PUFAs al administrar los productos de enriquecimiento por separado, por lo que se estableció una estrategia de enriquecimiento simultáneo simple y barata. Finalmente, mediante el enriquecimiento con fosfolípidos de krill ricos en PUFAs, y especialmente DHA, se puso a punto un protocolo de enriquecimiento todavía más directo para obtener nauplios y metanauplios de Artemia más ricos en PL y PUFAs.

Establecido dicho protocolo, se procedió a estudiar los cambios estructurales de las clases de lípidos tras el enriquecimiento, haciendo un seguimiento de la forma molecular en la que los PUFAs (especialmente el DHA) se concentran en la Artemia tras un enriquecimiento en fosfolípidos ricos en estos compuestos. Los resultados obtenidos muestran que los nauplios y metanauplios convierten activamente los ácidos grasos de los fosfolípidos, trasladándolos a los triglicéridos. Esta translocación en los triglicéridos, es mucho más patente para el DHA, que es el ácido graso poliinsaturado de cadena larga esencial por excelencia. La asimilación y metabolismo de los ácidos grasos de los enriquecedores por parte de los nauplios y metanauplios supone pues un notable inconveniente en el intento de vehicular ácidos grasos esenciales en los fosfolípidos de las presas vivas, por lo que se requieren más estudios tendentes a dilucidar las causas de las conversiones aquí expuestas si se desea optimizar definitivamente los protocolos enriquecedores correspondientes.

### [5.3. Puesta a punto de biomarcadores bioquímicos y de estrés de paralarvas de pulpos: RNA/DNA, proteínas de estrés \(hsp\)](#)



### Introducción

Las causas de las masivas mortalidades de las paralarvas de pulpo durante los primeros 30 días de vida, son aún desconocidas, y representan un obstáculo aún insalvable para el cultivo comercial de la especie.

### Objetivo

Investigar las causas de las mortalidades masivas mediante la selección y puesta a punto de biomarcadores de estrés basados la determinación del contenido de ácidos nucleicos (RNA/DNA) y de los niveles de las proteínas de estrés Hsp70, de paralarvas procedentes de experimentos de alimentación y nutrición.

### Resultados

Se pusieron a punto las metodologías para la determinación de los biomarcadores mencionados. Se observó una bajada de la relación RNA/DNA de las paralarvas sometidas a ayuno. Los tratamientos dietarios ensayados no produjeron cambios en dicha relación. Las proteínas de estrés Hsp70 también fueron inferiores en los animales en ayuno. Se pudo establecer alguna asociación entre los niveles de estas proteínas, y los tratamientos dietarios presumiblemente óptimos, y además se pudieron correlacionar con mortalidad y crecimiento. Más allá de estos resultados iniciales, el verdadero valor del trabajo realizado estriba en la puesta a punto de estas metodologías que pueden suponer una herramienta muy valiosa para el análisis de experimentos zootécnicos.

### Conclusiones

Los resultados parecen apuntar a que la ratio RNA/DNA puede ser un buen indicador de ayuno, mientras que los niveles de Hsp70 pueden ser un buen biomarcador del estado nutricional de las paralarvas.

#### **5.4.- Efecto del uso de saborizantes marinos.**

Como ya se adelantó en el primer informe presentado el año pasado, en otoño de 2011 se realizaron varias pruebas para estudiar el efecto sobre la aceptabilidad y consumo de alimento de diferentes atrayentes-saborizantes de origen marino en las dietas extrusionadas ya probadas con anterioridad en *Octopus vulgaris*. Estas pruebas se llevaron a cabo en las instalaciones IMIDA en San Pedro del Pinatar (prueba de aceptación) y en las del IRTA en San Carles de la Rapita (prueba de engorde). Uno de los objetivos de la adición de estos saborizantes era la disminución de la huevina en los piensos para pulpo, y la posible sustitución de ésta por materias primas de amplio uso en acuicultura que mejoraran el crecimiento del pulpo con piensos extrusionados.

##### **5.4.1. Primer ensayo**

###### **Instalaciones San Pedro del Pinatar (IMIDA)**

Antes de comenzar la prueba se realizó un muestreo de control, donde los pulpos fueron pesados individualmente dos veces, para asegurar un peso más real de cada animal. El peso medio estuvo entre 500 y 600 g.

La prueba se llevó a cabo en las instalaciones de San Pedro del Pinatar (Murcia) y comenzó con 10 pulpos (5 pulpos para cada tratamiento) alojados en 10 tanques de fibra de vidrio de 93 litros de volumen, con un caudal de renovación constante para asegurar una tasa de saturación de oxígeno del 99%. El aporte de agua era directo del mar, aunque se podía regular la temperatura mediante una bomba de calor, con un valor medio de 18,4°C.



*Figura 2. Alojamiento de los pulpos (IMIDA)*



*Figura 3. Muestreo y pesaje*

Se fabricaron 4 piensos experimentales extrusionados, en los que se redujo la cantidad de huevina y maltodextrina, incrementando la harina de pescado y de krill (Tabla 4) con respecto a pruebas anteriores, para estudiar la aceptabilidad y el crecimiento, en dos de ellas suplementadas con un saborizante marino (H20  $\beta$  y H10  $\beta$ , con esencia de marisco) para paliar el efecto de la disminución de la huevina y dos sin este attractante (H20 y H10). El saborizante estaba constituido por la esencia marina líquida, fijada con una base de levadura. Las dietas bajo estudio, fueron realizadas en la fábrica de piensos de la Universidad Politécnica de Valencia, usando un extruder semi industrial Clextral BC45, bajo condiciones de 100°C y 50 ATM. Los pellets tuvieron un diámetro de 1cm y una longitud de entre 4-5 cm.

