

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

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

**CULTIVO DEL PULPO**  
**2001-2004**

**INFORME FINAL**

## INDICE

---

Participantes .....	3
Introducción y objetivos .....	5
Resumen de resultados .....	8
Metodología y resultados .....	14
Subproyecto 1: cultivo larvario	
• Estandarización del cultivo intensivo de paralarvas con <i>Artemia</i> enriquecida y utilización de microdietas .....	14
• Cultivo semi-intensivo de paralarvas utilizando zoeas de crustáceos como presa complementaria o sustitutiva de la <i>Artemia</i> .....	15
• Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando afloramientos de plancton natural .....	23
• Otros cultivos larvarios .....	26
• Análisis bioquímicos de las presas y las paralarvas producidas por los distintos sistemas de cultivo .....	34
• Efecto de la alimentación del stock de reproductores en la calidad de las paralarvas producidas .....	52
• Análisis histológico de las paralarvas producidas por los distintos sistemas de cultivo .....	55
Subproyecto 2: engorde de juveniles	
• Experimentación y desarrollo de nuevas tecnologías de engorde: Jaulas, zonas acotadas, tanques en circuito abierto y recirculación con control de la temperatura .....	96
• Estudios de bioenergética y bioensayos de toxicidad de amoníaco, nitritos y nitratos .....	125
• Estudios de alimentación y nutrición de juveniles con el fin de desarrollar piensos compuestos .....	130
• Identificación por medio de técnicas de ADN de los stocks de pulpo procedentes de las distintas CCAA .....	138
• Condiciones óptimas para el transporte de huevos, paralarvas y juveniles de pulpo .....	145
Bibliografía Generada .....	152
ANEXO. Informe Comunidad Valenciana.....	158

## FECHAS DE REALIZACIÓN

Inicio del Plan: 1/1/2001

Finalización del Plan: 31/12/2004

## PARTICIPANTES

### **C.A. de Andalucía (P1)**

Consejería de Agricultura y Pesca

Centro de Investigación y Cultivos de Especies Marinas (C.I.C.E.M.) "El Toruño".

J. Luis Muñoz Pérez (Responsable).

### **C.A. de Asturias (P2)**

Consejería de Medio Rural y Pesca

Centro de Experimentación Pesquera

José Francisco Carrasco Fidalgo (Responsable).

Carmen Rodríguez Rodríguez

### **C.A. de Baleares (P3)**

Consellería d'Agricultura i Pesca

Estación de Acuicultura

Elena Pastor Gracia (Responsable).

Amalia Grau Jofre

### **C.A. de Canarias (P4)**

Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Grupo de Investigación en Acuicultura

Tafira María Soledad Izquierdo López (Responsable).

Carmen María Hernández-Cruz.

Instituto Canario de Ciencias Marinas.

Francisco Javier Roo Filgueira

Juan Socorro

Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación

María Paloma Feliciano Rivera.

**C.A. de Cataluña (P5)**

Institut de Ciències del Mar, Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals

Roger Villanueva López (Responsable).

Centro de Acuicultura. IRTA.

Dolores Furones Nozal

**C.A. de Galicia (P6, P7, P8)**

P6: Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Biología Campus Sur  
Universidad de Santiago.

Manuel Rey Méndez (Responsable).

P7: Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA)(P7).

Fátima Linares Cuerpo (Responsable).

P8: Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía.

José Iglesias Estévez (Responsable).

Francisco Javier Sánchez Conde

Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos. Dirección Xeral de Recursos Mariños.

Luis Rodríguez González.

**C.A. de Murcia (P9)**

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. Centro de  
Recursos Marinos.

Benjamín García García (Responsable).

**C.A. de Valencia (P10)**

Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Francisco J. Ruiz Sánchez (Responsable).

**DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO**

Nombre y apellidos: José Iglesias Estévez

Organismo/Centro: Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo

Departamento: Cultivos Marinos

## **INTRODUCCIÓN**

En la pasada década se han realizado en España diversos estudios sobre el pulpo (*Octopus vulgaris*) con el objetivo final de conocer sus posibilidades de cultivo a escala comercial. Los resultados de estos trabajos junto con algunas experiencias de engorde desarrolladas por empresas privadas demostraron su viabilidad para el cultivo comercial, suscitando un interés inmediato en los diversos sectores implicados. Como resultado, diversos organismos (Universidades, Centros de Investigación) de varias Comunidades Autónomas del Estado plantearon la necesidad de ampliar líneas de investigación con el propósito de resolver las dificultades encontradas en el cultivo de esta especie, centradas sobre todo en las primeras fases del cultivo larvario.

Como consecuencia la Secretaría General de Pesca Marítima a través de JACUMAR se hizo cargo de la financiación de un proyecto de investigación con la participación de diez equipos de expertos pertenecientes a diversos centros de investigación y universidades repartidos en ocho Comunidades Autónomas. El citado proyecto, titulado “El cultivo del pulpo”, se llevó a cabo entre 2001 y 2004. Teniendo en cuenta la amplitud de los objetivos perseguidos, se subdividió el proyecto en dos subproyectos, el primero de ellos dirigido al cultivo larvario y el segundo al proceso de engorde de juveniles. Cada uno de los subproyectos constaba a su vez con objetivos parciales y actividades definidas.

## **OBJETIVOS INICIALES**

Este proyecto persiguió dos objetivos fundamentales:

1. Desarrollar tecnologías de cultivo larvario que permitieran cerrar el ciclo de cultivo de la especie
2. Optimizar el proceso de engorde de juveniles en lo relativo a las estructuras utilizadas y al desarrollo de piensos que cubrieran los requerimientos nutricionales de la especie.

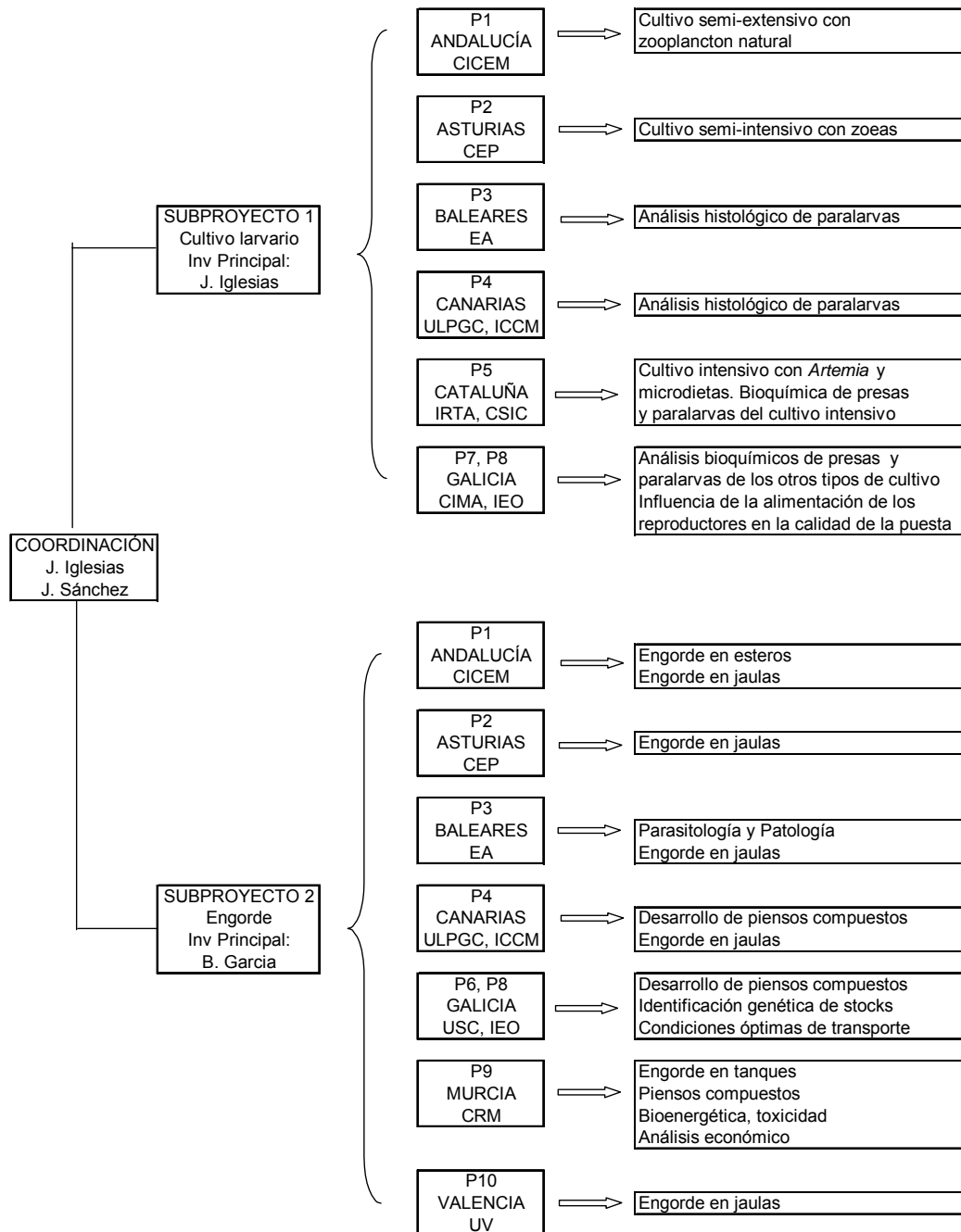
Teniendo en cuenta la amplitud de los objetivos perseguidos, se subdividió el proyecto en dos subproyectos con objetivos parciales y actividades definidas.

## SUBPROYECTO 1: CULTIVO LARVARIO

- Mantenimiento de stocks de reproductores destinados a la obtención de puestas y paralarvas.
- Estandarización del cultivo intensivo de paralarvas con *Artemia* enriquecida y utilización de microdietas.
- Cultivo semi-intensivo de paralarvas utilizando zoeas de crustáceos como presa complementaria o sustitutiva de la *Artemia*.
- Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando afloramientos de plancton natural.
- Análisis bioquímicos de las presas y las paralarvas producidas por los distintos sistemas de cultivo.
- Efecto de la alimentación del stock de reproductores en la calidad de las paralarvas producidas
- Análisis histológico de las paralarvas producidas por los distintos sistemas de cultivo.

## SUBPROYECTO 2: ENGORDE DE JUVENILES

- Experimentación y desarrollo de nuevas tecnologías de engorde: Jaulas, zonas acotadas, tanques en circuito abierto y recirculación con control de la temperatura.
- Estudios de bioenergética y bioensayos de toxicidad de amoníaco, nitritos y nitratos.
- Estudios de alimentación y nutrición de juveniles con el fin de desarrollar piensos compuestos.
- Identificación por medio de técnicas de ADN de los stocks de pulpo procedentes de las distintas CCAA.
- Condiciones óptimas para el transporte de huevos, paralarvas y juveniles de pulpo.
- Parasitología y patología.

**ESQUEMA DE ORGANIZACIÓN DE ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN**


## **OBJETIVOS REALIZADOS**

Se han llevado a cabo todos los objetivos previstos en ambos subproyectos excepto el último correspondiente al subproyecto 2 (parasitología y patología). Este objetivo ha sido suprimido del proyecto para evitar duplicidad de esfuerzo de investigación, al haber sido realizado simultáneamente por la Universidad de Vigo y IEO de Vigo en otro proyecto (“Influencia del control microbiano y parasitario en el cultivo larvario y en el engorde del pulpo *Octopus vulgaris*”), específicamente diseñado para tratar en profundidad esta línea de investigación.

## **RESUMEN DE RESULTADOS (CONCLUSIONES PROVISIONALES)**

Se describirán a continuación los resultados más relevantes obtenidos a lo largo de estos tres años en las tres fases de cultivo de la especie: reproducción, cultivo larvario y engorde hasta tamaño comercial. En capítulos posteriores se describen con mayor detalle cada una de las actividades de investigación realizadas por cada participante.

### Fase de reproducción

No existen problemas para la aclimatación de reproductores y obtención de puestas viables, bajo condiciones de cautividad. Este objetivo del proyecto puede llevarse a cabo por medio de la creación de un propio stock de reproductores, mezclando hembras y machos, o bien por separación individual de las hembras capturadas del mar ya fecundadas. El 100% de las hembras maduran y realizan la puesta en cautividad, obteniéndose porcentajes de eclosión de los huevos superiores al 80%.

Al obtener puestas viables en diferentes épocas del año no se considera necesario el dirigir la investigación a los procesos de inducción controlada de la maduración (fotoperíodo, temperatura, hormonas).

Se han definido las condiciones de transporte, desde el Atlántico hasta el Mediterráneo (12-13 horas), de hembras con puestas que facilitarían el intercambio de puestas viables entre centros de investigación o empresas del sector.



### Subproyecto 1: Cultivo larvario

Como ya se constatado en diversas comunicaciones previas, es en esta fase de cultivo donde se localizan los problemas principales que impiden el cierre del ciclo de cultivo de esta especie. Las paralarvas, en sus primeras semanas de vida, registran una mortalidad muy elevada y un crecimiento lento. Lo más probable es que esto venga causado por deficiencias nutricionales en la dieta larvaria, aunque no se descartan otros factores relacionados con las técnicas de cultivo (volumen, tipo de tanque, luz, circuito de agua etc.).

Con el objetivo de conocer mejor los problemas asociados a esta fase del cultivo, se diseñaron y desarrollaron diversos experimentos de cultivo de paralarvas, desde cultivos intensivos con artemia como presa tipo, cultivos semi-intensivos con aporte de otros organismos (estadios larvarios de crustáceos, misidáceos etc.) vivos o congelados, hasta sistemas semi-extensivos, con aporte de zooplancton natural a los cultivos. Las larvas producidas en cada uno de estos sistemas fueron sometidas a análisis bioquímicos e histológicos con el objetivo de averiguar como le influían los diferentes tratamientos en su composición y estructura interna.

A lo largo de los tres años del proyecto se pudieron descartar las técnicas de cultivo intensivo que utilizaban artemia enriquecida como única presa, así como los cultivos semi-extensivos donde se utilizaba exclusivamente zooplancton natural.

Los mejores resultados referentes a crecimiento y supervivencia se registraron en aquellos cultivos donde se utilizó artemia complementada con zoeas vivas de centollo. Mediante esta técnica se pudo completar el ciclo de cultivo del pulpo bajo condiciones de cultivo, obteniéndose juveniles que llegaron a alcanzar el estado adulto y realizar la puesta en cautividad. Estos resultados, pioneros en todo el mundo, fueron obtenidos por primera vez en el 2001 en el IEO de Vigo (Iglesias et al, 2004) consiguiendo un peso seco de las paralarvas de  $9.5 \pm 1.9$  mg y una tasa de 31.5% de supervivencia a los 40-45 días. Posteriormente los pulpos alcanzaron un peso de 0.5 a 0.6 Kg a los seis meses de edad, y un peso final de 1.4 a 1.8 Kg a los ocho meses, momento en el que maduraron y realizaron la puesta.

Al año siguiente, en el Centro de Experimentación Pesquera de Asturias, utilizando una tecnología de cultivo muy similar se consiguieron supervivencias larvarias del 60 al 90% a día 20 de vida y posteriormente ejemplares adultos maduros de un peso medio de alrededor de 3,5 Kg a los 16-18 meses. Sin embargo, esta técnica no es transferible al sector comercial ya que la disponibilidad de zoeas vivas es limitada y difícil de escalar el cultivo a niveles considerados comerciales. Por este motivo se contempla la necesidad de seguir investigando en busca de una dieta larvaria ó un enriquecedor de Artemia, que cubra más eficientemente los requerimientos nutritivos en estas fases tempranas de desarrollo.

### *Análisis bioquímicos*

Se ha analizado el efecto de tres tipos de alimentación de reproductores (crustáceos, mezcla al 50% de peces y crustáceos y mezcla al 50% de peces y cefalópodos), sobre la composición bioquímica de las paralarvas producidas. Se observaron diferencias significativas, así por ejemplo, el contenido proteico es más alto en la dieta de merluza y calamar (56%) respecto a la de crustáceos ó la de crustáceos y peces (36 y el 33% respectivamente). En cuanto a la composición lipídica, dichas paralarvas poseen sin embargo, un menor contenido en fosfolípidos (36%) frente al 40 y 44% de los lípidos totales en la de crustáceos y peces respectivamente.

Una vez más, se ha puesto de manifiesto la importancia de los ácidos grasos DHA y EPA en la dieta de las paralarvas. Se ha logrado la obtención de perfiles bioquímicos lipídicos y proteicos de paralarvas y sus presas que serán de elevado interés para determinar los requerimientos nutricionales de esta especie durante su cultivo larvario. Se considera que el principal problema a resolver durante el cultivo larvario es de orden nutricional y que para alcanzar los requerimientos nutricionales paralarvarios, los futuros cultivos basados en la línea de coalimentación (Artemia + microdieta) deben considerar alimentos equilibrados en fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, particularmente DHA, así como proteínas ricas en lisina, leucina y arginina. La obtención de microdietas equilibradas de adecuada palatabilidad y aceptación por las paralarvas es un objetivo todavía por alcanzar.

Por otra parte la buena aceptabilidad de las zoeas de centolla observada en las paralarvas de pulpo junto con el mejor crecimiento registrado cuando han sido utilizadas como complemento alimenticio, así como su composición bioquímica, que parece adecuarse a los requerimientos lipídicos del pulpo: alto contenido en fosfolípidos, carencia de triglicéridos y alto porcentaje de PUFA(n-3) en particular del 22:6(n-3), hacen que estas presas sean consideradas de gran valor en las primeras fases de alimentación viva. El contenido lipídico del bolo (*Ammodytes* sp.) y del zooplancton aportan igualmente interesantes valores de 22:6(n-3) como para continuar esa línea de investigación.

### *Análisis histológicos*

Los análisis histológicos de las paralarvas centraron su actividad principal en el análisis de la glándula digestiva, relacionando la morfología de la misma y las diversas vacuolas que aparecen en ella en función de la edad de las paralarvas y de las dietas a las que fueron sometidas. Igualmente se analizaron posibles alteraciones que pudieron aparecer en otros órganos.

Los resultados indican que la alta mortalidad larvaria se debe principalmente a causas nutricionales, tal como se postulaba al inicio del proyecto, observándose lesiones y otras alteraciones en aquellas larvas subalimentadas o con dietas solo a base de artemia, o con un exceso de lípidos. Sin embargo aquellas paralarvas alimentadas con dietas compuestas de artemia y zoeas de centolla mostraban un desarrollo del sistema digestivo perfectamente normal. Otros resultados muestran como la pigmentación y el aspecto de la glándula digestiva pueden servir de indicadores del estado nutricional de las larvas. Por último, la observación en algunas muestras de infecciones bacterianas y parasitarias aconsejan extremar las precauciones en los protocolos y manejo diario de los cultivos larvarios.

Durante el proceso de preengorde los misidáceos congelados son un buen alimento para “destetar” a los juveniles durante al menos el siguiente mes después de completar el desarrollo larvario. Pasados los primeros 30 ó 40 días estos pueden sustituirse por pulga de mar, con pequeños aportes de otros alimentos. Cuando los juveniles superan los 10 g de peso fresco puede iniciarse una alimentación similar a la de los adultos, es decir, a base de pescado y cangrejo.

Otros alimentos testados con éxito durante esta fase de preengorde fueron la mezcla de gónadas de crustáceos y de erizos, pequeños crustáceos (misidáceos, anfípodos y camarones) y músculo de mejillón.

### Subproyecto 2: Engorde de juveniles

Los buenos resultados de crecimiento obtenidos previamente, tanto en tanques como en jaulas, en Galicia, han impulsado a tres comunidades autónomas (Asturias, Canarias y Valencia) a desarrollar tecnologías de engorde en jaulas flotantes, y a una (Andalucía) a ensayar diversos sistemas de cultivo en esteros.

Así, en Asturias se llevaron a cabo, a partir de un diseño propio, varias pruebas de engorde en diferentes épocas del año, llegando a la conclusión de que es factible realizar ciclos de engorde de tres meses y obtener ejemplares de 3 o 4 Kg. a partir de pulpos de 1 Kg. si se cumplen ciertas condiciones tales como: separación por sexos, carga inicial entre 10 y 12 Kg.m<sup>-3</sup>, temperatura superior a 15°C y una dieta compuesta de crustáceos, peces y moluscos. La mortalidad acumulada no fue superior al 20%.

En las otras dos comunidades han partido de artefactos flotantes inspirados en el modelo C-160, que corresponde al que ha desarrollado la empresa Arrecifes del Atlántico en Galicia y que tan buenos resultados ha dado. Habiendo empezado más tarde, sus resultados no son tan concluyentes como en el caso asturiano. En Valencia, se ha comprobado que las altas temperaturas registradas en los meses estivales influyen negativamente en el proceso, reduciendo el número de potenciales ciclos anuales de engorde. En Canarias los primeros resultados de crecimiento y supervivencia han sido positivos, alcanzándose casi los cuatro 4 kgs en un periodo de tres meses, a pesar de haberse utilizado una dieta a base solamente de pescado.

Con el objetivo del potencial aprovechamiento de los esteros para engordar esta especie, en Andalucía se llevaron a cabo una serie de experiencias en estanques donde se disponían jaulas cilíndricas y tanques de fibra, ambos de 1 m<sup>3</sup>. Se estabularon pulpos a diferentes densidades y separación por sexos.

Los resultados en términos de crecimiento y supervivencia han sido positivos en todos los casos, recomendando este tipo de estructuras, por su bajo coste y facilidad de manejo y limpieza, para utilizar en el engorde de pulpo en esteros, si bien se aconseja realizarlo en aquellas épocas del año en que el agua se encuentre en un rango de temperatura de 15 a 20°C.

En este proyecto se han planteado además una serie de experiencias destinadas a conocer en mayor profundidad los parámetros recomendables para el cultivo de esta especie y también el desarrollo de piensos artificiales. Los resultados han permitido fijar unos rangos óptimos de temperatura y oxígeno disuelto, se han elaborado piensos que han sido bien aceptados por los animales, si bien tienen que mejorarse en sus características físicas y se ha desarrollado un modelo econométrico de una planta de engorde de pulpo en donde se contemplan todos aquellos factores que pueden afectar a la rentabilidad del proceso.

Se han llevado a cabo también estudios genéticos con el objetivo de dilucidar posibles variaciones dentro de la especie *Octopus vulgaris* procedente de las regiones atlántica y mediterránea y sus posibles efectos en el cultivo, no encontrándose diferentes estructuras poblacionales en las muestras analizadas provenientes de diferentes zonas costeras de la Península Ibérica.

En un último aspecto desarrollado en este subproyecto tenía como objetivo investigar las condiciones más favorables para el transporte de ejemplares vivos, tanto paralarvas y juveniles como reproductores. Una serie de experimentos diseñados para ese fin ayudaron a determinar los parámetros (temperatura, tiempo, densidad) que más influían en la supervivencia final así como los rangos de valores que deberían utilizarse para realizar el transporte en las mejores condiciones.

## METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Se describen a continuación la metodología y resultados más destacables obtenidos a lo largo de los tres años, ordenados según subproyectos y objetivos parciales.

### SUBPROYECTO 1: CULTIVO LARVARIO

#### Estandarización del cultivo intensivo de paralarvas con *Artemia* enriquecida y utilización de microdietas

Las experiencias de este apartado se han desarrollado en el Institut de Ciències del Mar, Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals.

#### *Mantenimiento de stocks de reproductores*

Se mantuvo un grupo de reproductores que se renovó anualmente, siendo su número de 22, 28 y 25, respectivamente para cada uno de los tres años de proyecto. La recolección de reproductores se realizó mediante embarques en la flota artesanal local (Ametlla de Mar, Tarragona) y su mantenimiento se realizó en las instalaciones del Institut de Ciències del Mar de Barcelona (CSIC) donde también se realizaron los posteriores cultivos larvarios. El mantenimiento de reproductores se realizó empleando tanques de 2000 litros provistos de suficientes refugios (macetas de barro, tubos de PVC) y en régimen de oscuridad, con los tanques provistos de cubiertas superiores. Los ejemplares fueron alimentados con una dieta a base de 2/3 de cangrejo verde (*Carcinus maenas*, *Carcinus mediterraneus*) y 1/3 de sardina y anchoa, todos ellos congelados. Las temperaturas de mantenimiento de los reproductores oscilaron entre 12 y 23 °C, refrigerando o calentando artificialmente el agua en las diferentes estaciones cuando se creyó oportuno para acelerar o ralentizar diferentes protocolos de cultivo.

El material larvario obtenido durante cada año de proyecto cubrió en exceso las necesidades de larvas destinadas a la realización de los diferentes cultivos. Este volumen larvario se estimó únicamente durante el primer año, siendo de 830.000 larvas.

Estos valores muestran la idoneidad de esta especie para ser explotada en acuicultura, desde el punto de vista de los requerimientos de volumen de reproductores y de material larvario.

Una vez obtenidas las puestas la duración del desarrollo embrionario se adecuó a las necesidades de cultivo mediante la variación de la temperatura de incubación, entre 12 y 23 °C.

#### *Cultivo larvario*

Se analizaron series de cultivos larvarios de tipo intensivo enfocados al estudio del efecto de nauplios de Artemia y microdietas sobre la composición bioquímica resultante en las larvas de los respectivos cultivos. Se ensayaron trials de cultivos larvarios en tanques cilíndricos de 25 l y también se utilizaron tanques cilindro cónicos de resuspensión de 50 l con diseño similar al utilizado por el laboratorio de la Comunidad de Asturias (J. F. Carrasco y colaboradores) para ensayar dietas a base de plancton marino congelado y microdietas comercializadas (Nippai®, AgloNorse®), con tamaño de 600-1000 $\mu$  y cápsulas experimentales con tamaño entre 200-400 $\mu$ . Las densidades de cultivo oscilaron entre 25 y 40 paralarvas de pulpo / litro desde el día 0. Los cultivos se realizaron a temperaturas entre 17 y 21 °C y bajo iluminación continua 24h. Las metodologías detalladas de cultivo se hallan publicadas en Navarro & Villanueva 2003; Villanueva et al 2002, 2004).

#### Cultivo semi-intensivo de paralarvas utilizando zoeas de crustáceos como presa complementaria o sustitutiva de la Artemia

Desarrollado en el Centro de Experimentación Pesquera de la C. A. de Asturias.

#### *Mantenimiento de stocks de reproductores*

Durante los tres años de duración del proyecto se estabularon un total de 63 ejemplares, de los que 43 eran hembras y 21 machos, con un peso de entre 1.000 g y 1.500 g. Se produjo la baja, por causas diversas, de 13 ejemplares, 8 hembras y 5 machos.

Los resultados más relevantes son los siguientes:

La totalidad de las hembras supervivientes se reprodujeron. Se obtuvieron puestas de hembras que permanecieron aisladas desde su confinamiento, sin contacto con machos, lo que indica que venían fecundadas de la mar.

Las hembras con puesta pueden consumir alimento, en concreto cangrejo vivo, durante las primeras tres cuartas partes de su desarrollo embrionario, cesando de alimentarse por completo cuanto está próximo la eclosión de las paralarvas. En estas circunstancias las hembras pueden permanecer con vida hasta 40 días después de la finalización de la eclosión.

El período de incubación de los huevos osciló entre un máximo de 56 días y un mínimo 23 días, para unas temperaturas medias de 16,1° C y 21,3° C, respectivamente.

El rendimiento de paralarvas varió bastante de unas eclosiones a otras, por lo general superior a las 100.000 paralarvas, con un mínimo de 55.000 y un máximo de 365.000. La duración de la eclosión fue de entre 11 y 17 días.

Durante el segundo y tercer año del proyecto se realizó el traslado de 4 hembras con puesta desde las dependencias de Castropol hasta las instalaciones de Gijón. El transporte se realizó por carretera, con una duración de 2 horas, en un depósito cilíndrico de 100 l, lleno hasta la mitad, con aireación suave.

#### *Cultivo larvario*

Se utilizaron dos sistemas de cultivo:

Sistema 1: sistema de recirculación formado por tres tanques parabólicos de fibra de poliéster, de color blanco, con una capacidad de 30 litros y un depósito regulador de 60 l, con aporte de agua nueva al sistema de 0,7 - 1 l/minuto. La entrada de agua a los tanques se realiza por un dispositivo basal que asegura una circulación vertical y ascendente que mantiene a las larvas, así como alimento, en constante movimiento.



Sistema 2: tanques cilíndricos de 200 l de capacidad, de color gris, en circuito abierto con aporte de agua nueva en superficie de 1 l/minuto y desagüe central con aireación en la base del mismo (Fig. 2).

La alimentación suministrada a las paralarvas y la temperatura del agua durante las distintas experiencias desarrolladas varió dependiendo de la anualidad y del sistema empleado. En el apartado de resultados, se detallarán las densidades de presa y las particularidades habidas en cada una de las distintas experiencias desarrolladas en los tres años del proyecto.

Las condiciones de cultivo de las paralarvas en los tanques fueron:

	<u>Sistema 1</u>	<u>Sistema 2</u>
Volumen tanque (l)	30	36 - 60
Densidad larvaria (larvas/l)	20-25	18 - 20
Luz	Fluorescente 40 W	Natural
Fotoperíodo	12 L:12 O	Natural
Malla de desagüe	300 µm	300 µm

Diariamente se controló la temperatura y la salinidad en los tanques. Cada 10 días se tomaron entre 5 y 10 ejemplares, dependiendo de la edad de las paralarvas, para la determinación de la longitud del manto (LM) y el peso seco (PS) y cada 10 días en el 2001 y cada 20 días en el 2002 y 2003, coincidiendo con el cambio de tanque, se realizó el recuento del número de larvas para determinar la supervivencia.

De las distintas experiencias desarrolladas solo se obtuvieron resultados satisfactorios en aquellas en las que se utilizó como sistema de cultivo los tanques parabólicos y se suministró como alimento de las paralarvas zoeas de centollo. En el resto de las experiencias los rendimientos en supervivencia o crecimiento de las paralarvas resultaron muy pobres a partir de la segunda semana de cultivo.

A continuación se muestran algunos de los resultados obtenidos en las experiencias desarrolladas durante los tres años de proyecto.

Anualidad 2001

**Sistema: 1** (Depósitos parabólicos)

*Densidad:* 20 paralarvas/l.

*Temperatura media:* 22,1° C-22,6° C.

*Alimentación:* aporte diario de zoeas de centollo vivas (0,5-0,7 z/ml) suplementadas, días alternos, con *Artemia* (0,3-0,8 A/ml).

\*La *Artemia* se suministró a partir del día 11 de cultivo.

\*\*A partir de la tercera semana de cultivo se suministraron zoeas congeladas.

LM (mm), PS (mg) y supervivencia (%) de las tres experiencias llevados a cabo durante el 2001.

Días	Experiencia 1			Experiencia 2*			Experiencia 3**		
	LM	PS	Sup.	LM	PS	Sup.	LM	PS	Sup.
1	2,06	0,33	100,0	2,06	0,38	100,0	2,18	0,39	100,0
10	3,13	0,70	63,0	3,08	0,89	84,5	2,86	0,82	81,9
20	3,92	1,80	18,7	4,10	2,24	81,7	3,57	1,38	61,5
30	4,17	3,58	0,8	4,57	3,36	44,5	3,73	2,17	5,76

Los resultados ponen de manifiesto que el suministro de zoeas vivas de centollo resulta determinante en el crecimiento y supervivencia de las paralarvas; la sustitución en la experiencia 3 de zoeas vivas por zoeas congeladas supuso una desaceleración en el crecimiento de las paralarvas y un aumento de la mortalidad. Por otro lado, la adición de *Artemia*, al menos en los primeros días, no parece ser determinante en el resultado final del cultivo.

**Sistema: 2** (Tanques cilíndricos)

*Densidad:* 20 paralarvas/l.

*Temperatura media:* 20,6° C-22,9° C.

*Alimentación:* variada, consistente en aporte diario de zoeas vivas o congeladas de centollo o de nécora (0,5-0,7 z/ml), *Artemia*, zooplancton, y fitoplancton.

Se realizaron 5 experiencias y en ninguna se sobrepasaron las dos semanas de cultivo. La utilización de zooplancton de la ría y zoeas de nécora, ya fueran vivas o congeladas, supuso una ralentización muy pronunciada del crecimiento y, paralelamente, un aumento de la mortalidad que resultó prácticamente total a las dos semanas de cultivo.

Anualidad 2002

*Densidad:* 25 paralarvas/l.

*Temperatura media:* 21,1° C-21,2° C.

*Alimentación:* aporte diario de zoeas de centollo vivas (0,7-1 z/ml), suplementadas días alternos con *Artemia* (0,3-0,8 A/ml). En los cultivos que sobrepasaron los 40 días además de la alimentación habitual se añadió misidáceos congelados (8-12 g/depósito).

\*A partir de la tercera semana de cultivo se suministraron zoeas congeladas.

LM (mm), PS (mg) y supervivencia (%) de las tres experiencias llevados a cabo durante el 2002.

Días	Experiencia 1			Experiencia 2			Experiencia 3*		
	LM	PS	Sup.	LM	PS	Sup.	LM	PS	Sup.
<b>1</b>	2,19	0,30	100,0	2,19	0,30	100,0	2,09	0,32	100,0
<b>10</b>	2,85	0,70		2,96	0,84		3,06	0,82	
<b>20</b>	3,36	1,35	89,6	3,42	1,78	93,5	3,90	1,62	59,2
<b>30</b>	4,27	3,38		4,35	3,76		4,30	3,39	
<b>40</b>	5,40	6,10	13,0	5,52	6,72	1,1	4,80	5,70	2,7
<b>50</b>			4,7				5,00	6,20	1,0
<b>60</b>	6,54	22,02	3,4				6,10	9,20	0,4

Los datos de supervivencia parciales de las tres experiencias ofrecen resultados satisfactorios a día 20 con unos porcentajes altos, por encima del 60%, destacando las dos primeras que rondan el 90%.

En estas dos experiencias se produjo un pico de mortalidad importante el día 39, coincidiendo con la aportación a los tanques, dos días antes, de pulga viva de tamaño pequeño tamizada por 2000 $\mu$ m, que redujo significativamente el número de paralarvas en uno de los cultivos y dio prácticamente al traste con el otro.

A pesar del contratiempo debido al aporte de pulga de mar, en la experiencia 1 se consiguieron ejemplares bentónicos o juveniles a día 60 de cultivo.

Es interesante reseñar que el crecimiento de las paralarvas cultivadas en las experiencias 1 y 2 del 2001, en los controles parciales hasta el día 30, presentaban un crecimiento similar o superior al registrado en las experiencias desarrolladas el presente año. Así todo en el 2001 no se consiguieron ejemplares bentónicos.

Dos son los aspectos que consideramos pudieron haber influido en la mejora de los resultados respecto al pasado año. La densidad de presas en los depósitos de cultivo que en las experiencias desarrolladas durante el presente año se ha mantenido siempre entre de 0,7–1 zoeas/ml, lo que supone un aumento respecto a las concentraciones mantenidas el pasado año. El otro factor que varió fue la disminución de las labores de mantenimiento, esto es: cambio de tanque y recuento de las paralarvas, que pasaron de 10 a 20 días.

**Sistema: 2** (Tanques cilíndricos)

*Densidad:* 20 paralarvas/l.

*Temperatura media:* 18,8° C-20,8° C.

*Alimentación:* variada, consistente en aporte diario de zoeas vivas o congeladas de cangrejo ermitaño (0,5-2 z/ml) o zoeas congeladas de centollo (0,3-1,0 z/ml), con o sin *Artemia*.

Se realizaron en total cuatro experiencias. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó zoeas vivas de cangrejo ermitaño con supervivencias a día 20 de entre el 44% y el 57%. No obstante, el crecimiento, tanto en tamaño como en peso, de las paralarvas siempre fue significativamente inferior al que se obtiene cuando se utilizan zoeas vivas de centollo.

Anualidad 2003

*Densidad:* 25 paralarvas/l.

*Temperatura media:* 22,4° C-23,2° C. Valores puntuales por encima de 24° C

*Alimentación:* en las tres experiencias se sustituyó la base de la alimentación viva, es decir, las zoeas de centollo por dieta inerte consistente en zoeas congelada (Experiencia 1), zoeas congeladas o copépodos (Cyclops) liofilizados (Experiencia 2) o por una mezcla de ambos (Experiencia 3), manteniéndose en todos los casos el suplemento, en días alternos, de *Artemia*.

Datos de LM (mm), PS (mg) y supervivencia (%) de las tres experiencias llevados a cabo durante el 2003.

Días	Experiencia 1			Experiencia 2			Experiencia 3		
	LM	PS	Sup.	LM	PS	Sup.	LM	PS	Sup..
1	2,23	0,34	100,0	1,98	0,38	100,0	1,98	0,38	100,0
10	2,63	0,67							
20	2,99	1,03	11,2						
30	3,18	2,78	1,10						

Debido a las elevadas temperaturas del agua registradas durante el 2003, con medias, en los tanques de cultivo, de entre 22,4° C y 23,2° C y valores puntuales por encima en todos los casos de 23° C y, que en ocasiones, alcanzaron los 24,2° C, resulta difícil analizar como afectó al desarrollo de las paralarvas la sustitución, como base de la alimentación, del alimento vivo por una dieta inerte. No obstante, los datos parciales de crecimiento y supervivencia de las paralarvas en la experiencia 1, comparados con los obtenidos en años anteriores, ofrecen peores resultados.

De los resultados obtenidos de las distintas experiencias llevadas a cabo durante los tres años de duración del proyecto podemos decir lo siguiente:

El sistema de flujo de entrada y salida del agua en el tanque de cultivo, así como la aireación del mismo, son aspectos fundamentales en la dispersión y en los contactos presa-paralarva, máxime cuando se trabaja con dieta inerte. En nuestro caso, la entrada de agua a los tanques, que se realiza por la parte inferior de los mismos, favorece el mantenimiento de las paralarvas y del alimento en suspensión y con ello el contacto presa-paralarva.

La alimentación de las paralarvas, como se suponía, resulta un factor clave en los resultados finales obtenidos. En nuestro caso, el aporte regular de zoeas vivas de centollo a los tanques de cultivo influyó significativamente en las elevadas supervivencias parciales obtenidas a día 20, en dos de las experiencias llevadas a cabo en el 2001 y en las desarrolladas en el 2002, así como en la posterior consecución de ejemplares bentónicos.

Otros aspectos que consideramos que también influyen en los resultados del cultivo larvario son:

- a) *la densidad de presa viva en los depósitos*: valores próximos a 1 zoea/ml aumentan los contactos y facilita la captura del alimento por parte de las paralarvas
- b) *las labores de mantenimiento de los tanques*: la reducción al mínimo de las labores de mantenimiento influye positivamente en la supervivencia y crecimiento de las paralarvas.
- c) *la temperatura de cultivo*: valores por encima de 24° C parecen afectar negativamente al desarrollo de las paralarvas. Temperaturas de entre 21° C y 22° C parecen ser las más adecuadas.

### *Preengorde de juveniles*

Los ejemplares proceden de la experiencia 1 desarrollada en el año 2002, en la que se consiguieron 23 ejemplares bentónicos, con una supervivencia a día 60 del 3,2%.

De los 18 juveniles –se sacrificaron 5 ejemplares– con los que se inició el cultivo, se produjo la baja de 13 ejemplares, quedando al final 5 (3 hembras y 2 machos) que a la edad de 527 días (17,5 meses) alcanzaron un peso medio alrededor de 3,5 Kg.

Las tres hembras, con una edad de 16-18 meses y un peso de entre 3.100 g y 3.600 g llegaron a reproducirse. De la primera de las puestas se produce la eclosión de paralarvas malográndose, por causas diversas, la eclosión de las dos restantes.

Los misidáceos congelados son un buen alimento para “destetar” a los juveniles durante al menos el siguiente mes, después de completar el desarrollo larvario. Pasados los primeros 30 ó 40 días estos pueden sustituirse por pulga de mar, con pequeños aportes de otros alimentos. Cuando los juveniles superan los 10 g de peso fresco puede suprimirse la pulga e iniciarse una alimentación similar a la de los adultos, es decir, a base de pescado (bacaladilla y chicharro) y cangrejo.

La temperatura ejerce una influencia importante sobre el crecimiento de los juveniles. El descenso paulatino desde los 20,2° C, en el control del día 100, hasta los 14,7° C del día 232 supuso una ralentización en el crecimiento de los ejemplares que se pone de manifiesto en la tasa instantánea de crecimiento que pasa del 4,97% hasta valores de entre 1,5% y 2%. Solo cuando la temperatura se recupera y alcanza valores medios próximos a 17° C o superiores la tasa instantánea vuelve a repuntar hasta el 4,37% para posteriormente disminuir, como era de esperar, al aumentar el tamaño de los ejemplares.

#### Cultivo semi-extensivo de paralarvas utilizando afloramientos de plancton natural

Las experiencias correspondientes a este apartado fueron realizadas en el Centro de Investigación y Cultivos de Especies Marinas (C.I.C.E.M.) "El Toruño".

Actuaciones para la obtención de un afloramiento de zooplancton natural.

El objetivo inicial de esta actividad fue la obtención de un afloramiento de zooplancton en uno de los estanques de tierra que se encuentran en las instalaciones del Centro. Para ello, se procedió a una renovación total del estanque con agua procedente del “caño” que alimenta las instalaciones. Dada la alta productividad de fitoplancton registrada, no se procedió a la fertilización inicial del medio.

Con objeto de seleccionar por su tamaño presas naturales, se diseñó y construyó un colector de zooplancton consistente en un tanque dispuesto en tierra y provisto de bomba aspirante, electrosoplante y un juego de 2 tamices de 4 y 2 mm de luz de malla. Después de 6 semanas se comprobó ausencia de sucesión completa en la población zooplanctónica, observándose rotíferos y tintínidos en altas densidades. Los copépodos calanoides aparecían en muy bajas densidades.

Se adoptó un nuevo método para la recolección de zooplancton en otro estanque de 4 has que constituye la reserva de agua de las instalaciones del Centro. El método está basado en el sistema de engorde de semillas de moluscos bivalvos (semillero flotante), pero con la dirección del flujo de agua inverso, es decir, el agua entra en el contenedor arrastrando y concentrando el zooplancton en su interior. Para evitar la entrada de organismos predadores no deseables, se dispone una malla de un tamaño de luz adecuada (3 mm) que impide el paso de animales de tamaño superior. El zooplancton acumulado en el contenedor se retiene gracias a una malla plástica colocada en el fondo- de una luz de 1 mm, inferior al tamaño de los organismos componentes del zooplancton requerido.

La mayoría de los organismos zooplanctónicos recolectados fueron copépodos (Calanoides). Se observaron larvas de camarones, huevos y larvas de peces estuáricos, y algunas especies de anfípodos. Ninguna de ellas se manifestaron como especies presas para la alimentación de las paralarvas, que se convertían asimismo en presas, como ocurría con los estadios larvarios de los camarones.

Después de varios ensayos con este método se procede al cultivo complementario de posibles presas, como zoeas de cangrejos (*Carcinus* sp.) -obtenidas a partir de hembras ovígeras- y el cladóceros *Moina* salina, producidas a partir de individuos recolectados en los propios estanques de tierra. La aceptabilidad de estas presas fue buena, suplementadas en ocasiones con nauplios de artemia ante la falta de disponibilidad continua de aquéllas, y enriquecidas con el compuesto comercial PROLON (DHA/EPA de 2), pero la mortalidad total de las paralarvas (100 % a los 25-30 días) seguía produciéndose al mismo tiempo que las alimentadas con Artemia enriquecida.