*Tabla 4. Composición de las dietas experimentales (%) en prueba IMIDA*

	GELATINA	MALTODEX	HUEVINA	HARINA PESCADO	KRILL	SABORIZANTES
<b>H20 <math>\beta</math></b>	19,4	9,7	19,4	38,8	9,7	3
<b>H10 <math>\beta</math></b>	19,4	9,7	9,7	43,7	14,5	3
<b>H20</b>	20	10	20	40	10	0
<b>H10</b>	20	10	10	45	15	0

La alimentación se realizó en una sola toma a las 9 de la mañana, y se retiraron los restos del alimento no ingerido a las 4 horas (13.00 h). Los restos se pesaron y anotaron, para luego calcular la ingesta real de los pulpos aplicándoles un factor de corrección a los datos que contemplara la pérdida por disgregación en agua y la ganancia de humedad.

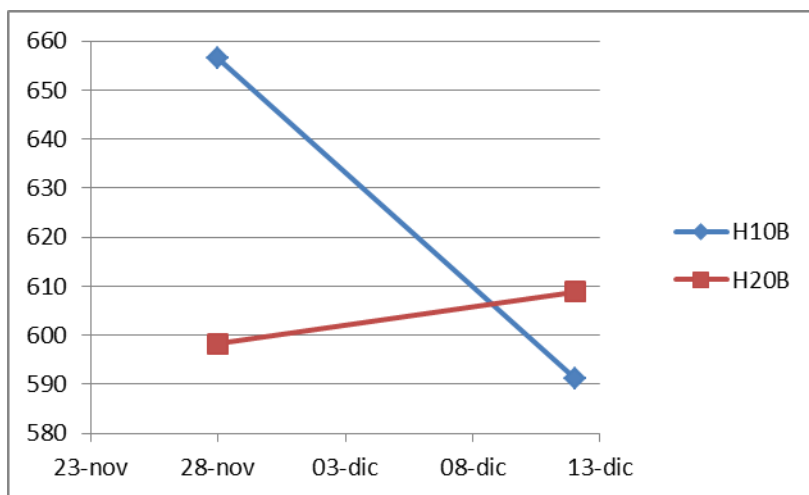


*Figura 4. Dietas experimentales*

Una vez concluidas dos semanas de ensayo con las dietas con atrayentes, se dejó a los animales descansar 1 mes, dándoles de nuevo alimento natural fresco con el fin de que cualquier efecto sobre el comportamiento del animal debido a las dietas, no influenciara la otra prueba. Pasado este tiempo, se les suministró el mismo pienso pero sin atrayentes.

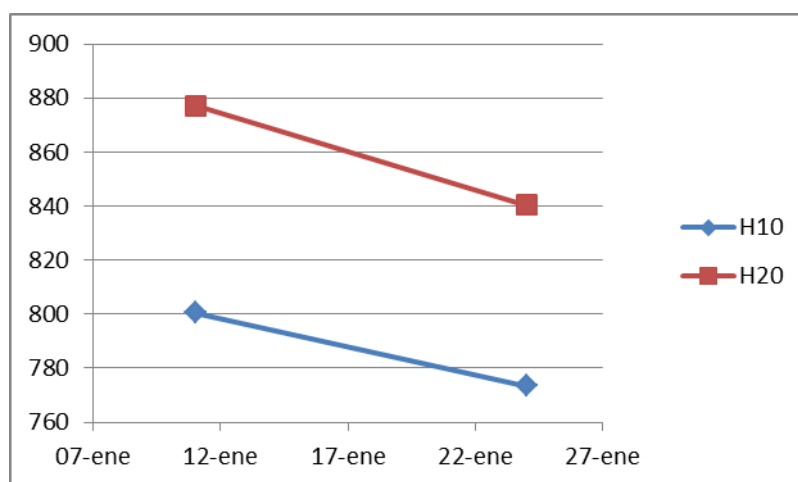
## **Resultados**

Durante la fase con atrayentes, se observó una marcada diferencia en el comportamiento de ambos grupos, viendo que aunque, el grupo del pienso H20, mostrara unos crecimientos muy bajos, en torno a 11 g (Fig. 5), fue claramente mejor que el grupo alimentado con la dieta H10, donde llegaron a perder alrededor de 70 g de peso.



*Figura 5. Evolución del peso medio (g) en dietas con atrayentes*

Sin embargo, en la prueba sin atrayentes, ambas dietas mostraron el mismo comportamiento, y en ambas el resultado fue una pérdida de peso entorno a los 35 g (Fig. 6).



*Figura 6. Evolución del peso medio (dietas sin atrayentes)*

**Tabla 5. Parámetros de crecimiento y eficiencia nutritiva de los pulpos alimentados con las dietas experimentales**

	<b>H10 β</b>	<b>H20 β</b>	<b>H10</b>	<b>H20</b>
IP (g)	-65.3 ± 25.8	10.6 ±23.1	-40.0 ±23.1	-36.9 ± 25.8
TAA (g/día)	0.83 ±0,75 a	2.25 ± 0.68 a	2.00 ± 0.68 a	4.75 ±0,75 b
IEA (%)	-560.8 ±188.3	-47.7 ± 168.4	- 394.0 ±168.4	-148.1 ±188.3
TCA (g/día)	-4.65 ± 1.84	0.76 ± 1.64	-2.86 ± 1.64	-2.63 ± 1.84
TAR (%P/día)	0,13 ± 0,10 a	0.38 ± 0,10ab	0.25 ± 0,10ab	0.56 ± 0,10 b

**Nota,** Letras distintas indican diferencias estadísticas entre las medias, Test Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), IP, incremento de peso; TAA, Tasa de alimentación diaria; IEA, índice de eficiencia alimentaria; TCA, Tasa de crecimiento diario, TAR, tasa de alimentación relativa.