En otro intento de obtención de zooplancton de mayor diversidad, se procede a la recolección de zooplancton natural en aguas abiertas del Golfo de Cádiz mediante una manga de red tipo bongo de 200  $\mu$  de luz de malla, en arrastre oblicuo cuando la profundidad lo permitía, y horizontal en aguas más someras. El zooplancton recolectado era cuidadosamente introducido en garrafas de 20 l de capacidad provistas de aireación. Posteriormente eran trasladadas al Centro. Después de unos primeros intentos en los que la totalidad de los organismos recolectados llegaban muertos debido a la duración del transporte (superior a 3 h), se consiguió reducir éste, lográndose la supervivencia parcial de algunas especies de zooplanctones. En las muestras observadas predominaban sobre todo crustáceos como copépodos, además de branquiópodos, ostrácodos y misidáceos, algunos de tamaño superior a 5mm. También se observaron zoeas de decápodos, cirrípedos, cnidarios, huevos de peces y en menor medida quetognatos. Se Introdujeron en tanques de fibra de 2 m<sup>3</sup> provistos de aireación, con fitoplancton y rotíferos producidos en el Centro, y donde la densidad de cultivo era de 15 paralarvas/L. La supervivencia de los zooplanctones fue nula a los dos y tres días de cultivo, por lo que no se pudo utilizar el zooplancton recolectado para el ensayo de alimentación de paralarvas.

Paralelamente se han realizado varios ensayos de cultivo utilizando distintas presas cultivadas al efecto, como nauplios y metanauplios de artemia con enriquecedores (fitoplancton, Prolon, Superselco) zoeas de centollas, de cangrejos (*Carcinus* sp, *Pagurus* sp), cladóceros (*M. salina*), huevos y larvas de lenguado, de doradas, tanto vivas como congeladas, e incluso migas de pescado. Los mejores resultados se han producido en los ensayos con artemia y zoeas de centollas, llegando a una supervivencia de un 5 % a los 30 días, observándose comportamiento de preasentamiento. A partir de este punto, las paralarvas morían. La ausencia de buenos resultados con los tipos de presa, y la duplicidad de experiencias con otros grupos que también han utilizado zoeas y artemia hicieron desestimar los análisis bioquímicos de las paralarvas.

Con el objetivo de completar los análisis histológicos y bioquímicos de paralarvas sometidas a diferentes estrategias de cultivo, se han utilizado larvas para el Plan Nacional JACUMAR-Pulpo procedentes de otros proyectos de investigación I+D que se desarrollaban paralelamente en las Comunidad Canaria (ICCM) y Gallega (IEO-Vigo).

Dichas experiencias se describen a continuación.

- **Instituto Canario de Ciencias Marinas. Telde. (Gran Canaria).**

Con el fin de obtener mayor muestra de paralarvas para estudiar el efecto de la alimentación en el desarrollo histológico de las mismas, se procedió a efectuar experiencias de cultivo larvario en nuestras propias instalaciones.

Para ello se capturaron del medio natural cuatro hembras y cuatro machos que se estabularon por parejas en tanques de 1000 y 2000 litros provistos de refugios extraíbles. Los reproductores fueron alimentados con crustáceos y pescado troceados. Se observó una buena adaptación en general y se obtuvieron con éxito las puestas espontáneas de cuatro de las hembras. Dos de ellas se extrajeron y se cuidaron en tanques de 100 litros con renovación de agua y las otras dos fueron cuidadas por las hembras respectivas hasta la eclosión.

Se realizaron diversas experiencias de cultivo larvario.

### **Experiencia 1**

Se realizaron las primeras experiencias de cultivo de paralarvas de pulpo en el año 2002 en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM). Las paralarvas se sembraron a una concentración inicial de 5 paralarvas por litro en tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 2000 l de volumen. Fueron alimentadas con distintos tipos de presas vivas, la dieta principal fue *Artemia* en distintos estadios de crecimiento, que se mantuvo en una concentración de 0.5 indiv/ml en el tanque larvario, añadida una vez al día. Como dieta complementaria se utilizaron mysis de camarón de charco (*Palaemon elegans*) (Ilustración 7) y mysis de camarón de profundidad (*Plesionika edwardsii*).

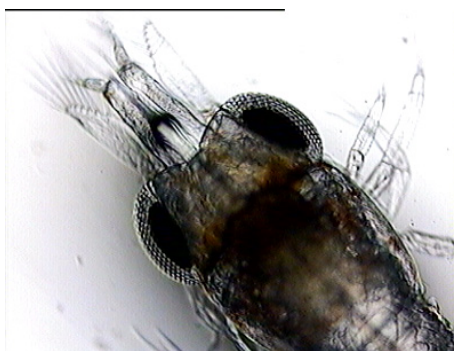


Ilustración 7. Mysis de camarón de charco

Durante toda la fase de cultivo se observó una mortalidad mantenida de las paralarvas, llegando a conseguirse una supervivencia de hasta 25 días en el caso de estar suplementada la *Artemia* con las mysis de camarón. En el caso de la *Artemia* como único alimento muy pocas larvas sobrevivieron los 20 días de cultivo larvario.

El crecimiento obtenido fue muy pobre en comparación con los resultados obtenidos para otros autores, así en paralarvas alimentadas con *Artemia* se obtuvo la siguiente expresión  $LT = 2,738 + 0,0139 \cdot d$  donde LT es la longitud total y d la edad en días. Entre otros factores esto podría ser debido al tipo de *Artemia* utilizada y a su alimentación.

La utilización de presas vivas, a pesar de ser muy eficaz como alimento de las paralarvas, presenta dos inconvenientes: por un lado, tienen un crecimiento similar e incluso superior al del depredador y a la edad de 18 días se observa que las mysis de camarón no consumidas aumentan de tamaño atacando a las paralarvas, esto justifica el uso de baja intensidad de luz con el fin de reducir la actividad de los camarones. Por otro lado la falta de una tecnología estándar de producción continuada de zoeas limita el uso de este tipo de presas como complemento a la *Artemia*.

## Experiencia 2

Larvas obtenidas por puesta natural fueron sometidas a diferentes tratamientos comparativos de inanición, alimentación con *Artemia* complementada con camarón y microdietas complementadas con *Artemia*, en sistemas de cultivos intensivos de las larvas, con el objetivo de estudiar la resistencia y evolución morfológica e histológica de las larvas frente a las mencionadas condiciones de alimentación.

Las larvas sometidas a inanición no pudieron superar el cuarto día de vida, mientras que las complementadas con camarón solo pudieron sobrevivir hasta el día 13.

En el 2003 se continuó con las experiencias, ensayando diferentes regimenes alimenticios para las paralarvas de pulpo.

## Experiencia 3

Se analizó el efecto de dos tipos de tanques, tanques bajos de una altura de 60cm y 100litros (TL) frente a tanques de 120cm y 120 l (TD), con tres tratamientos alimenticios diferentes por triplicado. Un tratamiento control (TA) en el que se suministraron nauplius de *Artemia* enriquecida, un segundo tratamiento (TB) donde además de la *Artemia* se añadió zoea de cangrejo moro (*Grapsus grapsus*), y un tercer tratamiento (TC) en el que se suministró *Artemia* enriquecida y una mezcla de zoeas de cangrejo blanco (*Plagusia depressa*) y carnada de vieja (*Xantho poressa*).

Las condiciones experimentales fueron: fotoperíodo natural, circuito abierto con una renovación del 10% al 50% al final de las experiencias. La densidad larvaria inicial fue de 15 larvas litros. El cultivo se realizó añadiendo diariamente 1litro de *Nannochloropsis sp.* a una concentración de 20-25  $10^6$ /ml, 2 rot/ml enriquecidos durante 6 horas con DHA protein selco (INVE). y 2 *Artemia*/ml de 72 horas, las cuales habían sido sometidas a un doble proceso de enriquecimiento durante 48h, con A1 selco (INVE).

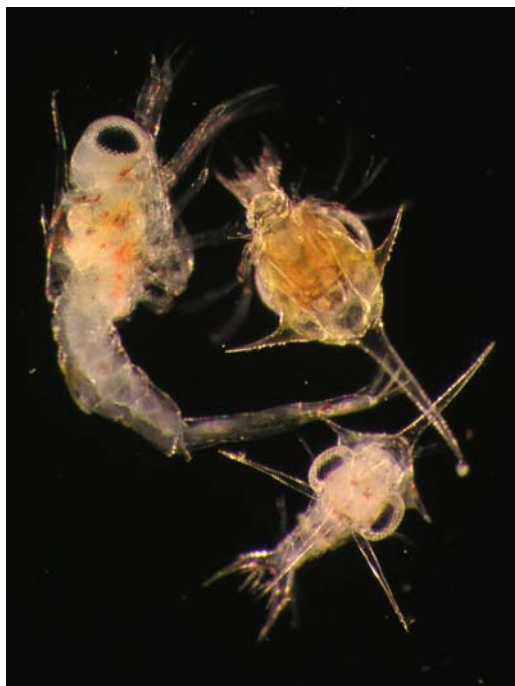


Ilustración 8. Alimento vivo utilizado

Se tomaron muestras morfométricas, peso seco e histológicas semanalmente y al final de la experiencia, además de bioquímicas al concluir el experimento.

#### Experiencia 4

En base a los resultados obtenidos en la primera experiencia, se planteó un segundo experimento en el cual se utilizaron únicamente los tanques (TD), que dieron mejores crecimientos y supervivencias.

En cuanto a la alimentación, en este caso se ensayaron nuevamente tres dietas; un tratamiento control (TA) en el que se suministraron nauplios de Artemia enriquecida, un segundo tratamiento (TB) donde además de la Artemia se añadió zoea de cangrejo moro (*Grapsus grapsus*), y un tercer tratamiento (TC), en el cual se seleccionó únicamente una especie de la dieta C probada en la primera experiencia, en concreto las zoeas de cangrejo blanco (*Plagusia depressa*) que se suministro conjuntamente con Artemia enriquecida.

Las condiciones de cultivo fueron similares al experimento anterior, en cuanto a iluminación, densidad larvaria y renovación de agua. Por el contrario, en este caso solo se utilizó 2 Artemia/ml de 72 horas, las cuales habían sido sometidas a un doble proceso de enriquecimiento durante 48h, con A1 Selco (INVE), sin adición de fitoplancton y rotíferos.



Ilustración 9. Paralarvas de pulpo coalimentadas con Artemia

Nuevamente se tomaron muestras morfométricas, de peso seco e histológicas semanalmente y al final de la experiencia, además de bioquímicas al concluir el experimento.

En el año 2004, las experiencias se centraron en evaluar distintos enriquecedores comerciales para la Artemia, para evitar los inconvenientes que presenta el trabajar con zoeas vivas de crustáceos para alimentar a las larvas de pulpo, y considerar que a nivel comercial hay que procurar no utilizar este tipo de alimento, dada la complicación que supondría al acuicultor.

Los enriquecedores utilizados fueron A1 selco (Inve aquaculture. Bélgica) y Red pepper paste (Bernaqua, Bvba, Bélgica), y por otro lado una microdieta comercial Gemma micro 0.3 (Skretting, Francia), y ralladuras de pescado congelado (*Boops boops*).

El 26 de julio se sembraron las paralarvas recién eclosionadas, en tanques de 100 litro. Se ensayaron por cuadruplicado 4 tratamientos.

TRATAMIENTO	EDAD MAX	SUPERVIVENCIA
T1	34 DIAS	1.5%
T2	38 DIAS	2.6%
T3	16 DIAS	1%
T4	22 DIAS	1.6%

T1: A1 Selco

T2: Red pepper

T3: Red pepper + microdieta

T4: Red pepper + pescado rallado

El tratamiento T2 artemia enriquecida con Red pepper fue la que alcanzó una mayor supervivencia frente a los demás tratamientos ensayados (ver tabla).

Sin embargo el crecimiento fue ligeramente superior en tratamiento de artemia enriquecida con A1 selco (ver gráfica).

Los restantes tratamientos dieron peores resultados tanto en crecimiento como supervivencia, una de las causas que se apuntan como condicionantes, es la calidad del agua en ambos casos ya que el aporte de materia orgánica inerte (Microdieta o ralladuras de pescado) produce una caída en la calidad de agua como consecuencia de la descomposición de la MO en el fondo del tanque y el desarrollo de flora microbiana.

- **Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía. Vigo (Pontevedra).**

En el año 2001 se realizó un proceso de cultivo larvario a partir de 2000 paralarvas eclosionadas en el propio Centro (Iglesias *et al.* 2004). Se utilizó un tanque de 1000 litros (2 paralarvas.l<sup>-1</sup>) circular, de 130 cm de diámetro con paredes negras y fondo blanco. La temperatura media de cultivo fue de 22.5°C y la salinidad de 35 ‰.

Se utilizó luz durante 24 horas, a una intensidad de 600-1000 lux en superficie. La primera semana el cultivo se realizó sin circulación de agua, añadiéndole al medio fitoplancton (*Chlorella* sp., *Isochrysis galbana* y *Chatoceros* sp.). Se utilizó una aireación central en el fondo, con el objetivo de obtener una turbulencia que asegurara la distribución homogénea de fitoplancton, paralarvas y presas. A partir del día 8 se utilizó un circuito abierto de agua 4 horas al día. Cada cuatro días se realizó una limpieza del fondo por aspiración.

La dieta larvaria la constituyó Artemia cultivada durante una semana con un preparado comercial de cereales, a una concentración de 0.05-0.1 ind.ml<sup>-1</sup>. Cuatro días a la semana se le añadieron al tanque zoeas de centolla (*Maja squinado*) a una concentración de 0.01-0.1 ind.ml<sup>-1</sup>.

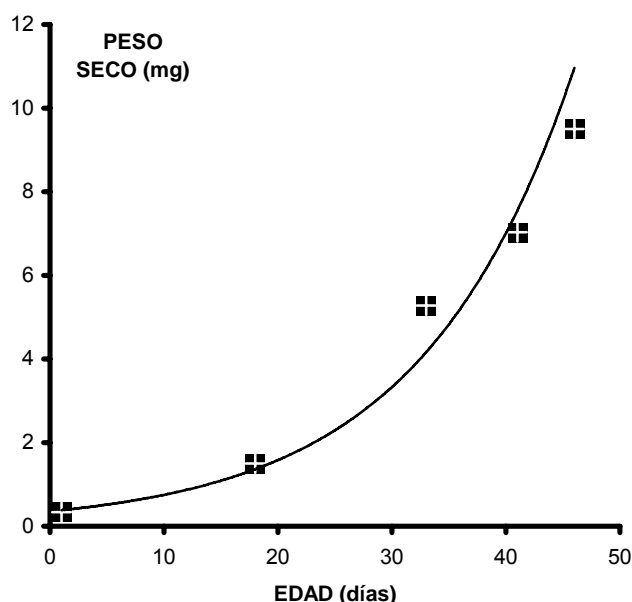


Figura 1.- Peso seco de paralarvas cultivadas con artemia y zoeas de centolla, desde la eclosión hasta los 45 días.

Las paralarvas, con un peso a la eclosión de 0.34±0.01 mg, alcanzaron a día 45 un peso de 9.5±1.9 mg, (figura 1) una tasa de 31.5% de supervivencia y un número medio de ventosas por brazo de 23. A esta edad comenzaron a migrar para las paredes y fondo del tanque.



Para realizar el proceso de destete se separaron dos grupos de 250 paralarvas y se trasladaron a dos tanques pero se observó una mortalidad total en ambos grupos a las pocas horas, probablemente debido al manejo, por lo cual se prosiguió el destete con las 130 supervivientes del tanque original.

En la fase de destete, que duró dos semanas, se registró una temperatura media de 22.5°C y se les suministroo una dieta compuesta por pequeños crustáceos vivos (misidáceos, anfípodos, camarones), porciones de músculo de erizo (*Paracentrotus lividus*) y mejillón (*Mytilus* sp) y gónadas de cangrejo (*Carcinus maenas*). Posteriormente se trasladaron a tanques cuadrangulares de 500 l, con un sustrato de arena, grava y macroalgas, donde se realizó el engorde. La dieta entonces consistió en cangrejos y mejillones congelados. Los pulpos alcanzaron un peso de 0.5 a 0.6 Kg a los seis meses de edad, y un peso final de 1.4 a 1.8 Kg a los ocho meses (figura 2). En esta etapa la supervivencia registrada fue de 1.5%.

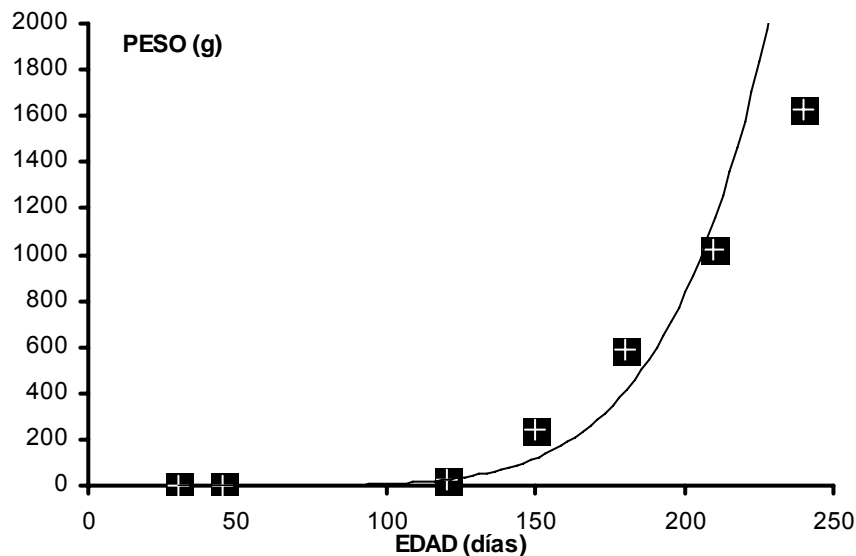


Figura 2.- Peso fresco de juveniles de pulpo hasta los 8 meses de edad.

El proceso de engorde continuó hasta que se produjo la muerte de los últimos ejemplares, un macho de 1.55 Kg y 339 días de edad y una hembra de 1.80 kg. Y 356 días. Ésta última había madurado y realizado una puesta de 112.000 huevos, completándose de esta forma el ciclo de cultivo de esta especie en cautividad por primera vez en el mundo.

## Análisis bioquímicos de las presas y las paralarvas producidas por los distintos sistemas de cultivo

Las paralarvas y presas utilizadas en los diversos sistemas de cultivo fueron procesadas y analizadas en dos centros:

- **Institut de Ciències del Mar, Centre Mediterrani d'Investigacions Marines i Ambientals.**

### *Composició en àcids grassos*

El estudio de la composición de ácidos grasos se ha obtenido a partir de ovarios maduros, huevos en diferente estado de desarrollo, paralarvas recién nacidas, paralarvas a diferentes edades procedentes de diversos cultivos y tratamientos alimentarios durante el primer mes de cultivo y juveniles salvajes de tallas posteriores al asentamiento. La comparación de los perfiles lipídicos y perfiles de ácidos grasos de paralarvas cultivadas frente a los perfiles naturales correspondientes a ovario, huevos, paralarvas recién nacidas y juveniles salvajes, puso de manifiesto la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados y concretamente DHA y EPA en la dieta paralarvaria de *Octopus vulgaris*. Así mismo se determinó la influencia de la dieta basada en *Artemia* sobre el perfil de ácidos grasos de las paralarvas cultivadas. La influencia del perfil de ácidos grasos del alimento se refleja en la composición de paralarvas a 10 días de edad y permanece básicamente sin cambios durante el primer mes de cultivo. El contenido en lípido total de las paralarvas cultivadas incrementó notablemente, así como sus niveles de ácidos grasos monoinsaturados, en detrimento de los ácidos grasos poliinsaturados y, particularmente, DHA. El reducido crecimiento y la elevada mortalidad parecen ser el resultado de una descompensación nutricional en los niveles de ácidos grasos del alimento artificial proporcionado durante los cultivos. Las deficiencias detectadas en los perfiles lipídicos provenientes de paralarvas de cultivo, en comparación con los perfiles lipídicos naturales, sugiere qué componentes nutricionales lipídicos pueden ser de importancia para la futura elaboración de microdietas adecuadas a los requerimientos nutricionales de la especie. En la Figura 1 se muestra la correlación negativa entre el porcentaje de lípido y el peso seco de ejemplares juveniles salvajes recién asentados.

El conjunto de resultados obtenidos durante el presente estudio sobre la composición de ácidos grasos en *Octopus vulgaris* se hallan descritos detalladamente en Navarro & Villanueva (2003) *Aquaculture* 219: 613-631.

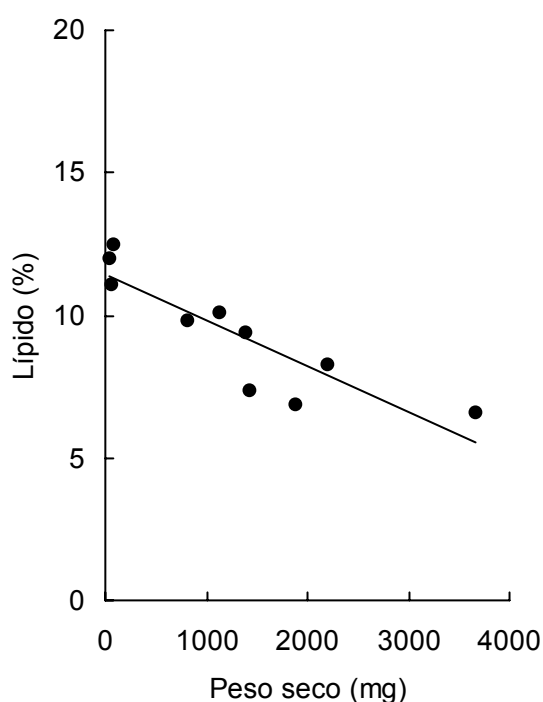


Figura 1. Relación entre los niveles de lípido (% en peso seco) y de peso seco (mg) en 10 juveniles salvajes de *Octopus vulgaris* recolectados en el Mediterráneo noroccidental.

### *Composición de aminoácidos*

El objetivo del presente apartado fue la determinación de la composición de aminoácidos en paralarvas de pulpo y cuantificar el efecto de diferentes dietas de aminoácidos sobre la composición, crecimiento y supervivencia paralarvaria. Paralarvas de pulpo recién nacidas mostraron elevados contenidos de nitrógeno no proteico que representó el 37% del peso seco de las paralarvas. Lisina, leucina y arginina representaron la mitad del contenido en aminoácidos esenciales (EAA), en tanto que glutamato y aspartato representaron la mitad de los aminoácidos no esenciales (NEAA). Se observó un descenso en los niveles de EAA desde ovarios maduros y huevos hasta a los niveles existentes en paralarvas. Recién nacidos tras cuatro días de ayuno perdieron 28% de su peso seco y sus niveles de aminoácidos descendieron tanto en su forma libre como total. Tras dos días de ayuno no se detectó prolina en su forma libre y tras 4 días de ayuno no se detectó tirosina.

La Figura 2 muestra los perfiles de EAA en muestras de ovario, huevos en diferentes estados de maduración, paralarvas recién nacidas y paralarvas recién nacidas tras 2 y 4 días de ayuno. La comparación de los perfiles de EAA totales de las presas ofrecidas mostró pocas diferencias entre los nauplios de Artemia enriquecida y presas naturales como las zoeas de cangrejo recién nacidas (*Pagurus prideaux* y *Maja squinado*). Los perfiles de EAA de nauplios de Artemia enriquecidos solo mostraron diferencias en los niveles de histidina de las paralarvas cultivadas de 10 días de edad. La Figura 3 muestra la comparación entre los niveles de EAA de las paralarvas de pulpo y sus presas.

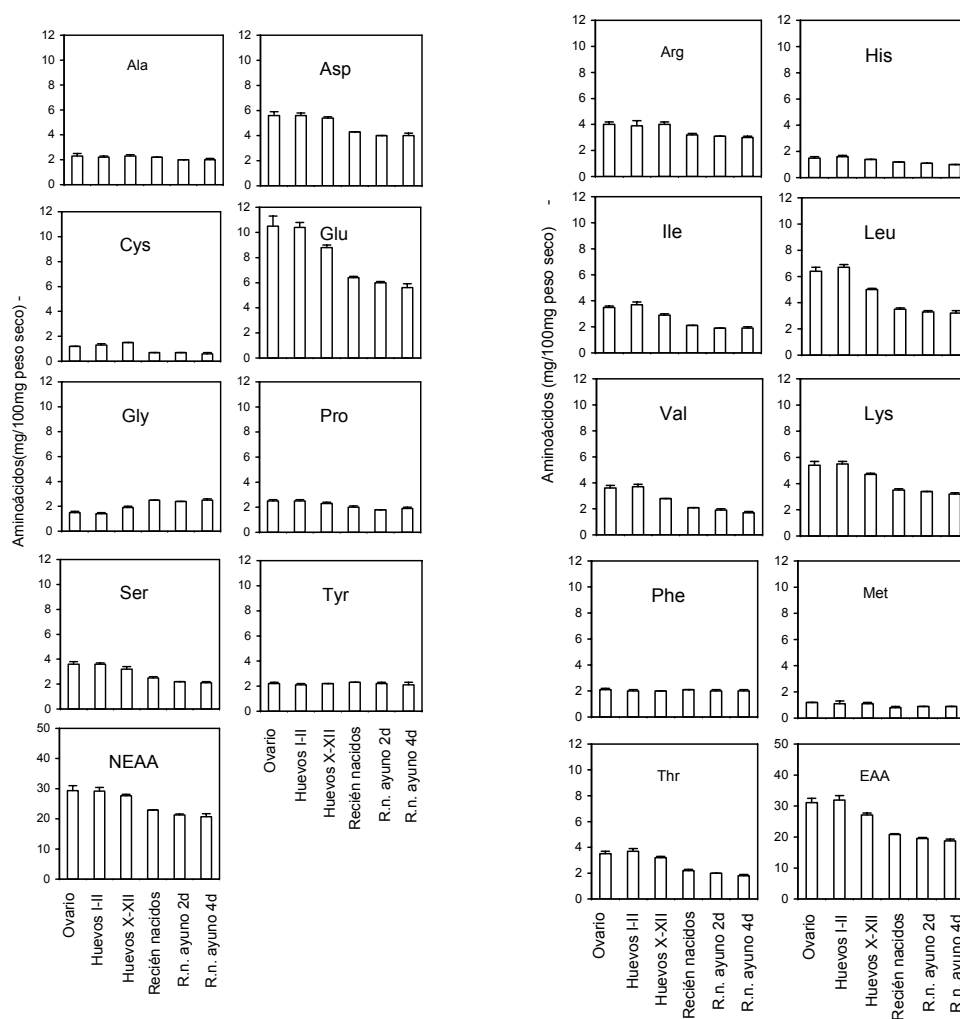


Figura 2. Valores medios y desviación estándar en contenidos de aminoácidos (mg/100 mg de peso seco) en muestras de *Octopus vulgaris* pertenecientes a ovarios maduros, huevos de puestas en estados de desarrollo I-II y X-XII, paralarvas recién nacidas, y paralarvas recién nacidas tras ayuno de 2 y 4 días. EAA, aminoácidos esenciales; NEAA, aminoácidos no esenciales.

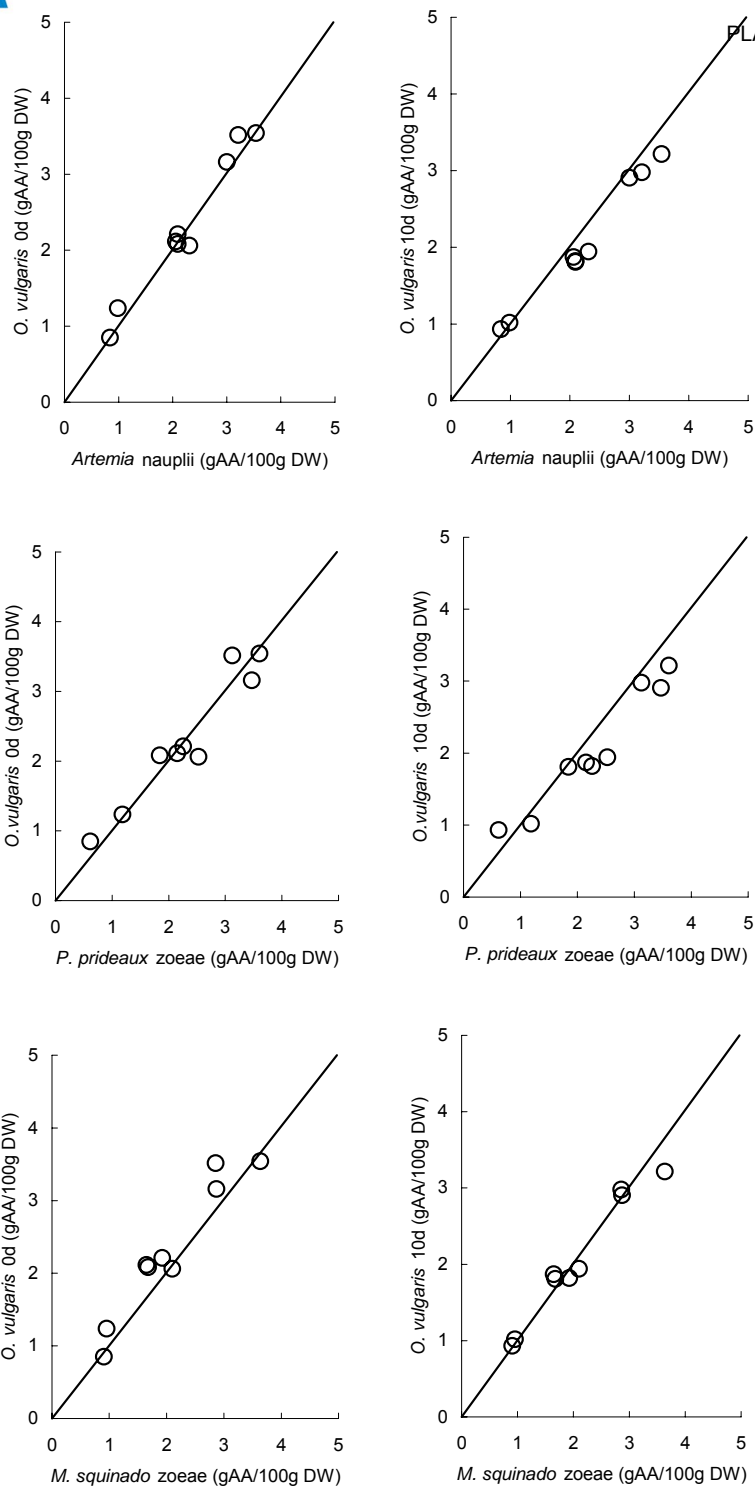


Figura 3. Comparación de los perfiles de aminoácidos esenciales (EAA) de paralarvas de *Octopus vulgaris* recién nacidas (columna izquierda) y paralarvas de edad 10 días (columna derecha) alimentadas con nauplio de *Artemia* enriquecida con SuperSelco<sup>®</sup>, frente a los perfiles de aminoácidos de nauplios de *Artemia* enriquecida y zoeas recién nacidas de *Pagurus prideaux* y *Maja squinado*.

Puntos situados por encima de la línea de pendiente 1 e intercepto 0, sugieren deficiencias para un determinado aminoácido y presa. Se indican (\*) los aminoácidos cuyos niveles se diferencian significativamente ( $p < 0.05$ ) entre paralarva y presa. Cada punto representa una media de tres réplicas. DW indica peso seco.

El presente estudio mostró la capacidad para la absorción de aminoácidos a partir del agua de mar por parte de paralarvas de pulpo, así como de recién nacidos de sepia común (*Sepia officinalis*) y calamar común (*Loligo vulgaris*). En las tres especies estudiadas, fenilalanina tritiada fue incorporada en relación inversa al tamaño de las paralarvas. A edad de 10 días, los cultivos de paralarvas de pulpo que recibieron diariamente una solución de aminoácidos añadida directamente a los tanques de cultivo, mostraron un incremento en sus niveles de aminoácidos totales. A la edad de 20 días los cultivos que recibieron soluciones de aminoácidos registraron supervivencias que en promedio fueron tres veces superiores a los cultivos control. Aún así, el efecto positivo del aporte de soluciones de aminoácidos sobre los cultivos paralarvarios es todavía incierto, ya que el peso seco de las paralarvas así cultivadas fue igual o inferior al de los cultivos control. De cada cultivo se recolectaron muestreos larvarios cada 5 días, hasta la edad de 30 d, que fueron fijados en formol tamponado para su posterior estudio histológico. Estas muestras están siendo elaboradas por miembros del presente proyecto pertenecientes a la C.A. de Baleares.

El análisis del contenido de aminoácidos totales en juveniles salvajes de *Octopus vulgaris* mostró un claro incremento en EAA en función del peso seco de los ejemplares. Estos cambios en composición bioquímica de los juveniles recién asentados muestran un incremento en proteína y a la vez una reducción en lípido conforme crece el animal. Ello es reflejo del notable crecimiento alométrico de la muscular corona braquial, rica en proteínas, en comparación con la cavidad visceral, rica en lípidos. El conjunto de resultados obtenidos durante el presente estudio sobre la composición de aminoácidos en paralarvas de *Octopus vulgaris* se hallan descritos detalladamente en Villanueva et al (2004) Aquaculture (in press).

### *Actividad proteolítica paralarvaria*

El objetivo del presente apartado fue determinar la actividad proteolítica en paralarvas de pulpo cultivadas con diferentes densidades de nauplios *Artemia* enriquecida como alimento (0.2, 2, 4 y 10 nauplios ml<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) y experimentar con el empleo y diseño de millicápsulas como medio para ofrecer pienso húmedo. Tras cinco días de cultivo, el tipo de dieta y ración alimentaria ya se reflejó sobre el peso seco y la actividad proteolítica paralarvaria. El tratamiento con menor ración alimentaria no produjo incremento en peso seco respecto al peso de nacimiento, en comparación con el incremento positivo registrado en los restantes tratamientos. Tras 20 días de cultivo las mejores supervivencias se alcanzaron con raciones de 2 y 4 nauplios ml<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Elevadas densidades de nauplio suplementadas con millicápsulas resultaron en un mejor crecimiento y mayores niveles de actividad proteolítica, tripsina y quimotripsina, pero obtuvieron muy baja supervivencia. La actividad proteolítica total se correlacionó con el peso seco paralarvario, en tanto que los niveles de tripsina y quimotripsina se mantuvieron a niveles de nacimiento solo para los tratamientos con elevada ración alimentaria, descendiendo en los restantes. Las millicápsulas diseñadas para la presente experiencia fueron ingeridas por las paralarvas a edad de 5 días, pero no produjeron incremento en peso significativo y su utilidad es incierta. Se pudo concluir que nauplios de *Artemia* enriquecidos pueden ser de utilidad como alimento inicial de paralarvas de pulpo para lograr doblar el peso de nacimiento de éstas, periodo que se extiende entre 11-14 días a 20°C. Transcurrido este periodo es necesaria presa de mayor tamaño y/o microdieta adecuada. El conjunto de resultados obtenidos durante el presente estudio sobre la actividad proteolítica en paralarvas de *Octopus vulgaris* se hallan descritos detalladamente en Villanueva et al (2002).

Grado de consecución de objetivos.

Los objetivos previstos se han centrado en el cultivo larvario intensivo, habiéndose realizado las actividades previstas para el proyecto. Aún así, el discreto crecimiento paralarvario de todos los cultivos realizados empleando diferentes protocolos alimentarios y la elevada mortalidad registrada, no ha permitido la obtención de juveniles bentónicos.

Se ha logrado la obtención de perfiles bioquímicos lipídicos y proteicos de paralarvas y sus presas que serán de elevado interés para determinar los requerimientos nutricionales de esta especie durante su cultivo larvario. A partir de los datos obtenidos se considera que el principal problema a resolver durante el cultivo larvario es de orden nutricional. Se considera que para alcanzar los requerimientos nutricionales paralarvarios, los futuros cultivos basados en la línea de coalimentación (Artemia + microdieta) deben considerar alimentos equilibrados en fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, particularmente DHA, así como proteínas ricas en lisina, leucina y arginina. Los perfiles lipídicos de nauplios de Artemia enriquecida se hallan distantes de los requerimientos de paralarvas de pulpo. Por otro lado, el perfil de aminoácidos esenciales de nauplios de Artemia enriquecidos no parece desviarse en gran medida del perfil de aminoácidos de paralarvas de pulpo durante la primera alimentación, siendo solo ligeramente deficitarios en histidina. La obtención de microdietas equilibradas de adecuada palatabilidad y aceptación por las paralarvas es un objetivo todavía por alcanzar.

- **Centro de Investigaciones Mariñas (Xunta de Galicia)**

*Análisis bioquímicos de presas y paralarvas.*

Las muestras de presas y de paralarvas analizadas durante los años 2001-2003 fueron suministradas por el C.O. de Vigo del IEO y por el Centro de Experimentación Pesquera de Gijón perteneciente a la C.A. Asturiana.

La alimentación de las paralarvas ha consistido básicamente en Artemia salina adulta de diferentes edades y con diferentes enriquecimientos complementada con otro organismo vivo que pudiese cubrir parcialmente los requerimientos nutritivos de las paralarvas de pulpo. Se han utilizado zoeas de centolla suministradas durante un corto período de tiempo con la finalidad de plantear un sistema viable desde el punto de vista industrial y de complementar una dieta estándar como Artemia con un alimento similar al utilizado por las paralarvas en el medio natural. También se han analizado otro tipo de presas como misidáceos, pulga de mar, así como zooplancton congelado y liofilizado utilizado como enriquecedor de la Artemia.



Las paralarvas analizadas procedentes de los cultivos realizados en el C.O. de Vigo del IEO se cultivaron siguiendo la metodología descrita por Iglesias et al. (1997) y Moxica et al. (2001). El alimento de los reproductores consiste en crustáceos de bajo valor comercial y el cultivo larvario se realiza en tanques de 1000-2000 litros de capacidad habiéndose realizado un cultivo en tanques de 9000 litros. En el Centro de Experimentación Pesquera de Gijón, el cultivo se realizó en tanques de un volumen de 30 l. La alimentación larvaria consistió en el suplemento diario de 0,7 - 1,0 zoeas/ml y de 0,3 - 0,8 Artemias/ml en días alternos. Se realizaron recuentos larvarios y cambio de tanque cada 20 días.

Se realizaron los siguientes análisis bioquímicos: proteínas totales por el método de Bradford (1976). Los lípidos totales fueron extraídos con cloroformo-metanol (2:1) esencialmente por el método de Blight & Dyer (1959) modificado por Fernández Reiriz et al (1989) y la determinación cuantitativa se realiza por gravimetría. Las clases de lípidos se separan por TLC según Freeman & West (1966) y Bitman & Wood 1982 y se cuantifican por densitometría. Los ácidos grasos se analizan por Cromatografía de Gases (CG).

#### *Análisis de presas*

En las Tablas I a y I b se presentan los resultados de los análisis realizados durante los años 2001-2003 de las siguientes presas: Artemia salina en diferentes estados y tamaños: Artemia de 1 día de vida en inanición, Artemia enriquecida con fitoplancton (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*) y con zooplancton congelado durante 6 y 24 horas, Artemia adulta de 3, 16 y 36 días de vida con tallas de 500µm, 1,28 mm y 3,92 mm alimentada durante 48 horas con zooplancton liofilizado, zoeas de centolla (*Maja squinado*), misidáceos y zooplancton congelado y liofilizado.

Tabla la. Composición bioquímica de presas vivas utilizadas en la alimentación larvaria del pulpo (2001-2003)

	Artemia 1 día de vida en inanición	Artemia enriquecida (Tetra, Iso, Chaet.)	Artemia enriquecida 6 horas (z.congelado)	Artemia enriquecida 24 horas (z.congelado)	Artemia adulto 3 días (z.liofilizado)	Artemia adulto 16 días (z.liofilizado)	Artemia adulto 36 días (z.liofilizado)
<i>Proteínas y lípidos (% Peso seco)</i>							
Proteínas	37,83	48,35	40,43	40,58	55,82	54,29	60,01
Lípidos	18,65	10,93	21,98	21,32	19,20	22,89	12,18
<i>Clases de lípidos (% total de lípidos)</i>							
Esteres+ Ceras	0,00	4,89	3,59	0,00	0,00	0,00	0,00
Triglicéridos	39,6	0,00	57,0	35,44	40,60	40,6	38,05
Á. grasos libres	0,70	11,36	4,64	2,04	9,64	4,36	9,62
Esteroles	2,17	5,85	4,80	2,69	2,54	2,57	2,54
Fosfolípidos	26,7	52,55	29,97	36,2	30,02	25,69	52,16
<i>Acidos Grasos (% sobre el total)</i>							
PUFA	18,9	30,7	26,4	27,3	26,6	38,6	32,9
Saturados	26,6	24,4	25,1	24,2	26,3	24,1	25,7
Monoinsaturados	54,5	37,5	48,5	48,6	47,2	37,3	41,4
Sum (n-3)	12,6	22,24	20,8	22,0	20,8	20,5	19,3
Sum (n-6)	6,14	7,8	5,57	5,0	5,59	17,6	13,5
EPA 20:5(n-3)	11,0	17,24	15,7	17,0	15,6	10,5	13,2
DHA 22:6(n-3)	0,05	0,60	2,95	2,85	2,38	3,21	2,24
(n-3)/(n-6)	2,04	2,85	3,72	4,41	3,73	1,16	1,43
DHA/EPA	0,00	0,03	0,19	0,17	0,15	0,31	0,17

Tabla Ib Composición bioquímica de presas vivas utilizadas en la alimentación larvaria del pulpo (2001-2003)

	Zoeas de centolla	Misidáceos	Pulga de mar ( <i>Talitrus saltator</i> )	Zooplankton congelado	Zooplankton liofilizado
<i>Proteínas y lípidos (% Peso seco)</i>					
Proteínas	16,77	12,60	19,97	22,37	35,91
Lípidos	10,61	14,20	19	13,47	9,65
<i>Clases de lípidos (% total de lípidos)</i>					
Esteres+ Ceras	4,89	0,00		12,11	14,79
Triglicéridos	0,00	0,00		0,62	0,00
Á. grasos libres	10,72	49,47		22,13	29,71
Esteroles	12,17	5,89		2,02	0,00
Fosfolípidos	57,82	10,72		26,83	20,95
<i>Acidos Grasos (% sobre el total)</i>					
PUFA	46,74	51,15	18,29	39,82	43,41
Saturados	25,12	28,33	35,45	35,77	35,85
Monoinsaturados	21,68	17,25	40,75	24,40	20,74
Sum (n-3)	37,76	47,26	4,81	36,96	39,70
Sum (n-6)	7,24	2,86	12,54	2,27	2,67
EPA 20:5(n-3)	20,32	26,94	2,63	20,97	14,57
DHA 22:6(n-3)	15,53	17,67	0,58	13,62	19,55
(n-3)/(n-6)	5,21	16,52	0,38	16,28	14,87
DHA/EPA	0,76	0,66	0,22	0,65	1,34

Los resultados reflejan la influencia del enriquecimiento sobre la composición bioquímica de la Artemia. Se alcanzan valores de proteínas del 48 y 41% del peso seco en Artemia enriquecida con fitoplancton y zooplancton respectivamente frente al 38% de los metanauplius en inanición. En cuanto a las diferentes clases de lípidos, los fosfolípidos representan el 52% de los lípidos totales cuando el enriquecimiento se realiza con fitoplancton y el 36% tras 24 horas de enriquecimiento con zooplancton congelado. No existe una relación clara entre el contenido de triglicéridos (TAG) en el zooplancton que carece de esta clase de lípidos y su contenido en los metanauplius de Artemia enriquecidos, donde los TAG se incrementan a las 6 horas de enriquecimiento con zooplancton para volver a los valores iniciales a las 24 horas. El contenido en PUFA supone en la Artemia en inanición el 19% del total de ácidos grasos, que se incrementa hasta el 31% cuando está enriquecida con fitoplancton y entre el 26- 27% del total con zooplancton congelado. Particularmente destacable es la diferencia existente en el contenido del ácido docosahexaenoico, 22:6(n-3), entre la Artemia en inanición que carece de este ácido graso y los metanauplius enriquecidos con zooplancton congelado donde suponen el 3% del total frente al 0,6% obtenido cuando se enriquece con fitoplancton.