Los resultados de crecimiento, aunque malos en ambas fases (IP y TCA, Tabla 5), muestran como la inclusión de saborizantes, provocó una menor ingesta (diferencia entre H10 y H20 respecto H 10 β y H20 β, respectivamente). La dieta H20 β es un buen ejemplo, pues produjo un leve crecimiento con saborizantes, mientras que sin ellos, la dieta H20, originó pérdidas de peso. Resulta muy sorprendente que los pulpos que presentan una mayor ingestión tengan un menor crecimiento, aunque no se tiene ninguna explicación de momento.

Claramente, la disminución de la huevina en las dietas extrusionadas ha afectado a la ingestión (diferencias de tasas de alimentación entre los H10 y los H20) no siendo los atractantes probados capaces de compensar la atracción de la huevina.

## 5.4.2 Segundo ensayo

### Instalaciones San Carles de la Rápita (IRTA)

Ejemplares de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*) fueron capturados con arte de arrastre en San Carlos de la Rápita y transportados trasladados a las instalaciones del IRTA (San Carles de la Rápita), donde fueron alojados en tanques y mantenidos en circuito abierto (T= 19° C) de agua de mar.

El experimento comenzó tras un periodo de adaptación de aproximadamente dos semanas, periodo en el cual se les alimentó con cangrejo y lisa. Se ensayaron tres tipos de dietas: dos piensos extrusionados con distintos saborizantes, y una dieta control a base de cangrejo y pescado (Tabla 6).

Las dietas siguen la base en composición de los piensos con los que se obtuvieron los mejores resultados en anteriores pruebas (son dietas similares a la H20 Y 3HPK del anterior proyecto Optipulpo). Se utilizaron dos atractantes, uno con esencia de marisco (H20m, el mismo que en el ensayo anterior) y otro con esencia de calamar (H20c).

**Tabla 6. Composición dietas experimentales (%) en prueba IRTA**

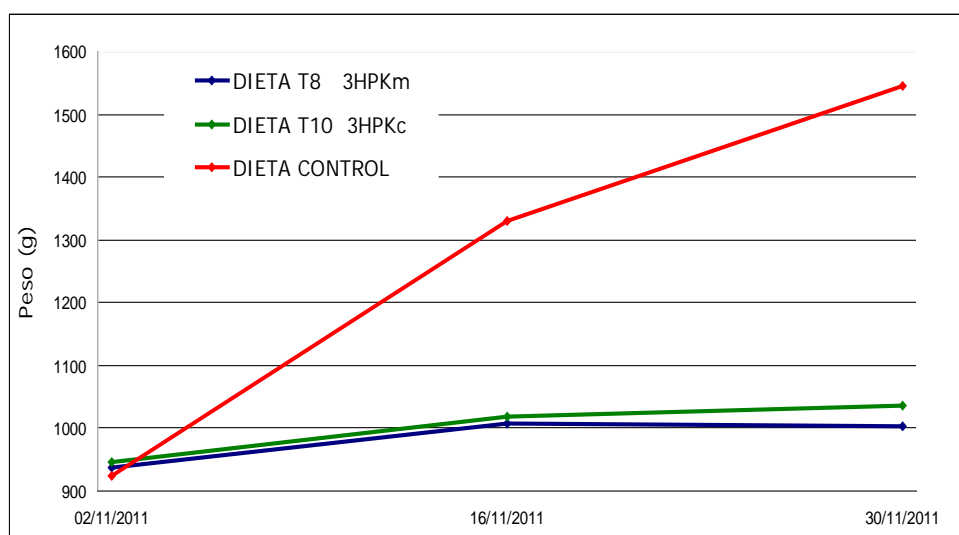
	GELATINA	MALTODEX	HUEVINA	H. PESCADO	KRILL	SABORIZANTE	TAURINA
<b>H20c</b>	20	10	24	29	10	5	2
<b>H20m</b>	20	10	24	29	10	5	2

Una vez adaptados a la instalación, se distribuyeron en tres tanques (uno para cada dieta), separados cada uno de ellos en seis compartimentos, donde se alojaron 6 pulpos. La alimentación se realizó una vez al día a las 9 de la mañana y a las 14 horas se recogían los restos de alimento no consumido, para poder realizarse el cálculo de las ingestas. Las tasas de alimentación fueron de un 4% en el caso de los pulpos que comían el alimento natural cuando este consistía en pescado, de un 10% si era cangrejo, y entre un 1 y un 2% con las dietas secas.

Los muestreos de peso se realizaron cada 15 días, pesando de forma individual cada uno de los pulpos de los tres tratamientos. Para ello, se sacaban los seis pulpos de cada compartimento, se introducían individualmente en una malla, posteriormente se devolvían a su tanque. La prueba tuvo una duración de 4 semanas.

## Resultados

En la Figura 7 se muestra la evolución del crecimiento obtenido durante la prueba, donde lógicamente, se observa un crecimiento mayor de los pulpos alimentados con alimento natural (cangrejo y lisa). Mientras que las dos dietas extrusionadas presentan un comportamiento similar.



**Figura 7. Evolución del crecimiento de los pulpos alimentados con las dietas artificiales enriquecidas con atractantes.**

El alimento natural, proporcionó aumentos de peso medios de 620g mientras que con ambas dietas extrusionadas fueron inferiores a 100g durante estas 4 semanas (66g para H20c y 92g para H20m).



## **5.5. Prueba de Aceptación en Sistema de recirculación.**

Durante el mes de Febrero de 2012, se llevó a cabo en las instalaciones de la granja de acuicultura de la Universidad Politécnica de Valencia, una prueba de aceptación de pienso extrusionado. Se compararon dos grupos, uno alimentado con alimento natural, boga y cangrejo, y otro alimentado con una dieta seca a base de harina de pescado y krill.

Pruebas con piensos similares se habían llevado a cabo ya en varias ocasiones en el anterior Proyecto Jacumar sobre alimentación de pulpo (Optipulpo), pero con resultados bastante malos de aceptación y crecimiento, tanto en los pulpos alimentados con las dietas extrusionadas como con alimento natural. La posible causa de ello era que siempre se habían tenido diferentes especies conjuntamente en la instalación, por lo que esta vez se decidió realizar un vacío sanitario de la misma, llenándola con agua de mar y únicamente pulpo como especie a engordar.