La Artemia adulta alimentada con zooplancton liofilizado presenta valores de proteínas más elevados que los metanauplius (54-60% del peso seco). El contenido en fosfolípidos se incrementa notablemente desde los 16 días de vida en que supone el 26% de los lípidos totales hasta el 52% con 36 días de vida. Los TAG suponen entre el 38 y el 41% de los lípidos totales.

El contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) varía en el zooplancton entre el 40 y el 43% del total de ácidos grasos. La Artemia adulta presenta el contenido más alto de PUFA con 16 días de vida suponiendo el 39% del total de ácidos grasos. El 22:6(n-3) representa el 3% del total de ácidos grasos. Este ácido graso alcanza valores de 14 y 19% del total en zooplancton congelado y liofilizado respectivamente.

Las zoeas de centolla utilizadas como presa complementaria en la alimentación de las paralarvas de pulpo en los cultivos realizados en el C.O. de Vigo y en la C.A. de Asturias presentan una composición bioquímica notablemente diferente a la Artemia.

Mientras que las proteínas y lípidos totales presentan en general valores más bajos, 17 y 11% del peso seco respectivamente, si analizamos las clases de lípidos observamos un alto contenido en fosfolípidos (58% del total de lípidos) sensiblemente más elevado que los obtenidos en la Artemia enriquecida con zooplancton (30-36%) y solo comparable a los metanauplius enriquecidos con fitoplancton y a la Artemia adulta de 36 días alimentada con zooplancton liofilizado donde alcanzan el 52% del total de lípidos. Los ácidos grasos libres y los esteroides presentan también valores más elevados. Los PUFA representan en las zoeas el 47% del total de ácidos grasos muy superior a los valores obtenidos en los metanauplius enriquecidos y adultos de Artemia. El 22:6(n-3) representa el 15,5% del total de ácidos grasos frente al máximo del 3% de la Artemia. La pulga de mar (*Talitrus saltator*) presenta un bajo contenido en PUFA. Otras presas utilizadas a pequeña escala en la alimentación de paralarvas en la C.A. de Asturias como los misidáceos aunque presentan un contenido de fosfolípidos sensiblemente inferior a Artemia y zoeas podrían ser de interés dado su alto contenido en PUFA y en particular de 22:6(n-3).

Durante el año 2004 se han recibido procedentes del IEO de Vigo diversas muestras de presas que consisten esencialmente en Artemia a diferentes concentraciones enriquecida con Isochrysis y con diferentes concentraciones de zooplancton congelado y liofilizado, así como bolo (*Ammodytes* sp.) y zooplancton liofilizado. El bolo liofilizado presenta un mayor nivel de proteínas (54% del peso seco) y de fosfolípidos (60% del total de lípidos) que el resto de los alimentos analizados. El nivel de 22:6(n-3) representa en el bolo liofilizado y en el zooplancton liofilizado el 13 y 16% del total de ácidos grasos respectivamente, muy superior a los valores obtenidos en la Artemia enriquecida que en estas muestras oscila entre el 0,3-0,6% del total.

### *Análisis de paralarvas*

En las Tablas II a y b se presentan los datos correspondientes a la composición bioquímica de las muestras de paralarvas de pulpo procedentes de los cultivos realizados durante los años 2001-2003 en el CO. de Vigo (lote 1) y en la C.A. Asturiana (lote 2).

En ambos casos se ha utilizado un sistema semi-intensivo a diferentes volúmenes de cultivo (más altos en el IEO de Vigo que en la C.A. Asturias) y la alimentación ha consistido básicamente en la utilización de Artemia enriquecida y zoeas de crustáceos. Este sistema ha permitido obtener supervivencias del 31% en el C.O. de Vigo a día 40 de vida y del 60 al 90% a los 20 días de vida en la C.A. Asturias.

Tabla IIa. Composición bioquímica de paralarvas procedentes IEO (Vigo)  
años 2001-2003

	Día 0	Día 1	Día 23	Día 30	Día 45	Día 56
<i>Proteínas y lípidos (% Peso seco)</i>						
Proteínas	40,19	54,38	43,73	46,63	61,22	46,92
Lípidos	13,44	14,29	17,56	10,9	15,36	13,17
<i>Clases de lípidos (% total de lípidos)</i>						
Esteres+ Ceras	0,00	0,17		0,00	0,00	0,00
Triglicéridos	0,00	0,17		0,00	0,00	0,00
Á. grasos libres	38,14	3,84		15,56	1,65	4,39
Esteroles	8,30	22,09		16,20	14,43	17,95
Fosfolípidos	36,45	34,08		51,73	43,91	37,66
<i>Acidos Grasos (% sobre el total)</i>						
PUFA	53,21	41,1	41,57	43,5	43,21	46,6
Saturados	28,34	34,49	33,74	30,7	31,65	29,8
Monoinsaturados	10,93	9,72	17,34	18,3	16,5	13,4
Sum (n-3)	41,80	34,19	30,65	31,7	26,3	33,3
Sum (n-6)	7,07	4,25	7,09	8,7	12,07	9,2
EPA 20:5(n-3)	15,87	13	15,97	19,79	14,38	18,97
DHA 22:6(n-3)	23,90	19,97	12,52	7,76	10,73	10,65
(n-3)/(n-6)	5,91	0,12	0,23	3,64	0,46	0,28
DHA/EPA	1,51	1,54	0,78	0,39	0,75	0,56

Tabla IIb. Composición bioquímica de paralarvas procedentes de C.A.Asturias.

	Día 0	Día 30	Día 40
<i>Proteínas y lípidos (% Peso seco)</i>			
Proteínas	32,85	33,04	41,19
Lípidos	13,73	16,39	10,24
<i>Clases de lípidos (% total de lípidos)</i>			
Esteres+ Ceras	2,43	3,90	
Triglicéridos	0	0	
Á. grasos libres	6,80	21,22	
Esteroles	11,58	11,35	
Fosfolípidos	46,36	36,81	
<i>Acidos Grasos (% sobre el total)</i>			
PUFA	56,12	49,92	42,62
Saturados	31,45	29,01	33,41
Monoinsaturados	7,95	16,57	16,01
Sum (n-3)	46,82	37,61	30,71
Sum (n-6)	5,99	7,97	7,10
EPA 20:5(n-3)	15,13	16,13	13,63
DHA 22:6(n-3)	26,04	19,17	15,43
(n-3)/(n-6)	7,82	4,72	4,32
DHA/EPA	1,72	1,19	1,13

Las diferencias más destacables en la composición bioquímica de las paralarvas de ambas procedencias (véanse paralarvas de día 30) son un mayor contenido proteico y en fosfolípidos en las paralarvas del lote 1 y un mayor % de PUFA y especialmente 22:6(n-3) en el lote 2. Estas diferencias pueden ser debidas a que en ambos lotes no se ha seguido un protocolo estandarizado ni en las condiciones de cultivo ni en la alimentación (tipo de enriquecedor de la Artemia, cantidad de zoeas añadidas, secuencia de alimentación etc.). Por ello estos resultados deberían ser ratificados con posteriores experimentos.

La Tabla III se ha realizado tomando los datos medios a las diferentes edades de las paralarvas de los cultivos realizados durante los años 2001-2003 en los centros citados con la finalidad de ofrecer una visión general de la evolución de la composición bioquímica de las paralarvas a lo largo del desarrollo.

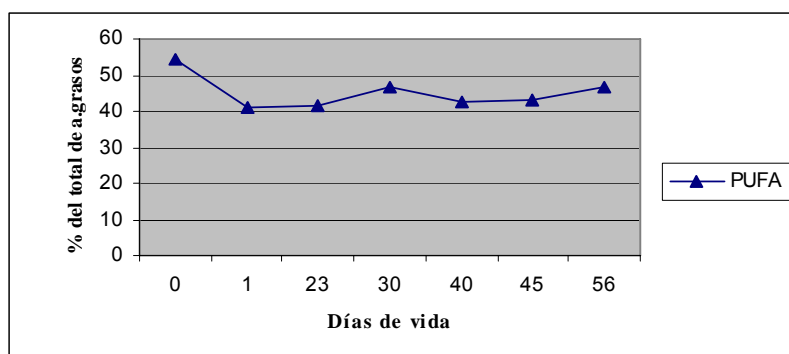
Tabla III. Composición bioquímica de paralarvas de pulpo a lo largo de su desarrollo

	Día 0	Día 1	Día 23	Día 30	Día 40	Día 45	Día 56
<i>Proteínas y lípidos (% Peso seco)</i>							
Proteínas	37,75	54,38	43,73	39,84	41,19	61,22	46,92
Lípidos	13,54	14,29	17,56	13,65	10,24	15,36	13,17
<i>Clases de lípidos (% total de lípidos)</i>							
Esteres+ Ceras	1,22	0,17		1,95		0,00	0,00
Triglicéridos	0,00	0,17		0,00		0,00	0,00
Á. grasos libres	22,47	3,84		18,39		1,65	4,39
Esteroles	9,94	22,09		13,78		14,43	17,95
Fosfolípidos	41,41	34,08		44,27		43,91	37,66
<i>Acidos Grasos (% sobre el total)</i>							
PUFA	54,18	41,1	41,57	46,71	42,62	43,21	46,6
Saturados	29,38	34,49	33,74	29,86	33,41	31,65	29,8
Monoinsaturados	9,94	9,72	17,34	17,44	16,01	16,5	13,4
Sum (n-3)	43,48	34,19	30,65	34,66	30,71	26,3	33,3
Sum (n-6)	6,71	4,25	7,09	8,34	7,1	12,07	9,2
EPA 20:5(n-3)	15,62	13	15,97	17,96	13,63	14,38	18,97
DHA 22:6(n-3)	24,62	19,97	12,52	13,47	15,43	10,73	10,65
(n-3)/(n-6)	0,15	0,12	0,23	0,24	0,23	0,46	0,28
DHA/EPA	1,58	1,54	0,78	0,75	1,13	0,75	0,56

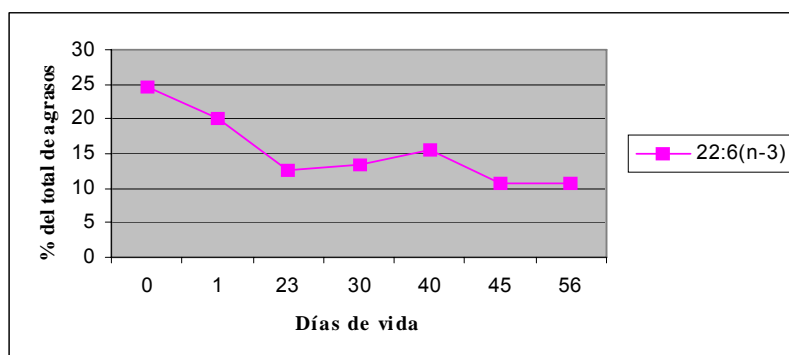
Las proteínas varían en las paralarvas de pulpo entre el 38 y el 61% del peso seco mientras que los valores de lípidos totales oscilan entre el 10 y el 18%. Las paralarvas de pulpo carecen prácticamente de lípidos de reserva (TAG y Ésteres + ceras). Los ácidos grasos libres y los esteroles están representados en cantidades variables representando a día 56 de vida el 4,4 y el 18% de los lípidos totales respectivamente. Los fosfolípidos representan la clase de lípidos mayoritaria en las paralarvas de pulpo suponiendo entre el 34 y el 44% del total de lípidos.



En lo referente a ácidos grasos, los PUFA suponen entre el 41 y el 54%, los saturados oscilan entre el 30-34% y los monoinsaturados representan entre el 10 y el 17% del total. Los PUFA (n-3) suponen el 43,5% del total de ácidos grasos en las paralarvas recién eclosionadas produciéndose un descenso a lo largo del desarrollo con valores del 26 y 33% a días 45 y 56 de vida respectivamente. El nivel de 22:6(n-3) supone el 25% del total en las paralarvas recién eclosionadas descendiendo a lo largo del desarrollo hasta valores del 11% a días 45 y 56 de vida (Fig.1 a y b).



(a)



(b)

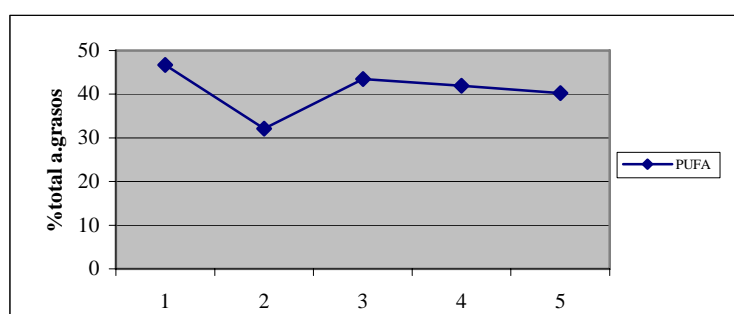
Fig.1. Evolución de los valores medios de PUFA y 22:6(n-3) a lo largo del desarrollo de las paralarvas de pulpo alimentadas c/Artemia + zoeas de crustáceos

Los resultados de las paralarvas analizadas procedentes de los cultivos realizados en el IEO (Vigo) en el año 2004 se exponen en la Tabla IV. Se corresponden con paralarvas de 9 y 30 días de vida alimentadas con Artemia enriquecida con zooplancton, paralarvas de 30 días de vida alimentadas con Artemia + raspado de bolo, Artemia + raspado de zooplancton y bolo desde el día 9 de vida y paralarvas de 46 días de vida alimentadas con Artemia + raspado de bolo.

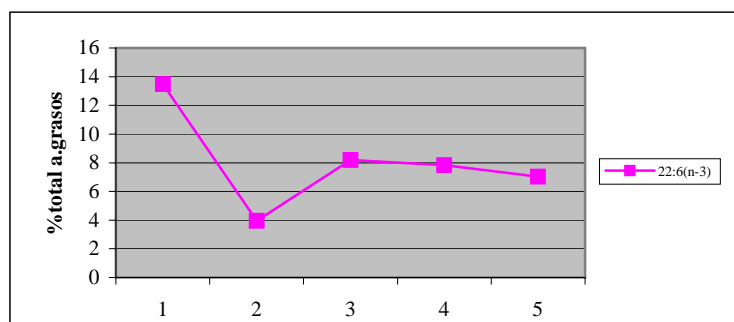
Tabla IV. Análisis paralarvas 2004 procedencia IEO (Vigo)

	Día 9 Alimento Art. enriquecida con zoop.	Día 30 Alimento: Art.enriquecida con zoop	Día 30 Alimento: Art.+raspado de bolo	Día 30 Alimento: Art.+raspado de zoop.	Día 30 Alimento: Bolo desde día 9	Día 46 Alimento: Art.+raspado de bolo
<i>Proteínas y lípidos (% Peso seco)</i>						
Proteínas	49,04	46,82	48,79	44,01	45,58	41,37
Lípidos	17,18	18,16	14,74	16,07	18,97	14,83
<i>Clases de lípidos (% total de lípidos)</i>						
Ésteres+ Ceras	2,12	2,14	2,46	2,49	1,76	2,70
Triglicéridos	3,62	4,83	2,63	7,14	0,96	5,97
Á. grasos libres	0,91	0,00	0,00	0,00	13,93	0,00
Esteroles	12,15	10,92	14,90	11,53	9,23	16,04
Fosfolípidos	41,21	42,12	40,01	40,29	34,53	35,29
<i>Acidos Grasos (% sobre el total)</i>						
PUFA	36,58	32,08	43,46	41,97	40,27	41,42
Saturados	28,63	29,74	29,98	29,93	30,97	34,00
Monoinsaturados	34,79	38,18	26,56	28,10	28,76	24,58
Sum (n-3)	27,34	20,88	29,19	28,34	25,11	26,89
Sum (n-6)	6,66	8,87	11,35	11,01	14,00	11,98
EPA 20:5(n-3)	14,98	15,82	18,99	18,30	13,08	18,33
DHA 22:6(n-3)	11,25	3,94	8,19	7,84	7,02	6,06
(n-3)/(n-6)	4,11	2,35	2,57	2,57	1,79	2,24
DHA/EPA	0,75	0,25	0,43	0,43	0,54	0,33

Los PUFA representan entre el 40-43% del total de ácidos grasos en las paralarvas de 30 días de vida alimentadas con Artemia complementada con raspado de bolo liofilizado ó de zooplancton liofilizado así como en las que han sido alimentadas con bolo desde el día 9 de vida. El 22:6(n-3) supone en estas muestras entre el 7-8% del total de ácidos grasos. Aunque estos valores son inferiores a los valores medios, obtenidos en paralarvas de la misma edad alimentadas con Artemia + zoeas, donde los PUFA suponen el 47% del total de ácidos grasos y el 22:6(n-3) el 13,5%, son similares a los obtenidos en paralarvas cultivadas en el IEO de Vigo (lote 1) y superiores a los obtenidos con Artemia enriquecida con batido de zooplancton en que los PUFA suponen el 32% y el 22:6(n-3) alcanza el 4% del total de ácidos grasos (Fig.2 a y b).



a



b

Fig.2. Evolución de los valores de PUFA y 22:6(n-3) en paralarvas de 30 días de vida alimentadas con:

1. Artemia+zoeas de crustáceos
2. Artemia enriquecida con zooplancton
3. Artemia +raspado de bolo
4. Artemia + raspado de zooplancton
5. Bolo desde el día 9 de vida

Además, el Centro de Investigaciones Mariñas, estudió el efecto de la alimentación del stock de reproductores en la calidad de las paralarvas producidas:

Estos experimentos se llevaron a cabo durante los años 2002 y 2003 y consistieron en ver el efecto producido por la alimentación de reproductores de pulpo sobre las paralarvas producidas.

Se analizaron paralarvas procedentes de reproductores alimentados con crustáceos de bajo valor comercial (*Carcinus maenas* y *Polybius henslowi*) par A, y 50% crustáceos y 50% peces (*Micromesisteus poutassou*, *Trachurus trachurus* y *Sardina pilchardus*), par B y con merluza y calamar (par C).

Los resultados se muestran en la Tabla V y nos indican que la composición bioquímica de las paralarvas A y B es bastante similar y existen diferencias significativas respecto a las paralarvas C. Así, el contenido proteico alcanza el 56% en par C frente al 36 y el 33% en par A y par B. En cuanto a la composición lipídica, lo más destacable es el menor contenido de fosfolípidos de Par C con valores de 36% del total de lípidos frente al 40 y 44% de los lípidos totales en par A y par B respectivamente. Los esteroides son por el contrario más altos en par C suponiendo el 20% del total de lípidos frente al 13 y 15% en par A y par B.

Tabla V. Composición bioquímica de paralarvas de pulpo recién eclosionadas procedentes de reproductores alimentados con diferentes alimentos.

	Par A	Par B	Par C
<i>Proteínas y lípidos (% Peso seco)</i>			
Proteínas	35,87	33,06	56,07
Lípidos	15,10	15,84	13,89
<i>Clases de lípidos (% total de lípidos)</i>			
Ésteres + Ceras	0,00	0,00	0,00
Triglicéridos	0,00	0,00	0,00
Á. grasos libres	6,65	0,88	4,06
Esteroles	12,88	15,41	19,95
Fosfolípidos	40,47	43,72	35,99
<i>Ácidos Grasos (% sobre el total)</i>			
PUFA	56,03	56,55	47,13
Saturados	31,56	31,73	41,90
Monoinsaturados	12,41	11,71	10,97
Sum (n-3)	44,26	46,96	38,66
Sum (n-6)	7,3	5,17	5,15
EPA 20:5(n-3)	16,43	17,85	14,59
DHA 22:6(n-3)	25,54	27,33	22,75
(n-3)/(n-6)	6,06	9,08	7,51
DHA/EPA	1,55	1,53	1,56

Todos los ácidos grasos tienen valores sensiblemente más altos en par A y par B que en par C. Los PUFA alcanzan valores del 56% del total de ácidos grasos en par A y par B frente al 47% en par C. Los PUFA de la serie (n-3) suponen el 44 y 47% del total de ácidos grasos en par A y par B y el 39% en par C. Aunque el contenido en 20:5 (n-3) y 22:6 (n-3) es ligeramente más alto en par A y par B que en par C sin embargo la tasa 22:6(n-3)/20:5(n-3) alcanza valores similares en los tres tipos de paralarvas.

Grado de consecución de objetivos.

Se han llevado a cabo las actividades previstas en el CIMA en cuanto a análisis bioquímicos de presas y paralarvas de pulpo y a la influencia de la alimentación de los reproductores sobre las paralarvas producidas.

Los datos presentados de composición bioquímica junto con los ya existentes permiten avanzar en el conocimiento de los requerimientos nutritivos de las paralarvas, pero no se han obtenido datos definitivos sobre su influencia directa sobre el crecimiento y la supervivencia de las paralarvas.

La buena aceptabilidad de las zoeas de centolla observada en las paralarvas de pulpo junto con el mejor crecimiento registrado cuando han sido utilizadas como complemento alimenticio, así como su composición bioquímica que parece adecuarse a los requerimientos lipídicos del pulpo, alto contenido en fosfolípidos, carencia de triglicéridos y alto porcentaje de PUFA(n-3) en particular del 22:6(n-3), hacen que estas presas sean consideradas de gran valor en las primeras fases de alimentación viva.

La composición en ácidos grasos de las paralarvas alimentadas con Artemia + zoeas es mejor que con los otros alimentos probados y semejante a la de los ejemplares procedentes del medio natural, sin embargo la utilización de este método de alimentación a escala industrial es muy discutible ya que exigiría la disponibilidad de una gran cantidad de presas vivas en estado larvario de esos crustáceos durante el proceso de cultivo larvario.

Debido al alto contenido en PUFA de las paralarvas de pulpo alimentadas con Artemia con raspado de bolo o zooplancton, en especial del 22:6(n-3), la utilización de estos alimentos en el cultivo larvario del pulpo, ya probados con éxito en Japón debe ser tenido en consideración para futuros cultivos.

Según los resultados mostrados las paralarvas procedentes de reproductores alimentados con crustáceos y crustáceos y peces presentarían una mejor composición lipídica (contenido más alto de fosfolípidos y de ácidos grasos) y las procedentes de los reproductores alimentados con merluza y calamar presentarían un más alto contenido proteico.

### Análisis histológico de las paralarvas producidas por los distintos sistemas de cultivo

Las experiencias descritas en este apartado se han llevado a cabo en las Comunidades Autónomas Balear y Canaria.

- **Estación de Acuicultura de la Conselleria d'Agricultura i Pesca Balear.**

La gran mortalidad que se observa en la fase de cría larvaria del pulpo, *O. vulgaris*, es el principal impedimento para cerrar el ciclo de cultivo de la especie. Muy poco se conoce de esta fase temprana de vida en el pulpo salvaje, que permita aportar datos sobre la etiología de la mortalidad larvaria observada en cría experimental. Se sabe que, que después de la eclosión, las paralarvas forman parte del plancton hasta que alcanzan la fase bentónica, experimentando múltiples cambios morfológicos relacionados con la adaptación a los nuevos hábitos de vida, la duración de los cuales depende parcialmente de la temperatura (Mangold, 1983). A este respecto, es muy interesante la revisión de Nixon & Mangold (1996), que permite integrar el conocimiento existente hasta el momento, relacionándolo con los cambios observados en el desarrollo del sistema nervioso central de la paralarva y su comportamiento etológico. Esta transición al estado adulto no implica una metamorfosis radical como se observa en otros invertebrados marinos, pero sí cambios secuenciales (Vecchione, 1982), que son mayores en aquellos octópodos de huevos pequeños y juveniles planctónicos ( Guerra, 1992), como es el caso de *O. vulgaris*.

Con la finalidad de mejorar los aspectos tecnológicos de la cría larvaria del pulpo y optimizar su proceso de engorde, la JACUMAR puso en marcha el Plan Nacional del Pulpo (2001-2004), coordinando los esfuerzos investigadores realizados en las diversas CCAA participantes en el proyecto. Con respecto a la cría larvaria, durante los tres años de duración de este Plan Nacional se han empleado diferentes regímenes alimenticios y sistemas de cría larvaria por parte de los distintos equipos implicados, con el objetivo último de encontrar la clave que permita cerrar el ciclo de la especie en cautividad con tasas de supervivencia razonables. En el marco del citado Plan Nacional, muestras de paralarvas correspondientes a las diversas experiencias de cría realizadas fueron remitidas a nuestro grupo de la CA de Baleares (P3) para su estudio histológico.

Los resultados obtenidos se exponen a continuación, describiéndose las alteraciones detectadas en las diversas experiencias de cría y detallándose éstos por grupos de investigación y año de suministro de muestras.

Las paralarvas estudiadas han sido proporcionadas por los grupos de investigación P5 (IRTA-CSIC), P2 (CA ASTURIAS) y P8 (IEO VIGO). El grupo P1 (CA Andalucía) no nos suministró muestras para su estudio.

Las muestras suministradas por los diversos grupos han sido las siguientes:

P2 (CA ASTURIAS), paralarvas criadas con zoeas de centollo suplementadas con metanauplius de *Artemia*, en días alternos, en cultivo semi-intensivo, según metodología descrita en el informe del Plan Nacional del Pulpo correspondiente al año 2002. Muestras recibidas el año 2002, no se especifica fecha de cría larvaria. Muestras desde 1 día de edad hasta 40 días, con la siguiente periodicidad (d = días) y en la siguiente cantidad (n = número de ejemplares):

1d n = 24	25d n = 5
5d n = 5	30d n = 5
10d n = 6	35d n = 5
15d n = 5	40d n = 3
20d n = 5	

P5 (IRTA-CSIC), paralarvas criadas en cultivo intensivo con aporte de *Artemia* enriquecida con diversos tratamientos. Los detalles de la metodología aplicada en esta experiencia de cría larvaria aparecen publicados en Villanueva *et al.* (2004). Muestras correspondientes a las crías larvarias realizadas durante los meses de junio-julio del 2001. 4 tratamientos realizados, procediendo todas las paralarvas de la misma puesta:

Nauplio de *Artemia* enriquecido con SuperSelco + aminoácidos libres en el medio. Muestras de día 10 a día 30 con intervalos de 5 días, n = 5.

Con esta experiencia se pretendió evaluar los efectos del aporte de aminoácidos en el medio en la supervivencia de las paralarvas de pulpo.



Nauplio de *Artemia* enriquecido con SuperSelco exclusivamente. Muestras de día 10 a día 25 con intervalos de 5 días, n = 5.

Nauplio de *Artemia* enriquecido con SuperSelco y metionina + aminoácidos libres en el medio. Muestras de día 10 a día 30 con intervalos de 5 días, n = 5.

Nauplio de *Artemia* enriquecido con SuperSelco y metionina. Muestras de día 10 a día 30 con intervalos de 5 días, n = 5.

Se decidió el enriquecimiento suplementario con Metionina debido a que este aminoácido esencial se encuentra en un contenido relativamente bajo en los nauplios de *Artemia* y en el zooplancton (Helland *et al.* 2000, 2003). La suplementación de dietas artificiales con Lys y Met ha demostrado promover un crecimiento significativo en subadultos de *S. officinalis* (Domingues, 1999).

P8 (IEO-VIGO), paralarvas criadas con aporte de zoeas de crustáceos, siguiendo la metodología descrita por Iglesias *et al.* (2003). Muestras correspondientes a las crías larvianas del año 2002 (sin especificar fecha) y del 2003 (junio-julio).

Año 2002, del día 0 a día 23, con la siguiente periodicidad y cantidad:

0d	n = 5	15d	n = 5
5d	n = 5	20d	n = 5
10d	n = 8	23d	n = 5

Año 2003, del día 0 a día 13, 4 tratamientos distintos:

Cría normal, con *Artemia* y fitoplancton en el tanque, se trata de paralarvas que sufrieron un episodio patológico. Muestras de día 0, 2, 4, 7 y 10, n = 10 (prueba desarrollada del 23 de junio al 3 de julio).

Cría con fitoplancton el tanque y aporte de *Artemia* y zooplancton congelado, L-13. Muestras de día 0, 2, 4, 7, y 10, n = 10 (prueba desarrollada del 23 de junio al 3 de julio).

Cría con fitoplancton en el tanque, aporte de Artemia y tratamiento en el agua de probióticos. Muestras de día 1, 3, 5, 7, 10 y 13, n =10 (prueba desarrollada del 5 de julio al 17 de julio).

Cría con fitoplancton en el tanque, aporte de Artemia y de zoeas (a partir de día 4). Muestras de día 5, 7, 10 y 12, n =10 (prueba desarrollada del 11 de julio al 18 de julio).

Las muestras fueron incluidas, en su mayoría, en 2-OH-etil-metacrilato, al ser su número escaso y permitir esta técnica alcanzar una mejor resolución en la observación microscópica. El mayor número de muestra proporcionado en el año 2003 por el participante P8 permitió la inclusión de parte de ella en paraplast.

Las muestras procesadas en metacrilato fueron inmediatamente deshidratadas en un gradiente creciente de etanoles, para su posterior inclusión y su corte semifino a 3-4 $\mu$ m. Las secciones obtenidas se tiñeron mediante las siguientes técnicas histomorfológicas: Hematoxilina de Mayer/eosina acética y azul de toluidina al 1% en tampón bórax.

Las muestras procesadas en paraplast fueron deshidratadas en un gradiente creciente de alcohol-acetona, aclaradas en xileno, incluidas en paraplast y seccionadas a 4-5 $\mu$ m. Las secciones obtenidas se tiñeron con la tinción histomorfológica de hematoxilina de Mayer/eosina acética, así como con las tinciones complementarias de GRAM y de PAS, en aquellos casos en que se estimó oportuno.

#### *Desarrollo histológico de los diversos órganos*

Las paralarvas presentan, desde el día 0, el cuerpo dividido en 2 partes claramente delimitadas: el cefalopodio, que consta de la cabeza, de la corona de tentáculos y del sifón, y el visceropalio, que consiste en un saco muscular o manto, en cuyo interior se alojan las branquias y las vísceras; el espacio vacío que dejan éstas se denomina cavidad paleal (Guerra, 1992). La larva recién eclosionada es un cefalópodo completo en miniatura, con el tubo digestivo perfectamente formado y la boca abierta, con una reserva nutritiva en su saco vitelino interno, que va siendo reabsorbida en paralelo con la digestión de presas capturadas activamente (Boletzky, 1989).

Hay que destacar que, durante el desarrollo larvario de los cefalópodos, se producen cambios más o menos dramáticos y progresivos en las proporciones corporales, pero no drásticas metamorfosis (Boletzky, 1974).

En el cefalopodio podemos observar, a lo largo del desarrollo larvario, una progresiva evolución del sistema nervioso, que ya desde la eclosión presenta unos lóbulos ópticos bien desarrollados, y del cerebro que, poco a poco, va aumentando en tamaño y complejidad. Se pueden observar, también, los ganglios braquiales situados en los brazos, cuyo número y complejidad va en desarrollo paralelo al del correspondiente brazo. El número de ventosas aumenta de forma progresiva a lo largo de la etapa de crecimiento larvario (Nixon & Mangold, 1996). Los ojos presentan una gran complejidad, pudiéndose distinguir en ellos, desde el primer día de la eclosión, una lente bien formada, que divide al ojo en una cámara anterior y una posterior, donde se localiza el humor vítreo. La anatomía de la retina es relativamente simple comparada con el ojo de los Vertebrados, y consta sólo de 2 componentes neurales: las células visuales y las fibras eferentes. La retina puede dividirse histológicamente en 3 capas: La capa externa, la más gruesa, que consta de células de soporte y del segmento distal de las células visuales, en la base del cual se sitúa el fotorpigmento; la capa interna, que está formada por el segmento proximal de las células visuales, donde se localizan los núcleos; y la capa plexiforme. La localización del fotorpigmento depende de la adaptación a la luz: en los ojos adaptados a la oscuridad se localiza en la base de la capa externa, mientras que en la visión diurna, el pigmento migra distalmente (Budelmann *et al.*, 1997).

En el visceropalio, el día 0 se observa una gran masa de vitelo central localizada en el saco vitelino interno, que no forma una masa homogénea, sino que se encuentra distribuida a modo de “plaquetas” vitelinas, que están siendo activamente reabsorbidas por el sincitio vitelino (Fig. 1).

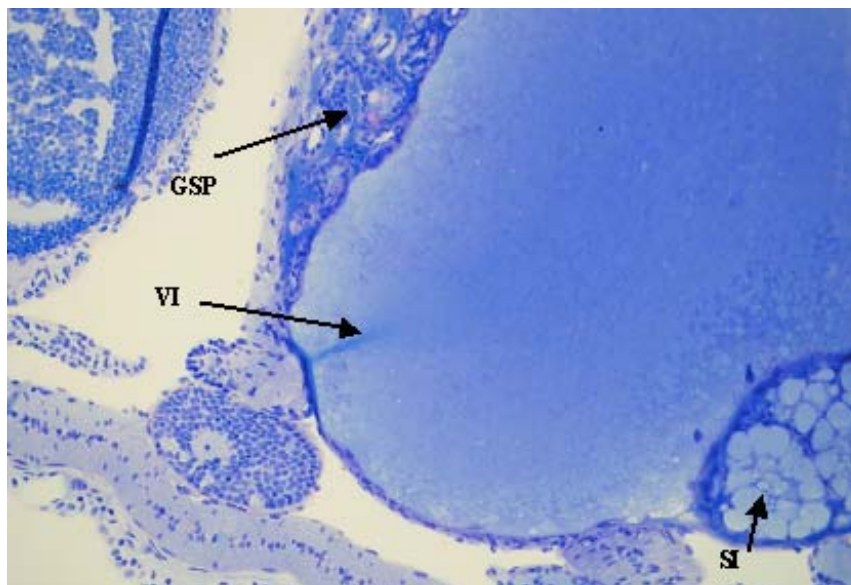


Fig. 1. Paralarva de 0d de edad alimentadas con zoeas de crustáceos. Muestras del IEO Vigo. Se observan las glándulas salivares posteriores (GSP) adyacentes al saco vitelino interno (VI), que está siendo reabsorbido por el sincitio vitelino (SI).

El día 1 se observan restos del saco vitelino interno y del sincitio vitelino, que no se observan en las muestras posteriores. Una cadena de ganglios periféricos conforman el sistema nervioso localizado en el visceropalio, cuya complejidad es cada vez más evidente a medida que avanza el desarrollo larvario (Fig. 6). En cuanto al sistema digestivo, desde el día 1 se observa la existencia del buche (Fig. 2) y del esófago, con la envuelta quitinosa en formación, la existencia de un estómago primordial (Fig. 2) con envuelta quitinosa, el ciego helicoidal (Fig. 2) y el intestino (Fig. 6). Una enorme glándula digestiva (Fig. 2) ocupa la mayor parte de la cavidad celomática visceral, y anteriormente a ella se localizan las glándulas salivares posteriores (GSP; Fig.1 y 2), pares, dispuestas en torno al esófago y al buche. Pueden verse alrededor del buche y el esófago, los canales terminales de ambas glándulas salivares. Entre estos canales terminales se observa la vena cefálica. Ventralmente a la glándula digestiva se encuentra la bolsa de tinta y su glándula aneja, claramente visibles. También en la base de la glándula digestiva pueden observarse, claramente distinguibles a partir del día 10 de edad, en posición anterior al estómago y localizados dentro de la misma cápsula glandular, los apéndices pancreáticos (Fig. 6), que en los octópodos están constituidos por túbulos tapizados por un epitelio simple columnar (Bidder, 1966). Los primordios branquiales en desarrollo, localizados en la cavidad paleal, se observan lateralmente a ambos lados de la glándula digestiva (BR, Fig. 2, Fig. 6).

En la base de ambas branquias se distingue el primordio de la glándula branquial (Fig. 6). Junto a las branquias, ya en el celoma pericárdico, se localizan los corazones branquiales. Próximos a ellos encontramos los apéndices renales de la vena cava, que junto con los apéndices pericárdicos constituyen los más importantes órganos excretores.

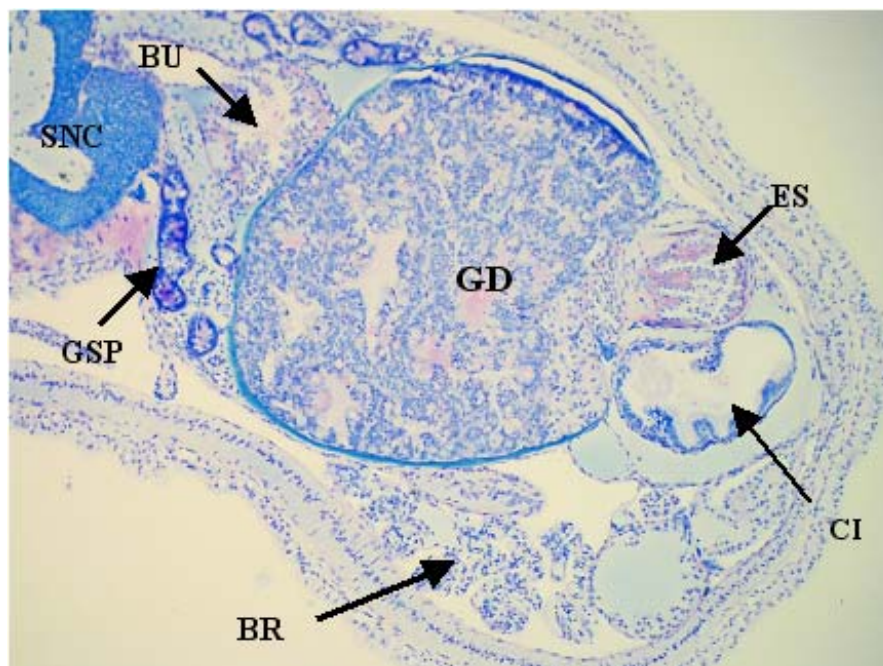


Fig. 2. Paralarva de 10d de edad alimentada con zoeas de crustáceos. Muestras del IEO Vigo. Sección longitudinal. Se observa el buche (BU), en posición medial respecto a las glándulas salivares posteriores (GSP), la glándula digestiva (GD), las branquias (BR), el estómago (ES) y el ciego (CI). SNC, Sistema Nervioso Central.

Estos son los principales órganos que se observan en las paralarvas, cuya complejidad y tamaño relativo va variando a medida que progresa el desarrollo larvario.

La epidermis de los cefalópodos está constituida por un epitelio simple columnar formado por células epiteliales que presentan una superficie apical en cepillo, células sensoriales, células ciliadas y células mucosas. En la dermis, formada por tejido conectivo, se localizan los cromatóforos, iridóforos, leucóforos y células reflectoras (Brocco, 1976).

En el presente informe nos centraremos en la descripción de las alteraciones localizadas en el tracto digestivo, así como en las glándulas salivares posteriores y en la epidermis, al ser éstos los principales órganos responsables de la digestión y la absorción de nutrientes en cefalópodos.

Las glándulas salivares posteriores secretan una sustancia viscosa en la cavidad bucal anterior, la cual es una mezcla de diferentes sustancias biológicamente activas (Budelmann *et al.*, 1997). La secreción incluye una potente neurotoxina llamada cefalotoxina que provoca la parálisis de las presas retenidas en sus brazos (Ghiretti, 1959). Además, la secreción salivar contiene proteasas (Morishita, 1978), capaces de disolver las uniones musculares del caparazón de los crustáceos y de permitir a los pulpos la ingestión del contenido de éstos, dejando los restos cuticulares completamente limpios cuando son descartados (Best & Wells, 1984; Kasugai, 2001). Recientemente se ha descrito, también, actividad hemolítica en la saliva del pulpo *E. cirrhosa*, no asociada a enzimas proteolíticos, cuya función podría ser aumentar la permeabilidad de la membrana celular y, de esta manera, favorecer la acción enzimática de los enzimas digestivos (Key *et al.*, 2002). Se ha demostrado la existencia de una elevada actividad proteolítica localizada en las glándulas salivares posteriores de las paralarvas de pulpo (Boucaud-Camou & Roper, 1995), que pueden facilitar la penetración de las toxinas en los tejidos de la presa, pero también pueden desarrollar un papel en la digestión de los tejidos y acelerar la eficiencia y velocidad de la digestión, la cual es más rápida en juveniles de cefalópodos (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987). Se ha discutido sobre la posibilidad de una digestión externa en los octópodos, que parece limitarse a la rotura de las uniones musculares con el caparazón, permitiendo la ingestión del contenido blando de las presas de crustáceos (Mangold & Bidder, 1989). Existen evidencias de este mismo comportamiento alimentario y, por tanto, de digestión externa, en paralarvas de pulpo alimentadas con zoeas de crustáceos, dejando como descarte, tras la alimentación, el exoesqueleto entero y vacío, sin desmembrar los apéndices (Hernández-García *et al.*, 2000).

La glándula digestiva o hepatopáncreas es el mayor órgano glandular de los cefalópodos. Posee múltiples funciones, algunas no completamente bien comprendidas, entre las que podemos citar las siguientes:

(1) síntesis y secreción de enzimas digestivos, (2) reabsorción y metabolismo de nutrientes, (3) almacenamiento de reservas y (4) excreción de productos de desecho (Budelmann *et al.*, 1997). Histológicamente, estas glándulas están constituidas por túbulos tapizados por un epitelio simple. Se han descrito 3 tipos celulares en la glándula digestiva de los pulpos, denominados en la literatura clásica “cellules à boules”, “grey body cells” y “basal cells” (Bidder, 1957).



En la actualidad se cree que sólo existen 2 tipos celulares: las células basales o células de reemplazo y las mucho más numerosas células digestivas (“cellules à boules” de la denominación clásica), con capacidad multifuncional y estructura polifórmica (Boucher-Rodoni, 1982b, Bundelmann *et al.*, 1997). Las células de cuerpos grises o “grey body cells” no serían más que estados de transición de las células digestivas (“Cellules à boules”), con un aspecto microscópico tan modificado que las hace difícilmente distinguible al microscopio óptico y cuyo carácter sería excretor, debido a la observación de cuerpos grises en los filamentos mucosos intestinales (Boucher-Rodoni, 1982b). Estas células digestivas (“cellules à boules”) pueden presentar diferentes tipos de vacuolas o gránulos, dependiendo de su ciclo citológico: los gránulos de digestión (“boules”), de carácter proteínico, que corresponden a lisosomas primarios o secundarios, dependiendo del proceso digestivo; las vacuolas de excreción, entre las que podemos observar vacuolas con un contenido granuloso y coloración pardusca (“brown bodies”), gotas lipídicas, “cuerpos grises”, que son estructuras vesiculares ligeramente PAS+ relacionadas con procesos de ayuno y de carácter excretor y, en ocasiones, gránulos refringentes, que corresponden probablemente a depósitos de residuos de la oxidación lipídica (Boucher-Rodoni, 1976, 1982b).

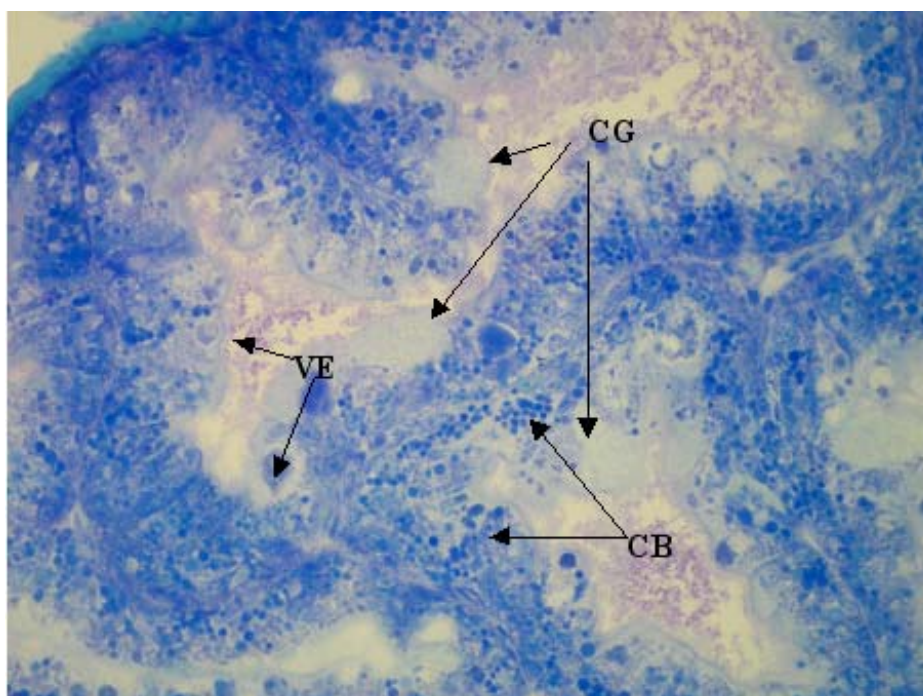


Fig. 3. Glándula digestiva de para larva de 35d de edad alimentada con zoeas de crustáceos. CA Asturias. Fase cecal. Podemos observar células digestivas (“cellules à boules”; CB), vacuolas de excreción (VE) y cuerpos grises (CG). Las células digestivas presentan abundantes gránulos de digestión (“boules”), lo cual es indicativo de una ingestión reciente. Se pueden observar los divertículos digestivos repletos de quimo. La glándula digestiva presenta un aspecto compacto, con una luz reducida en los divertículos digestivos.

El ciclo citológico de las células digestivas es, probablemente, el siguiente y se trata de un fenómeno rítmico, donde alternan fases de secreción y absorción: Durante las fases iniciales de la digestión, y previamente a la captura de la presa, se observa un aumento del número de “boules” o gránulos de digestión en las células digestivas. Estos gránulos corresponderían a lisosomas primarios, que serán eliminados por secreción apocrina. Contienen enzimas digestivos (amilasas, pepsina, quimotripsina, proteasas, lipasas, esterases, fosfatas ácida y alcalina), muchos detectables también en paralarvas, que manifiestan una actividad fundamentalmente proteásica (Boucaud-Camou & Roper, 1995). Esta secreción enzimática llega al estómago a través de los conductos digestivos y del ciego, teniendo lugar la digestión estomacal (“fase estomacal”). Después, el quimo llega al ciego, eliminándose los desechos alimenticios al intestino. El quimo alcanza la glándula digestiva a través de los conductos digestivos, comenzando la “fase cecal” o absorptiva. Las células digestivas manifiestan en esta fase una intensa actividad endocitótica, aumentando el tamaño de las “boules” y observándose vacuolas de excreción, gotas lipídicas y pequeñas vesículas endocitóticas. En este caso las “boules” o gránulos de digestión corresponden a lisosomas secundarios vinculados a la digestión y el metabolismo intracelular. Las vacuolas de excreción son eliminadas por secreción apocrina u holocrina (Boucher-Rodoni, 1976, 1982b; Boucher-Rodoni & Mangold, 1977; Best & Wells, 1983, 1984). La duración de la digestión depende de la temperatura y del modo de vida de la especie, siendo mayor en los animales bentónicos, en los cuales es igual o superior a 12h, pero más rápida y eficiente en cefalópodos que en peces, para un modo de vida y una temperatura similar (Boucher-Rodoni, 1973). En este proceso digestivo, el estómago tiene una función principalmente mecánica, y el buche una función de reservorio. La absorción tiene lugar fundamentalmente en el ciego y la glándula digestiva, mientras que el intestino tiene fundamentalmente una función de formación de los cordones mucosos (Boucher-Rodoni, 1982a).

La epidermis, como ya hemos descrito anteriormente, es un epitelio simple que presenta una fuerte actividad fosfatasa-alcalina en paralarvas, lo que sugiere una actividad de intercambio activo con el medio externo (Boucaud-Camou & Roper, 1995).



Se ha demostrado que las paralarvas de pulpo presentan la capacidad de tomar aminoácidos y hexosas directamente del medio marino (Castille & Lawrence, 1978) y que el aporte único de materia orgánica en el medio sin suministro de alimento en paralarvas de *L. forbesi* permite el crecimiento positivo y un porcentaje de supervivencia mayor a los 10 días de edad que en aquellas paralarvas alimentadas con alimento sólido (Vecchione & Hand, 1989). Esta toma de aminoácidos disueltos en el agua de mar juega un papel vital en la biología de los invertebrados marinos de cuerpo blando y, generalmente, aporta las necesidades nutricionales de la epidermis y de las estructuras superficiales activas (Ferguson, 1982), lo que en fases larvarias de moluscos bivalvos puede llegar a suponer la suficiente energía como para satisfacer el 39-70% de las necesidades energéticas globales (Manahan, 1990).

#### *Estado sanitario de las paralarvas*

En este capítulo se describirá el proceso de desarrollo progresivo de la paralarva, así como la presencia o ausencia de alimento en el buche y/o estómago y el aspecto de la glándula digestiva, considerando los siguientes parámetros: abundancia de gránulos digestivos (“boules”) en la glándula digestiva, abundancia de vacuolas de excreción, presencia de células grises y tamaño de la luz de los túbulos digestivos. La presencia de grandes vacuolas de excreción y de abundantes células grises, así como la escasa abundancia de gránulos digestivos, ha sido asociada con procesos de ayuno (Boucher-Rodoni, 1976, 1982b; Vecchione & Hand, 1989). El aspecto de la glándula digestiva en paralarvas capturadas del medio natural, así como en aquéllas criadas en cautividad que presentan una alimentación adecuada, es el de un órgano macizo, con un grueso epitelio glandular y escasa luz en sus túbulos digestivos. Por el contrario, las paralarvas mal alimentadas presentan una amplia luz y delgadas paredes en sus túbulos (Vecchione & Hand, 1989). Por otro lado, se ha observado que aquellas paralarvas que se nutren regularmente presentan una actividad secretora rítmica, almacenándose gránulos digestivos entre las diversas digestiones; sin embargo, un ayuno prolongado provoca una degranulación del órgano (Boucher-Rodoni, 1976, 1982b). Es decir, el aspecto histológico de la glándula digestiva indica el estado de nutrición de la paralarva, pudiéndose deducir su estado nutricional a partir del número y tamaño de sus diversas inclusiones, la abundancia de células grises y el grosor del epitelio glandular.

También se incidirá en el aspecto de las glándulas salivares posteriores, dada su importancia en la digestión de los octópodos y debido a nuestra observación empírica de que es uno de los primeros órganos en manifestar alteraciones, incluso antes de que éstas sean detectadas en la glándula digestiva.

Se considerarán también las lesiones observadas en la epidermis, al intervenir este órgano en la absorción de nutrientes y constituir la barrera necesaria para el mantenimiento del equilibrio osmótico.

### 1. Muestras suministradas por el grupo p2 (Asturias)

No se han observado infecciones bacterianas ni parasitarias en ninguna de las paralarvas estudiadas en esta prueba.

En las paralarvas de día 1 de edad, pueden observarse restos del saco vitelino interno y del sincitio vitelino situados anteriormente a la glándula digestiva. Las paralarvas no presentan signos de lesión ni alteraciones en su glándula digestiva ni en las glándulas salivares posteriores, no observándose acumulación de alimento en el buche.

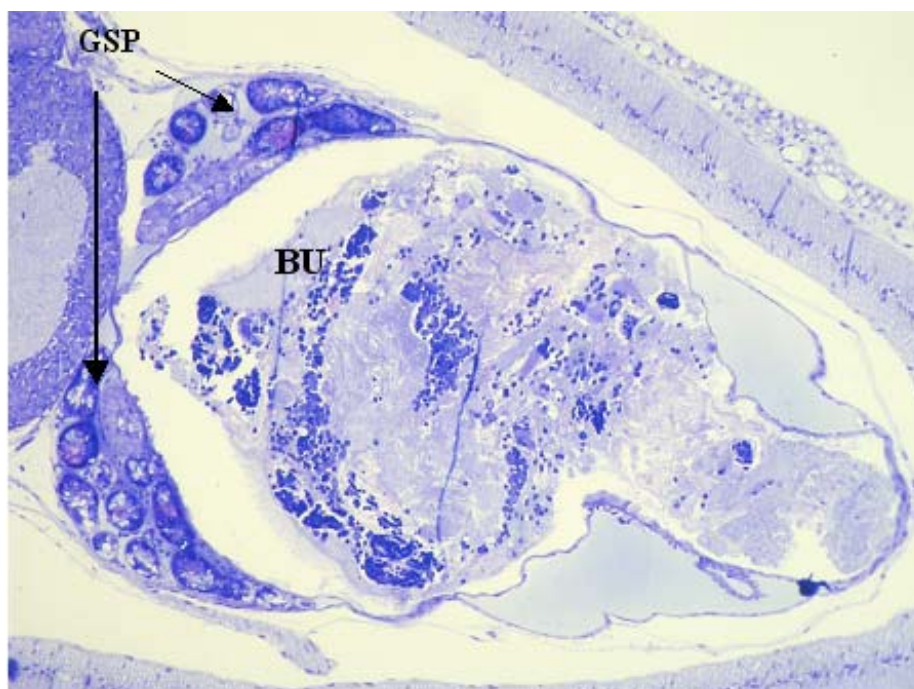


Fig. 4. Paralarva de 5 d. de edad alimentada con zoeas de crustáceos. CA Asturias. Se observa el buche (BU) repleto de restos alimenticios, sin cubiertas quitinosas. GSP, glándulas salivares posteriores.

Al día 5 se observa el buche repleto de alimento en el 100% de las larvas observadas (Fig. 4). El día 10 se observan restos alimenticios en la luz del tracto digestivo del 100% de las paralarvas observadas, presentando la glándula digestiva abundantes gránulos de digestión. Al día 15, el 80% de las paralarvas presentan restos alimenticios en su luz. En aquéllas que no los presentan, se observa la vacuolización de algunas células de la glándula digestiva y la descamación de éstas, aunque, en general, la glándula digestiva presenta abundantes gránulos de digestión (“boules”); también se observa a la aparición de células grises, poco abundantes. Al día 20 no se observan restos alimenticios en ninguna de las paralarvas estudiadas, siendo más evidente la vacuolización de la glándula digestiva, así como la progresiva vacuolización de las glándulas salivares posteriores; también se aprecia un aumento de las células grises. Al día 30, el 50% de las paralarvas estudiadas presentan restos alimenticios en el tracto digestivo, observándose en aquéllas que no tienen alimento un inicio de vacuolización de la glándula digestiva; la vacuolización de la glándula digestiva es parcial y se observan algunas células grises. Al día 35 se observa alimento en el tracto digestivo de un 80% de las paralarvas. Sin embargo, tanto en las que presentan alimento como las que no los presentan se observa vacuolización inicial de la glándula digestiva, con descamación celular. Algunas paralarvas presentan abundantes células grises (Fig. 3). Las glándulas salivares posteriores presentan atrofia parcial en los acinis glandulares.

El día 40, se observa restos alimenticios en el 33% de las paralarvas enviadas. La picnosis y vacuolización de las glándulas salivares posteriores son constantes en toda la muestra, mientras que la vacuolización de la glándula digestiva es más evidente en aquellas paralarvas que no presentan restos alimenticios en su tracto digestivo. Se observan abundantes células grises.

Es constante el hecho de que los restos alimenticios observados en el buche y estómago de las paralarvas no presentan restos quitinosos. La secreción de las glándulas salivares posteriores está formada por gránulos eosinófilos y con apetencia por el azul de toluidina.

Si la secreción se localiza en la luz, o bien en células con el citoplasma de aspecto reticular, esta secreción es basófila y metacromática (color violeta).

En esta prueba, a pesar de apreciarse una vacuolización progresiva en la glándula digestiva, que se manifiesta por un mayor número y tamaño de las vacuolas de excreción, más acentuada en las paralarvas sin presencia de alimento en la luz del tracto digestivo, se observa en todas las muestras estudiadas la presencia de abundantes gránulos de digestión en las células principales de la glándula digestiva. Ello implica actividad digestiva de esas paralarvas y, por tanto, alimentación regular de los ejemplares estudiados, aunque en el momento de estudio no se haya producido una ingestión reciente de alimento. Se trataría de ejemplares que se encuentran en la fase “cecal” de la digestión, sin observarse lesiones detectables en la glándula digestiva a lo largo del desarrollo larvario. El aumento de células grises estaría en concordancia con procesos de excreción. Cabe prestar especial atención al hecho de que, en las paralarvas estudiadas en esta prueba, los restos alimenticios observados en el buche y estómago no presentan restos de cubierta quitinosa.

Dado el comportamiento alimenticio descrito por Hernández-García *et al.* (2000) en paralarvas de pulpo alimentadas con zoeas, en las que se detecta el descarte de los exoesqueletos quitinosos vacíos tras la ingestión de su contenido, y teniendo en cuenta la observación empírica de la ingestión completa, por parte de las paralarvas, de los metanauplius de *Artemia*, estos restos alimenticios no quitinosos parecen indicar, en el caso de dietas mixtas, una preferencia por las zoeas en detrimento de los metanauplius, los cuales deben ser ingeridos en último término.

Sin embargo, es de destacar el progresivo deterioro de las glándulas salivares posteriores, que en las paralarvas de 40 días de edad se encuentran alteradas en todas las muestras analizadas sin estar asociada estas lesiones a procesos infecciosos. Ello implica que la etiología de las alteraciones observadas no es infecciosa, sino atribuible a otras causas, probablemente nutricionales.

## **2. Muestras suministradas por el grupo P5 (IRTA-CSIC).**

No se han observado infecciones bacterianas ni parasitarias en ninguna de las paralarvas estudiadas en esta prueba.

## 2.1. Prueba del enriquecimiento con Superselco

En cuanto a la prueba del grupo P5 (IRTA-CSIC) del Superselco, a los 10 días sólo un 33% de las paralarvas presentaban restos alimenticios en su tracto digestivo. La vacuolización de esta glándula era evidente en todos los ejemplares estudiados, pudiéndose distinguir vacuolas de excreción de vesículas de tamaño variable, en ocasiones similar al de los gránulos digestivos. Probablemente estas vesículas correspondan a gotas lipídicas cuyo contenido se haya perdido durante el proceso de deshidratación previo a la inclusión de la muestra en metacrilato, y estén relacionadas con el elevado contenido lipídico de la emulsión enriquecedora y con la capacidad de almacenamiento de reservas de naturaleza esencialmente lipídica que manifiesta la glándula digestiva, descrita por otros autores (Boucher-Rodoni, 1982b). Se observa, también, cierta desorganización de las glándulas salivares posteriores. Es de destacar la presencia de gránulos de digestión, pero en un número mucho menor al observado en las muestras del experimento anterior (grupo P2), así como la mayor amplitud de la luz de los túbulos digestivos. Se observa, por tanto, una desgranulación manifiesta respecto a los resultados del experimento anterior. El epitelio estomacal y cecal presenta, también, vacuolización. A partir del día 10 no se observan restos alimenticios en el tracto digestivo de las paralarvas estudiadas, sólo en ocasiones restos quitinosos en el estómago. A los 15 días de la eclosión se observa una vacuolización generalizada del tracto digestivo, cada vez más evidente, con un aumento de la luz de los túbulos de la glándula digestiva y desprendimiento de la envuelta quitinosa del estómago en ocasiones (Fig. 6). Las glándulas salivares posteriores presentan vacuolización citoplásmica y picnosis generalizada. En un 45% de las muestras pueden observarse restos quitinosos en el estómago, pero no restos alimenticios. Al día 20 se observa igualmente la vacuolización generalizada del tracto digestivo y la ausencia de restos alimenticios en la luz de la glándula digestiva, que tiene un tamaño excesivo. En ocasiones (20%) el estómago se encuentra repleto de restos quitinosos. Las glándulas salivares posteriores presentan el mismo aspecto que en la etapa anterior. Al día 25 se observa desprendimiento de las envueltas quitinosas esofágicas y estomacales, y vacuolización generalizada de la glándula digestiva, con ausencia de gránulos de digestión. No se observan restos alimenticios en el tracto digestivo y las glándulas salivares posteriores presentan vacuolización citoplásmica y picnosis, cada vez más generalizada. La presencia de células grises es escasa a lo largo de toda la prueba.



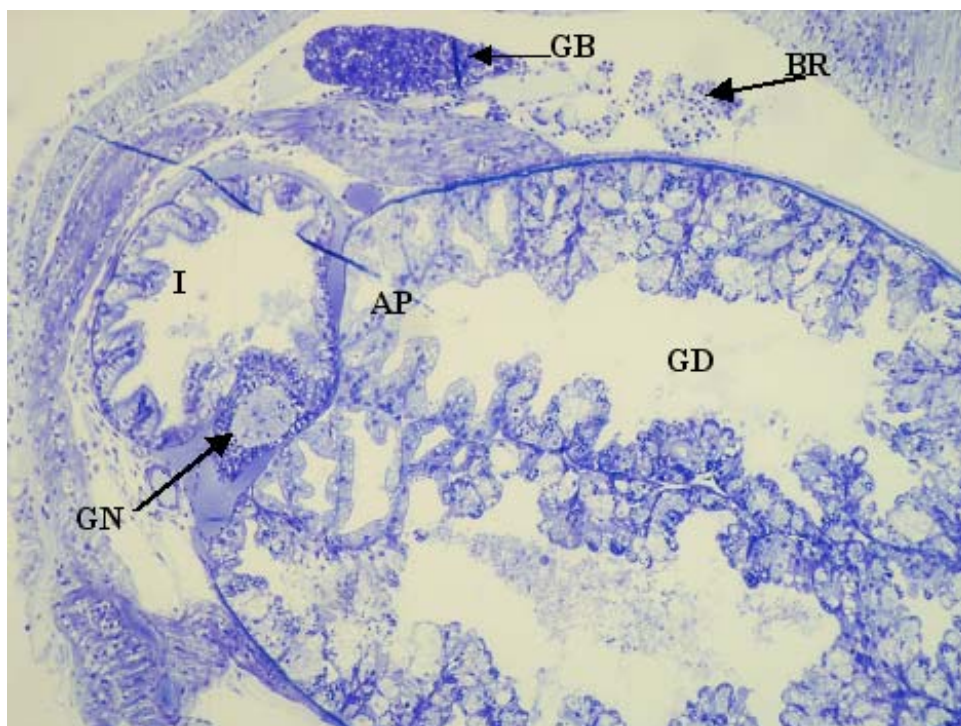


Fig. 5. Paralarva de 15 d. Prueba del SuperSelco. Se observa la desgranulación intensa de la glándula digestiva, con escasos gránulos digestivos (“boules”), y la enorme amplitud de la luz glandular. No se observan restos alimenticios. I, intestino. AP, Apéndices pancreáticos. GB, glándula branquial. BR, Branquia. GN, ganglio nervioso. GD, glándula digestiva.

Hemos de destacar el hecho de que, en esta prueba, desde el primer día de muestreo, la presencia de gránulos de digestión en la glándula digestiva es escasa, incluso en aquellas paralarvas que presentan restos alimenticios en su luz, lo que implica que la actividad enzimática y digestiva de este órgano es reducida y menor que en el caso de la prueba anterior. Ello concuerda con el aspecto areolar de la glándula digestiva, que presenta una amplia luz en sus túbulos digestivos, con el enorme tamaño de las vacuolas de excreción, y con la ausencia de restos alimenticios en la mayoría de paralarvas estudiadas, factores todos ellos indicativos de una deficiente ingestión de alimento. La escasa presencia de gránulos de digestión en la glándula digestiva de las paralarvas de esta prueba indica poca actividad digestiva y, por tanto, baja o nula ingestión de alimento, dependiendo de la muestra. La presencia de abundantes restos quitinosos en el estómago de estas paralarvas (Fig. 6), juntamente con el hecho de la ausencia de material alimenticio en la luz de la glándula digestiva, indica que las cubiertas quitinosas de los nauplio de Artemia son de difícil digestión y expulsión, pues se mantienen largo tiempo en el estómago sin que se haya producido una ingesta reciente.

Todo ello parece indicar que el alimento ingerido y/o los regímenes alimenticios no son suficientes para cubrir los requerimientos alimenticios de la especie y puede, además, indicar que la ingesta exclusiva de nauplios de *Artemia* no sea la dieta más idónea.

También se ha de destacar el hecho de la abundante presencia, en la glándula digestiva, de vesículas y vacuolas de pequeño tamaño, no observadas en la experiencia anterior. Probablemente, se traten de gotas lipídicas almacenadas en el interior de las células digestivas, relacionadas con la elevada concentración lipídica de la emulsión enriquecedora empleada. Para poder corroborar esta afirmación es necesaria la fijación previa del contenido lipídico de las vesículas con tetróxido de Osmio, fijación que no se realizó y que impide conocer con exactitud la naturaleza de las mismas. Sin embargo, su aspecto y localización concuerda con los depósitos lipídicos descritos por Boucher-Rodoni (1982b). Esta acumulación excesiva de reservas lipídicas implicaría una degeneración grasa y un exceso de lípidos en la dieta.

Por otro lado, es sorprendente la vacuolización observada en el epitelio estomacal y cecal. Al ser el ciego un importante órgano de absorción, esta vacuolización podría estar relacionada con la absorción de componentes lipídicos de la emulsión enriquecedora. Sin embargo, el estómago no está descrito como un órgano absorptivo sino relacionado con fenómenos de digestión mecánica. Además, la cubierta quitinosa del estómago dificulta esta posibilidad de absorción. La vacuolización del epitelio estomacal estaría relacionada, probablemente, con fenómenos degenerativos que concordarían con la picnosis nuclear que se observa en estas mismas células.

Es muy notable también la desorganización celular, vacuolización y picnosis que se observa en las glándulas salivares posteriores desde el primer día de muestreo de esta prueba. Estas lesiones afectan tanto a los acinis glandulares como a los conductos de secreción. Ello implica un funcionamiento deficiente de estas glándulas, en ocasiones tremendamente acusado. Ya que las glándulas salivares posteriores intervienen en el proceso de digestión externa y de inmovilización de presas, las lesiones observadas suponen un grave deterioro en la capacidad alimenticia de la paralarva afectada y, por tanto, en sus posibilidades de supervivencia. La manifestación tan temprana de las lesiones observadas en estas glándulas puede influir muy negativamente en su capacidad digestiva y de inmovilización de presas y, de este modo, determinar la baja ingestión alimenticia observada desde el primer día de muestreo.

## 2.2. Prueba del enriquecimiento con Superselco y aminoácidos libres en el medio

Al día 10 de cría, los ejemplares no presentan restos alimenticios en su tracto digestivo. Sin embargo, la glándula digestiva, aunque similar en morfología a la descrita en la experiencia anterior, presenta una mayor abundancia de gránulos digestivos y un mayor grosor del epitelio glandular. Por otro lado, sí se observa una vacuolización incipiente en las glándulas salivares posteriores con desorganización celular. Al día 15 se observan restos alimenticios y quitinosos en el 40% de los ejemplares estudiados; El aspecto histológico de la glándula digestiva es similar al descrito a los 10 días de edad, pero se observa un progresivo deterioro de las glándulas salivares posteriores, con un aumento de la vacuolización y picnosis celular. Al día 20, la vacuolización y picnosis de las glándulas salivares posteriores es más evidente y se aprecia la ausencia de restos alimenticios en estómago y buche. Por otro lado, es de destacar la presencia de restos quitinosos en estómago en un 40% de los ejemplares estudiados y el desprendimiento de la envuelta quitinosa del buche en un 20% de los ejemplares. Al día 25 no se observan tampoco restos alimenticios en el tracto digestivo, aunque sí remanentes quitinosos en el estómago de un 40% de los ejemplares. La abundancia de gránulos digestivos ha disminuido, y se aprecia una atrofia generalizada de las glándulas salivares con vacuolización y picnosis intensa. El epitelio cecal presenta vesículas de tamaño variable. Un 20% de los ejemplares manifiesta un desprendimiento parcial de la envuelta quitinosa del esófago. Las observaciones realizadas al día 30 de edad son muy similares a las descritas el día 25, detectándose restos quitinosos y alimenticios en el estómago de un 20% de los ejemplares y una mayor abundancia de gránulos digestivos. A los 30 días, se detecta cierta vacuolización del epitelio estomacal aunque menos intensa que en la prueba anterior. Es de destacar la escasa o nula presencia de células grises a lo largo de toda la experiencia, y la presencia de vesículas lipídicas en la glándula digestiva, aunque en proporción menor que en el caso de la experiencia anterior.

El aspecto de la glándula digestiva es el de un órgano con mayor actividad digestiva que en la experiencia previa, con un mayor grosor del epitelio glandular y un mayor número de gránulos digestivos, a pesar del escaso contenido gástrico detectado en los ejemplares estudiados. Sin embargo, su aspecto dista mucho de ser el órgano macizo y repleto de gránulos digestivos que presentan las paralarvas del experimento del grupo P2.



Se observa cierta actividad digestiva, presentando el órgano el aspecto de encontrarse en la fase “cecal” de la función digestiva. Es de destacar que las lesiones de las glándulas salivares posteriores son constantes a lo largo de toda la experiencia y podrían contribuir a la deficiente ingestión de alimentos por los motivos anteriormente expresados.

### 2.3. Prueba del enriquecimiento con Superselco + Metionina adicional

La imagen histológica de las paralarvas de esta prueba es muy similar a la de la prueba 2.1 (prueba de enriquecimiento con Superselco). La glándula digestiva muestra en las paralarvas estudiadas una escasa presencia de gránulos digestivos, una gran abundancia de vacuolas de excreción y vesículas probablemente lipídicas, y una degeneración manifiesta de las glándulas salivares posteriores desde el primer día de muestreo (día 10 de edad de las paralarvas). El epitelio glandular es mucho más bajo, y la glándula en su conjunto presenta un aspecto areolar (Fig. 6). Las paralarvas presentan restos quitinosos en estómago, en proporción variable a lo largo de los días de muestreo: un 40% el día 10, 20% el día 15, 40% el día 20, 40% el día 25 (Fig. 6), 0% el día 30. Sólo una escasa proporción de éstas presentan restos alimenticios en estómago o buche. Desde el día 15 se pueden observar desprendimientos quitinosos y descamación celular en el buche y/o estómago. Al día 30 se observa degeneración de la retina ocular, con desprendimiento celular y de la membrana limitante. A lo largo de la experiencia se observa la vacuolización cecal, probablemente relacionada con fenómenos de absorción lipídica, y la vacuolización intensa del estómago en algunas paralarvas. De todos modos, estos fenómenos de vacuolización celular (localizados en el hepatopáncreas y en los otros órganos digestivos) son menos intensos que en el caso de la prueba 2.1. Es de destacar la observación, al día 25 de edad, de un corte longitudinal del intestino de una paralarva repleto de restos quitinosos: ello implica que estos restos serán expulsados con los cordones mucosos y, por tanto, no digeridos en el curso del proceso digestivo. Las células grises no son muy abundantes a lo largo de la experiencia. También es interesante señalar que la desgranulación de la glándula digestiva es más evidente en aquellas paralarvas que no presentan restos quitinosos ni alimenticios en su tracto digestivo siendo, por tanto, concordante con procesos de ayuno.

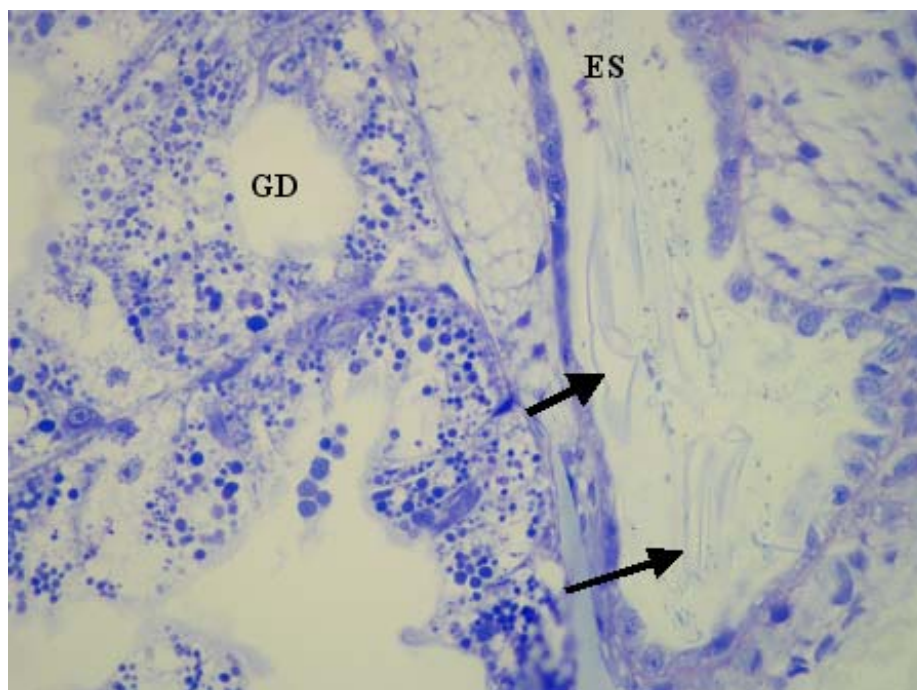


Fig. 6. Paralarva de 25 d de edad. Prueba de Met + SuperSelco. Obsérvese la amplia luz de la glándula digestiva (GD) y la presencia de restos quitinosos (flechas) en el estómago (ES).

Todas estas observaciones concordarían con procesos de pobre nutrición larvaria y ayuno, e incluso inanición, como ya se ha explicado detalladamente en el capítulo 2.1. Las paralarvas obtenidas son, por tanto, de baja calidad, y las lesiones constantes observadas en las glándulas salivares posteriores dificultan, más aún si cabe, la ingestión alimenticia y la capacidad de captura de presas. De todos modos, la degeneración grasa observada en esta prueba es menor que en el caso de la suplementación única con Superselco, lo que parece indicar un cierto efecto positivo del enriquecimiento con Metionina.

#### 2.4. Prueba del enriquecimiento con Superselco + Metionina adicional y aminoácidos libres en el medio

La imagen histológica de las paralarvas de esta prueba es muy similar al experimento 2.2. (enriquecimiento con Superselco y aminoácidos libres en el medio): Las paralarvas presentan desgranulación de la glándula digestiva con respecto a las paralarvas de la prueba III.2.1 (grupo P2, CA Asturias), pero mucho menos intensa que en el caso de las pruebas que no presentan suplementación adicional de aminoácidos en el medio.

Se observan, también, vesículas, probablemente lipídicas, localizadas en la zona basal de las células glandulares digestivas. Las células grises son escasas y, desde el primer día de muestreo (día 10 de edad), se observan lesiones en las glándulas salivares posteriores, similares a las descritas en las pruebas anteriores. La presencia de restos quitinosos en estómago es inconstante y varía a lo largo de los días de muestreo: el día 10, un 20% de los ejemplares los presentan; al día 15, un 20%; al día 20, un 20%; al día 25, un 20% y al día 30, un 0%. Esta presencia de restos quitinosos va acompañada, en ocasiones muy escasas, con la presencia de restos alimenticios en buche y estómago. Se observa, en parte de los ejemplares muestreados, desde el primer día de muestreo, la vacuolización del ciego, así como la vacuolización estomacal. A partir del día 15 de muestreo se aprecian desprendimientos parciales de la cubierta quitinosa del estómago y/o buche en algunos de los ejemplares muestreados.

Es de destacar en esta prueba que, a pesar de la baja frecuencia de restos quitinosos en el estómago de las paralarvas estudiadas, indicativos de una ingesta más o menos reciente, las paralarvas presentan más gránulos digestivos que en el caso de aquéllas provenientes de otras pruebas en las que no había un aporte de aminoácidos libres en el medio: ello indicaría un efecto beneficioso de este aporte que mejoraría la calidad de las paralarvas obtenidas. Sin embargo, como ya hemos comentado, estas paralarvas distan mucho de presentar una glándula digestiva maciza y con aspecto similar a las paralarvas de la prueba 2.1, el cual se asemeja mucho a las imágenes histológicas obtenidas de paralarvas del medio natural (Vecchione & Hand, 1989; Boucaud-Camou & Roper, 1995). Además, las lesiones en las glándulas salivares posteriores son constantes a lo largo de toda la experiencia, lo que indicaría una baja calidad larvaria.

Los resultados histológicos obtenidos en las 4 experiencias realizadas por el grupo P5 estarían de acuerdo con los resultados de supervivencia que presentan estas mismas experiencias: las mejores supervivencias, al día 20 y al día 30 de cría larvaria, se obtendrían en aquellas pruebas en las que existe un aporte adicional de aminoácidos libres al medio, con respecto a las supervivencias obtenidas en las pruebas en que este aporte adicional no se produce. Además, a los 20 días de edad, las diferencias de supervivencia de los grupos experimentales que reciben la solución de aminoácidos en el medio con respecto al grupo control serían significativamente positivas y de orden de magnitud 3 veces superior (Villanueva *et al.*, 2004).

Histológicamente, hemos observado que las paralarvas a las cuales se suministra una solución de aminoácidos libres en el medio presentan una glándula digestiva con una mayor actividad que aquéllas a las cuales no se suministra dicho aporte adicional, independientemente de que existan restos de una ingesta más o menos reciente en su tracto digestivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vecchione & Hand (1989) y confirmarían el efecto positivo de la adición de nutrientes en el medio en la supervivencia y calidad de las paralarvas obtenidas. De todos modos, las lesiones observadas en las glándulas salivares posteriores, constantes en todas las experiencias, y las lesiones progresivas detectadas a lo largo del tracto digestivo, muestran que las paralarvas criadas con un régimen alimenticio basado en metanauplius de *Artemia* enriquecidos son de baja calidad y presentan escasas posibilidades de supervivencia.

### 2. 3. Muestras suministradas por el grupo P8 (IEO VIGO).

Se han observado infecciones bacterianas o parasitarias en algunas paralarvas, que detallaremos a continuación.

#### 2.3.1. Muestras correspondientes al año 2002

Al día 0 de edad se observa la presencia del saco vitelino interno en las paralarvas estudiadas, cuyo vitelo está siendo reabsorbido activamente. Al día 5 de edad, la alimentación larvaria es exclusivamente exógena y todas las paralarvas presentan el digestivo completamente bien formado, al igual que las glándulas salivares posteriores. A los 10 días de edad, no se observan restos alimenticios en ninguna de las paralarvas estudiadas, pero la glándula digestiva se encuentra bien desarrollada, con abundantes gránulos de digestión y vacuolas de excreción; los ejemplares se encuentran en la fase cecal de la digestión (Fig. 2). Las glándulas salivares se encuentran bien desarrolladas. Al día 15 de edad, las paralarvas se encuentran, también, en la fase cecal de la digestión y las glándulas salivares se encuentran perfectamente formadas, distinguiéndose la secreción metacromática en la luz de los acinis glandulares, así como los conductos glandulares. El hecho más destacable es la observación, en una paralarva (20% de la muestra) de una infección sistémica de órganos internos y tegumentos provocada por un protozoo ciliado histiófago del Orden Scuticociliata.

A los 20 días de edad, las paralarvas se encuentran perfectamente desarrolladas, presentando un 20% de ellas el buche repleto de alimento. El resto de la muestra se encuentra en la fase cecal de la digestión, sin observarse alteraciones patológicas. Las glándulas salivares posteriores comienzan a manifestar signos de alteración, presentando picnosis y vacuolización parcial de algunos túbulos y acinis glandulares. El día 23 de edad se observan lesiones localizadas en la glándulas salivares posteriores, presentando ésta picnosis, vacuolización y atrofia que determinan un funcionamiento incorrecto. La glándula digestiva no presenta alteraciones apreciables, observándose en un 20% de las paralarvas restos alimenticios en el buche.

En toda la experiencia destaca el aspecto de órgano macizo que presenta la glándula digestiva, con abundancia de túbulos digestivos de epitelio glandular grueso y con las células digestivas repletas de gránulos digestivos, vacuolas de excreción en posición apical y escasas células grises. Su aspecto es muy similar al de la prueba del grupo P2. Podemos considerar que éste es el aspecto de una glándula digestiva en perfecto funcionamiento, como ya indicaban otros autores (Boucher-Rodoni, 1982b; Vecchione & Hand, 1989). No hemos observado lesiones en glándula digestiva a lo largo de la prueba, ni restos quitinosos en los ejemplares muestreados, lo que corrobora el modo alimenticio descrito en la prueba del grupo P2, es decir, el descarte de los exoesqueletos en el caso de alimentación con zoeas de crustáceos. A pesar de no observar restos alimenticios en la mayoría de paralarvas, la mayoría de ejemplares estudiados se encuentra en la fase cecal de la digestión, lo cual implica una correcta ingestión periódica de alimento. Hemos de destacar que, como en el caso de la prueba del grupo P2, las lesiones observadas se localizan en glándulas salivares posteriores, lo que puede contribuir a una dificultad en la inmovilización de las presas y de ingestión de su contenido, y por tanto, a su viabilidad futura. No se han detectado fenómenos bacterianos o parasitarios que expliquen las lesiones localizadas en glándulas salivares posteriores. Sólo se ha detectado un episodio parasitario localizado el día 15 de edad (Fig. 7). Los ciliados histiófagos causantes del proceso, son generalmente ciliados de vida libre que se alimentan de sedimentos y que se han descrito como parásitos oportunistas que provocan graves infecciones sistémicas en especies de cría, especialmente en rodaballo.

La inmunodepresión parece ser el factor clave en el desarrollo del proceso infeccioso: factores estresantes tales como un manejo inadecuado, cambios bruscos de temperatura, mala calidad del agua, o una dieta inadecuada podrían desencadenar el proceso que, una vez que adquiere características epizooticas, provoca elevadas mortalidades en un breve espacio temporal (Padrós *et al.*, 2001). Ante la detección de esta infección parasitaria, de graves consecuencias si adquiere dimensiones epizooticas, se deben tomar medidas preventivas oportunas en las futuras crías larvarias, minimizando los factores estresantes. Sería conveniente la introducción de baños profilácticos preventivos como protocolo rutinario. El hecho de que las paralarvas de pulpo puedan sufrir infecciones parasitarias por scuticociliados debe ser tenido en cuenta en los protocolos de cría larvaria, pues las consecuencias de las epizootias sistémicas causadas por estos protozoos suelen ser dramáticas y fatales en un corto espacio de tiempo, y no suelen tener solución terapéutica, como se han descrito en otras especies de cría (Padrós *et al.*, 2001).

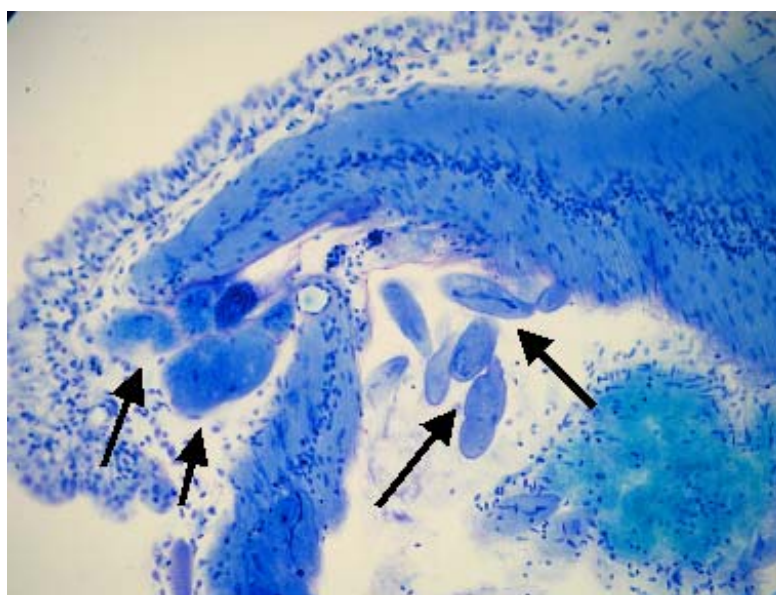


Fig. 7. Paralarva de 15 d de edad. Se Observa la presencia de protozoos scuticociliados en el celoma y la dermis (Flechas).

### 2.3.2. Muestras correspondientes al año 2004

En la observación macroscópica de todas las muestras del año 2003 proporcionadas por el grupo P8, destacaba un hecho que no habíamos apreciado en ninguna de las muestras precedentes: Las paralarvas presentaban una pigmentación muy intensa, oscura, que les hacía adquirir un aspecto moteado.



Esta característica era invariable, independientemente del experimento que se hubiera realizado. Sin embargo, las muestras proporcionadas en años precedentes por éste u otros grupos de investigación, eran de color claro y con una pigmentación escasa. Es de destacar que, en el medio natural, las paralarvas de pulpo son translúcidas, a excepción de los ojos, la glándula digestiva y la bolsa de tinta. Los ojos tienen iridocitos asociados, cuyas propiedades reflectoras actúan ocultando la paralarva, al igual que la cubierta plateada de la glándula digestiva, y las paralarvas presentan muy pocos cromatóforos en la superficie dorsal. Todos estos hechos actúan conjuntamente para camuflar a las paralarvas de los predadores visuales localizados en el plancton (Nixon & Mangold, 1996). Las paralarvas son planctontróficas, diurnas, nadadoras activas y cazadores visuales, al no tener desarrolladas las capacidades quimiorreceptoras y mecanorreceptoras que poseen los adultos localizadas en las ventosas y que les permitirían la caza nocturna (Nixon & Mangold, 1996). Esta característica común de las paralarvas criadas en el año 2003 podría, por tanto, considerarse anómala e indicativa de la existencia de alguna alteración, bien patológica o bien de las condiciones de cría, que diferirían de aquéllas que se observan en el medio natural (posible cría en oscuridad o bien cría con tanques negros que causara la pigmentación adaptativa al medio).