Esta prueba nos sirvió para divulgar la noticia de que por primera vez se había conseguido que los pulpos consumieran y crecieran ligeramente con un pienso extrusionado diseñado en la Universidad politécnica de Valencia.

*Radio Televisión Valenciana*

[http://www.rtvv.es/va/ciencia\\_i\\_tecnologia/Investigadors-Politecnica-creen-artificial-polps\\_0\\_655734485.html](http://www.rtvv.es/va/ciencia_i_tecnologia/Investigadors-Politecnica-creen-artificial-polps_0_655734485.html)

*UPV Televisión*

<http://www.youtube.com/watch?v=OnvohABSUOI>

### **Material y métodos**

La prueba comenzó con 10 pulpos capturados en las costas de Cases d'Alcanar (Tarragona) y trasladados a las instalaciones de la UPV. Todos ellos fueron alojados individualmente en tanques de fibra de vidrio de 1700l, de los cuales solo se lleno un tercio, dejando 2 terceras partes del tanque vacío para evitar fugas. Cada tanque contenía un refugio en forma de tubo de PVC o nasas de arcilla.

El sistema de tanques estaba dentro de un sistema de recirculación cerrada, con renovación constante de agua asegurando una saturación de oxígeno cercana al 98%.



*Figura 8. Tanques y alojamientos de los pulpos en las instalaciones de la UPV.*

Se fabricó una dieta experimental (Tabla 7) en la fábrica de piensos de la Universidad Politécnica de Valencia, usando un extruder semi industrial Clextral BC45, bajo condiciones de 100°C y 50 ATM, similar a la utilizada en las pruebas del proyecto Optipulpo con las que se habían obtenido buenos resultados.

*Tabla 7. Composición dietas experimentales (%).*

	GELATINA	MALTODEX.	HUEVINA	H. PESCADO	KRILL	TAURINA
<b>3HPK</b>	19,6	9,8	29,4	29,4	9,8	2

Los pellets tuvieron un diámetro de 1cm y una longitud de entre 4-5 cm,



*Figura 9. Detalle de la dieta artificial utilizada para la alimentación del pulpo.*

La alimentación se realizó en una sola toma a las 9 de la mañana, acercando los gránulos con ayuda de unas pinzas (Figura 9 y 10) y se retiraron los restos del alimento no ingerido a las 4 horas (13,00h).

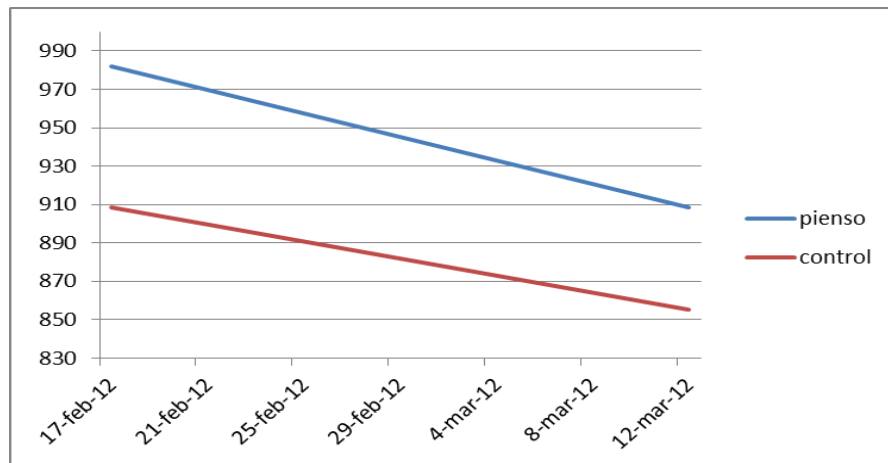


*Figura 10. Detalle del suministro de los pellets a los pulpos de forma diaria.*

## **Resultados**

Después de 24 días de ensayo, hubo que parar la prueba debido a la falta de ingesta de los animales, ocasionada, posiblemente como ya se comentó en el informe final proyecto anterior, Optipulpo, por la incapacidad de producir esta especie en un sistema de recirculación, a pesar de que las condiciones del mismo fueran las óptimas.

Los resultados ocasionados (Fig, 11), fueron pérdidas de peso constantes en los pulpos alimentados tanto con la dieta extrusionada como con el alimento natural, por lo que puede decir que no fue debido a una mala composición de las dietas, ya que los pulpos alimentados con alimento natural, en ese tiempo deberían de haber doblado su peso, y en este caso también sufrieron pérdidas.



*Figura 11. Evolución de los pesos de los pulpos alimentados con ambas dietas en las instalaciones de la UPV.*

## **5.6. Efecto del uso de harina de calamar en la aceptabilidad y crecimiento del pulpo**

Dados los buenos resultados obtenidos con los pienso que combinaban distintas proporciones de harina de pescado y krill, probados en las instalaciones del IRTA en Tarragona en la última prueba del OPTIPULPO, se plantea una prueba similar pero en este caso con la inclusión de harina de calamar en lugar de harina de krill para ver si en este caso se consiguen mayores ingestas y crecimiento,

Este cambio viene motivado, por estudios recientes, que demuestran la necesidad que tiene el pulpo de arginina, un aminoácido muy concreto que abunda especialmente en la carne de los cefalópodos. Su ausencia o bajos niveles del mismo en las dietas, puede provocar una menor síntesis de proteínas en el organismo del animal, y esto producir menores crecimientos.

### **Material y métodos**

Ejemplares de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*) fueron capturados con arte de arrastre en las costas de Cases d'Alcanar y transportados a las instalaciones del IRTA (San Carles de la Rápita), donde fueron alojados en tanques y mantenidos en circuito abierto (T= 19° C) de agua de mar.

El experimento comenzó tras un periodo de adaptación de aproximadamente quince días, periodo en el cual se les alimentó con cangrejo.

Se ensayaron tres tipos de dietas: dos piensos extrusionados con distintas proporciones de harina de calamar y harina de pescado, con yema de huevo y gelatina, y una dieta control a base de cangrejo y pescado (Tabla 8).

**Tabla 8. Composición de las dietas extrusionadas (%)**

	GELATINA	MALTODEXTRINA	HUEVINA	H, PESCADO	CALAMAR	TAURINA
<b>HPC</b>	19,6	9,8	29,4	19,6	19,6	2
<b>3HPC</b>	19,6	9,8	29,4	29,4	9,8	2

HPC se refiere a una dieta con igual proporción de harina de pescado (19,6%) y calamar y 3HPC tiene tres veces de harina de pescado y una de calamar (29,4 y 9,8%)

La fabricación de los piensos se llevó a cabo en la Universidad Politécnica de Valencia, usando un extruder semi industrial Clextral BC45, bajo condiciones de 100°C y 50 ATM.



**Figura 12. Detalle de la fabricación y de las dietas experimentales**

La composición nutritiva de las dietas puede verse en la Tabla 9. Aunque los datos están expresados en materia húmeda, se observa una gran diferencia en el contenido en grasa de las dietas, que al expresarla en seco es del doble para los dos piensos, del orden de 20% frente a 10% en la dieta control.

*Tabla 9. Composición proximal de las dietas experimentales (expresada en porcentaje de peso húmedo)*

	<b>Control</b>	<b>HPC</b>	<b>3HPC</b>
Humedad (%)	78,23	18,61	13,43
Proteína bruta (%mh)	12,46	49,52	53,38
Grasa bruta (%mh)	2,36	16,43	18,56
Cenizas (%mh)	4,02	15,34	16,04

Una vez adaptados a la instalación, los pulpos se distribuyeron en tres tanques (Figura 13), separados cada uno de ellos en seis compartimentos, donde se alojaron 6 pulpos.



*Figura 13. Tanques tabicados en 6 compartimentos (IRTA)*

La alimentación se realizó una vez al día a las 9 de la mañana, y a las 14 horas se recogía de los restos de alimento no consumido, para poder realizarse el cálculo de las ingestas. Las tasas de alimentación suministradas fueron de un 4% en el caso de los pulpos que comían el alimento natural cuando este consistía en pescado, de un 10% si era cangrejo, y de un 1% con las dietas secas. Los muestreos de peso se realizaron cada 14 días, pesando de forma individual cada uno de los pulpos de los tres tratamientos. Para ello, se sacaban los seis pulpos de cada compartimento, se introducían individualmente en una malla y posteriormente se devolvían a su tanque.



*Figura 14. Detalle del muestreo y pesaje de los pulpos cada 15 días.*

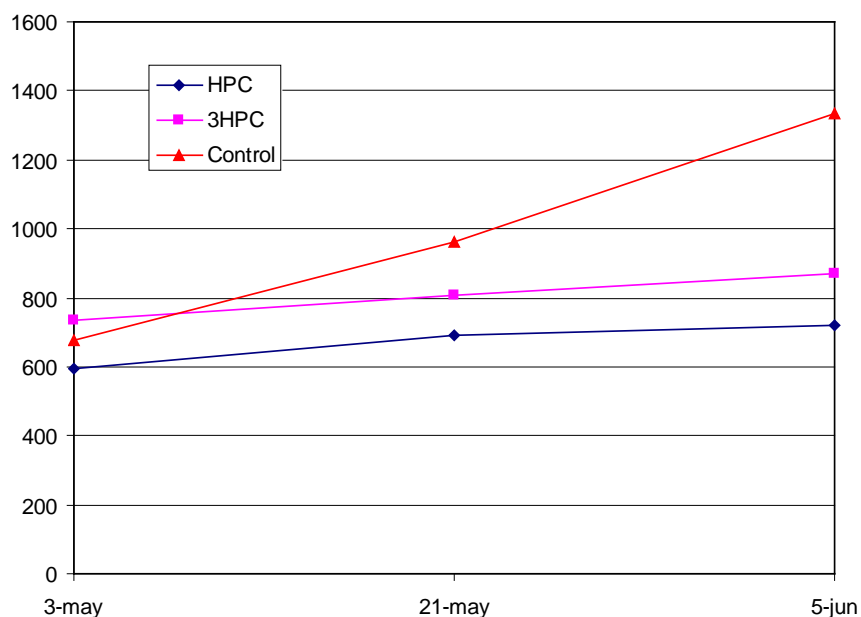
Durante la prueba se fueron recogiendo las heces de los distintos tanques, a fin de poder analizar la digestibilidad de las dietas, una vez terminada la prueba.

La prueba concluyó a las 4 semanas, dado el aumento de la temperatura del agua, la cual rondaba los 24°C, ya que rondando esta temperatura, la ingesta disminuye hasta casi ser nula.

Tras finalizar la prueba, los pulpos se trajeron a la UPV donde se analizaron todos los pulpos en experimentación, tres de cada tratamiento fueron analizados enteros, y los otros tres fueron analizados separando glándula digestiva y músculo.

## **Resultados**

Tras las 4 semanas de experimento se obtuvieron crecimientos significativos con las dos dietas experimentales, aunque muy lejos aún de los crecimientos que se pueden obtener con alimento natural como muestra la Figura 15 y Tabla 10. La ingestión en materia húmeda fue claramente diferente, y también en materia seca, del doble para la dieta control (10%/d) frente a las secas (5-6%).