En todas las muestras observadas, independientemente del experimento estudiado, se detectaba una intensa descamación epidérmica con picnosis nuclear, y una pérdida de integridad de la epidermis, con la consecuencia directa de pérdida del equilibrio osmótico. La capa muscular subyacente localizada en el visceropalio se encontraba desorganizada, con una intensa vacuolización y picnosis (Fig. 8).

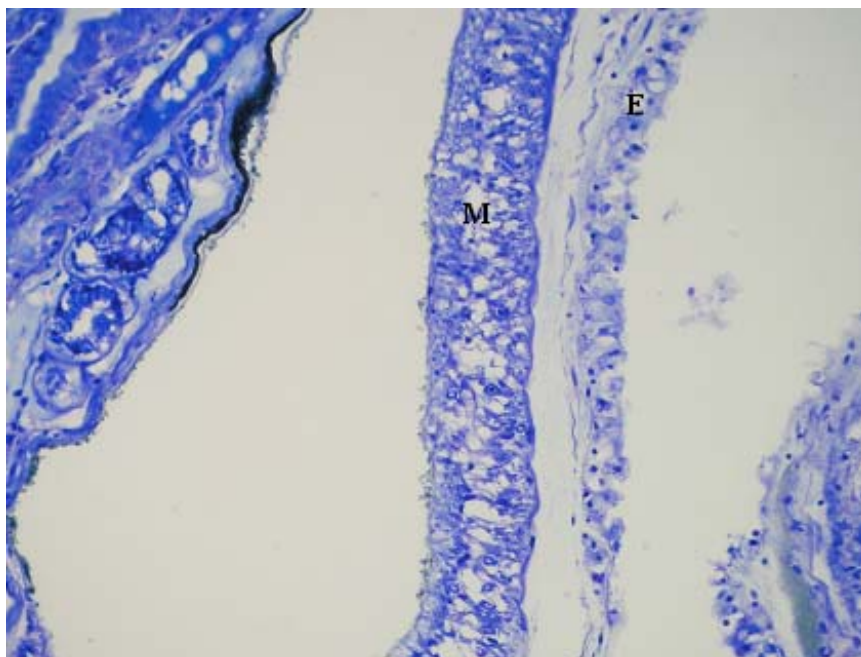


Fig. 8. Paralarva de 13 d de edad. Prueba L5. Se observa la epidermis (E) y la capa muscular subyacente (M) completamente alteradas.

Las glándulas salivares posteriores presentaban, también, vacuolización más o menos intensa. Los melanóforos situados en la dermis estaban dilatados, y el pigmento localizado en la capa externa de la retina se sitúa en la base de ésta, situación habitual en condiciones de adaptación a la oscuridad. En algunas paralarvas las vísceras presentan atrofia, y se aprecia una vacuolización intensa de la glándula digestiva, indicativa de ayuno. En otras, se aprecia el buche y/o el estómago repleto de alimento; en ocasiones, este último órgano presenta restos quitinosos, si la alimentación ha sido a base de metanauplius de *Artemia*. Invariablemente, en todas las muestras se aprecia una infección bacteriana localizada en la cámara posterior del ojo, y que afecta fundamentalmente a la capa externa de la retina (Fig. 9).



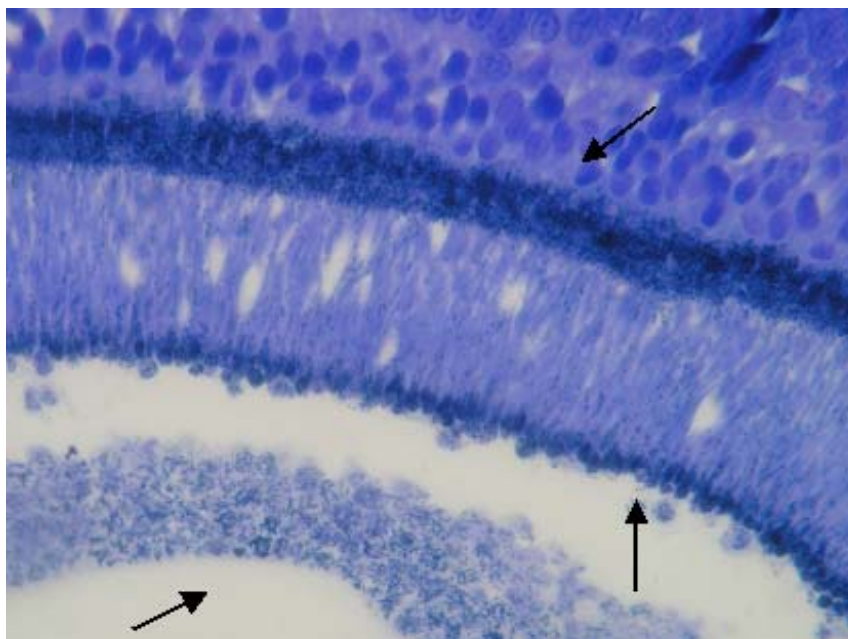


Fig. 9. Retina de una paralarva de 13 d de edad. Se observa una nube bacteriana (Flecha) en la cámara posterior del ojo y la presencia de bacterias en la capa externa de la retina (flecha).

Las bacterias se sitúan entre las células visuales formando cordones verticales, y también en la membrana limitante, en ocasiones provocando su desprendimiento e invadiendo la cámara posterior del ojo, donde formarían nubes bacterianas. Se tratarían de bacilos cortos, robustos, gram negativos, que podrían considerarse *Vibrio*-like (la confirmación de género y especie debería hacerse por bacteriología). Las lesiones ocasionadas por esta infección afectarían de forma fundamental al equilibrio osmótico y a la capacidad de supervivencia larvaria, invalidando, en gran medida, el resultado de las pruebas comparativas de los diversos regímenes alimenticios ensayados.

Las bacterias del género *Vibrio* son, fundamentalmente, patógenos oportunistas que viven libremente en el medio marino. Constituyen organismos típicos causantes de epizootias bacterianas en centros de cría, donde la calidad del medio se deteriora fácilmente por el aporte de gran cantidad de materia orgánica dispersada por el alimento, a la que se debe añadir la producida por los excrementos de los propios ejemplares de cría (fenómeno conocido como “polución propia”).

Si un agente infeccioso llega a estas explotaciones, en los que los ejemplares se encuentran estresados por las propias condiciones de la cría intensiva y por el efecto directo o indirecto de la “polución propia”, les es fácil distribuirse por toda la extensión de la explotación. Las posibilidades de transmisión de enfermedades aumentan, siendo muy difícil detener los brotes iniciados (Egusa, 1979). Bajo estas condiciones, propicias para el desarrollo de infecciones bacterianas, se deben minimizar el estrés larvario mejorando, en la medida de lo posible, las condiciones higiénicas y de manejo e introduciendo tratamientos profilácticos en los protocolos larvarios, con el objetivo de disminuir la carga bacteriana en los tanques de cría y minimizar, de esta manera, las posibilidades de infección bacteriana.

De los resultados obtenidos hasta el momento podemos obtener las siguientes conclusiones:

- La alta mortalidad observada durante la cría larvaria del pulpo se debe, fundamentalmente, a causas nutricionales.
- Las lesiones observadas en el sistema digestivo son compatibles con esta afirmación, siendo más acusadas en aquellas paralarvas en las cuales no se observan restos alimenticios en su tracto digestivo y manifiestan signos de inanición.
- Las lesiones observadas en las pruebas alimentarias en las que se suministra como alimento único metanauplius de *Artemia* son más tempranas e intensas que en el caso de dietas únicas o mixtas basadas en zoeas de crustáceos.
- Las lesiones observadas en las pruebas de alimentación con metanauplius de *Artemia* son compatibles con una ingesta insuficiente de alimento. Se deben revisar los regímenes alimenticios y/o la palatabilidad de las presas, con el objetivo de mejorar la ingesta de metanauplius por parte de las paralarvas.
- Las dietas con un exceso de lípidos causan degeneración grasa de la glándula digestiva.

- La alimentación con zoeas de crustáceos es adecuada hasta el día 20 ó 23 de edad, que es cuando se comienzan a apreciar alteraciones en las paralarvas con este régimen alimenticio.
- Las lesiones más tempranas se localizan en glándulas salivares posteriores, e influirán, por tanto, en la capacidad de digestión externa e inmovilización de presas, dificultando la supervivencia larvaria.
- El aspecto de la glándula digestiva constituye un buen indicador del estado nutricional de la paralarva.
- La pigmentación externa de las paralarvas es indicativa de alteración.
- Se han observado infecciones parasitarias y bacterianas en algunas crías larvarias, causantes de mortalidad. Se deben introducir modificaciones en los protocolos de cría que minimicen las probabilidades de infección (manejo adecuado, tratamientos preventivos periódicos, mejora de la calidad del medio).

#### Bibliografía citada

- Best, E.M.H. & Wells, M.J., 1983. The control of digestion in Octopus I: The anticipatory response and the effects of severing the nerves to the gut. *Vie et Milieu* 33, 135-142.
- Best, E.M.H. & Wells, M.J., 1984. The control of digestion in Octopus II. The role of internal stimuli. *Vie et Milieu* 34, 1-7.
- Bidder, A.M., 1957. Evidence for an absorptive function in the "liver" of Octopus vulgaris Lam. *Pubblicazione Stazione Zoologica Napoli* 29, 139-150.
- Bidder, A.M., 1966. Feeding and Digestion in Cephalopods. En: (K.M. Wilbur & C.M. Yonge, Eds.) *Physiology of Mollusca*, vol.2. Academic press, New York, pp.97-124.
- Boletzky, S.V., 1974. The "larvae" of Cephalopoda. A review. *Thlassa Jugoslava* 10, 45-76.

- Boletzky, S.V., 1989. Recent studies on spawning, embryonic development and hatching in the Cephalopoda. *Advances on Marine Biology* 25, 85-115.
- Boucaud-Camou, E. & Roper, C.F.E., 1995. Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bulletin of Marine Science* 57, 313-327.
- Boucher-Rodoni, R., 1973. Vitesse de digestion d'*Octopus cyanea* (Cephalopoda: Octopoda). *Marine Biology* 18, 237-242.
- Boucher-Rodoni, R., 1976. Etude histologique du tube digestif de deux Céphalopodes, *Eledone cirrosa* (Octopoda) et *Illex illecebrosus* (Teuthoidea) au cours de la digestion. *Cahiers de Biologie Marine* 17, 245-260.
- Boucher-Rodoni, R., 1982a. La glande digestive des Céphalopodes, organe de synthèse et de sécrétion d'enzymes digestives. *Cahiers de Biologie Marine* 23, 299-318.
- Boucher-Rodoni, R., 1982b. Étude cytologique de la glande digestive de deux Céphalopodes *Eledone cirrhosa* et *Sepia officinalis*. *Cahiers de Biologie Marine* 23, 393-413.
- Boucher-Rodoni, R. & Mangold, K., 1977. Experimental study of digestion in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *Journal of Zoology, London*, 183:505-515.
- Boucher-Rodoni, R., Boucaud-Camou, E., Mangold, K., 1987. Feeding and digestion. En: (Boyle, P.R., Eds.) *Cephalopod Life Cycles*, vol. 2, Academic Press, London, pp. 85-108.
- Brocco, S. L., 1976. The ultrastructure of the epidermis, dermis, iridophores, leucophores, and chromatophores of *Octopus dofleini martini* (Cephalopoda: Octopoda). *Proceedings of the University of Washington, Seattle*. (En Budelmann et al. , 1997).
- Budelmann, B.U., Schipp, R. & Boletzky, S.V., 1997. Cephalopoda. En: (Harrison, F.W., Khon, A.J., Eds.) *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Mollusca II*, vol. 6<sup>a</sup>. Wiley-Liss, New York, pp. 119-414.
- Castille, P.L. & Lawrence, A.L., 1978. Uptake of amino acids and hexoses from sea water by octopus hatchlings. *Physiologist* 21, 4.
- Domingues, P. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*. PhD, Universidade do Algarve. 95 pp.
- Egusa, S., 1979. Relationship of major infectious diseases of fihs and shellfish to culture techniques and mangement in the intensive aquaculture of Japan. *Proc. 7th Japan-soviet Joint Symp. Aquaculture, Sep. 1978 (Tokyo, 1979)*. pp: 63-72.

- Ferguson, J.C., 1982. A comparative study on the net metabolic benefits derived from the uptake and release of free amino acids by marine invertebrates. *Biological Bulletin* 162,1-17.
- Ghiretti, F., 1959. Cephalotoxin: The crab-paralysing agent of the posterior salivary glands of cephalopods. *Nature* 183, 1192-1193.
- Guerra, A., 1992. Fauna Ibérica, Vol.1, Mollusca, Cephalopoda (Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Eds.), 327 pp.
- Helland, S., Triantaphyllidis, G.V., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., Lavens, P. & Sorgeloos, P., 2000. Modulation of the free aminoacid pool protein content in populations of the brine shrimp *Artemia* spp. *Marine Biology* 137, 1005-1016.
- Helland, S., Terjesen, B.F. & Berg, L., 2003. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 215, 213-228.
- Hernández-García, V., Martín, A. Y. & Castro, J. J., 2000. Evidence of external digestion of crustaceans in *Octopus vulgaris* paralarvae. *Journal of Marine Biology Association U.K.* 80, 559-560.
- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Otero, J. J. & Moxica, C., 2003. El cultivo del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier). (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica, Eds.), 18 pp.
- Key, L.N., Boyle, P.R. & Jaspars, M., 2002. Novel activities of saliva from the octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca; Cephalopoda). *Toxicon* 40, 677-683.
- Kasugai, T., 2001. Feeding behaviour of the Japanese pygmy cuttlefish *Idiosepius paradoxus* (Cephalopoda: Idiosepiidae) in captivity: Evidence for external digestion?. *Journal of Marine Biology Association U.K.* 81, 979-981.
- Manahan, D. T., 1990. Adaptions by invertebrate larvae for nutrient acquisition from seawater. *American Zoology* 30, 147-160.
- Mangold, K.M., 1983. *Octopus vulgaris*. En: (Boyle, P.R., Eds.), *Cephalopod Life Cycles*, vol.1, Academic Press, London, pp. 335-364.
- Mangold, K. & Bidder, A.M., 1989. L'appareil digestif et la digestion. En: (P.P. Grassé, Eds.) *Céphalopodes. Traité de Zoologie* 5/4. Masson, Paris. pp:321-373.
- Morishita, T., 1978. Studies on the protein digestive enzymes of octopus, *O. vulgaris* Cuvier. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University* 5, 197-282.

- Nixon, M. & Mangold, K., 1996. The early life of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopodidae) in the plankton and at settlement: a change in lifestyle. *Journal of Zoology*, London 239, 301-327.
- Padrós, F., Zarza, C.A. & Crespo, S., 2001. Infecciones por ciliados histiófagos en acuicultura marina: aspectos histopatológicos. *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas* 4, 500-512.
- Vecchione, M., 1982. Morphology and development of planktonic *Loliguncula brevis* (Cephalopoda: Myopsida). *Proceedings of the Biology Society of Washington* 95, 602-609.
- Vecchione, M. & Hand, V.A., 1989. Digestive-Gland Histology in Paralarval Squids (Cephalopoda:Loliginidae). *Fishery Bulletin, U.S.* 87, 995-1000.
- Villanueva, R., Riba, J., Ruíz-Capillas, C., González, A. V. & Baeta, M., 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture* (in press).

- **Instituto Canario de Ciencias Marinas. Telde. (Gran Canaria).**

## 1.1 ESTUDIO HISTOLÓGICO

Durante el primer trimestre del año 2002 se avanzó en la puesta a punto de las técnicas de inclusión, corte y tinción de las paralarvas, así como de distintos órganos del adulto capturado del medio natural. Eso nos permitió conocer las características histológicas de esta especie, desconocida hasta entonces para nuestro grupo en este campo, y elaborar un Atlas de la Histología con el fin de comprender mejor la evolución de los órganos durante el desarrollo de las paralarvas.

Posteriormente se procesaron y analizaron todas las muestras de paralarvas recibidas de otros grupos de investigación. Hay que destacar que solo el grupo de Vigo pudo enviar muestras de paralarvas en este primer año.

Del grupo de trabajo de Vigo se recibieron muestras de paralarvas de 0, 5 10, 15, 20 y 23 días. Todas fueron procesadas e incluidas en parafina, realizándose cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$ . A continuación se realizaron tinciones de Hematoxilina –Eosina y de ácido periódico- reactivo de Schiff. El análisis microscópico incluyó la observación, identificación y evolución de los principales órganos de la larva, centrándonos principalmente en su digestivo y glándulas anexas, así como su estudio morfométrico. Todas las preparaciones con sus características más relevantes fueron fotografiadas digitalmente, y nos permitió comparar las paralarvas que se están produciendo en esta comunidad, con las experiencias preliminares que llevamos a cabo en Canarias.



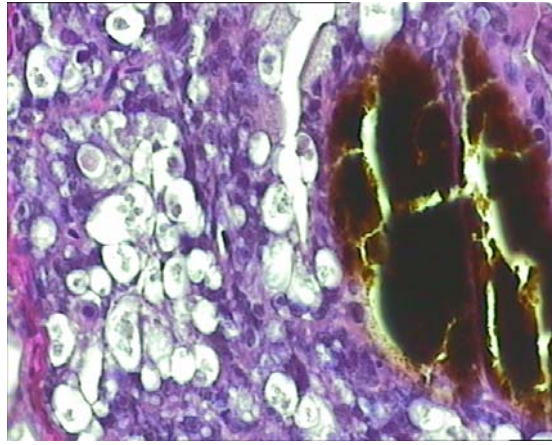


Ilustración 1. Sección transversal de una paralarva de 0 días de edad, mostrando principalmente el manto, las glándulas digestivas y el saco de tinta.

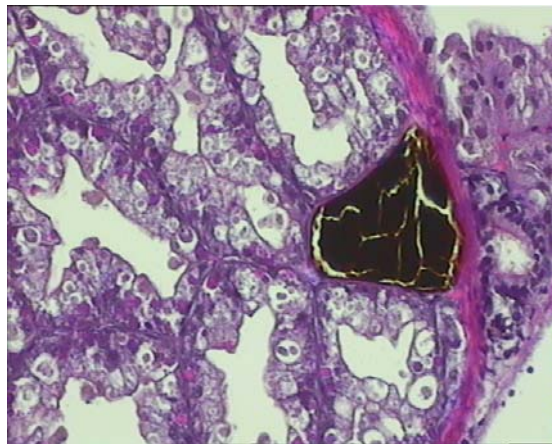


Ilustración 2. Sección transversal de una paralarva de 5 días de edad, mostrando la organización de la glándula digestiva.

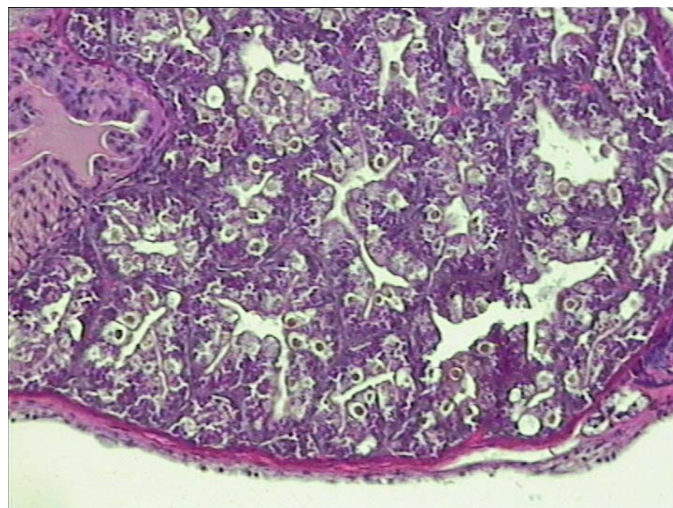


Ilustración 3. Sección transversal de una paralarva de 23 días de edad, mostrando la glándula digestiva con una escasa cantidad de vacuolas de absorción, sugiriendo un estado de inanición o insuficiencia nutricional.



Durante el año 2003, se prosiguió con el estudio del material enviado por los diferentes grupos en la primera anualidad. Con fecha 7/11/03 se recibió del grupo P8 (Galicia) diferentes muestras correspondientes a los tratamientos ensayados durante los meses de julio y agosto de este año. Las experiencias realizadas y el material recogido se resumen en:

#### MUESTRAS REMITIDAS POR EL IEO DE VIGO

##### CULTIVO DE PARALARVAS NORMAL, PRUEBA PATOLOGÍA

Fitoplancton en el tanque y artemia como alimento

10 paralarvas, recién eclosionadas, días 2, 4, 7 y 10.

##### CULTIVO DE PARALARVAS CON ZOOPLANCTON L-13

Fitoplancton en el tanque y Artemia y zooplancton congelado como alimento

10 paralarvas recién nacidas, día 2, 4, 7 y 10

##### CULTIVO DE PARALARVAS CON PROBIÓTICOS

Fitoplancton en el tanque y Artemia como alimento, con tratamiento en el agua de probióticos.

10 paralarvas de 1, 3, 5, 7, 10 y 13 días

##### CULTIVO DE PARALARVAS CON ZOEAS VIVAS.

Fitoplancton en el tanque y Artemia y unas pocas zoeas (día 4) como alimento.

10 paralarvas días 5, 7, 10 y 12.

Todas las muestras fueron procesadas e incluidas en parafina, realizándose cortes seriados de 5  $\mu$ m. A continuación se realizaron tinciones de Hematoxilina –Eosina y de ácido periódico- reactivo de Schiff.

El estudio histológico se centró principalmente en el análisis de la glándula digestiva, relacionando la morfología de la misma y las diversas vacuolas que aparecen en ella en función de la edad de la paralarva y de la dieta a la que fue sometida. Igualmente se analizaron posibles alteraciones que pudieron aparecer en otros órganos.

En la glándula digestiva, nos encontramos con tres tipos de células fundamentales. Células basales, de formas piramidales y situadas en la zona basal del epitelio. Células de digestión, con forma columnar y que están asociadas a vacuolas de absorción y excreción. Y un tercer tipo de células, con forma caliciforme y que presentan gránulos de secreción enzimática.

El estudio de la glándula digestiva reveló la presencia de diversas formas vacuolares, centrándonos en el estudio de los siguientes tipos de vacuolas:

En las células de digestión

- 1) Vacuolas V1, esféricas, eosinófilas, que van desde la zona apical hacia la zona basal de la célula, consideradas vacuolas de absorción.
- 2) Vacuolas V2, grandes, ovaladas de coloración parduzca, situadas en la zona apical de la célula e independientes. Estas vacuolas son consideradas cuerpos de excreción celular.

En las células de secreción

- 3) Vacuolas V3, esféricas de pequeño tamaño, altamente electro densas y localizadas en células con aspecto caliciforme. Estas vacuolas se observan en grandes grupos y se consideran vacuolas de secreción enzimática.

Cultivo de paralarvas con zoeas vivas.

En las paralarvas alimentadas con ZOEAL5, se puede observar como las vacuolas V1 están presentes en las muestras de todos los días, exceptuando una muy baja intensidad en los días 5 y 10 de vida larvaria. Por otro lado las V3 incrementan su presencia a partir del día 7. A su vez las vacuolas V2 permanecen en igual concentración en todas las muestras.

A su vez, son evidentes síntomas de degeneración tisular en algunas larvas el día 7 de vida, encontrando además cuerpos esféricos que pueden estar asociados a patógenos. Además en las larvas del día 13, se observan todas las vacuolas mencionadas, destacando un incremento del número y tamaño de vacuolas de absorción en transición desde la zona apical hacia la zona basal de la célula.

En definitiva, la variación observada en las vacuolas de absorción V1, indican por un lado, en las larvas de 5 días, un proceso de aprendizaje en la captura del alimento, esto está de acuerdo con las experiencias en inanición donde las paralarvas pueden sobrevivir hasta el día 4 de sus reservas vitelinas. Sin embargo la disminución de estas vacuolas el día 10 señala un estadio en el cual un número importante de larvas no han superado con éxito esta primera etapa, reflejado por una bajo proceso de absorción del alimento a nivel celular, y podría verse reflejado con picos de mortalidad. Finalmente el incremento en número y transporte de estas vacuolas dentro de la célula observados a partir del día 13 son signos de una correcta actividad alimenticia de las paralarvas que superaron con éxito esta primera etapa.

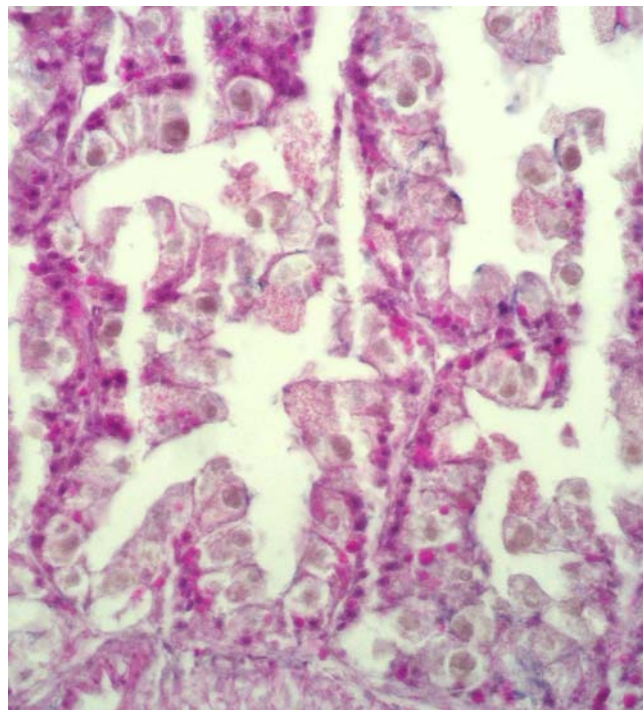


Ilustración 4. Glándula digestiva de una paralarva de 7 días de edad, mostrando todavía una baja actividad enzimática (flecha, vacuolas de secreción V3).

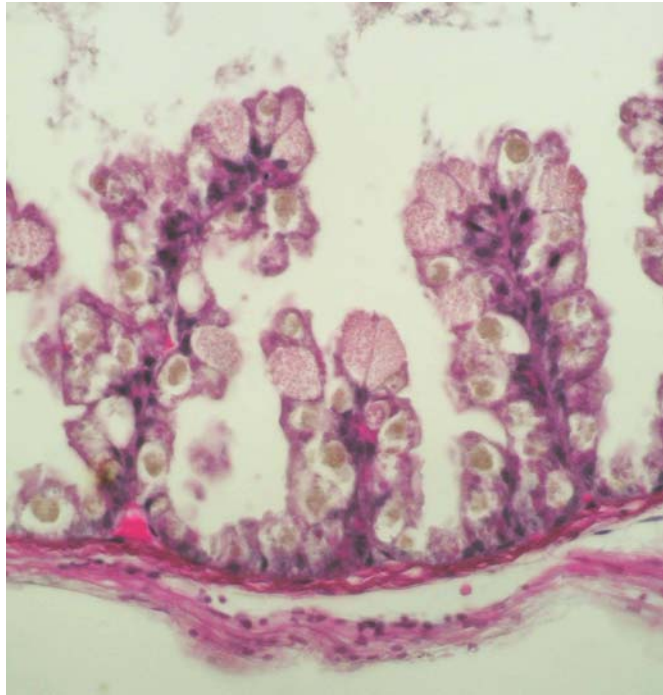


Ilustración 4. Glándula digestiva de una paralarva de 10 días de edad, mostrando un incremento de la actividad enzimática.

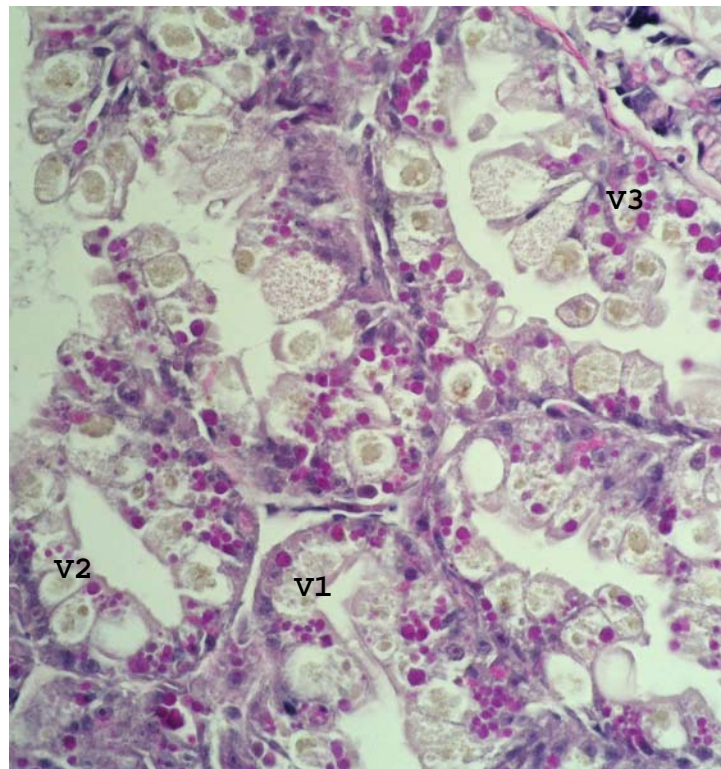


Ilustración 5. Glándula digestiva de una paralarva de 13 días de edad, mostrando los tres tipos de vacuolas (V1 absorción V2 excreción y V3 enzimática).

Cultivo de paralarvas con probióticos.

En el día 1 se observa un comportamiento similar en las larvas analizadas, donde apreciamos una alta concentración de vacuolas de absorción (V1), con tamaños variados y ampliamente repartidas por toda la célula. Una alta proporción de vacuolas de excreción (V2), y una baja cantidad de vacuolas de secreción (V3).

En el día 3 ha disminuido considerablemente la presencia de vacuolas V1, estando estas en menor número y dispersas en la célula, manteniendo todavía una baja cantidad de vacuolas V3.

A partir del quinto día hay un claro incremento de vacuolas de absorción V1, manteniéndose el resto de vacuolas sin variaciones.

El día siete de vida larvaria se aprecia un incremento importante en el número de vacuolas de secreción (V3), viéndose una elevada actividad secretora hacia la luz de la glándula.

A partir del día 10 se aprecian en algunas larvas una alta cantidad de vacuolas lipídicas de absorción en la zona basal de las células columnares del estómago.

En el día 13 se observa una gran diversidad en cuanto al número de vacuolas de absorción, con una mayor tendencia de la vacuola hacia la zona basal de la célula, y con gran variedad de tamaño.

El patrón de variación en los primeros días de la larva en cuanto a las vacuolas de absorción, V1, podría estar relacionado con la absorción de los vestigios de las reservas endógenas, dificultándose esta labor en los siguientes días, donde las reservas se han agotado y tienen que aprender a preñar. En este caso el aporte de probiótico se manifiesta favoreciendo la capacidad de absorción de las larvas, o incluso podría reflejar una mejora en el comportamiento alimenticio al observarse un incremento del número de vacuolas de absorción al día 5 de vida. Esta mejora queda reflejado en los siguientes días con acumulo de reservas lipídicas en el tracto digestivo, sin que esto sea necesariamente signo de una dieta equilibrada.



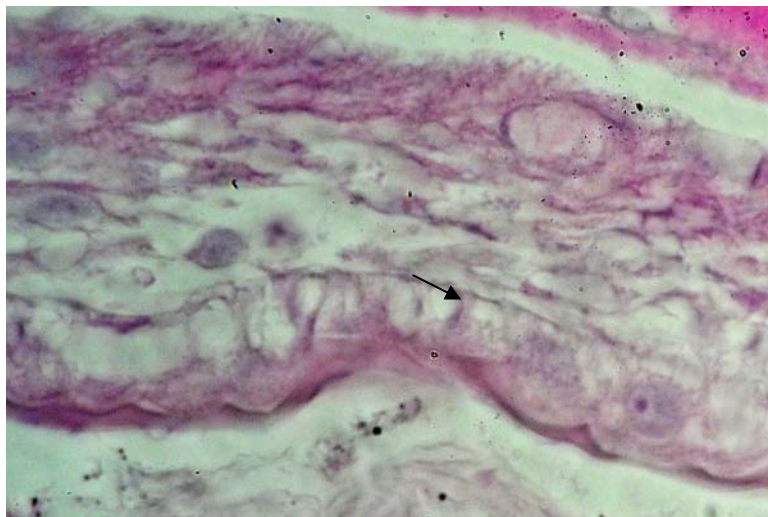


Ilustración 6 Depósitos lipídicos en el epitelio digestivo (flecha).

Cultivo de paralarvas con zooplancton.

Al igual que en los anteriores tratamientos, en los primeros días se observa una alta densidad de vacuolas de absorción (V1), y muy pocas de excreción y secreción (V2 y V3).

Al llegar el cuarto día la presencia de vacuolas V1, queda resaltada por el gran tamaño que adquieren estas en larvas que presentan un mayor número de ellas. Sin embargo predomina una gran variabilidad de vacuolas V2, mientras que las V3 todavía permanecen en bajas cantidades.

En el séptimo día, se observa una reducción del número de vacuolas V1, estando presentes en concentraciones importantes únicamente en un tercio de las larvas observadas. Continúa la gran variabilidad de las vacuolas V2, aunque por otro lado resalta el auge que adquiere la presencia de vacuolas de secreción (V3).

En las larvas de 10 días, se aprecia una muy baja actividad vacuolar en todo el parénquima, observándose además un proceso de descamación del epitelio en algunas paralarvas.

En este tratamiento destaca la reducción de vacuolas de absorción desde el día 7 de la larva, sin que estas incrementen en los días posteriores, esto nos indica la baja eficacia de la alimentación en estos días.

Cultivo de paralarvas según técnicas de cultivo estándar del IEO-Vigo. Patología.

A día 7 de tratamiento, predomina una alta actividad de absorción en la totalidad de las larvas analizadas, existiendo una gran variedad en las vacuolas V2 y V3. Al llegar el día 10 de vida, ha disminuido la cantidad de vacuolas de absorción, observándose puntualmente procesos degenerativos en pequeñas áreas de la glándula digestiva, acompañada por una baja actividad de vacuolas de secreción. Sin embargo, no podemos evidenciar alteraciones patológicas concluyentes en este órgano.

## **SUBPROYECTO 2: ENGORDE DE JUVENILES**

Experimentación y desarrollo de nuevas tecnologías de engorde: Jaulas, zonas acotadas, tanques en circuito abierto y recirculación con control de la temperatura.

Teniendo en cuenta la amplitud de este objetivo parcial y el número de Comunidades Autónomas interesadas en él, las actividades de investigación correspondientes a este apartado se desarrollaron en diferentes centros. A continuación se describen las realizadas por cada uno de ellos.

### **Engorde en jaulas flotantes**

Esta actividad fue desarrollada en tres comunidades autónomas: Asturias, Valencia e Islas Canarias.

- **Centro Experimentación Pesquera (Comunidad Asturiana)**

Para llevar a cabo las experiencias de engorde se diseñó una jaula de forma rectangular, de malla galvanizada, de 1,70 m de largo, 1,20 m de ancho y 1,95 m de alto, provista de dos flotadores de fibra de vidrio. La jaula se dividió en dos compartimentos iguales, de 2 m<sup>3</sup> cada uno, en donde se introdujeron 49 tubos de PVC, de 16 cm de diámetro y 35 cm de longitud, como refugios para los ejemplares.

La jaula se fondeó en el puerto de Tapia de Casariego, en una zona protegida, de fácil accesibilidad y con una profundidad de 4 m. Se realizaron cuatro experiencias, dos en el 2002 y otras dos en el 2003, en los periodos comprendidos de abril-julio y julio-octubre. En todos los casos, los ejemplares fueron suministrados por pescadores, capturados con nasas y trasladados desde el mar hasta la lonja en recipientes, con un suministro de agua continuo.

El número de ejemplares utilizados para las cuatro experiencias realizadas fueron de 90, 47, 50 y 48 pulpos con unos pesos medios de 1.090 g (rango: 900 g-1.400 g), 917g (rango: 600 g-1.600 g), 1.008 g (rango: 800 g-1.400 g) y 995,8 g (rango: 700 g-1.300 g), respectivamente.



En todos los casos se hizo una selección de sexos, mediante la observación del tercer tentáculo derecho, estabulando exclusivamente machos para evitar competencia entre ellos y bajas o mermas de crecimiento, en el caso de las hembras, durante el periodo de maduración sexual y de puesta.

La alimentación se basó en una dieta mixta de pescado congelado y cangrejo y mejillón vivo, durante 5 días a la semana. Las especies utilizadas fueron: lirio (*Micromesistius poutassou*), chicharro (*Trachurus trachurus*), boga (*Boops boops*), mujil (*Mujil sp.*), caballa (*Scomber scombrus*), faneca (*Trisopterus luscus*), sardina (*Sardina pilchardus*), cangrejo (*Carcinus maenas*) y mejillón (*Mytilus edulis*). La cantidad de alimento suministrado osciló entre un 5% y 10% de la biomasa total, modificándose en función del alimento no consumido.

La temperatura media del agua, para los cuatro periodos de engorde fueron de 14,5° C (12,0° C-17,0° C), 15,9° C (13,0° C-18,0° C), 15,3° C (14,0° C-17,0° C) y 8,7° C (17,0° C-21,1° C), respectivamente.

La salinidad en todas las experiencias se mantuvo entre el 33‰ y el 35‰.

Al final de cada experiencia los ejemplares fueron chequeados para determinar el porcentaje de pulpos con calvas o lesiones en el borde del manto, así como la posible presencia de tentáculos comidos.

Para cada experiencia se determinó la tasa de crecimiento específico, como  $G = (\ln \text{ peso medio final} - \ln \text{ peso medio inicial}) \times 100 / \text{días de cultivo}$ ; el incremento en peso diario, como  $\Delta P = (\text{Peso medio final} - \text{Peso medio inicial}) / \text{días de cultivo}$  y el índice de conversión de alimento, como  $IC = \text{Alimento ingerido} / (\text{Peso medio final} - \text{Peso medio inicial})$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla se presentan los datos de inicio y los resultados finales obtenidos en las cuatro experiencias llevadas a cabo durante los periodos primavera-verano y verano-otoño del 2002 y 2003.

	AÑO 2002		AÑO 2003	
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4
Periodo de engorde	17/04-12/07	25/07-29/10	10/04-09/07	23/07-22/10
Días de cultivo	85	96	90	90
Nº ejemplares	90	47	50	48
Biomasa inicial (Kg)	98,1	43,1	50,4	47,8
Biomasa final (Kg)	89,8	145,8	53,7	155,3
Carga inicial (Kg/m <sup>3</sup> )	24,5	10,7	12,6	11,9
Carga final (Kg/m <sup>3</sup> )	22,4	36,4	13,4	38,8
Peso medio inicial (g)	1.090,0	917,0	1.008,8	995,8
Peso medio final (g)	1.694,0	3.738,5	1.790,0	3.982,0
Inc. Peso (g/día)	7,02	29,39	8,69	33,18
G (%)	0,51	1,46	0,64	1,54
IC		4,0	9,2	3,8
Mortalidad (%)	41,1	17,0	36,0	18,7

En todas las experiencias el periodo de engorde se mantuvo en torno a los 90 días. La densidad de cultivo, salvo en la primera experiencia que prácticamente fue el doble (22,5 ejemplares/m<sup>3</sup>), se aproximó a los 12 ejemplares/m<sup>3</sup>, es decir, una carga inicial de 24,5 Kg/m<sup>3</sup> en la primera y en torno a los 12 Kg/m<sup>3</sup> en las tres últimas.

Como podemos ver en la figura 1, el suministro total de peces, crustáceos y moluscos fue similar en todas las experiencias, aunque con diferencias en las pautas de distribución de la alimentación.

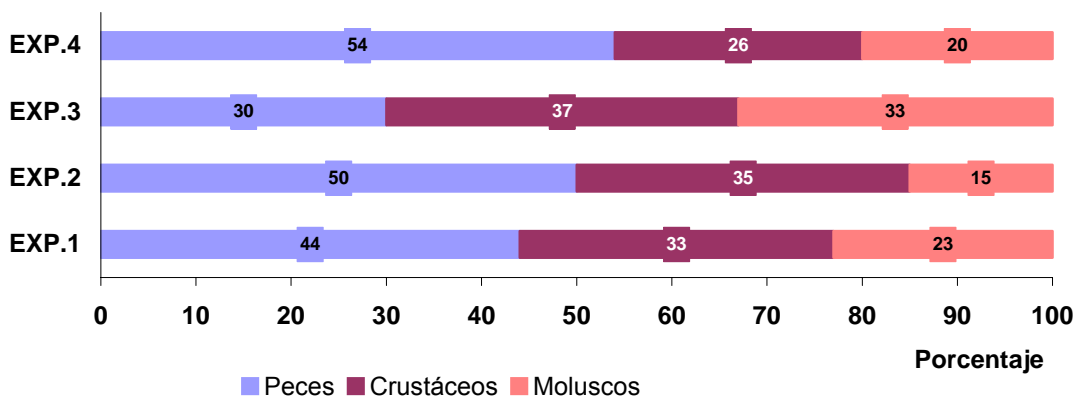


Fig.1. Alimentación suministrada en las cuatro experiencias desarrolladas.

En la experiencia 1, las proporciones para peces, crustáceos y moluscos fueron del 44%, 33% y 23%, respectivamente. El aporte de pescado durante todo el proceso de engorde se mantuvo entre el 40% y el 50%, mientras que para los crustáceos se inició con un aporte bajo, del 17%, durante el primer mes, siendo compensado con el 42% y el 31% en los dos meses siguientes. El aporte de alimento se inicia con el 8% de la biomasa, siendo reducido y ajustado en función de los restos acumulados. Durante el proceso de engorde se llegan a producir algunos casos de adelgazamiento, obteniéndose al final de la experiencia una biomasa total inferior a la inicial, es decir, la baja tasa de crecimiento no llegó a compensar la pérdida de biomasa por mortalidad. La mayoría de los ejemplares, al final de la experiencia, se encuentran entre 1.500 g y 2.000 g.

En la experiencia 2, el aporte de peces, crustáceos y moluscos bivalvos fue del 50%, 35% y 15%, respectivamente. El aporte de alimento se inició con el 9% de la biomasa, disminuyendo al 5% al final de la experiencia. La mayoría de los ejemplares, al final del periodo de engorde, se situaban entre los 3.000 g -3.500 g y 4.000 g- 4.500 g.

En la experiencia 3, las proporciones de peces, crustáceos y moluscos fueron del 30%, 37% y 33%, respectivamente, fundamentalmente lirio, cangrejo y mejillón. El aporte de alimento se inicia con el 8,7% de la biomasa, siendo necesario ir reduciendo hasta el 6,6%, al final de la experiencia. La mayoría de los pulpos, en el momento del despesque, registraban un peso entre 1.000 g y 2.000 g.