**Figura 15. Evolución de los pesos de los pulpos alimentados con las dietas experimentales**

**Tabla 10. Parámetros de crecimiento y eficiencia nutritiva de los pulpos alimentados con las dietas experimentales**

	HPC	3HPC	Control
IP (g)	123,75 ± 19,31 a	142,5 ±102,75 a	659,16 ±104,28 b
IPR (%)	21,58 ± 6,59 a	22,20 ±16,77 a	105,39 ± 34,43 b
IT (g)	204,08 ±47,33 a	176,07 ± 67,30 a	1283,15 ±290,1 b
TAA (g/d)	7,28 ±1,69 a	6,28 ± 2,40 a	47,39 ± 10,71 b
IEA (%)	62,97 ±17,80 a	76,97 ± 43,72 a	54,04 ±15,24 a
IC	1,67 ±0,43 a	1,69 ± 0,94 a	2,03 ± 0,78 a
TCA (g/día)	4,41 ± 0,96 a	5,09 ± 3,67 a	23,54 ± 3,72 b
TEC (%P/día)	0,69 ±0,16 a	0,69 ± 0,42 a	2,53 ± 0,63 b
TAR (%P/día)	1,10 ± 0,05 a	0,82 ± 0,15 a	4,53 ± 0,29 b

**Nota.** Letras distintas indican diferencias estadísticas entre las medias, Test Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), IP, incremento de peso; IPR, incremento de peso relativo; IT, ingesta total; TAA, Tasa de alimentación absoluta; IEA, índice de eficiencia alimentaria; IC, índice de conversión; TCA, Tasa de crecimiento diario, TEC, tasa específica de crecimiento; TAR, tasa de alimentación relativa.



Como se observa en la Tabla 10 los pulpos alimentados con el pienso 3HPC obtuvieron un aumento de peso en torno a los 142,5 gramos, mientras que el HPC obtuvo crecimientos del orden de 124 gramos, Ambas dietas muestran comportamientos similares de crecimiento diario (0,69 %) y un crecimiento con respecto a su peso inicial idéntico (alrededor de un 22 %), pero la dieta 3HPC lo logró ingiriendo menor cantidad de alimento, lo que indica un mejor comportamiento en cuanto a eficiencia. Estos crecimientos podrían compararse con la prueba de harina de pescado-krill del Optipulpo, aunque en aquel caso los pulpos alimentados con la dieta 3HPK tuvieron un crecimiento superior a estos pulpos (mientras que la HPK fue muy similar) pero con 15 días más de alimentación.

En dicha prueba las TAA de las dietas experimentales fueron muy similares a las de esta prueba (7,85 y 8,15 frente a 7,28 y 6,28 g/d), sin embargo los pulpos alimentados con el alimento natural tuvieron tasas de alimentación muy superiores (132 frente a 47 g/d), posiblemente como consecuencia del tamaño final que se alcanzó en aquella prueba con la dieta natural (2.300 g frente a 1.300 en la presente prueba).

En cuanto a los análisis realizados a los pulpos tras la prueba de crecimiento se obtuvieron los resultados que aparecen en la Tabla 11.

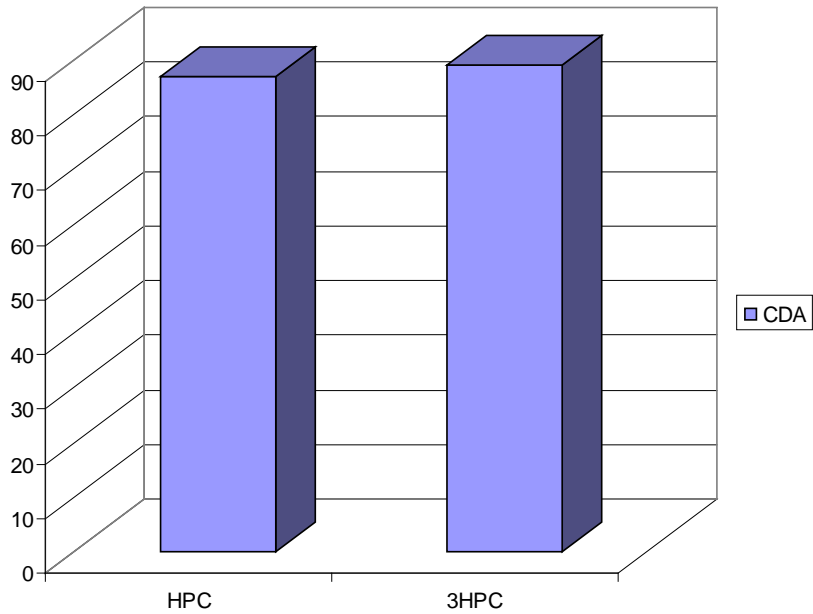
Se puede ver como no aparecen diferencias significativas en la composición corporal de los pulpos entre las dos dietas secas, sin embargo sí que las hay, si se compara con los pulpos que consumieron el alimento natural, sobre todo a nivel de glándula digestiva, donde destaca, la mayor acumulación de lípidos en las glándulas de los pulpos alimentados con las dietas extrusionadas. Esto es muy similar a lo que ocurrió en la prueba de engorde del Optipulpo con la harina de pescado y krill (dietas HPK y 3HPK), aunque en aquella prueba las diferencias de grasa de la glándula entre dietas extrusionadas y alimento natural fueron también significativas, pero con menores porcentajes en los tres casos, produciéndose un mayor porcentaje en forma de glucógeno. Esto podría deberse a un mayor nivel de lípidos e incluso de carbohidratos en las dietas, probablemente mayor, del que necesita el pulpo como fuente de energía. Este engrasamiento de la glándula, probablemente cause disfunciones metabólicas que afecten al crecimiento.

*Tabla 11. Composición nutricional de diferentes partes y del cuerpo entero según la dieta (n=3)*

	Control	HPC	3HPC
<b>Músculo (Tentáculo)</b>			
Humedad (%)	80,17±0,59	81,52±0,59	81,40±0,59
Proteína bruta (%mh)	16,56±0,40 <sup>a</sup>	14,76±0,40 <sup>b</sup>	14,27±0,40 <sup>b</sup>
Grasa bruta (%mh)	0,47±0,09	0,50±0,09	0,52±0,09
Cenizas (%mh)	1,95±0,11	2,22±0,11	1,92±0,11
<b>Glándula digestiva</b>			
Humedad (%)	61,70±0,60 <sup>a</sup>	57,83±0,60 <sup>b</sup>	57,50±0,60 <sup>b</sup>
Proteína bruta (%mh)	23,77±0,72 <sup>a</sup>	15,95±0,72 <sup>b</sup>	16,20±0,72 <sup>b</sup>
Grasa bruta (%mh)	9,81±1,05 <sup>a</sup>	20,86±1,05 <sup>b</sup>	19,36±1,05 <sup>b</sup>
Cenizas (%mh)	1,63±0,06	1,40±0,06	1,46±0,06
<b>Cuerpo entero</b>			
Humedad (%)	78,36±0,58 <sup>a</sup>	78,92±0,58 <sup>a</sup>	82,15±0,58 <sup>b</sup>
Proteína bruta (%mh)	17,54±0,40 <sup>a</sup>	15,86±0,40 <sup>b</sup>	13,80±0,40 <sup>c</sup>
Grasa bruta (%mh)	1,33±0,26	1,70±0,26	0,99±0,26
Cenizas (%mh)	2,01±0,08	1,93±0,08	1,74±0,08

**Nota.** Letras distintas indican diferencias estadísticas entre las medias, Test Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). La composición del cuerpo no fue analizada debido a la escasez de pulpos capturados al inicio de la prueba.

En el estudio de la digestibilidad de la materia seca realizado sobre estas dietas, se ve de igual modo, un comportamiento muy similar, siendo ligeramente más digestible la dieta 3HPC, la cual mostró una digestibilidad de la materia seca de 89%, mientras que la dieta HPC mostró un 86,9%.



*Figura 16. Coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca de los piensos extrusionados HPC y 3HPC.*

La presente prueba, muestra el aceptable comportamiento que tiene la harina de calamar como ingrediente proteico en las dietas para pulpos. Si bien no se han obtenido unos crecimientos mayores a los de anteriores pruebas realizadas con harina de krill en vez de calamar, sí se ha visto como son dietas altamente digestibles. Además, hay que tener en cuenta que el aumento repentino de las temperaturas, influyó en las ingestas de los pulpos durante los últimos días de ensayo, disminuyendo así su crecimiento.

## **5.7. Disminución de aglutinantes y atrayentes en las dieta con harina de calamar para conseguir mayores crecimientos**

En las pruebas precedentes realizadas con piensos secos extrusionados (3HPC y HPC) del IRTA (Tarragona), los resultados de la composición de la glándula digestiva en materia seca dieron un alto contenido en grasa (29 y 30%) y carbohidratos (12,16% y 9,5%) proporcionado seguramente por los altos niveles de huevina y de maltodextrina, comparado con los niveles los pulpos alimentados con dietas naturales (2,95% CHO, en seco, lo que pudiera ser una causa del bajo crecimiento.

Por ello y por el hecho de que el crecimiento es aún relativamente bajo respecto al alimento natural, se planteó la presente prueba, donde se compararán dos dietas secas extrusionadas con menores cantidades de maltodextrina y huevina, incrementando las fuentes proteicas (Tabla 12), con una dieta control a base de alimento natural.

### **Material y métodos**

Ejemplares de pulpo de roca (*Octopus vulgaris*) fueron capturados con arte de arrastre en las costas de Cases d'Alcanar y transportados a las instalaciones del IRTA (San Carles de la Rápita), donde fueron alojados en tanques y mantenidos en circuito abierto (T= 19° C) de agua de mar. El experimento comenzó tras un periodo de adaptación de aproximadamente diez días, periodo en el cual se les alimentó con cangrejo.

Se ensayaron tres tipos de dietas: dos piensos extrusionados con distintas proporciones de fuentes proteicas, harina de calamar, harina de pescado y la harina de krill (Tabla 12) formuladas para tener niveles proteicos de 45 y 50%. Además ambos piensos contenían distintas cantidades del principal atrayente, huevina, y las mismas cantidades de los compuestos aglutinantes (gelatina y maltodextrina), y una dieta control a base de cangrejo y boga.

***Tabla 12. Composición de las dietas extrusionadas (%) con diferente nivel proteico***

	H,PESCADO	KRILL	CALAMAR	M-DEXTRINA	GELATINA	HUEVINA	TAURINA	VITAM, <sup>1</sup>
45CP <sup>2</sup>	15	20	20	10	10	20	2,5	2,5
50CP <sup>2</sup>	15	25	25	10	10	10	2,5	2,5

<sup>1</sup>Valores son g,kg-1 (excepto aquellos en paréntesis): 25; Colina, 10; DL-a-tocoferol, 5; ascorbicacid, 5; (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ca<sub>3</sub>, 5, Composición de pmezcla: acetato de retinol, 1000000 UI kg-1; calcipherol, 500 UI kg-1, DL-a-tocoferol, 10, bisulfito de sodio menadiona, 0,8; clorhidrato de tiamina, 2,3, riboflavina, 2,3, clorhidrato de piridoxina, 15; cianocobalamina, 25, nicotinamida, 15, ácido pantoténico, 6, ácido fólico, 0,65; biotina, 0,07; ácido ascórbico, 75, inositol, 15; betaína, 100; 12 polipéptidos.

<sup>2</sup> Estas dietas recibieron el nombre de 45CP y 50CP debido a la cantidad de proteína que contenían.

La fabricación de los piensos se llevó a cabo en la Universidad Politécnica de Valencia, usando un extruder semi industrial Clextral BC45, bajo condiciones de 100°C y 50 ATM.

Una vez adaptados a la instalación se distribuyeron en tres tanques separados cada uno de ellos en seis compartimentos, donde se alojaron 6 pulpos, (Figura 17).