Por último, en la experiencia 4, la buena aceptación del alimento supuso el suministro de una mayor cantidad y variedad de especies, siendo todas ellas igualmente aceptadas, con unas proporciones para peces, crustáceos y moluscos del 54%, 26% y 20%. La ración se inicia con el 8,3% de la biomasa y se reduce al final al 3,3%. La mayoría de los pulpos engordados alcanzaron un peso entre los 3.500 g y 4.500 g.

En lo que se refiere al crecimiento específico, los mejores resultados se obtienen en las experiencias 2 y 4 con valores de 1,46% y 1,54%, mientras que en las experiencias 1 y 3 los valores se sitúan en el 0,51% y 0,64%, respectivamente.

El incremento en peso en las mejores experiencias, la 2 y la 4, alcanzan valores de 29,39 g/día y 33,18 g/día, mientras que en la 1 y la 3 se mantiene con valores de 7,02 g/día y 8,69 g/día, respectivamente.

El índice de conversión (IC) se calculó considerando el peso de valvas, agua intervalvar, cabezas, esqueletos y caparazones, obteniéndose unos valores, para las experiencias 2, 3 y 4 de 4,0, 9,2 y 3,8, respectivamente.

Centrándonos en la mortalidad (Fig. 2), en la experiencia 1 se produce una tendencia continua de bajas, durante todo el período de engorde, con un máximo de mortalidad instantánea a los 80 días y en ejemplares de 2-3 Kg de peso, que se traduce en una mortalidad acumulada del 41,1%. En las otras tres experiencias, con una densidad menor, en la experiencia 2, las bajas se producen durante el primer mes de estabulación, estabilizándose al final con una mortalidad acumulada del 17%. En la experiencia 3 se produce una mortalidad continua a lo largo del proceso de engorde, con un máximo al final del período para alcanzar una mortalidad total del 36%. Por último, en la experiencia 4 se presenta un máximo a los 60 días, estabilizando en una mortalidad final del 18,7%.

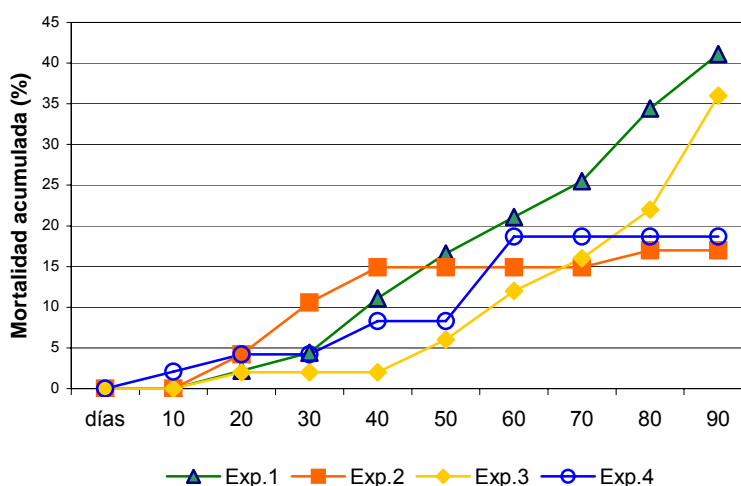


Fig.2. Mortalidad registrada en las cuatro experiencias desarrolladas.

Por último debemos destacar la mejora que se produce en cuanto a lesiones en la piel, pasando del 77% en la primera experiencia, al 23%, 20% y 12% en las tres últimas, probablemente relacionado con la disminución de la densidad.

## CONCLUSIONES

Los pulpos, aunque permiten su cultivo en cautividad y a densidades relativamente elevadas, son animales territoriales que precisan un mínimo de espacio para su desarrollo y crecimiento. A densidades por encima de las adecuadas es posible que se estresen, compitan por el espacio y dejen de comer, de ahí la elevada mortalidad y bajo crecimiento obtenido en la experiencia 1, que también se refleja en el mayor porcentaje de lesiones en la piel, del 77%, frente a las otras tres experiencias, del 23%, 20% y 12%, respectivamente, en donde la densidad de estabulación es prácticamente la mitad.

La calidad del alimento y la temperatura del agua, van a influir en la tasa de alimentación y en el índice de conversión, como parece reflejarse en los buenos resultados obtenidos en las experiencias 2 y 4, llevadas a cabo en verano-otoño, en donde se aportó un mayor número de especies de peces y en donde se registraron unas temperaturas medias del agua, más altas. En todas las experiencias se pudo comprobar que los cangrejos vivos eran los primeros en ser capturados, desechando los restos del día anterior, ante el nuevo alimento suministrado.

La conclusión final de las cuatro experiencias desarrolladas durante los años 2002 y 2003 es que resulta factible el engorde de pulpo en jaula partiendo de ejemplares en torno a 1 Kg de peso, con densidades de carga de 10-12 Kg/m<sup>3</sup>, temperaturas superiores a 15° C y una alimentación mixta, con un aporte mínimo de crustáceos del 25%. En estas condiciones se pueden obtener ejemplares de entre 3 y 4 Kg de peso medio, en ciclos de 3 meses, con una tasa de crecimiento cercana al 1,5% y con una mortalidad acumulada no superior al 20%.

- **Departament de Microbiologia i Ecologia. Universitat de València. Universitat de València y la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana)**

La fluctuación térmica en aguas valencianas (Denia), con temperaturas de 26 ° C a principios de verano (junio de 2003) y de 12 ° C en invierno (enero de 2004), limita el periodo de engorde anual a dos ciclos de aproximadamente 3 meses: uno en

primavera y otro desde principios de otoño a principios de invierno. Esto ha obligado a modificar la programación inicial (véase más adelante). Hasta el momento se han realizado tres ciclos de engorde y quedan otros tres por realizar hasta finales de 2005.

En el primer ciclo (mayo-julio 2003), se puso a punto el método de cultivo, constatando el buen comportamiento dinámico de la jaula y la tolerancia de los pulpos a las condiciones de cultivo. En el segundo (octubre 2003-enero 2004), se obtuvieron los primeros datos fiables sobre crecimiento ( $G=1,38$  %/día) y supervivencia (59,4 %). Aunque el crecimiento puede considerarse aceptable, la supervivencia es baja comparada con los valores en torno al 80 % que suelen obtenerse en este tipo de engordes (Rey-Méndez *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003).

A partir de ese momento el aumento de la supervivencia constituyó un objetivo prioritario para los restantes ciclos. Por eso, en el tercer ciclo (abril-junio 2004), se introdujeron algunas modificaciones: (1) captura de juveniles en la zona de cultivo para minimizar el estrés del transporte; (2) no inclusión de ejemplares pequeños (<300 g) debido a su elevada mortalidad; (3) suministro de alimento más fresco y con mayor presencia de crustáceos; (4) instalación de bandejas en el fondo de la jaula para retirar los restos de alimento y posibles cadáveres. Sin embargo los resultados han vuelto a ser buenos en crecimiento ( $G=1,69$  %/día) pero regulares en supervivencia (56,7 %). Más adelante se discute sobre las posibles causas.

#### Modificaciones en la programación prevista

- En el primer año se realizó un ciclo de engorde en vez de dos, debido a las fechas de recepción de la jaula, fuera del periodo adecuado para el engorde en función de la variación térmica. En el tercer año se realizarán dos ciclos en lugar de tres también debido las limitaciones impuestas por la fluctuación térmica.
- La proporción de pescado, crustáceos y moluscos en la dieta no siempre se ha ajustado al porcentaje 60:20:20 %, sino que ha fluctuado en función de su disponibilidad en el mercado. La tendencia ha sido aumentar el porcentaje de crustáceos.
- No se ha utilizado la jaula de PVC de sección hexagonal prevista, cuya principal característica era orientar los refugios hacia el exterior para minimizar la agresividad entre los animales.

Se ha optado por la jaula “C-160” de la empresa Arrecifes del Atlántico SL (Muxía) por tratarse de una estructura contrastada y por albergar mayor número de refugios (208 vs. 72 en la hexagonal).

### Nueva programación

Después del segundo ciclo (otoño 2003), además de fijar el aumento de supervivencia como objetivo prioritario, también se modificó el planteamiento de los restantes ciclos:

- Tercer ciclo (abril-junio 2004, ya realizado). Comparación de resultados entre un lote de individuos de peso homogéneo y otro de individuos de peso heterogéneo.
- Cuarto ciclo (otoño 2004-invierno 2005). Comparación de crecimiento entre machos y hembras, manteniendo ambos sexos separados.
- Quinto ciclo (primavera 2005). Despesque en una extracción (lote control) o en dos extracciones (lote experimental). En este último caso los individuos de peso superior a 2,5 Kg, serán extraídos a los dos meses de engorde y el resto a los tres. Se evita el riesgo de que los ejemplares grandes (>2,5 Kg) puedan morir al final del engorde debido al aumento de las temperaturas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha utilizado una jaula tipo “C-160” con dos compartimentos y 208 refugios. La jaula fue fondeada en un ensanchamiento del canal de entrada del puerto de Denia (Alicante), en una zona con 6 m de profundidad, buena renovación y ausencia de fluctuaciones verticales importantes.

Los juveniles utilizados en el primer y segundo ciclo fueron capturados mediante arrastre en aguas de Burriana (Castellón), distante aproximadamente 200 Km de Denia. Los juveniles del tercer ciclo fueron capturados en aguas de Denia. Los individuos de los dos primeros ciclos fueron agrupados en dos lotes denominados “pequeños” y “grandes” con objeto de uniformizar su tamaño. Los individuos del tercer ciclo fueron agrupados en los lotes “homogéneo” (rango 505-1000 g) y “heterogéneo” (rango 330-1735 g), con objeto de comprobar si una clasificación inicial tiene consecuencias en el rendimiento final (véase más información en la Tabla 1).

El porcentaje de peces, crustáceos y moluscos en la dieta ha sido: 80:13:7 (primer ciclo), 74:14:12 (segundo) y 61:28:11 % (tercero). En los dos primeros ciclos el alimento procedía de excedentes de supermercados. En el tercero procedía mayoritariamente de descartes y compras efectuadas en la Lonja de Denia, siendo más fresco y diverso que el anterior. La ración diaria ha oscilado entre el 5 y 10 % de la biomasa en cultivo.

Con los resultados obtenidos se ha calculado la tasa instantánea de crecimiento (G, %/día) de la manera habitual. El índice de consumo (IC) se ha calculado dividiendo el alimento correspondiente a cada individuo superviviente por el incremento de peso medio (se ha estimado que la fracción comestible en crustáceos es 0.5 y en moluscos 0.3). La tasa relativa de alimentación (TRA, %) se ha calculado multiplicando el alimento/día por 100 y dividiéndolo por la biomasa media. Como los engordes han sufrido cierta mortalidad, también se han calculado G e IC en base a las variaciones de biomasa (G Biomasa, IC Biomasa), variable que responde tanto al incremento de peso medio como a las pérdidas por mortalidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer ciclo: Mayo-Julio 2003

La temperatura del agua varió entre 19 ° C y 28 ° C. Hacia mitad del ciclo (segunda mitad de junio) ya se alcanzaron 25 ° C.

La supervivencia fue muy baja en el grupo de animales pequeños, 12,2 %, con una fuerte caída al comienzo y resultó mayor, 49,4 %, en el de los grandes (Figura 1). Las correspondientes tasas de mortalidad mensual fueron 41,2 y 23,7 % (Tabla 1). La tasa de crecimiento G fue de 2,66 y 1,01 %/día en pequeños y grandes, respectivamente. El elevado valor de G en el grupo de los pequeños se debe en parte a que la mortalidad afectó sobre todo a los individuos de menor peso, lo cual hace aumentar artificialmente la media del grupo. El índice de consumo fue elevado, 7 y 10,6 en pequeños y grandes, respectivamente. Cuando G e IC se calculan en base a las variaciones de biomasa, registran valores negativos ya que se produjo un descenso de la biomasa.



La supervivencia se vio afectada por las elevadas temperaturas (entre 25 y 28° C en la segunda mitad del engorde). Estas temperaturas están por encima del límite de 23 ° C, a partir del cual se produce pérdida de peso y aumento de la mortalidad (Aguado y García, 2002).

Tabla 1. Datos de cada ciclo de engorde y tasas e índices resultantes.

(\*Valores conjuntos de los dos grupos "pequeños y "grandes").

Ciclo	1: Mayo - Julio 2003			2: Oc-En' 04		3: Abril - Junio 2004	
Duración (días)	64			108		67	
Grupos	Pequeños	Grandes	Conjunto	Conjunto*	Homogén.	Heterogén.	Conjunto
Núm. inicial	74	79	153	180	91	96	187
Peso medio (g)	243	754	507	532	752	811	783
Desv. típica	106	232	313	220	116	377	283
Biomasa (Kg)	18,0	59,6	77,6	95,8	68,5	77,9	146,4
Densd. (Kg/m <sup>3</sup> )	3,1	10,2	6,6	8,2	11,7	13,3	12,5
Núm. final	9	39	48	107	57	49	106
Peso medio	1.337	1.438	1.419	2.350	2.377	2.489	2.429
Desv. típica	544	419	447	742	591	653	623
Biomasa	12,0	56,1	68,1	251,5	135,5	122,0	257,4
Dens. final	2,1	10,6	5,8	21,5	23,2	20,9	22,0
Incr. peso (g/mes)	513	321	428	505	727	751	737
Alimento (Kg)	68,4	282,3	350,7	783,3	413,5	375,7	789,2
TRA (%)	7,1	7,6	7,5	4,2	6,1	5,6	5,8
Superviv. (%)	12,2	49,4	31,4	59,4	62,6	51,0	56,7
Mortld. (%/mes)	41,2	23,7	32,2	11,3	16,7	21,9	19,4
G (%/día)	2,66	1,01	1,61	1,38	1,72	1,67	1,69
G Biomasa	-0,63	-0,09	-0,20	0,89	1,02	0,67	0,84
IC	7,0	10,6	8,0	4,0	4,5	4,6	4,5
IC Biomasa	-11,5	-81,4	-37,1	5,0	6,2	8,5	7,1

## Segundo ciclo: Octubre 2003-Enero 2004

La temperatura varió entre 22 ° C al principio del engorde y 12 ° C al final. La supervivencia en ambos grupos de animales, pequeños y grandes, fue muy parecida (Figura 1). A falta de un mes para finalizar el engorde y aprovechando el último control de peso, se realizó una clasificación por tamaños (véase también Figura 2). La supervivencia conjunta final fue de 59,4 %, lo que supone una mortalidad mensual de 11,3 %, muy inferior a la del ciclo 1 (Tabla 1). La tasa de crecimiento fue 1,38 %/día y el índice de consumo 4.

La clasificación (individuos por encima o por debajo de 2 Kg) se hizo para disminuir la dispersión de tamaños y favorecer la supervivencia. Sin embargo no se puede concluir que el efecto fuera positivo ya que la mortalidad mensual conjunta paso de 4,5 % en el tramo anterior a la clasificación a 8,9 % en el posterior. Los resultados de supervivencia, crecimiento y consumo de alimento fueron mucho mejores que los del primer ciclo y constituyen una primera referencia en el actual proyecto.

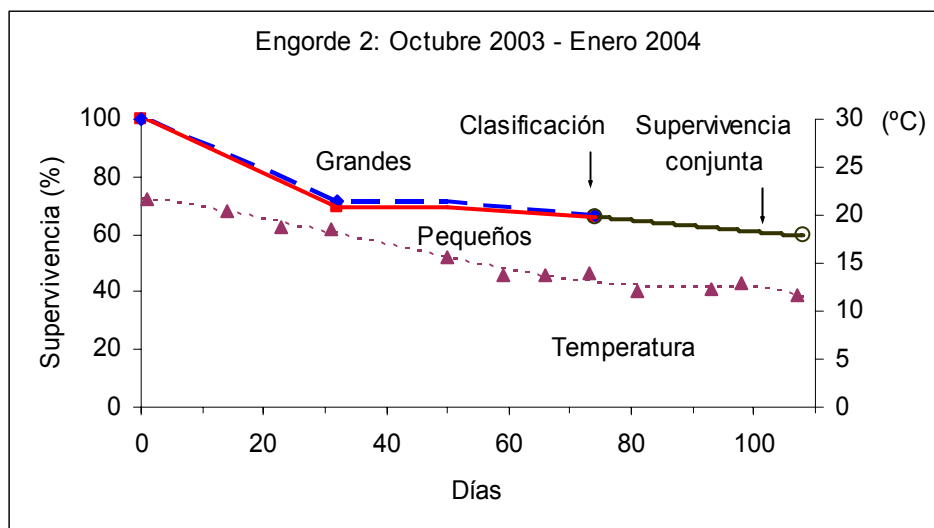


Figura 1. Variación de la supervivencia y la temperatura en el segundo engorde.

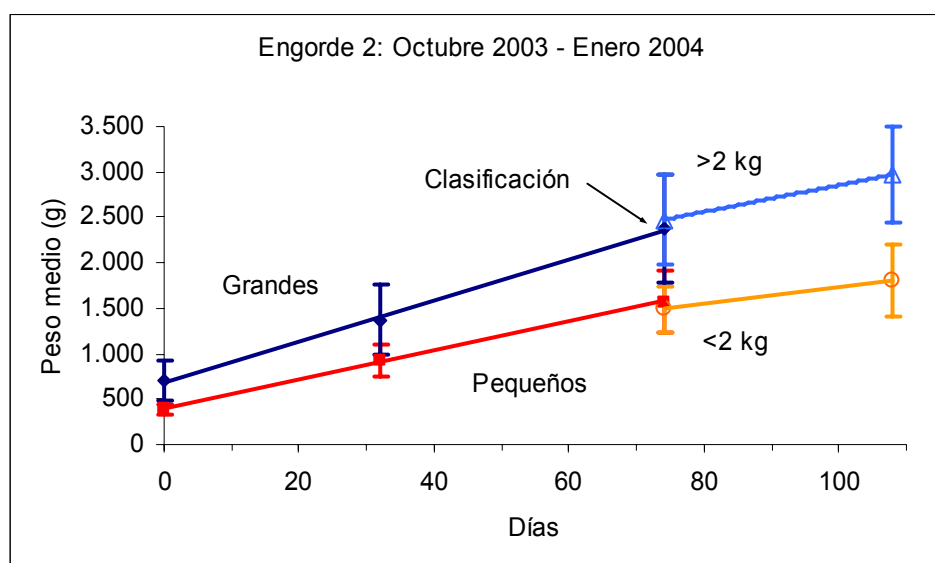


Figura 2. Variación del peso medio en el segundo engorde.

### Tercer ciclo: Abril-Junio 2004

La temperatura varió entre 13 y 22 ° C (Figura 3). La supervivencia en el grupo homogéneo fue 62,6 % y en el grupo heterogéneo 51 %. En este último disminuyó notablemente al principio pero se sostuvo después, mientras que en el homogéneo la caída fue más lineal. La mortalidad inicial afectó sobre todo a los individuos de menor tamaño, especialmente en el grupo heterogéneo. En ambos grupos el peso de los individuos muertos solía estar por debajo de la media de los supervivientes (Figura 4). La tasa de crecimiento fue algo mayor en el grupo homogéneo (1,72 %/día) que en el heterogéneo (1,67 %/día). El IC fue ligeramente inferior en el grupo homogéneo (4,5 vs. 4,6 en heterogéneo) a pesar de que la tasa relativa de alimentación (TRA) fue superior (6,1 vs. 5,6). Si G e IC se calculan con las variaciones de biomasa, se aprecia que las diferencias se agrandan a favor del grupo homogéneo (Tabla 1). En consecuencia, parece recomendable partir de grupos de peso homogéneo para el engorde. Si la dispersión es grande los individuos de menor talla sufren una importante mortalidad inicial, que repercute en el rendimiento final del lote. Rey-Méndez *et al.* (2003) también constatan una mortalidad inicial mayor entre los animales más pequeños.

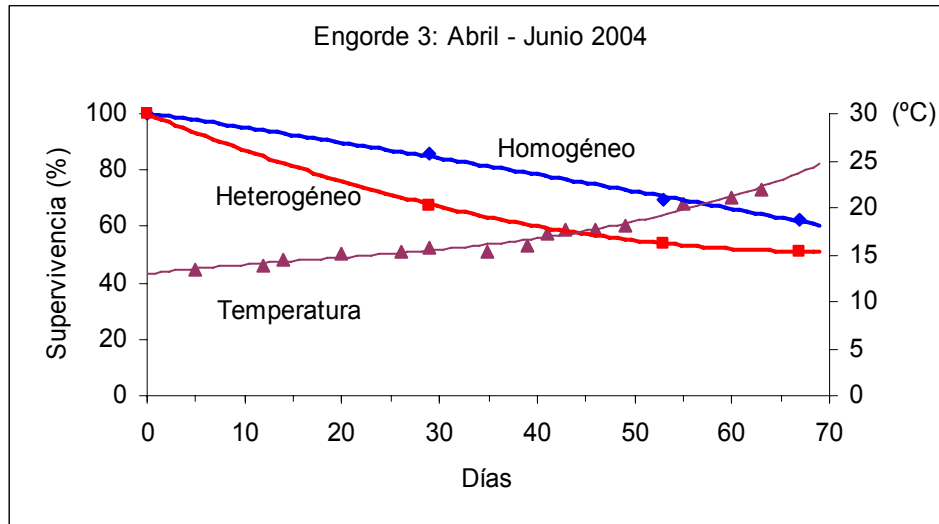


Figura 3. Variación de la supervivencia y la temperatura en el tercer engorde.

La mortalidad conjunta fue de 19,4 % al mes, cifra superior a la del segundo ciclo. El incremento mensual de peso medio fue de 737 g, superior al de los ciclos anteriores, aunque en aquellos el peso medio inicial también era inferior (Tabla 1). La G conjunta (1,69 %/día) fue superior a la del segundo ciclo, así como también IC (4,5) y TRA (5,8 %/día), ésta última como consecuencia de un mayor reparto de alimento. El cálculo de G e IC con la biomasa, pone de manifiesto que en el tercer ciclo se produjo menor incremento de biomasa y peor aprovechamiento del alimento que en el segundo ciclo. En ambos parámetros ha influido la mayor mortalidad registrada.

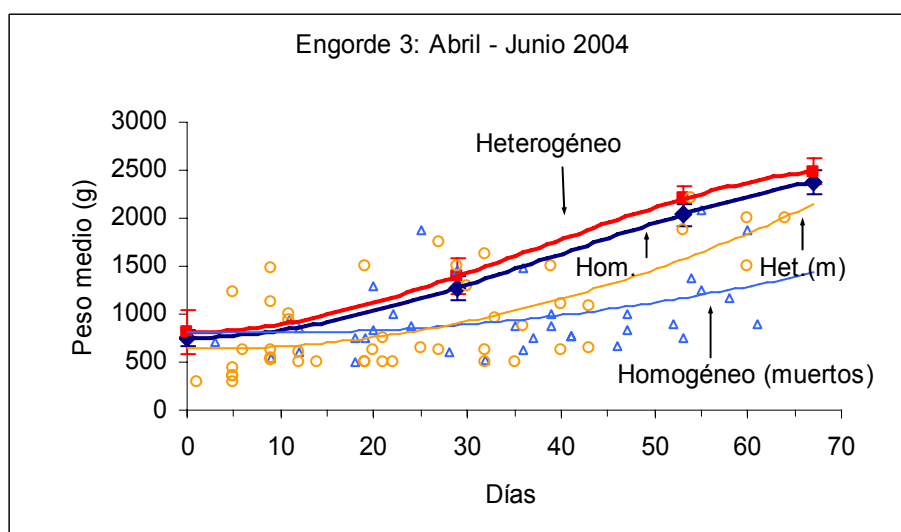


Figura 4. Variación del peso medio en tercer engorde. También se ha representado el peso de los individuos muertos de cada grupo.

Ya se ha comentado que en el tercer ciclo se hizo un gran esfuerzo por mejorar la supervivencia, prestando especial atención a la alimentación, de forma que se distribuyó tanto alimento en 67 días como en el segundo ciclo en 108 días (Tabla 1). También se ha comentado que el alimento era más fresco, diverso y con mayor proporción de crustáceos. Sin embargo la mortalidad mensual resultó mayor que en el segundo ciclo.

La explicación resulta difícil. El incremento medio de peso, de 737 g al mes, hace pensar que no ha habido malnutrición. Tampoco se han observado síntomas de ninguna patología. La jaula se encuentra en un lugar con buena renovación pero en el que parece haber sedimentación de material debido a la pérdida de velocidad de las olas al ensancharse el canal de entrada al puerto de Denia. De hecho hay una capa de varios cm de espesor de fango negro por debajo de la jaula y también depósitos negruzcos en el interior de los refugios. Por otra parte, también hay cierto tráfico de barcos. No se sabe si estas circunstancias pueden aumentar el estrés o la agresividad entre los animales.

#### Bibliografía citada

- Aguado Jiménez F. & B. García García, 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*. 10: 361-377
- Rey-Méndez, M, E. Tuñón & M. Luaces-Canosa, 2003. Estudio de los efectos del peso inicial y el sexo sobre el comportamiento, la mortalidad y el crecimiento del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en cultivo industrial. IX Cong. Nac. de Acuicultura, Cádiz Mayo 2003, Libro de resúmenes 276-277.
- Rodríguez, C., J.F. Carrasco & M. Rodríguez, 2003. Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en jaula. IX Cong. Nac. de Acuicultura, Cádiz Mayo 2003, Libro de resúmenes 268-269.

- **Instituto Canario de Ciencias Marinas (Comunidad Canaria)**

Tras la reunión anual del grupo de trabajo que tubo lugar en Gijón en Febrero de 2003 y atendiendo a las sugerencias de otros participantes se optó por la utilización de los artefactos flotantes diseñados por la empresa Arrecifes del Atlántico (modelo C-160), que ya han sido probados en diferentes Comunidades Autónomas. Si bien la construcción de las mismas se realizó en unos talleres locales en base a distintos esquemas facilitados por cortesía de D. Manuel Luaces Canosa (Gerente de Arrecifes del Atlántico) y material fotográfico recogido en una visita a la citada empresa.



Ilustración 10. Fondeo de las primeras jaulas de engorde de pulpo, en el archipiélago Canario. Enero 2004.

El hecho de poder construir los artefactos en la isla, contribuye de manera significativa a la disminución de los costes de los artefactos y facilitaría en un futuro, el desarrollo de la actividad industrial de engorde de esta especie, al reducir el efecto de la insularidad en el desarrollo de la actividad.

A pesar de contar con los artefactos para la realización de las experiencias de engorde desde el mes de septiembre, los trámites administrativos para la autorización de entrada al puerto y fondeo de los artefactos retrasaron de manera ostensible el comienzo de dicha experiencia.

La jaula presenta unas dimensiones estándar de 3X3X1.5 m con capacidad para 180 individuos en cada una de sus dos sub-unidades.

Experiencia 1: Durante el mes de febrero de 2004 se procedió a la constitución de un stock de ejemplares, que se mantuvo en las instalaciones de tierra, hasta su introducción en las jaulas de engorde, que tuvo lugar el 23 de marzo. Se realizó un seguimiento diario del estado y comportamiento de los animales así como mortalidad observada durante la alimentación. Semanalmente se determinó la cantidad de alimento suministrado y parámetros físicos químicos como oxígeno disuelto y temperatura. Una de las principales dificultades a la hora de abordar esta experiencia, fue la obtención de ejemplares de tallas inferiores al kilogramo en esta época del año, por lo cual se decidió realizar un estudio comparativo de crecimiento con dos rangos de peso bien diferenciados; En el grupo 1 ( $G_1$ ) se utilizaron 35 individuos con una media  $1.5 \pm 0.45$  kg y en el grupo 2 ( $G_2$ ) 22 individuos de  $2.3 \pm 0.75$  kg, la densidad inicial de cultivo fue de  $10\text{kg/m}^3$ . La alimentación consistió en pescado congelado, Boga (*Boops boops*) obtenida como descarte de las operaciones de despesque de las jaulas de engorde de Dorada y lubina de la empresa Granja Marina Playa de Vargas con una tasa de alimentación diaria del 7 %, una vez al día durante 5 días a la semana. La selección de este único tipo de alimentación se fundamenta, por un lado en la escasez de descartes de crustáceos de la pesca profesional, lo que encarece su utilización en un potencial cultivo industrial, y por otro lado la aceptación que ha presentado este alimento en las experiencias realizadas en tanques. La experiencia tuvo una duración de 2 meses, el principal motivo para acortar el ciclo productivo en un mes fue para evitar el periodo de maduración gonadal que ha sido establecido en Canarias durante los meses de mayo-junio. Los resultados obtenidos han demostrado la expectativas teóricas de crecimiento para esta especie, en el  $G_1$  se obtuvo una supervivencia final de 91%, con un peso medio de  $2.6 \pm 0.75$  kg y un SGR de 0.8%. En el grupo 2, los animales de mayor talla la supervivencia fue ligeramente inferior con un 77%, un peso medio de  $3.8 \pm 1.4$  kg y un SGR de 0.6%.

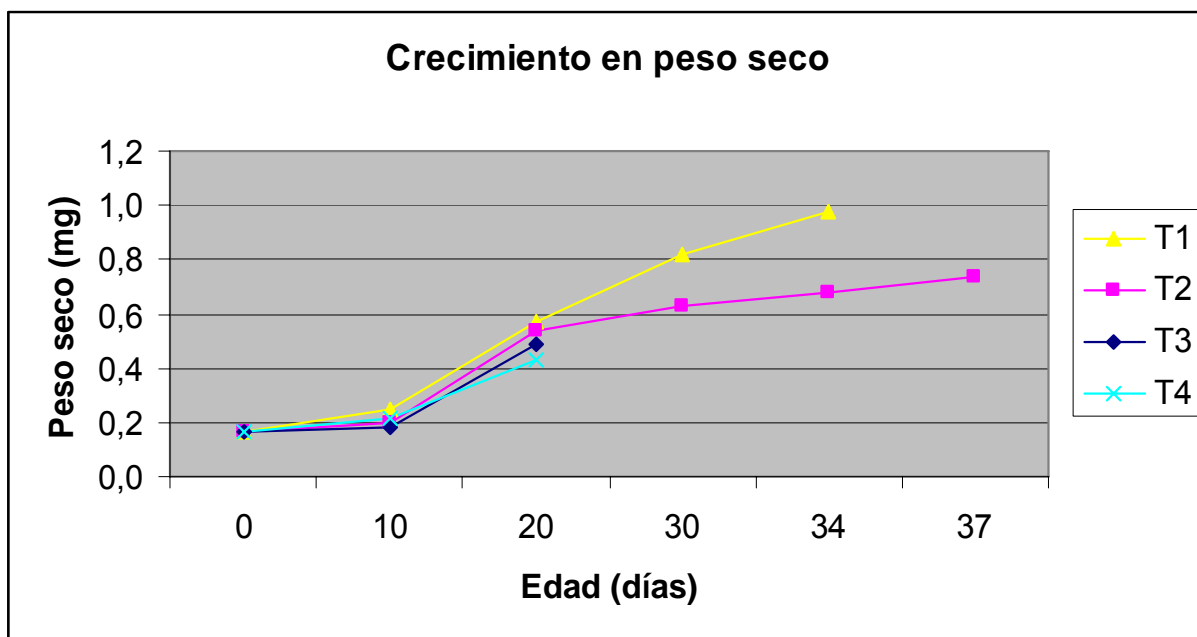


Ilustración 11: Ejemplar de gran talla, 7,25 Kg desde un peso inicial de 3,9 kg.

La producción de este primer ciclo fue íntegramente cedida a un restaurante local para su degustación y comparativa con animales salvajes, demostrando una gran aceptación por los consumidores.

Experiencia 2: La segunda experiencia de engorde dio comienzo 3 de diciembre de 2004, esta época se ha mostrado más idónea para la captura de juveniles, obteniéndose la cantidad necesaria para realizar una nueva experiencia en condiciones industriales. Al igual que en la primera experiencia la alimentación consiste en pescado congelado, Boga (*Boops boops*) con una tasa de alimentación diaria del 7 %, una vez al día durante 5 días a la semana de cultivo, Se establecieron nuevamente dos grupos de engorde, en el grupo 1 ( $G_1$ ) se utilizaron 105 individuos con una media  $720 \pm 280$ g y en el grupo 2 ( $G_2$ ) 79 individuos de  $940 \pm 345$  g, la densidad inicial de cultivo fue de  $15\text{kg}/\text{m}^3$ . Esta experiencia está actualmente en desarrollo, teniendo prevista su finalización el 3 de Marzo de 2005. Por otro lado la segunda unidad de engorde, está a la espera de recepción de autorización administrativa para su fondeo.





### Engorde en tanques

Esta actividad fue desarrollada en la comunidad autónoma andaluza, en las instalaciones del Centro de Investigación y Cultivos de Especies Marinas (C.I.C.E.M.) "El Toruño".

Engorde de subadultos.

*Captura y transporte.*

La captura y transporte de pulpos del medio natural han resultado exitosos, registrándose baja tasa de mortalidad (inferior a 5 %) después de unos 5 días de observación en tanques de fibra. Las causas principales de mortalidad en los individuos recién capturados fueron el canibalismo y las lesiones producidas como consecuencia de su captura (principalmente erosiones graves en la piel y amputaciones de tentáculos). Las capturas se han realizado principalmente mediante buceo en aguas de la costa gaditana, principalmente en Tarifa.

Aunque no era un objetivo experimental, la necesidad de obtener ejemplares para la reproducción y engorde hizo que en los tres años del proyecto se hayan realizado varios transportes de subadultos, a unas 2 – 3 h de distancia de nuestro centro. Los individuos capturados mediante buceo son introducidos en un tanque de 500 L de capacidad, y con aireadores provenientes de un electrosoplante adaptado al vehículo. Las condiciones de transporte han variado según las distintas ocasiones, pero en general han sido las siguientes: individuos de pesos variados, desde 300 g a 1,2 k, en número que varía de 12 a 30 ejemplares y que son introducidos en un tanque que se llena con agua de mar hasta una altura de 1/4 de su capacidad (125 L); la temperatura del agua es la misma que la del medio (12 a 16 °C), registrándose una ligera subida de 2- 4 °C al llegar al destino; en todos los casos la concentración de oxígeno en el agua no ha sido inferior a 5 ppm; con el fin de evitar canibalismo, se les facilita refugios de distinto tamaño. La carga de transporte en estas condiciones varió de 75 a 150 k/m<sup>3</sup>. Debido a la ausencia de bajas y el tiempo de duración del transporte (inferior a 3 h) durante las primeras capturas, decidimos obviar el valor de los parámetros químicos del agua (desechos nitrogenados, pH ...), si bien, en viajes más prolongados habría que tenerlos en cuenta. Una vez en el Centro, eran clasificados por tamaño e introducidos en tanques con circuito abierto.

### *Marcaje*

Con objeto de poder identificar cada animal, se realizó un ensayo de marcaje externo con marcas tipo “disco de Peterson” de plástico laminado, y de tipo “Lock-on”, filamento de plástico flexible que se cierra en sus extremos formando un anillo.

Con el fin de manejarlos fácilmente durante el marcaje, los pulpos, se “anestesiaron” previamente. Para ello, un lote de 24 ejemplares de pesos comprendidos entre 260 y 1540 g se sometieron individualmente a una bajada de temperatura de 17,7°C a 5 °C. Cuando presentaban una decoloración acompañada de movimientos lentos y sin fuerza, se procedía a su marcaje. Los tiempos transcurridos hasta que mostraban estas características varió entre 4 y 7 minutos, sin que existiera correlación entre el sexo y el peso. Un segundo lote de 24 ejemplares de pesos comprendidos entre 540 y 2160 g fueron también sometidos individualmente a una bajada de salinidad de 30 ppm a 12 ppm.

El tiempo transcurrido hasta que se consideraban manejables varió entre 10 y 20 minutos, no existiendo tampoco en este caso una correlación entre sexo y peso.

Las marcas eran insertadas en el borde de la abertura paleal del manto. A los 36 días, el disco lo conservaban el 50 % de los animales, mientras que la marca lock-on permanecía sólo en el 1 % de los pulpos. A los 54 días, estos porcentajes de retención bajaron al 10 y 0 % respectivamente. La observación de los pulpos indicaba que las marcas se las quitaban por desgarramiento del borde del manto.

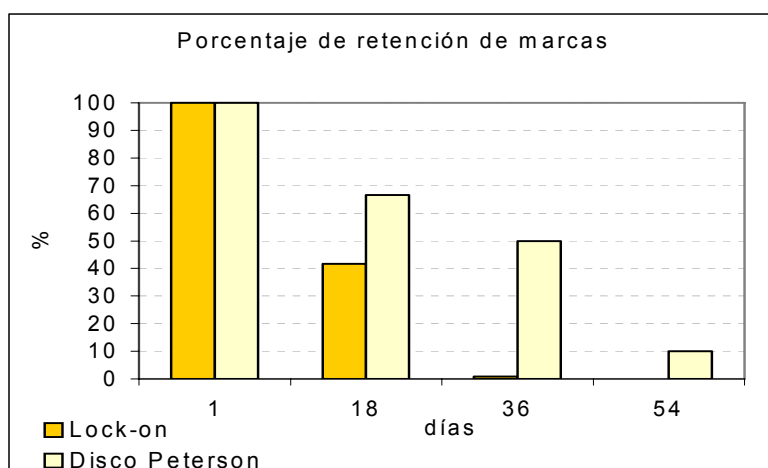


Fig.1: Retención de dos tipos de marcas en pulpos

Experiencias de engorde.

Durante la duración de este proyecto se han realizado varios ensayos de engorde bajo distintas condiciones de cultivo encaminados a determinar el mejor sistema en el interior de estanques de tierra, de forma que su seguimiento y mantenimiento fueran lo más efectivo posible.

En 2001 se construyeron 6 jaulas cilíndricas de 1 m<sup>3</sup> de capacidad (1 m de diámetro y 1,30 m de altura) formadas por un armazón de hierro recubierto por una malla plástica gruesa. En su interior se dispusieron refugios de PVC a diferentes alturas para que pudieran ser ocupados por los pulpos. Las jaulas eran suspendidas en el interior de un estanque de tierra que funciona como reserva de agua de las instalaciones del Centro.

El objetivo era determinar el crecimiento de tres lotes formados por pulpos machos, hembras y mixtos bajo las condiciones naturales de calidad de agua que se registra habitualmente en una reserva de agua que abastece a los cultivos de peces en estanques. Paralelamente, se estabulan lotes de las mismas características en tanques de fibra de 2 m<sup>3</sup> en el interior de las instalaciones, donde el control de la calidad del agua está asegurado.

Se suministra a todos los lotes el mismo tipo de alimentación a saciedad, consistente en un 50% de crustáceos (*Carcinus* spp.), 40 % de peces de especies variadas (sardinas, boquerones, caballas, lisas, espáridos, góbidos...) y un 10% de moluscos bivalvos (corrucos, almejas chochas, vieiras...) procedentes en su mayor parte de decomisos y de muestras obtenidas en campañas de muestreos pesqueros.

La experiencia comienza el 21 de mayo, y en el caso de las jaulas, después de 20 días de cultivo, se suspende el engorde por el aumento de temperatura y salinidad que se registra, alcanzando valores de 24 °C y 42 ppm respectivamente. En estas condiciones se observa una ausencia de alimentación, con pérdida de peso y posterior mortalidad de los ejemplares estabulados.

El engorde en tanques bajo condiciones de calidad de agua controladas se continúa. Los valores de temperatura estuvieron comprendidos entre 18 y 21 °C, y los de salinidad entre 36 y 39 ppm. El período de cultivo es de 107 días finalizando el 4 de septiembre. El siguiente cuadro resume las condiciones experimentales y los resultados obtenidos.

	MACHOS	HEMBRAS	MIXTO
P. inicial (g)	1447± 692	1107± 488	752 ± 459
Nº inicial	14	16	16
Carga inicial (k/m3)	10,345	8,915	6,225
P. final (g)	3596± 667	2292± 85	2879 ± 677
Nº Final	12	11	10
Superv. (%)	86	69	63
Carga final (k/m3)	20.8	14.1	16.9
G (%)	0,85	0,68	1,25
Tasa Absoluta Crec.	20,08	11,08	19,87

Las bajas se producen por canibalismo debido a la diferencia de peso en los distintos lotes. En el caso de las hembras y del lote mixto se registraron puestas (3 y 4 respectivamente) que fueron aisladas junto con las hembras y contabilizadas como bajas.

La tasa específica de crecimiento (G) es mayor en el lote mixto debido al menor peso inicial de los pulpos. Considerando los otros dos lotes, los machos experimentan un mayor crecimiento que las hembras, corroborando trabajos anteriores.

Las ecuaciones de crecimiento obtenidas para los 3 lotes son:

Machos:  $y = 1408,2 e^{0,0084x}$  ;  $R^2 = 0,9643$

Hembras:  $y = 1065 e^{0,0072x}$  ;  $R^2 = 0,9912$

Mixto:  $y = 708,64 e^{0,0121x}$  ;  $R^2 = 0,9768$

La siguiente gráfica muestra la evolución del crecimiento de los distintos lotes donde se observa el mayor crecimiento del lote mixto respecto al de las hembras, debido a la mayor tasa de crecimiento de los machos en aquél.

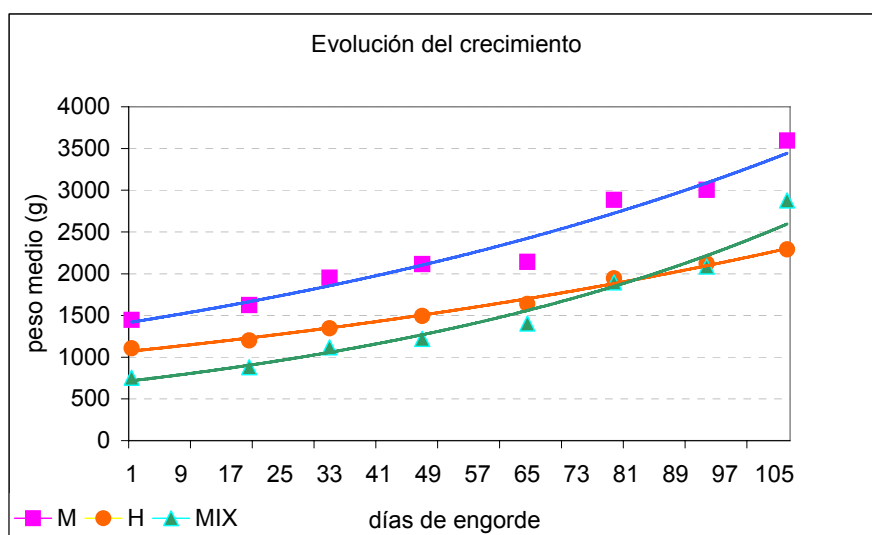


Fig. 2: Crecimiento de los distintos lotes en tanques.

En 2002 se ensaya otro tipo de sistema de engorde en el interior de un estanque de tierra del Centro, consistente en contenedores de preengorde de semillas de moluscos bivalvos.

Los contenedores, de 0,9 m de diámetro y 0,5 m de altura de agua, tienen una capacidad de 0,32 m<sup>3</sup>. Disponen de un fondo de malla y paredes lisas, y son cubiertos con una tapa a la que se le ha provisto de una malla de sombreo para mitigar la luz. Para asegurar el intercambio de agua en su interior se equipan con un sistema de air-lift utilizado para el preengorde de bivalvos. Después de detectarse algunas fugas por levantamiento del fondo y desplazamientos de las rejillas por donde circula el agua procedente del air-lift, el diseño es mejorado asegurando fuertemente todos los componentes del sistema.