**Figura 17. Fase de adaptación y tanques de engorde (IRTA).**

La alimentación se realizó una vez al día a las 9 de la mañana, y a las 14 horas se recogía de los restos de alimento no consumido, para poder realizarse el cálculo de las ingestas. Las tasas de alimentación fueron de un 4% en el caso de los pulpos que comían el alimento natural cuando este consistía en pescado, de un 10% si era cangrejo, y de un 1-2% con las dietas secas. Los muestreos de peso se realizaron cada 15 días, pesando de forma individual cada uno de los pulpos de los tres tratamientos, Para ello, se sacaban los seis pulpos de cada compartimento, se introducían individualmente en una malla, posteriormente se devolvían a su tanque.

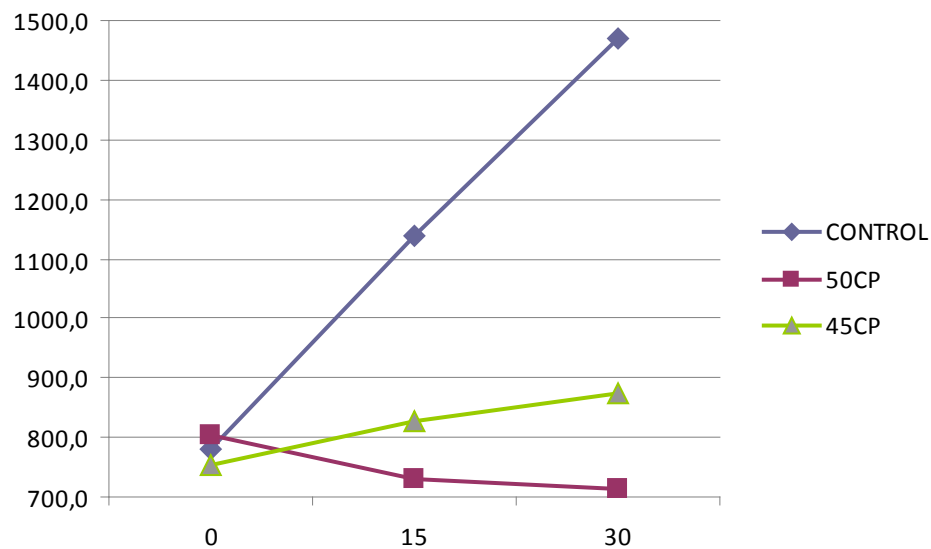


*Figura 18. Muestreo y pesaje de los pulpos al inicio de la prueba*

Durante la prueba se fueron recogiendo las heces de los distintos tanques, a fin de poder analizar la digestibilidad de las dietas, una vez terminada la prueba.

## Resultados

Tras las 4 semanas de experimento se obtuvieron claras diferencias entre tratamientos como muestra la gráfica, donde podemos ver, como la dieta natural presenta crecimientos muy por encima los obtenidos con las dietas artificiales.



*Figura 19. Evolución de los pesos de los pulpos durante la prueba.*

Durante la alimentación diaria se vio una peor aceptación del pienso 50CP, que contenía la menor proporción de huevina como atrayente, con respecto a los pulpos alimentados con la dieta 45CP, además de presentar ambas dietas una mayor disgregación, debido a la menor cantidad de aglutinantes en la fabricación. Esto queda pendiente de confirmar tras el análisis de los parámetros nutritivos.

Tras las 4 semanas de experimento se obtuvieron claras diferencias entre las tres dietas respecto al crecimiento, siendo los de la dieta natural muy por encima los obtenidos con las dietas artificiales:

**Table13. Parámetros de crecimiento y eficiencia nutritiva de los pulpos**

	<b>Control</b>	<b>45CP</b>	<b>50CP</b>
Pes. Inicial (g)	781 ± 39.82	754.16 ± 37.33	803 ± 40.32
IP (g)	690± 49.89c	120.8 ± 44.11b	-88± 24.57c
TAA(g/día)	51.79± 3.80b	7.57 ± 0.76 <sup>a</sup>	3.97± 0.98 <sup>a</sup>
TAR (%P/día)	4.58 ± 0.19c	0.93± 0.06b	0.51 ± 0.09 <sup>a</sup>
IC	2.13± 0.17	1.70± 0.26	

En cuanto a los análisis realizados a los pulpos tras la prueba de crecimiento se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 3).

**Tabla 14. Composición nutricional de la glándula digestiva según la dieta. (n=6)**

	<b>Inicial</b>	<b>Control</b>	<b>45CP</b>	<b>50CP</b>
<u>Glándula digestiva</u>				
Humedad (%)	71,37	62,07 ± 1,78	68,17 ± 1,78 <sup>a</sup>	74,57a ± 2,30 <sup>b</sup>
Proteína bruta (%mh)	18,36	19,89 ± 0,75 <sup>b</sup>	14,66 ± 0,75 <sup>a</sup>	16,42 ± 0,98 <sup>a</sup>
Grasa bruta (%mh)	1,64	3,16 ± 0,29 <sup>b</sup>	1,41 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,38 <sup>a</sup>

Podemos ver como no aparecen diferencias significativas en el músculo de los pulpos entre las dos dietas secas y la dieta natural, sin embargo sí que las hay en el caso de la glándula digestiva, en los pulpos que consumieron el alimento natural destaca la mayor acumulación de lípidos. Esto, en el caso de los pulpos alimentados con la dieta H10 estaría muy relacionado con la baja ingesta y por lo tanto pérdida de peso.

Respecto a los resultados de digestibilidad de la materia seca fueron de un 83.4% para la dieta 45 CP y un 94.4% para la boga y el cangrejo, la digestibilidad proteica de un 87, 95.8, 98.6 y la lipídica 98.5, 57.1 y 100%, respectivamente. La digestibilidad de la dieta 50CP no se pudo hacer, ya que como consecuencia de la no ingestión no se obtuvieron heces para esta prueba.