En su interior se disponen tubos de PVC fijados al fondo para procurar refugio a los pulpos. Inicialmente se ensayan cargas iniciales de 10 y 20 k/m<sup>3</sup> (4 contenedores por cada carga inicial), pero en pocos días de cultivo, en los contenedores con mayor carga se observa una alta mortalidad debido a canibalismo. Se opta por ensayar cargas iniciales próximas a 10 k/m<sup>3</sup> de lotes de machos y hembras (4 contenedores por cada sexo). Se tienen muy en cuenta los pesos iniciales de estabulación para evitar el canibalismo. La duración del engorde es de 65 días, en los meses de febrero a abril. La alimentación, compuesta por un 70 % de cangrejos y 30 % de peces, es pesada y suministrada a saciedad. Cada día se retiran los restos y se pesan para determinar el consumo del alimento.

La tabla siguiente resume la experiencia, donde se han agrupado los 4 contenedores de cada grupo de machos y hembras ensayado.

GRUPO	P.inic (g)	Nº ini.	K/m <sup>3</sup> inicial	P. final (g)	K/m <sup>3</sup> final	Nº final	Superv (%)	TAC (g/día)	G (%)	TAA (g/día)	IC
Machos	671 ± 87	6	13.1±1.4	1650 ± 302	29.2 ± 5.2	4.75 ± 0.96	79	15.06	1.38	53.6	3.56
Hembras	844 ±112	5	12.7±1.9	1733 ± 421	23.3 ± 4.1	3.75 ± 0.5	75	13.68	1.11	62.35	4.56

Durante el período de engorde no se detectaron puestas de hembras ya que fueron capturadas y clasificadas previamente con pesos inferiores a 500g, asegurándonos que no estaban fecundadas. Posteriormente al período de engorde que se trata, fueron destinadas a la reproducción.

Como cabía esperar, la tasa G es mayor en los machos que en las hembras, y el IC es mayor en éstas que en los machos. La tasa G de esta experiencia es mayor que la obtenida en la experiencia de engorde del año anterior debido a que se estabularon pulpos con mayor peso medio inicial.

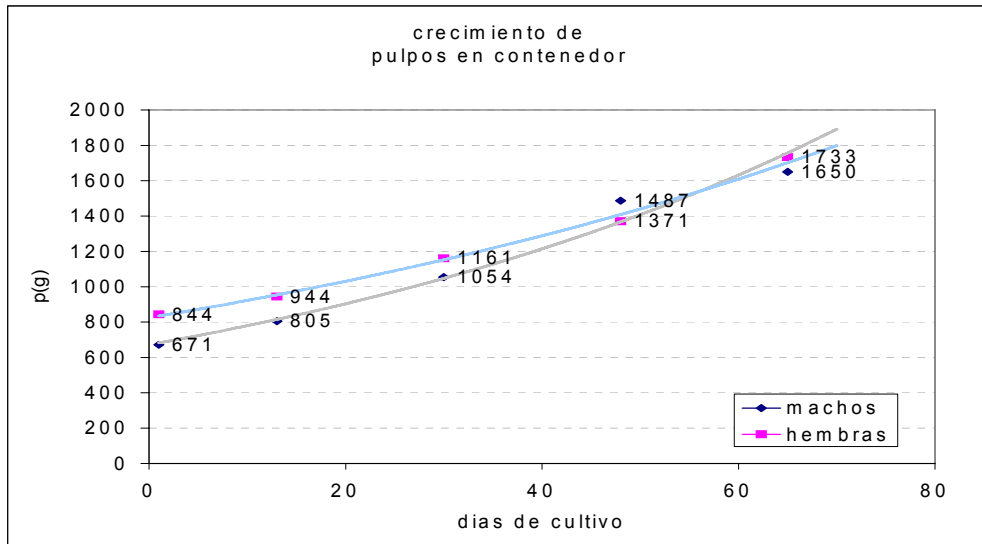


Fig.3: Crecimiento de pulpos machos y hembras en contenedores

En la gráfica se observa como partiendo de pesos inferiores, a los 48 días el peso medio de los machos supera al de las hembras.

Las ecuaciones de crecimiento obtenidas para ambos lotes de pulpos son:

$$\text{Hembras : } y = 825,23e^{0,0111x} \quad R2 = 0,996$$

$$\text{Machos: } y = 672,27e^{0,0148x} \quad R2 = 0,9806$$

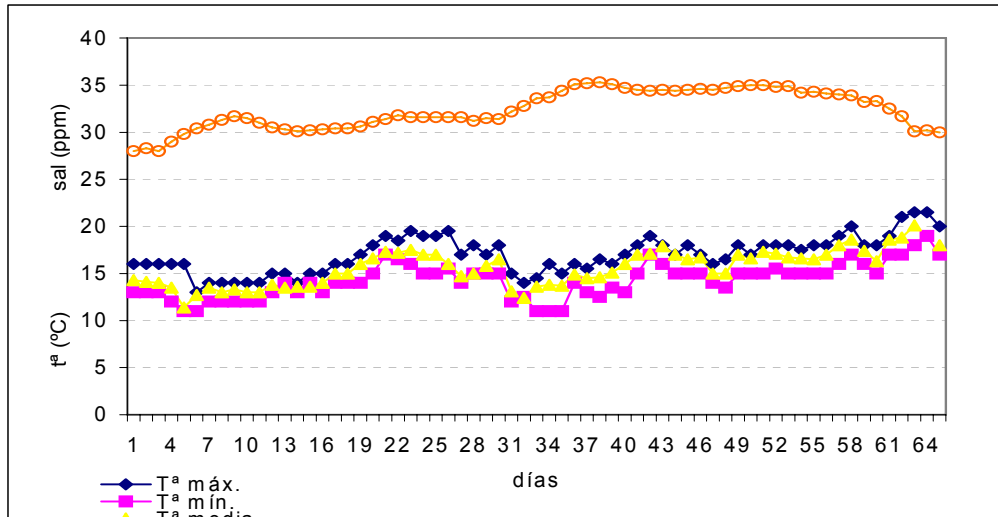


Fig. 4: Evolución de la temperatura y salinidad durante el período de engorde.

La gráfica representa las variaciones de temperaturas (máximas, mínimas y registradas a las 10 h) y salinidad en el interior de los contenedores. Durante el período de engorde, los valores medios de las temperaturas han sido:

Temperaturas máximas:  $17,0 \pm 2,0$  °C

Temperaturas mínimas:  $14,3 \pm 1,9$  °C

Temperatura medida a las 10 h:  $15,6 \pm 1,9$

Los valores de salinidad en el interior de los contenedores oscilaron entre 28 y 35,3 ppm, siendo la media de  $32,4 \pm 2,1$  ppm.

Las variaciones de temperaturas diarias registradas en el interior de los contenedores están influidas fuertemente por las condiciones atmosféricas al estar aquéllos dentro de un estanque de tierra de escasa profundidad y limitado volumen. Las variaciones de salinidad vienen determinada por las renovaciones periódicas de agua procedente de un brazo de mar que se interna 9 Km. en tierra firme. Estas condiciones de oscilación de temperaturas determinan la tasa de alimentación de los pulpos, y por consiguiente su crecimiento. A una temperatura constante de 18 °C el crecimiento sería óptimo.



A principios de abril se realiza una nueva experiencia de engorde con individuos machos para determinar los crecimientos en función de los pesos medios y la carga inicial de estabulación.

Cuatro grupos de ejemplares son estabulados en tanques de fibra de 2 m<sup>2</sup> de superficie y 1 m<sup>3</sup> de capacidad, en circuito abierto, y con una tasa de alimentación que varía entre el 4 y 6% de su peso para los individuos más grandes, y entre el 8 y 10% para los individuos más pequeños. Fueron alimentados inicialmente con peces y crustáceos procedentes de descartes de pescas experimentales que constituyen actividades de otros proyectos que realiza el Centro. Se evitó el suministro de pescado azul (boquerones y sardinas) debido a su alto contenido en grasas, y a la escasa metabolización de éstas por los cefalópodos.

Otros cuatro grupos son estabulados en jaulas flotantes de forma cilíndrica, de aproximadamente 1 m<sup>3</sup> de capacidad, en condiciones semejantes de densidad, tamaño y alimentación que los anteriores, y sumergidos en el interior de un estanque. Diariamente se registran los valores de salinidad, temperatura y concentración de oxígeno en el agua. Periódicamente se realizan muestreos biométricos para determinar los parámetros de crecimiento y la supervivencia.

Las condiciones iniciales de estabulación son las siguientes:

<b>TANQUE</b>	<b>n</b>	<b>Pi(g)</b>	<b>desv</b>	<b>Ci(K/m3)</b>
<b>T1</b>	16	1393	224	22,6
<b>T2</b>	8	1250	198	10
<b>T3</b>	8	443	85	3,5
<b>T4</b>	16	631	94	10
<b>JAULA</b>				
<b>C1</b>	16	1220	205	20,4
<b>C2</b>	8	1050	162	9,2
<b>C3</b>	8	635	91	5,1
<b>C4</b>	16	525	82	8,9

La figura 5 muestra la evolución de la salinidad y temperaturas en las jaulas y en los tanques de cultivo durante el período de engorde. El valor medio de temperatura registrado en las jaulas fue de  $18,9 \pm 2,2$  °C, y en los tanques de  $19,4 \pm 0,7$  °C. El valor medio de salinidad fue similar en los dos sistemas:  $36,2 \pm 1,6$  en las jaulas y de  $36,7 \pm 1,8$  en los tanques.

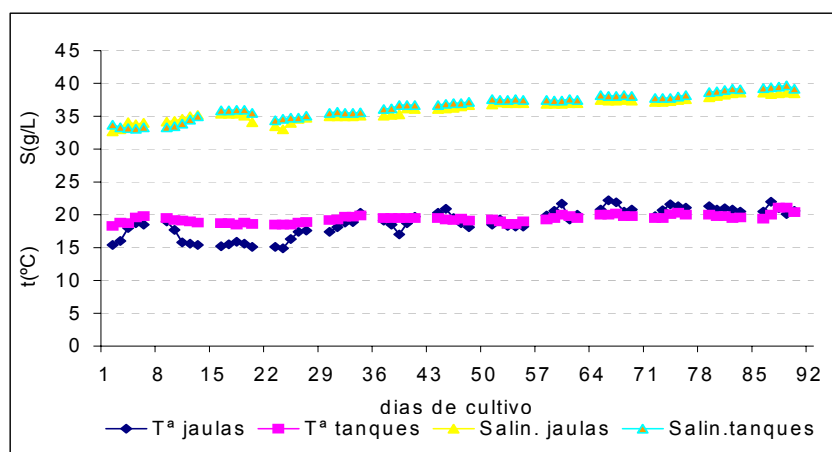


Fig. 5: Evolución de la temperatura y salinidad durante el período de engorde

Después de 90 días de cultivo, los resultados se expresan en la siguiente tabla donde: PF (g): Peso final; Sup(%): Supervivencia; Cf ( $k/m^3$ ): Carga final; G (%): Tasa específica de crecimiento; TCA (g/día): Tasa de crecimiento absoluto; TAA (g/día): Tasa de alimentación absoluta; TAR (%/día): Tasa de alimentación relativa; EA: Eficiencia alimentación.

TANQUE	PF	desv	Sup.	Cf	G	TCA	TAA	TAR	EA.
T1	3198	758	87,5	41,3	0,91	19,84	83,98	3,95	19,24
T2	2863	768	87,5	20,2	0,91	17,73	87,68	3,94	24,41
T3	1468	545	100	11,5	1,32	11,26	66,22	6,93	17,00
T4	1566	555	93,75	22,4	1,00	10,27	78,63	7,16	13,06
<b>JAULA</b>									
C1	2100	595	81,25	36,2	0,60	9,67	56,54	3,41	17,10
C2	2340	584	87,5	23,5	0,88	14,18	56,00	3,30	25,32
C3	1485	412	87,5	13,4	0,93	9,34	64,83	6,12	14,41
C4	1565	456	93,75	29,2	1,20	11,43	63,94	6,12	17,87

Destaca la alta supervivencia en todos los casos, aunque el escaso número de bajas se ha producido en el último mes de cultivo, cuando la temperatura sobrepasa los 20 °C, y es independiente de la carga: cargas finales de 20 y 40  $k/m^3$  registran la misma supervivencia.

Se observa un mayor crecimiento en los ejemplares mayores estabulados a menor densidad. En individuos pequeños la densidad no influye inicialmente en el crecimiento.

Las tasas relativas de crecimiento (G) y de alimentación (TAR) son mayores en los individuos más pequeños, mientras que la eficiencia de alimentación (EA) es independiente de las clases de pesos, y responde más a una variabilidad individual.

La sensibilidad de esta especie a la temperatura se manifiesta en un retardo del crecimiento en los ejemplares estabulados en jaulas (en algún caso se ha detectado pérdida de peso) durante el último mes en el que la temperatura media ha sido de 21,1 °C.

Aunque se han registrado valores de salinidad altos (más de 40 g/L), éstos se correlacionan con el aumento de la temperatura del agua, por lo que su influencia sobre el crecimiento de los ejemplares cultivados puede estar enmascarada por el efecto de esta última.

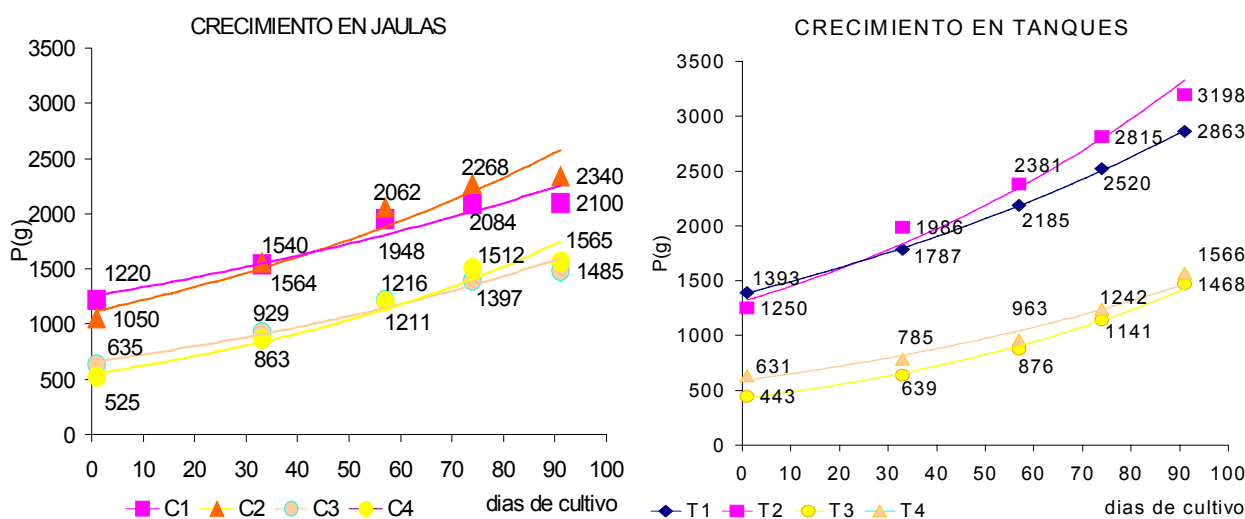


Fig. 6: Crecimiento de los distintos lotes de pulpos cultivados en jaulas y tanques.

Estos resultados de crecimiento corroboran los obtenidos en otras experiencias. La época del año para realizar el engorde en jaulas o contenedores en el interior de estanques de tierra en las condiciones naturales de nuestra zona es una elección primordial para el éxito del cultivo.

La utilización de recintos flotantes de reducidas dimensiones en el interior de estanques se ha manifestado eficiente ya que permite crecimientos y cargas finales similares a los obtenidos en tanques. Además, la facilidad de su manejo y limpieza es un factor a tener en cuenta que puede repercutir en la viabilidad del engorde a la hora de considerar un posible cultivo comercial.

Se propone pues el engorde de esta especie en este tipo de estructuras durante los meses del año en los que la calidad del agua del estero sea la más apropiada y no resulte limitante (temperaturas entre 15 y 20 °C), y que puede variar según el año de 6 a 9 meses en nuestra zona. La buena gestión y la frecuencia de renovación del agua del estero podría optimizar el resultado del engorde.

A excepción de un ensayo de engorde en recintos cerrados dispuestos sobre el fondo, y construido con tubos de PVC y malla plástica, en el interior de un estanque de tierra, el empleo de nuevos sistemas de engorde de juveniles no ha podido efectuarse en 2003. Por causas desconocidas y posiblemente debidas a factores climáticos, el reclutamiento de nuevos efectivos en la población de pulpos en el caladero de Conil durante el pasado 2003 ha sido muy escaso como lo demuestra los valores de los desembarcos efectuados en lonja. La propia cofradía se impuso una veda total de capturas durante todo el período de pesca de esta especie (de octubre de 2003 a mayo de 2004).

La captura de pulpos destinados al proyecto fue de unos 60 individuos, de los que 20 fueron destinados inicialmente a la reproducción. Estas capturas tuvieron que realizarse mediante buceo en una amplia zona costera, entre Tarifa y las costas del sur de Málaga. No obstante, y después de algunas bajas, se destinaron 18 ejemplares machos para su engorde en contenedores flotantes, con resultados de crecimiento semejantes a los obtenidos en la anualidad anterior. Los ejemplares restantes (18) fueron destinados a su mantenimiento en tanques con el fin de suplir posibles bajas de reproductores.

Publicaciones y actividades relacionadas con el proyecto.

J.L. Muñoz. El engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en condiciones naturales de un estero. IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz 12-16 mayo 2003.

S. Cárdenas, J.P. Cañabate, E. Revilla, J. Méndez, J.L. Muñoz, J.M. Naranjo. Recirculation Aquaculture Systems (RAS) at CICESM El Toruño. En "Recirculation and their application in aquaculture. IFREMER, Sète (France) 12-16 enero 2004. (Publicación adicional)

J.L. Muñoz. Expectativas en el cultivo del pulpo. II Jornadas de Acuicultura en el Litoral Sur atlántico. Cartaya (Huelva). Marzo 2004.

J.L. Muñoz. Cultivo de Cefalópodos. I Jornadas Científico-Técnicas Andalucía-Marruecos. Univ. De Cádiz. 4-5 marzo de 2004.

La labor correspondiente a los dos siguientes apartados se ha desarrollado en el **Centro de Recursos Marinos de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.**

#### Estudios de bioenergética y bioensayos de toxicidad de amoníaco, nitritos y nitratos

1. Bioenergética y condiciones ambientales óptimas de cultivo.

1.1. *Temperatura óptima de engorde.*

Se realizaron una serie de ensayos de engorde en tanques de 450 l con ejemplares aislados de pulpo que nos permitieron desarrollar un modelo, mediante el análisis de regresión múltiple que relaciona el crecimiento y la tasa de alimentación, con el tipo de alimento (boga y cangrejo), peso del animal y temperatura del agua (Aguado y García García, 2002 y 2003). A partir de dicho modelo se estima que la temperatura óptima de crecimiento, ingesta y eficacia de la alimentación se encuentran entre los 16 y los 19° C (Fig. 1). Por encima y por debajo de este rango, el crecimiento, la ingesta y la eficiencia de la alimentación disminuyen, tanto más cuanto más grandes son los individuos.

A partir de los 22° C empiezan a darse fenómenos de mortalidad y por encima de los 24° C comienzan a producirse pérdidas de peso, que son de mayor magnitud cuanto más grandes son los ejemplares, y la mortalidad aumenta considerablemente hasta alcanzar prácticamente el 100% en el extremo superior del rango térmico experimental (27-28° C).

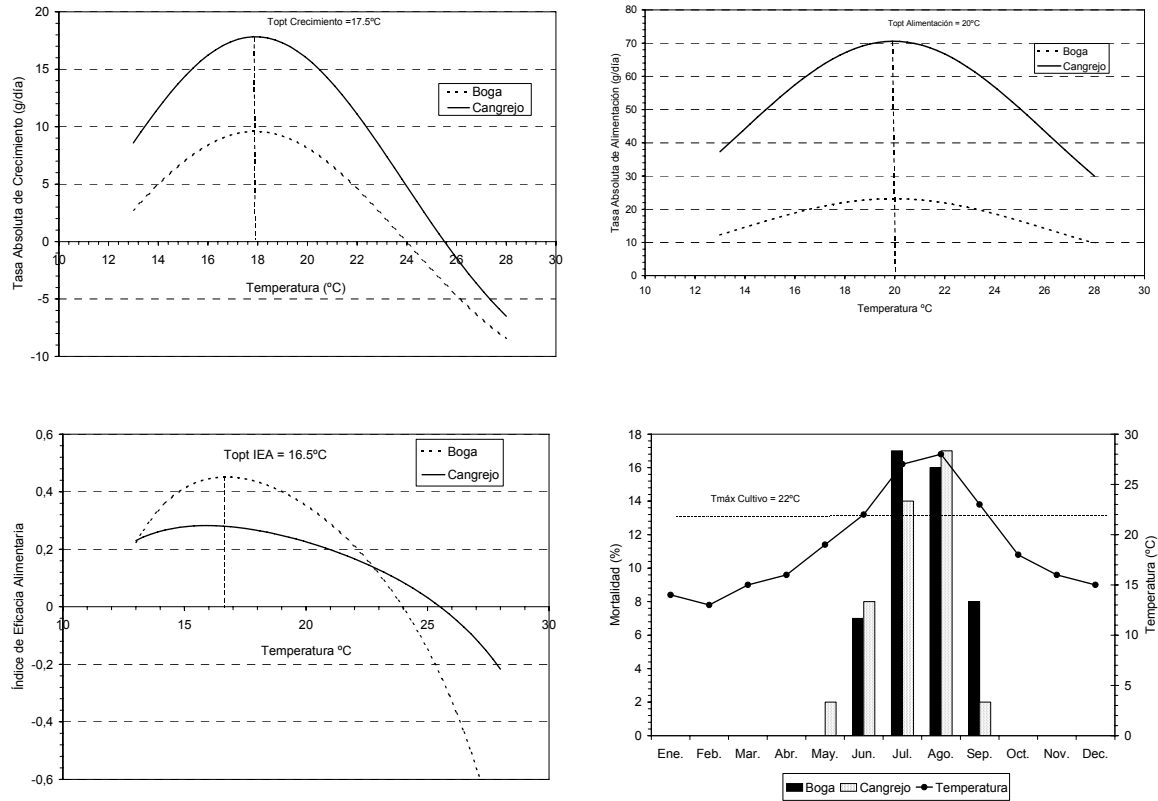


Fig. 1. Estimación de la temperatura óptima de engorde a partir de los modelos desarrollados (Aguado y García García, 2003)

### 1.2. Nivel óptimo, crítico y letal de oxígeno disuelto

Mediante una serie de experimentos en acuarios/respirómetros se ha desarrollado un modelo del comportamiento respiratorio del pulpo en función del peso corporal y la temperatura (Cerezo, 2002; Cerezo y García García 2003; Cerezo y García García, en prensa). La concentración crítica de oxígeno disuelto es del 32% de saturación y depende significativamente de la temperatura de forma exponencial, pero no se modifica por el peso.

La concentración letal de oxígeno aumenta en función de la temperatura y el peso, ajustándose los datos a ecuaciones logarítmicas. Los valores letales estimados para un ejemplar de 300 g entre 15 y 17° C están comprendidos entre el 3 y el 6% de saturación. La concentración de oxígeno donde se modifica la frecuencia de ventilación está comprendida entre el 63 y 67% de saturación, no obstante, muestra una correlación significativa con la temperatura, alcanzando valores que superan el 85% de saturación de oxígeno a 28° C.

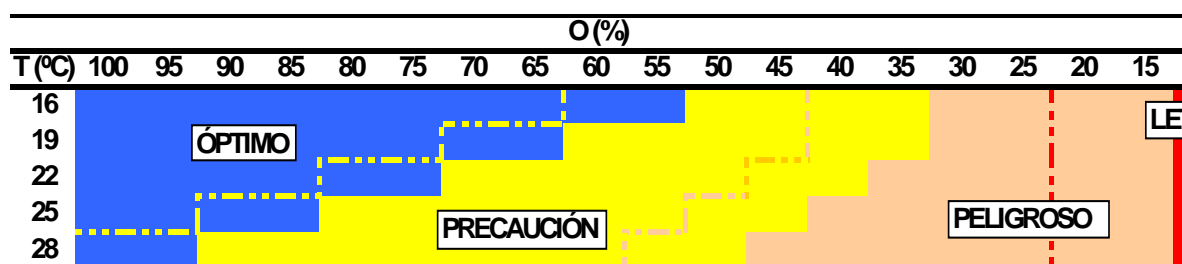


Fig. 2. Concentración óptima de oxígeno disuelto (% saturación de oxígeno) para el mantenimiento y engorde del pulpo, y concentraciones de precaución, peligro y letal en función de la temperatura del agua (Cerezo, 2002; Cerezo y García García, 2003).

### 1.3. Consumo de oxígeno.

Se realizaron medidas del consumo de oxígeno en respirómetros con medidas continuas durante tres días en ejemplares de distinto peso y a distintas temperaturas, y alimentando con cangrejo. A partir de los datos, y mediante el análisis de regresión múltiple, se ha desarrollado modelos de CO de rutina, diario, alimentación y máximo en función de peso y temperatura (Cerezo, 2002; Cerezo et al., 2002; Cerezo y García García, 2003; Cerezo y García García, 2004). La relación entre el consumo de oxígeno de rutina y la temperatura se ajusta a una función potencial con un exponente menor que 1 para el rango comprendido entre 13 y 26° C. Esta tendencia se rompe entre 26 y 28° C donde se observa un fuerte incremento del metabolismo, probablemente asociado a una respuesta para combatir la elevada temperatura. La alimentación provoca un aumento de consumo de oxígeno de 1,8 veces su valor de rutina después de suministrar raciones máximas de alimentación, independientemente del peso o la temperatura.

Este pico máximo de consumo de oxígeno se alcanza sobre las 10 horas después de la ingesta, aunque la duración media del efecto de la alimentación se prolonga hasta 20 horas, dependiendo, en ambos casos, de forma inversa del peso. Todos los niveles de consumo de oxígeno con alimentación, pico máximo, acción dinámica específica y diario dependen significativamente del peso y de la temperatura, y se ajustan a una ecuación potencial en función de estas dos variables.

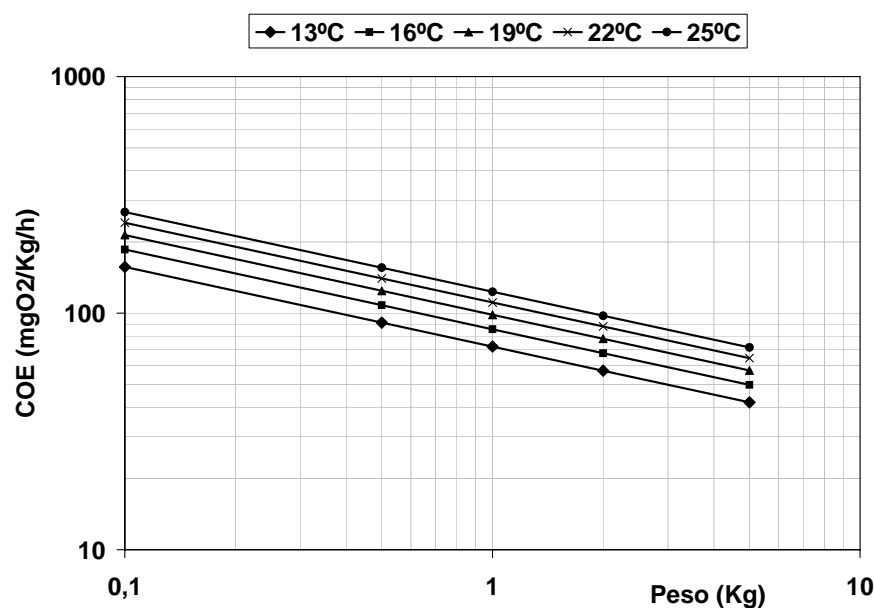


Fig. 3. Consumo específico de oxígeno diario del pulpo de roca en función de la temperatura y el peso corporal (Cerezo y García García, 2004).

#### 1.4. Producción de amoníaco.

También se ha desarrollado un modelo de producción de amoníaco en función de la proteína ingerida y del peso corporal a una temperatura de  $18 \pm 1^\circ \text{C}$  (Cerezo et al., 2003). Las medidas se realizaron en acuarios y con ejemplares cuyos pesos variaron entre 600 y 3600 g. El peso, no obstante, no influye significativamente sobre la tasa de excreción, siendo la proteína ingerida el factor que determina la tasa de excreción de amoníaco.



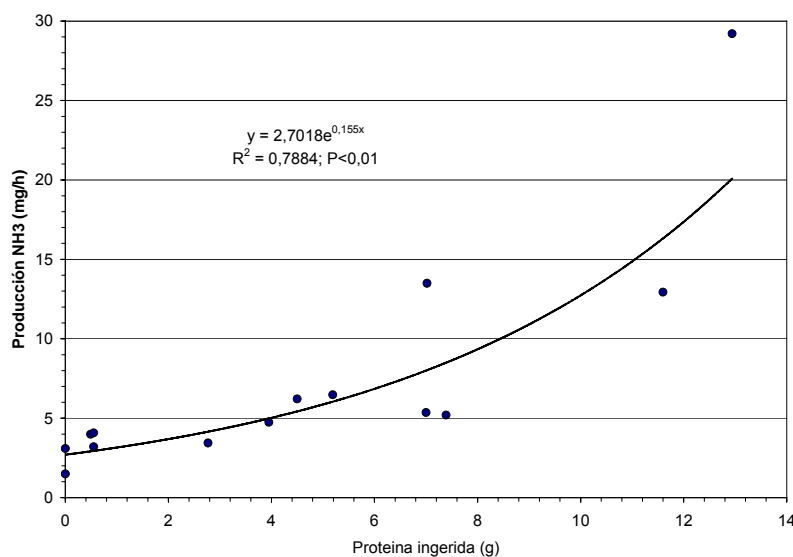


Fig. 4. Producción media de amoníaco total individual (PA) en función de la proteína ingerida en *O. vulgaris*.

### 1.5. Relación O/N.

A partir de los modelos de consumo de oxígeno y producción de amoníaco desarrollados se ha analizado la relación atómica O/N (oxígeno consumido / nitrógeno excretado). El índice O/N es conocido como un buen indicador para deducir las condiciones catabólicas en el cuerpo del animal. Cuando el índice es más alto de 24 el mayor sustrato para obtener energía son los lípidos, y cuando es más bajo de 24 el mayor sustrato es la proteína. Cuando la tasa es alrededor de 8, los animales usan las proteínas como único sustrato. Según nuestros resultados cuando el alimento no es limitante (tasas de alimentación del 3 al 6%), el pulpo obtiene la energía fundamentalmente de la proteína, mientras que cuando se dan situaciones de ayuno utiliza también los lípidos.

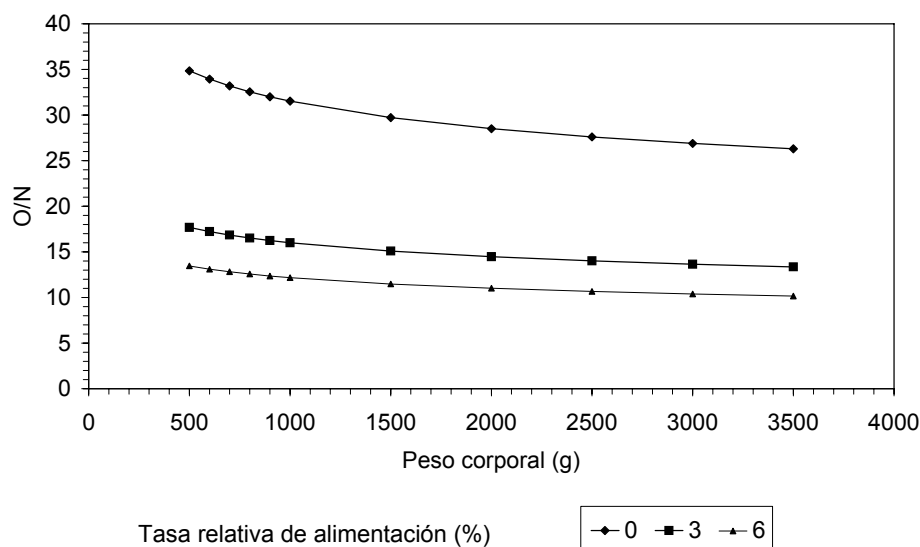


Fig. 5. Relación atómica O/N en función del peso corporal y la tasa de alimentación

## Estudios de alimentación y nutrición de juveniles con el fin de desarrollar piensos compuestos.

### 2. Alimentación/nutrición.

A lo largo del proyecto se han realizado distintos experimentos utilizando como alimento dos especies de peces (boga y sardina) y cangrejo. El objetivo ha sido comparar el crecimiento y la eficacia de alimentación en base a la distinta composición en macronutrientes de estas dietas, con el fin, por un lado de cuantificar mediante modelos empíricos dichos índices y, por otro lado, analizar los requerimientos de estos macronutrientes (García García y Aguado, 2002; Aguado y García García, 2003).

#### 2.1. *Composición en macronutrientes del pulpo de roca y de las especies utilizadas como alimento (sardina, boga y cangrejo).*

La principal variación se encuentra en el contenido en lípidos (Fig. 6); el contenido en el pulpo es muy bajo del 0,4%, y en las distintas dietas es de 18% en la sardina, de 6% en la boga y de 0,8% en el cangrejo. Por tanto, uno de los factores que influye en los distintos crecimientos y eficacia de alimento es el contenido en lípidos de la dieta (García García y Aguado, 2002).

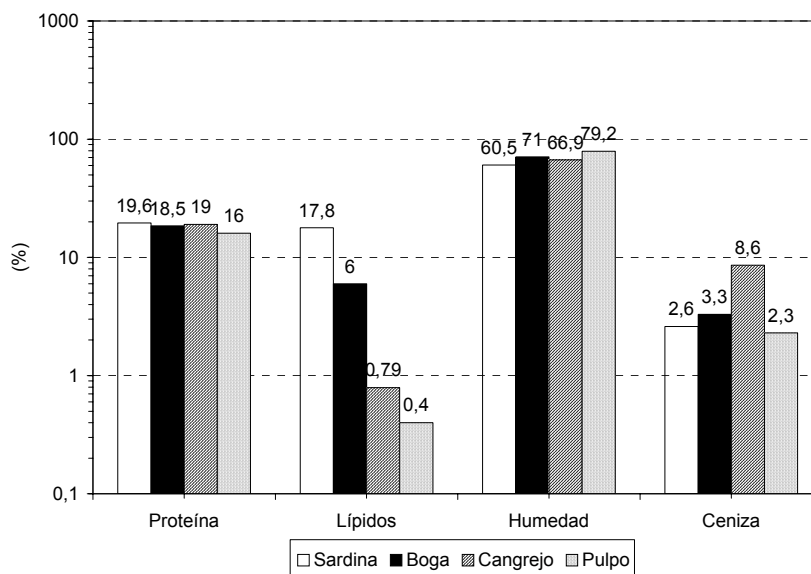


Fig. 6. Composición en macronutrientes de los organismos utilizados como alimento y del pulpo.

## 2.2. Dietas monoespecíficas.

El crecimiento más alto se obtiene con el cangrejo (Aguado y García García, 2003), aunque también el índice de conversión más pobre (Fig. 7), incluso teniendo en cuenta sólo la fracción comestible (aproximadamente el 50%). El crecimiento con sardina (alto contenido en lípidos) es significativamente más bajo que con boga, pero sin embargo la tasa de alimentación es superior. Presumiblemente, el pulpo no sólo no utiliza los lípidos, sino que al no emulsionarse éstos en el tracto digestivo se dificulta la absorción de aminoácidos, y el pulpo intenta compensarlo con un aumento de la ingesta. Por tanto, los niveles altos de lípidos no sólo son muy poco utilizados por el pulpo sino que dificultan la digestibilidad de la proteína, disminuyendo los rendimientos en cuanto a crecimiento e índice de conversión (García García y Aguado, 2002).

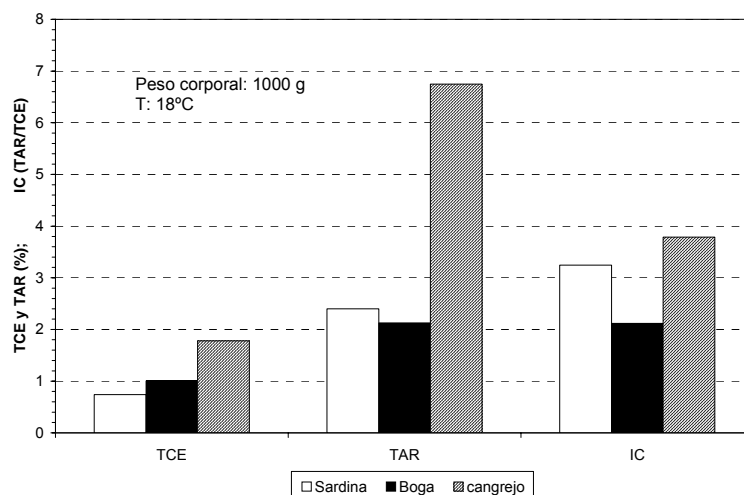


Fig. 7. Tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de alimentación relativa e índice de conversión en el pulpo de roca en función de la dieta.

Al comparar los resultados en ejemplares alimentados con boga y otros con cangrejo (Fig. 7) se observa que si bien el crecimiento con cangrejo es casi el doble que con boga, la ingesta, incluso teniendo en cuenta sólo la fracción comestible, es muy superior y por tanto el IC alimentando con cangrejo es muy pobre (Aguado y García García, 2003). Es muy probable que tanto a la boga (bajo crecimiento) como al cangrejo (bajo índice de conversión) les falte, o se encuentre a niveles insuficientes, algún elemento nutricional que explique estos resultados. De hecho, con dietas mixtas (boga y cangrejo) como se muestra en el apartado siguiente los rendimientos son máximos.

### 2.3. Dietas mixtas. Distintos porcentajes de boga/cangrejo

Como continuación de los experimentos anteriores se montó uno en el que se siguieron distintos patrones de suministro de boga y cangrejo a la semana que suponían distintos porcentajes de ingesta de boga/cangrejo (Cerezo y García García, 2003). Como se muestra en la Fig. 8 para ingestas de cangrejo (fracción comestible) del 100 al 60% no hay diferencias significativas en el crecimiento, sin embargo, según disminuye el % de cangrejo se mejora el IC. Para ingestas del 45% de cangrejo en la dieta el crecimiento disminuye pero muy poco y se sigue mejorando el IC.

Este patrón, que se corresponde con el suministro de tres días boga y un día cangrejo, parece el óptimo, más aun si se tiene en cuenta el índice de conversión económico (Euros alimentación/Kg producido). La composición en macronutrientes de esta dieta mixta en materia húmeda es de 19,6% de proteína y 3,7 de lípidos, y una energía bruta de 642 kJ/100g y relación proteína/energía de 31 (g proteína/MJ).

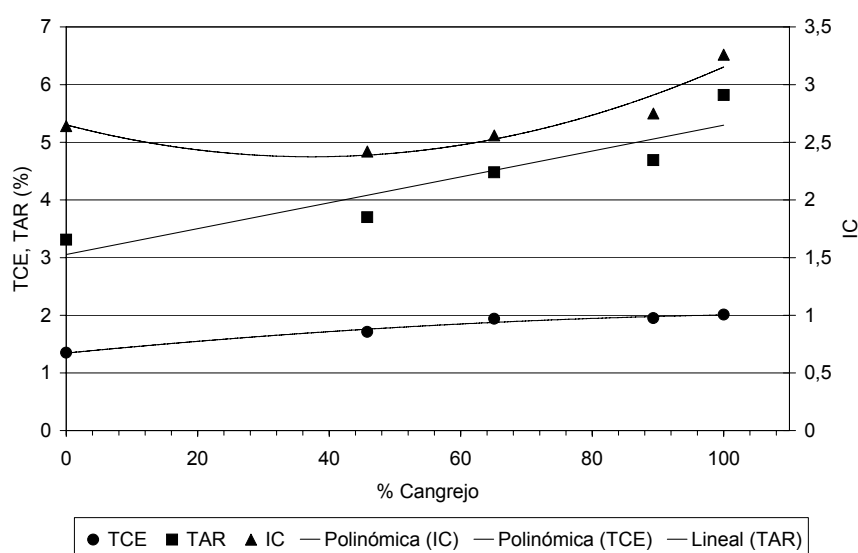


Fig. 8. Relación entre el % de cangrejo en la dieta y la tasa específica de crecimiento (TCE), tasa de alimentación relativa (TAR) e índice de conversión (IC) (Cerezo y García García, 2003)

Por otro lado, en los ensayos de engorde con lotes de ejemplares juntos en tanques, hemos observado que cuando la dieta no contiene cangrejo aumenta la agresividad y la mortalidad. Así, de supervivencias muy pobres con dietas basadas en boga y/o sardina (proyectos JACUMAR anteriores al presente) se han conseguido supervivencias del 90 al 100% cuando también se incluye cangrejo. Por tanto el cangrejo contiene algún, o algunos, nutrientes que contribuyen a optimizar no sólo el crecimiento, si no también a disminuir la presumiblemente la agresividad y el canibalismo. Cuando los ejemplares están aislados en tanques y la dieta es de boga y/o sardina la supervivencia también ha sido muy alta (García García y Aguado, 2002; Aguado y García García, 2003; Cerezo y García García, 2003).

#### 2.4. Desarrollo de piensos compuestos.

En base a los resultados anteriores se confeccionaron dietas semihúmedas con distinto porcentaje de harina de pescado y harina de Krill. Se utilizó alginato sódico al 3% y hexametáfosfato sódico al 1,5% como compactantes del pienso. La composición de las dietas fue de aproximadamente: 30% de proteína, 4% de lípidos y 56% de humedad. La supervivencia fue del 100%. La aceptación del pienso fue buena en el sentido de que les resultaba atractivo, lo cogían y se lo comían; pero al hacerlo se desgranaba con lo que un porcentaje alto del mismo no era consumido realmente. Esto provocó que, si bien los pulpos sobrevivieron, no crecieron, en incluso, perdieron peso, con lo que su ingesta real de nutrientes no fue suficiente para cubrir sus necesidades vitales. No hubo diferencias en la aceptación de las dietas con lo que, en principio, el problema no fueron sus componentes sino el formato de la misma. Por la particular forma de alimentarse del pulpo habría que conseguir una textura determinada que evite que el pienso se disgregue cuando este lo está consumiendo y pueda ser ingerido en su práctica totalidad. Este es quizás el aspecto más importante que habría que solucionar en una primera etapa para poder desarrollar un pienso comercial.

#### 3. Ensayos de engorde.

Se ha realizado un experimento con el objeto de determinar si un bajo número de días de ayuno a la semana (1 y 2) afectan al crecimiento y al IC (García García y Cerezo, 2003). Los días de ayuno en condiciones industriales de engorde o experimentales puede suceder ante temporales, incidencias diversas o simplemente por causas de disponibilidad de personal en domingos y festivos. En tres grupos de 5 ejemplares de pulpos aislados se han seguido tres estrategias distintas de alimentación: Grupo 1 ayunaron 2 días a la semana (Sábado y Domingo); Grupo 2, ayunaron un día a la semana (Domingo) y Grupo 3, no ayunaron ningún día a la semana. El ensayo tubo una duración de 37 días y en todos los casos se suministró cangrejo congelado como alimento. La supervivencia fue del 100% y no existieron diferencias significativas en el crecimiento ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, en el grupo que ayunó dos días a la semana se obtiene la tasa de alimentación más baja y, por consiguiente, el índice de conversión más satisfactorio. En los dos grupos que ayunaron uno o dos días se observa una mayor ingesta los días que son alimentados, particularmente el día después del ayuno.

Por otro lado, para analizar si un día de ayuno afecta a la agresividad y consiguientemente a la supervivencia, se establecieron ejemplares de unos 900 g juntos en dos tipos de tanques: “raceway” (R) y de sección circular. En el primero se suministro alimento todos los días y en el segundo se estableció un día de ayuno a la semana, y, en ambos, un día se suministraba cangrejo y otro día boga. Los resultados de crecimiento e índice de conversión fueron muy satisfactorios (912 y 1133 g/mes y 4,73 y 3,22 de IC) y la supervivencia fue igual en los dos lotes, del 91,7% (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de crecimiento, tasa de alimentación e índice de conversión en los ensayos de engorde con pulpos juntos en tanques “raceway” y circulares.

	Lote R (Raceway)	Lote C (Circular 1)	Lote C (Circular 2)	Lote C (Promedio Circular)
Tiempo (días)	77	58	58	58
Peso inicial (g)	920	906	911	908±4
Peso final (g)	3260	3317	2880	3098±309
I P (Incremento Peso) (g)	2340	2411	1969	2190±313
IP/MES (g)	912	1247	1018	1133±162
TRC (% día)	1,64	2,24	1,98	2,11±0,18
TRA B (% día)	3,74	4,30	4,26	4,28±0,03
TRA CFC (% día)	5,02	3,95	3,87	3,91±0,05
TRA CE (% día)	10,03	7,89	7,75	7,82±0,10
TRA B+CFC (% día)	4,38	4,12	4,07	4,09±0,04
TRA B +CE (% día)	6,88	6,10	6,00	6,05±0,07
IC B+CFC	3,01	2,09	2,27	2,18±0,12
IC B+CE	4,73	3,10	3,35	3,22±0,18
Supervivencia (%)	91,7	100	83,3	91,7

B: boga; CFC: cangrejo fracción comestible; CE: cangrejo entero

Además de los estudios biológicos descritos hasta aquí, se ha realizado un estudio de viabilidad, desde el punto de vista económico, de una planta de engorde de pulpo:

#### 4.2. Modelo econométrico de viabilidad/rentabilidad para el engorde de pulpo en explotaciones en tierra.

Para este estudio se han utilizado todos los modelos desarrollados en el apartado 1 (crecimiento, tasa de alimentación, comportamiento respiratorio, consumo de oxígeno y producción de amoníaco), y en base a ellos se ha diseñado y valora económicamente una planta de engorde intensivo en tierra para 100 Tm. (García García et al., 2004). La planta cuenta con 4 circuitos cerrados independientes con 18 tanques circulares. El sistema renueva agua proveniente de un pozo de agua de mar. Se han realizado los correspondientes cálculos hidráulicos para el dimensionado de las conducciones, tanto de entrada como de salida de los tanques, así como las tuberías de renovación de agua de pozo. En cada tanque se inserta en su centro una jaula de acero galvanizado dentro de la cual se inserta una estructura metálica con T de PVC hasta una capacidad de 144 habitáculos, con un diseño similar al utilizado por algunas empresas instaladas en Galicia. Además la explotación necesitaría un edificio destinado a almacén, cámara para conservación de pescado, oficinas, aseos y vestuarios, sala de manipulado. El régimen de producción es intensivo, a partir de alimentación con dieta mixta de boga y cangrejos. Se establecen los flujos de caja y se calculan a partir de los correspondientes cobros y pagos ordinarios y extraordinarios. Para realizar el análisis de sensibilidad se han utilizado las siguientes variables: Inversión (K), tipo de interés de mercado (i), precio mínimo de oferta del producto en €/Kg (Pv), precio del juvenil en Euros (Pj) y coste de la alimentación en €/Kg. (Pa). Se generaron 243 alternativas y los datos así obtenidos se ajustaron a la siguiente ecuación:  $Y = a + bK + ci + dPV + e PA + fPP$ , donde Y es el VAN o el TIR. Por último, consideramos la situación favorable de acceso a pescado proveniente de arrastreros en óptimas condiciones de precio.



Las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

- Condiciones normales de accesibilidad a materias primas de alimentación.

$$\text{VAN} = -2,793,990.98 - 1.10K - 154,795.93i + 1,416,621.50Pv - 402,560.95Pj - 1,444,896.89Pa$$

$$\text{TIR} = -0.117 - 1.06E-07K + 0.080Pv - 0.0225Pj - 0.072Pa$$

- Condiciones favorables de accesibilidad a materias primas de alimentación.

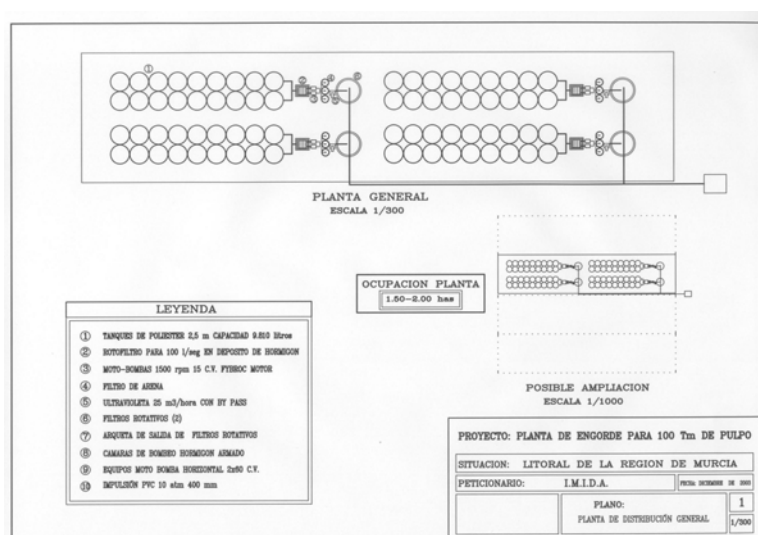
$$\text{VAN} = -2,210,369.73 - 1.01K - 301,173.20i + 1,401,603.75Pv - 422,590.22Pj - 1,527,140.84Pa$$

$$\text{TIR} = 0.020 - 1.90E-07K + 0,079Pv - 0,025Pj - 0,089Pa$$

En la alternativa de partida se utilizan como valores de las variables los precios actualizados de materias primas destinadas a alimentación así como de adquisición de juveniles provenientes de captura en mar abierto y, en estas circunstancias, el modelo estima para Pv de 6.46 y 8.74 € un VAN de -902,074 y 2.327.823 € y un TIR de 0.16% y 18.44%, respectivamente; es decir, que la actividad tiene una fuerte dependencia del precio de mercado del producto y en caso de precios bajos es de una rentabilidad muy baja, no compatible con el alto riesgo de la misma. En estas condiciones el precio mínimo para ofertar el producto al mercado con unos resultados de rentabilidad interesantes para el inversor (TIR = 13%; que es la suma del interés de mercado para alternativas financieras sin riesgo más un interés debido al riesgo de esta inversión) es de 8.06 €.

Por su parte, utilizando los datos de partida y variando el precio de adquisición del juvenil comprobamos que para Pj de 3.40 y 4.60 € obtenemos un VAN de 954,411 y 471,338 € y un TIR de 10.65% y 7.95%, respectivamente. En este caso, dentro del rango del modelo, no hay tanta influencia de Pj sobre las variables de viabilidad/rentabilidad, aunque ni aún en el caso más favorable (precio adquisición del juvenil 3,40 €) la inversión es atractiva desde el punto de vista de la rentabilidad. El coste de la alimentación, para el caso más favorable, es decir, 2,25 €/kg pulpo (precio de boga 0,30 €/kg y precio de cangrejo 1,08 €/kg) obtiene una VAN de 1,522,016 € y un TIR de 13.31%, es decir, está en el mínimo de rentabilidad satisfactorio para el empresario. En cualquier caso, todo lo expuesto es válido para el caso que consideramos normal de acceso y adquisición de pescado fresco para la alimentación.

En la situación favorable, de adquisición a precios bajos debido a la disponibilidad de pescado proveniente de arrastreros de la zona, los índices son mucho más favorables. Así por ejemplo, en la alternativa de partida utilizando los valores extremos de coste de alimentación Pa de 1.20 y 1.80 € se obtiene un VAN de 2,990,849 y 2,074,565 € y un TIR de 22.35% y 17.01%, respectivamente.



Esquema de planta piloto de engorde de pulpo

Identificación por medio de técnicas de ADN de los stocks de pulpo procedentes de las distintas CCAA.

Este apartado de investigación se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Biología Campus Sur. Universidad de Santiago.

Esta actividad tenía previsto su desarrollo durante todo el año 2001, cuatro meses del 2002 y otros cuatro en el 2003. Durante el año 2001 se recolectaron especímenes de diversas regiones y se trabajó sobre el diseño de cebadores que permitieran la amplificación y posterior secuenciación de las mejores zonas, desde el punto de vista informativo, que nos posibiliten el estudio filogenético de los diferentes stocks de pulpo.

Durante el año 2002, además de completar la recolección de especímenes, se secuenciaron tres genes mitocondriales: coenzima III (CoIII), citocromo b (cit b) y RNA ribosómico 16S (rRNA16S). Se diseñaron cebadores localizados en el gen NAD-1 y en el rRNA16S, con el fin de amplificar una región que en el genoma mitocondrial de *Loligo bleekeri* contiene una zona no codificante. Debido a que estas zonas se caracterizan por su elevada tasa mutacional, esta secuencia podría ser adecuada para detectar variabilidad intraespecífica.

Durante el año 2003, la labor de colección previa de muestras de *Octopus vulgaris* de diversas localizaciones geográficas nos permitió disponer de diferentes especímenes originarios de la costa atlántica panameña, costa gallega, costa atlántica marroquí, costa peninsular mediterránea, cantábrica (Asturias), Pacífico Sur (Chile), golfo de Cádiz y de Argentina. El estudio de la variabilidad genética intraespecífica en esta especie requiere de la adecuada selección de la secuencia que provea de la requerida resolución. Por ello, se amplificaron y secuenciaron exitosamente diversos genes mitocondriales: 16S rRNA, COIII y Citocromo b.

Los resultados más destacables en la actividad B5, fueron los siguientes:

1. Análisis de secuencias del gen 16S rRNA.- La amplificación de un fragmento del gen mitocondrial 16SrRNA fue llevada a cabo, mediante el uso de los cebadores 16Sa y 16Sb (Steiner, com.pers.) en 10 individuos capturados en aguas gallegas y del Mediterráneo y en 13 individuos de la costa atlántica de Panamá. A partir del fragmento amplificado se obtuvo un alineamiento de 543 pares de bases, añadiendo las secuencias homólogas disponibles en el GenBank para todas las especies del género *Octopus*, incluyendo aquellas de diversas poblaciones de organismos clasificados como *O. vulgaris* y *Octopus spp.* El análisis de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas dentro del género *Octopus* se centró en el estatus de *O. vulgaris* y especies más próximas. Se distingue un clado monofilético, relativamente bien soportado (61%) que incluye: i) muestras agrupadas monofiléticamente (100%) del cosmopolita *O. vulgaris* (Clado I) (incluyendo las muestras propias de *O. vulgaris* originarias del Atlántico nordeste y Mediterráneo), ii) un clado monofilético (100%) incluyendo al californiano *O. bimaculoides*, y los hermanos, iii) clado de *O. mimus* (97%) de las costas atlántica y pacífica, y iv) el clado (100%) de las muestras atlánticas del clasificado como *O. vulgaris* de Panamá y Brasil (Clado II) (Figura 1).

Las muestras de *O. vulgaris* originarias del Atlántico nordeste y Mediterráneo se agrupan congruentemente, con muy bajos valores de distancias ( $< 0.002$ ) y presentando mayoritariamente un único haplotipo entre ellas, junto al resto de muestras de *O. vulgaris*, provenientes del Pacífico suroeste (Taiwán y Australia), Atlántico centro-oeste (Venezuela y Brasil), Atlántico sureste (Sudáfrica), y más cercanamente con muestras del Atlántico centro-este (Senegal y Tenerife) y Mediterráneo. A nivel global se observa un agrupamiento de las muestras en relación con la región geográfica de la que provienen, indicando una ausencia de flujo génico entre esas distantes áreas geográficas y probablemente ligado a un fenómeno de aislamiento por distancia.

Las muestras, clasificadas morfológicamente como *O. vulgaris*, capturadas en el Atlántico centro-oeste, concretamente en diversas localidades de la costa Atlántica de Panamá, se sitúan en una posición muy divergente respecto de las muestras anteriores, con valores de distancia dentro de la muestra muy reducidos ( $< 0.003$ ). Junto a estas muestras se agrupa una secuencia disponible en el GenBank, también clasificada como *O. vulgaris* originaria de Brasil. El clado hermano de estas muestras está constituido por dos individuos de *O. mimus* del Pacífico (Chile y Costa Rica) y por una muestra atlántica de *Octopus* spp de Venezuela, asignada ahora a *O. mimus*.

Las topologías obtenidas plantean varias situaciones problemáticas y congruentes con el incierto estatus taxonómico de varias especies (incluyendo *O. vulgaris*) y otros resultados de sistemática molecular (Soller et al., 2000). En la actualidad se está procediendo a la redescrición de esta especie, basándose en un neotipo mediterráneo.

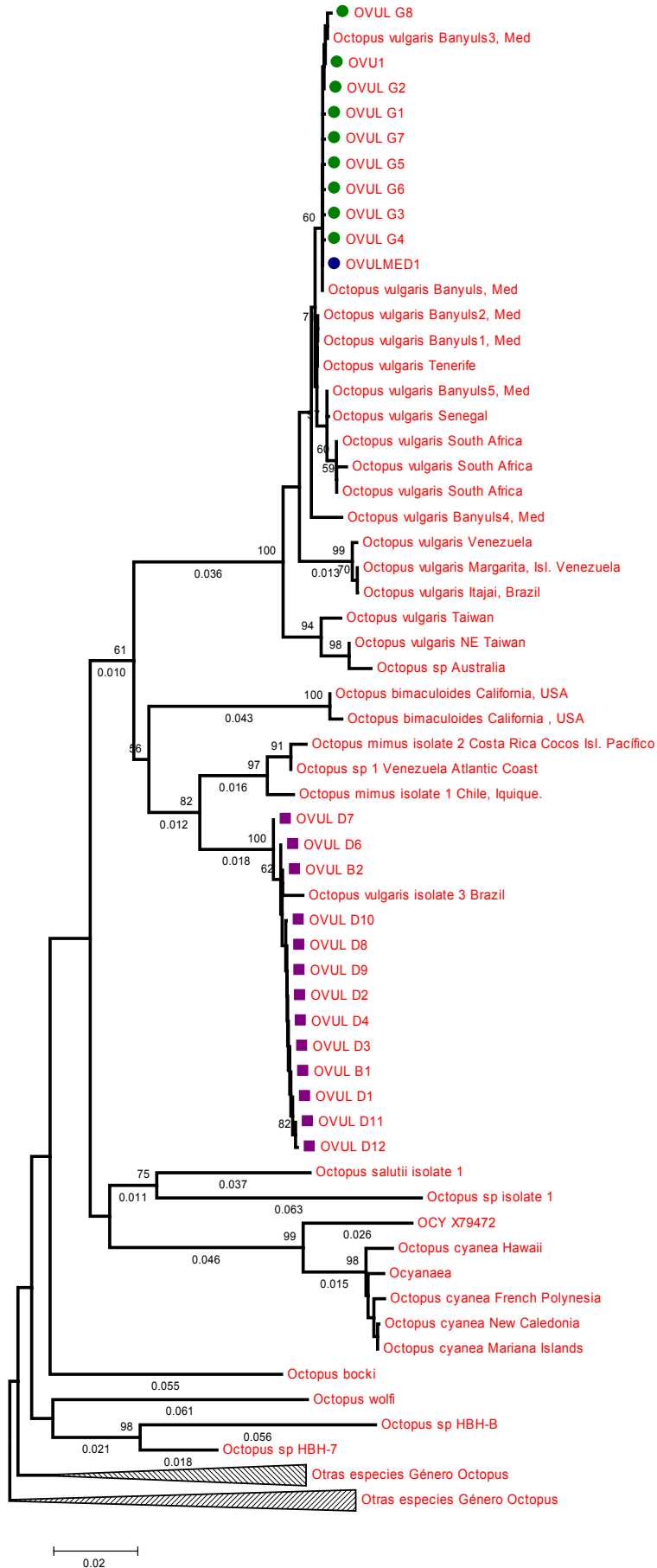
*O. mimus* ha sido considerado una sinonimia de *O. vulgaris*, pero recientemente ha sido elevado a la condición de especie con una distribución centrada en Pacífico sudeste, a lo largo de la costa chilena (Osorio, et al. 1979; Cortez, 1995). El análisis de datos disponibles en el GeneBank, identificando una secuencia clasificada como *Octopus* sp. y asumiendo su certeza, indica la presencia de esta especie en aguas atlánticas venezolanas. La definición de esta especie, así como otras especies relacionadas, como *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides*, es compatible con una definición de especie monofilética para *O. vulgaris*, siempre que esta especie se constriña a los taxa incluidos en el Clade I (Figura 1).

En consecuencia, las muestras, morfológicamente diagnosticadas como *O. vulgaris*, de Panamá y Brasil, no pueden ser consideradas como tal especie, para mantener la monofilia de *O. vulgaris*.

La posición de *O. mimus* y las muestras problemáticas como clades hermanos, sugeriría la posibilidad de incluir estas últimas muestras como una población divergente de *O. mimus*, en el que probablemente se involucrase la elevación del Istmo de Panamá como un evento vicariante. Sin embargo, la presencia de la muestra venezolana muy relacionada con un individuo de *O. mimus*, descartaría esta posibilidad.

Finalmente, las muestras de Panamá y Brasil, agrupadas en el clade divergente podrían representar una especie críptica, con la necesidad de ser evaluada y descrita morfológicamente.

Las secuencias ribosomales han mostrado la elevada divergencia de las muestras propias euro-africanas respecto a las americanas cuestionando la designación de *O. vulgaris* para esos individuos americanos. Sin embargo, la variabilidad obtenida entre las distintas muestras euro-africanas en las secuencias analizadas, es excesivamente reducida, lo que impide plantear un análisis de la estructura poblacional para dichas muestras, basada en secuencias del 16S rRNA.



**Figura 1.** Árbol no enraizado basado en secuencias parciales del gen 16S rRNA, en estimación de distancias de Tamura-Nei, y en análisis de bootstrapping (1000 réplicas). Se muestran encima de las líneas los valores de bootstrapping (>50%), mientras que debajo se indican los valores de distancias (>0.010). Las muestras marcadas con ● pertenecen a muestras de *O. vulgaris* capturados en aguas gallegas y del Mediterráneo, mientras que aquellas con ■ provienen de las costa atlántica de Panamá.

Buscando una alternativa, para el análisis genético poblacional, se procedió a caracterizar secuencia mitocondriales codificantes y no codificantes que posean un mayor variabilidad que los genes ribosomales, por medio del uso de cebadores de PCR “universales” y del diseño de nuevos cebadores basados en el genoma mitocondrial disponible de *L. bleeckeri* (Figura 2).

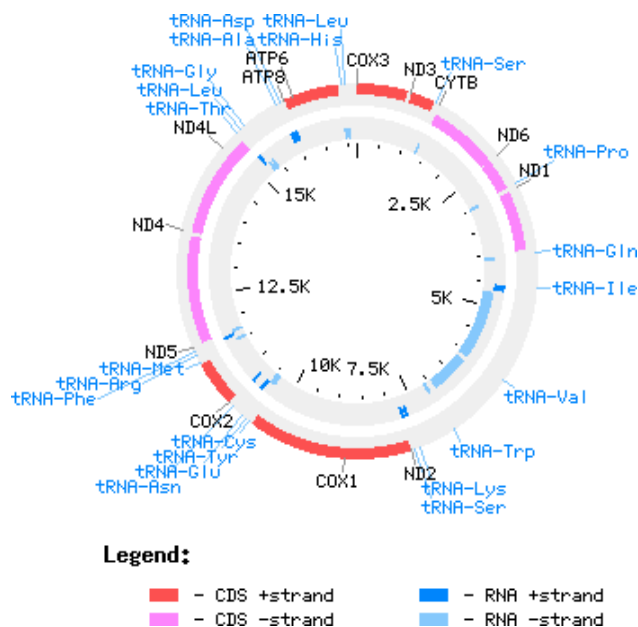


Figura 2. Genoma mitocondrial de *L. bleeckeri*.

2. Análisis de secuencias del gen citocromo b.- Aunque el gen citocromo b constituye una de las secuencias de uso más frecuente como marcador molecular, no existe ninguna secuencia de este gen en el GeneBank para el género Octopus. La secuencia obtenida, mediante el uso de cebadores universales, contiene 363 pares de bases del gen citocromo b, en muestras de individuos capturados en el Mediterráneo, aguas atlánticas de Marruecos y Galicia.

En estas secuencias se detectó un único sitio polimórfico (transición), no mostrando heterogeneidad asociada a una distribución geográfica. Este bajo nivel de variabilidad nucleotídica es insuficiente para el estudio de la estructura genética poblacional.

3. Análisis de secuencias del gen ColIII.- El análisis de secuencias correspondientes al gen mitocondrial ColIII (565 pb), indica la presencia de escasos sitios polimórficos dentro de la especie *O. vulgaris*, detectándose idénticos haplotipos, en la muestra analizada, para el Mediterráneo y Atlántico.

4. Caracterización y análisis de secuencias alternativas.- En la secuencia mitocondrial de *L. bleeckeri*, entre los genes ND4 y ATP8 se sitúa una amplia región no codificante. En esta región la organización génica es la siguiente; ND4, ND4L, tRNA-Thr, tRNA-Leu, tRNA-Gly, tRNA-Ala, tRNA-Asp. Entre las secuencias del tRNA-Gly y tRNA-Ala, se localiza una secuencia no codificante de 510 pb. Estas secuencias debido a la ausencia de restricciones mutacionales, poseen generalmente una mayor tasa mutacional. Por ello es de interés la detección y caracterización de una posible secuencia homóloga en *O. vulgaris*. Flanqueando esa región se diseñó y sintetizó un cebador forward localizado en el gen ND4 (OVUL1F: CGYTCNGGYTGRTAMCCYCA) y un cebador reverse situado en el gen ATP8 (OVUL2R: ATDGGDGMTAATTGTGGCAT). La amplificación de esta región dio resultados negativos, no siendo posible obtener un producto de PCR de suficiente calidad para su secuenciación tras probar numerosas estrategias de PCR, ello indica la ausencia de secuencias homólogas a los cebadores o una distinta ordenación génica en *O. vulgaris* en esas región del DNA mitocondrial.

En otra región del genoma mitocondrial se encuentra una segunda secuencia no codificante de alrededor de 500 pb en *L. bleeckeri*. La organización génica en esta área es la siguiente CytB, ND6, ND1, tRNA-Glu, Sec. no codif., tRNA-Ile, 16SrRNA. Para la amplificación y posterior secuenciación de esta región se usaron cebadores diseñados a partir de las secuencias obtenidas para el Citocromo B (OVUL3R, forward) y para el 16S rRNA (MOL3F, reverse).

La secuencia obtenida en *O. vulgaris*, muestra la ausencia de los genes tRNA-Glu y tRNA-Ile, así como de la mayoría de la secuencia no codificante. Entre los genes ND1 y 16SrRNA se localizan tan sólo 150pb sin homología en el genoma mitocondrial de *L. bleeckeri*.



En la muestra analizada, de la secuencia específica de *O. vulgaris*, se ha detectado la presencia de dos haplotipos, diferenciados por una única transición con frecuencia heterogéneas entre la pequeña muestra del Atlántico y del Mediterráneo. Ello sugiere el probable aislamiento génico de ambas poblaciones y la necesidad del uso de marcadores con mayor resolución, como microsatélites (Greatorex et al. 2000).

Referencias: Soller, R. Warnke, K., Saint-Paul, U., Blohm, D. 2000. Marine Biology 136:29-35. Greatorex, E.C., Jones, C.S., Murphy, J., Key, L.N., Emery, A.M. and Boyle, P.R. 2000. Mol. Ecol. 9 (5): 641-642.

Los trabajos previstos fueron realizados completamente. Como objetivo conseguido debemos destacar la posible ausencia de una estructura poblacional detectada en las muestras de los especímenes procedentes de las costas peninsulares, lo que conllevaría un flujo génico entre el Atlántico y el Mediterráneo. Por ello, diferencias fenotípicas y de comportamiento, de interés para el cultivo industrial, no parecen sustentarse en los datos moleculares obtenidos hasta el momento. Son destacables, también, los resultados obtenidos para especímenes de otras latitudes (Panamá), que posibilitan una nueva aproximación a la clasificación del género *Octopus*, aunque sería necesaria una mayor recogida de muestras en esas zonas.

#### Condiciones óptimas para el transporte de huevos, paralarvas y juveniles de pulpo.

La investigación correspondiente a este apartado se llevó a cabo por Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía en colaboración con Institut de Ciències del Mar de Barcelona.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Transporte de reproductores y puestas*

La siguiente experiencia tuvo como objetivo averiguar las condiciones óptimas de transporte durante un tiempo prolongado de reproductores con sus respectivas puestas, cubriéndose un trayecto entre el Centro Oceanográfico de Vigo y el ICM de Barcelona.

El material que se utilizó fue el siguiente:

1 cilindro de PVC de 20 cm. De diámetro y 40 cm de largo, que contenía una hembra de *Octopus vulgaris* y su puesta.

1 furgoneta

2 tanques cilíndricos de 1 m de altura y capacidad de 200 l.

1 botella de 5 l de oxígeno, regulada al mínimo de salida de oxígeno

1 termómetro manual.

1 oxímetro portátil.

1 kit de análisis de nitritos.

Se controlaron los niveles de temperatura, oxígeno y nitritos, cada 2 horas.

El habitáculo que contenía la hembra + puesta se sujetó con otros elementos plásticos en el interior del tanque de transporte para asegurar su posición correcta, manteniendo los cordones de huevos en posición vertical.

#### *Transporte de paralarvas*

Se realizaron una serie de experiencias de laboratorio con el fin de determinar la densidad de paralarvas más adecuada para el transporte de las mismas. Simultáneamente se valoró la influencia de otros parámetros tales como la temperatura y la concentración de oxígeno en el agua de transporte. Al contrario de la experiencia anterior, no existió un transporte real de las paralarvas, únicamente una simulación.

Las experiencias fueron realizadas con paralarvas de día 0 ó día 1 de vida, las cuales fueron introducidas en bolsas de plástico transparente (de 30 litros de capacidad) en un volumen de 10 litros de agua, rellenando el resto del espacio con oxígeno puro. En los casos en que el oxígeno de partida presentaba valores inferiores a  $7 \text{ mg.l}^{-1}$  se realizó un aporte extra de oxígeno directamente en el agua.

Se diseñaron tres bloques de experiencias basados en la diferente ubicación de las bolsas durante el proceso de transporte simulado: (i) en cámara isoterma a  $14^\circ \text{ C}$ ; (ii) en cajas de corcho blanco a temperatura ambiente; (iii) en cajas de corcho blanco con barras refrigeradas.

En cada uno de estos casos se probaron distintas densidades de paralarvas (100 a 6000 paralarvas.l<sup>-1</sup>), mantenidas durante diferentes periodos de tiempo (6 a 24h); de cada una de las combinaciones se realizaron dos réplicas.

### *Transporte de juveniles*

Para las experiencias se utilizaron pulpos de 750 a 1100 gr., que fueron introducidos individualmente en bolsas de malla de red (de 1 cm de luz) o en tubos de PVC (experiencias 5 y 6) rodeados por la misma malla de red. Se utilizaron tanques plásticos rectangulares de 250 litros que se llenaron con 200 litros de agua salada filtrada y saturada de oxígeno. En el fondo del tanque se dispuso de una estructura rectangular formada por tubo poroso, conectada mediante una tubería plástica a una conducción que surtía de 100 litros de aire comprimido por minuto, que equivale a una presión de 300 milibares. Las simulaciones o experiencias de transporte se llevaron a cabo en una cámara isoterma que permitía mantener la temperatura constante en cada ensayo.

Los pulpos fueron estabulados en los tanques durante 24 horas. En ese intervalo se tomaron medidas regulares (cada 1-2 horas) del oxígeno disuelto. Se usaron como variables la temperatura (desde 13° C hasta 19° C) y la carga (desde 50 hasta 165), expresada en kilogramos por m<sup>3</sup>.

## RESULTADOS

### *Transporte de reproductores y puestas*

Transcurridas 7 horas de transporte, y al apreciarse un incremento en los valores de nitritos, la hembra + puesta se traspasó al segundo bidón. La temperatura inicial de salida en Vigo (15.5° C) se incrementó hasta 17.7° C al llegar a Barcelona (Figura 1). La duración total del transporte fue de 11h 15 min. Al llegar al ICM de Barcelona se procedió a aclimatar lentamente la hembra +puesta en un tanque provisto con circuito abierto. Se intentó que el incremento térmico no superara 1 grado por hora. Transcurridas 24 horas desde el inicio del transporte, la temperatura fue de 19.5° C, siendo así la diferencia total de 4 grados.

Tras el transporte la hembra mostró una perfecta adaptación a las nuevas instalaciones. La temperatura a la que se mantuvo en ICM Barcelona fue de 19.5 grados. Transcurridos 18 días (24 de octubre 2000), empezaron las eclosiones larvarias. No se observaron mortalidades larvarias de recién nacidos ni cordones de huevos sin eclosionar, por lo que la calidad de los huevos se consideró normal. Las larvas fueron utilizadas para realizar diversos cultivos experimentales en el ICM, llevados hasta 20 días, por lo que la calidad larvaria se consideró normal.

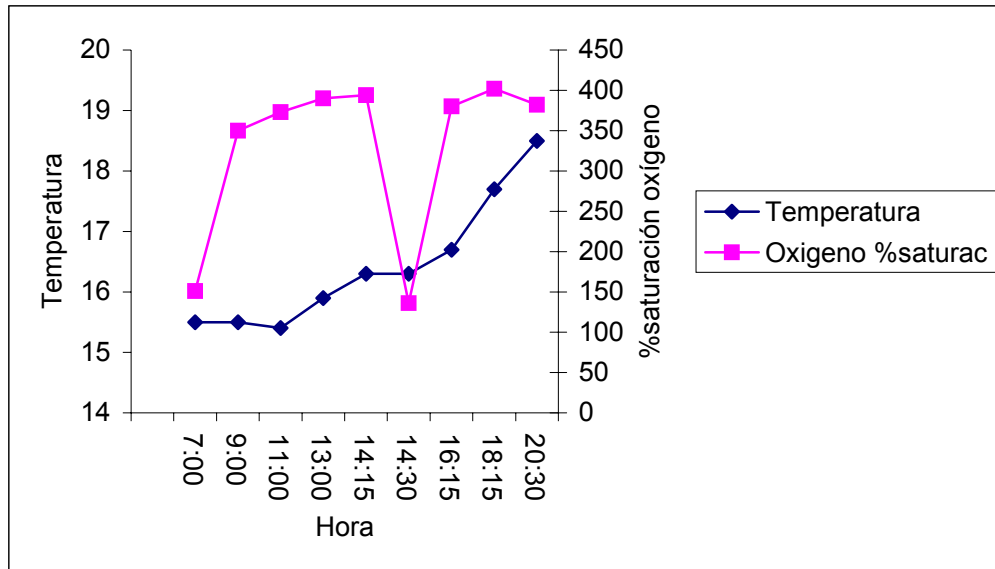


Figura 1.- Valores de temperatura y saturación de oxígeno a lo largo del tiempo de transporte de una hembra de pulpo con su puesta.

### *Transporte de paralarvas*

La siguiente Tabla muestra los valores de los parámetros de las distintas experiencias, así como los valores de mortalidad obtenidos en cada caso.

Densidad (paralarvas.l <sup>-1</sup> )	Duración (h)	T <sup>a</sup> inicial (° C)	T <sup>a</sup> final (° C)	O <sub>2</sub> inicial (mg.l <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub> final (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalidad (%)
(i)Experiencia en cámara isoterma a 14° C						
100	6	13.3	13.6	14.4	24.2	0.15
100	12	13.3	13.6	12.8	25.1	0.20
100	24	13.3	13.3	15.7	25.6	0.10
500	6	13.4	13.6	9.8	20.3	0.02
500	12	13.5	13.5	9.7	24.5	0
500	24	13.4	13.2	9.5	28.1	0.09
1000	24	14.2	13.4	9.3	21.1	0.35
2000	24	14	13.3	7.6	19.6	0.10
3000	24	14.3	13.5	7.0	15	0.03
4000	12	15.4	14.2	11.6	14.2	3.00
4000	24	15.6	14.2	12.8	13.9	18.91
5000	24	15.6	14.3	9.8	9.2	59.60
6000	24	15.6	14.6	10.2	9.0	58.20
(ii) En cajas de corcho blanco a temperatura a ambiente						
2000	24	15.5	17.5	12.1	18.7	0.04
3000	6	15.6	16.3	12.8	15.6	0.06
3000	12	15.5	16.7	10.4	16.7	0.11
3000	24	15.7	17.6	12.5	14.9	32.00
4000	12	15.7	17.5	12.2	17.1	0.06
4000	24	15.7	17.9	10.4	7.4	48.85
(iii) En cajas de corcho blanco con barras refrigerantes						
3000	24	16.3	15.1	9.0	17.3	8.62
4000	24	15.8	11.8	10.4	16	34.00

## Transporte de juveniles

## Resumen de experiencias

Experiencia <sup>o</sup>	Peso medio (Kg.)	Carga (Kg.m <sup>-3</sup> )	Temperatura	Supervivencia %
1	0.85	50	13.3	100
2	0.89	89	16.7	100
3	1.00	160	13.5	95
4	1.10	165	19.5	100
5	1.08	151	16.3	96
6	1.10	142	14.2	100

En general todas las experiencias han resultado satisfactorias, registrándose unas tasas de supervivencia cercanas al 100% en todos los casos. El oxígeno disuelto se mantuvo durante las 24 horas dentro de unos niveles considerados seguros, tal como se refleja en la Figura 2.

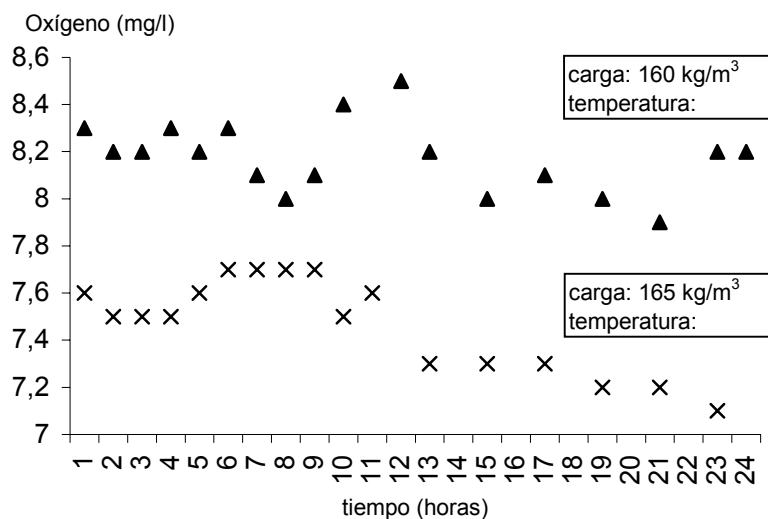


Figura 2.- Valores de oxígeno disuelto durante 24 horas en dos tanques conteniendo pulpos a diferente temperatura y biomasa.

Incluso bajo estas situaciones extremas de alta densidad ( $160-165 \text{ Kg/m}^3$ ), al cabo de 24 horas los valores de oxígeno no bajaron de  $7 \text{ mg/l}$  y las supervivencias fueron del 95 y 100% respectivamente.

## Conclusiones de transporte

### *Transporte de reproductores y puestas*

En conclusión, se considera que el transporte de hembras y puestas desde el Atlántico al Mediterráneo o viceversa, es factible. El hecho de que las dos poblaciones de *Octopus vulgaris* (Atlántico y Mediterráneo) tengan épocas de puesta con algunas diferencias en el tiempo, hace pensar que este tipo de transporte pueda ser útil de cara a realizar cultivos larvarios fuera de la temporada natural.

### *Transporte de paralarvas*

Analizando los resultados obtenidos se deduce que:

- a) Transportes de 24 horas ó mayor duración no deben exceder concentraciones de  $3000 \text{ paralarvas.l}^{-1}$ .
- b) Transportes de 12 horas ó inferior duración pueden contener hasta  $4000 \text{ paralarvas.l}^{-1}$ .
- c) Existe una relación o tendencia directamente proporcional entre la temperatura y la mortalidad.
- d) El aporte extra de oxígeno puro parece influir positivamente en la supervivencia paralarvaria.

### *Transporte de juveniles*

- e) El transporte de pulpos vivos de  $1 \text{ Kg.}$  es factible en altas densidades (hasta  $165 \text{ Kg. m}^{-3}$ ), durante 24 horas, en un rango de temperatura de  $13^\circ \text{ C}$  a  $19^\circ \text{ C}$ . El sistema de transporte ha de ir provisto de aire a presión que permita mantener unos niveles de oxígeno disuelto de  $7 \text{ mg.l}^{-1}$  y los animales preferiblemente se estabularán aislados en bolsas o tubos.

## BIBLIOGRAFÍA GENERADA

2001:

- Aguado, F., Rueda, F.M., Egea, M.A., Hernández, M.D., Faraco, F. y García García, B. 2001. Efecto de la temperatura sobre la supervivencia en el transporte, estabulación y engorde de *Octopus vulgaris* Cuvier (1797) en el Mediterráneo occidental. En: Convergencia entre Investigación y Empresa: Un reto para el siglo XXI. Fernández-Palacios, H y Izquierdo, M. (Eds.). Monografías del ICCM nº 4, pp.:174-179.
- Aguado Giménez, F. y García García, B. 2001. Crecimiento e ingesta del pulpo común (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) en condiciones experimentales de engorde, Influencia del peso corporal y la temperatura. VIII Congreso Nacional de Acuicultura (Santander, 22 al 25 de mayo 2001).
- García García, B.; Aguado Giménez, F. y Faraco Munuera, F. 2001. Efecto de la alimentación con dos peces de bajo valor comercial (*Boops boops* y *Sardina pilchardus*) sobre el crecimiento y aprovechamiento nutritivo del pulpo común (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1.797). VIII Congreso Nacional de Acuicultura (Santander, 22 al 25 de mayo 2001).
- Moxica C., Linares F., Otero J.J., Iglesias J. y Sánchez F.J.: "Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en tanques de 9 m<sup>3</sup>." Actas del VIII Congreso Nacional de Acuicultura. Santander, 22-25 mayo 2001.
- Navarro JC, Villanueva R (2001) The fatty acids of early stages of *Octopus vulgaris*. C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds.). European Aquaculture Society Special Publication No. 30. Oostende, Belgium. 420-423.
- Rey-Méndez, M., E.G. Tuñón & R. Amor. Estudio comparativo del tipo de jaula y disposición de refugios sobre la mortalidad en el engorde industrial del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797)". COLACMAR-2001. San Andrés (Colombia).



Villanueva, R., N. Koueta, J. Riba and E. Boucaud-Camou. Crecimiento y actividad proteolítica en paralarvas de *Octopus vulgaris* a diferentes raciones alimentarias durante la primera alimentación, usando nauplios de *Artemia* y microdietas. Actas del VIII Congreso Nacional de Acuicultura, p. 148-150, Santander, 22-25 mayo 2001.

2002:

Di Cristo C., M. Paolucci, J. Iglesias, F.J. Sánchez & A. Di Cosmo (2002). Presence of two Neuropeptides in the fusidorm ganglion and reproductive ducts of *Octopus vulgaris*: FMRFamide and Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). *Journal of Experimental Zoology*, 292-267.

Iglesias, J., F.J. Sánchez, J.J. Otero y C. Moxica. 2002. El cultivo del pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier): Situación actual, problemas y perspectivas. 3.<sup>a</sup> Convocatoria Premio Jacumar de Investigación en Acuicultura: Primer Premio.

García García, B. y Aguado, F. 2002. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211: 171-182.

Moxica C., Linares F., Otero J.J., Iglesias J. y Sánchez F.J.: "Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en tanques de 9 m<sup>3</sup>." *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4). 2002: 31-36

Tuñón, E., A. Parada, C. Caeiro & M. Rey-Méndez. Estudio comparativo basado en la dieta diferenciada para el engorde de pulpo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) en una explotación industrial". "IV Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas". Edts. M. Rey-Méndez, J. Fernández-Casal, M. Izquierdo & A. Guerra. 2002. Págs.: 211-222.

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: 269-286.

2003:

Carrasco, J.F.; Rodríguez, C. Y Rodríguez, M. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de crustáceos Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 255-256, Cádiz, mayo 2003.

Cerezo, J. y García García, B. Influencia de la temperatura y el peso sobre la concentración de oxígeno adecuada para el cultivo del pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797). Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 292-293, Cádiz, mayo 2003.

Cerezo, J. y García García, B. Descripción del patrón de consumo de oxígeno postprandial en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797).259 Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 259-260, Cádiz, mayo 2003.

Cerezo, J. y García García, B. Crecimiento y aprovechamiento nutritivo de dietas compuestas de distintos porcentajes de cangrejo y boga en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797). Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 248-250, Cádiz, mayo 2003.

Cerezo, J.; Gómez, E. y García García, B. Resultados preliminares sobre la producción de amoníaco en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) obtenidos mediante un electrodo de ion selectivo.306 Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 305-306, Cádiz, mayo 2003.

García García, B.; Cerezo, J. y Faraco, F. Influencia del número de días de ayuno a la semana sobre el crecimiento y el índice de conversión en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris*).295 Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 295-296, Cádiz, mayo 2003.

- García García, J.; Rodríguez González, L.M. y García García, B. Estudio económico de una explotación tipo de engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en Galicia, mediante la analítica de costes. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 503-505, Cádiz, mayo 2003.
- Iglesias, J. y Sánchez, F. J. “El cultivo del pulpo: una alternativa industrial”. Revista Pesca Internacional Nº 40, Diciembre 2003. Pp.40-43
- Muñoz J. L. El engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en condiciones naturales de un estero. IX Congreso Nacional de Acuicultura. Pp. 264-266. Cádiz 12-16 mayo 2003.
- 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.
- Rey-Méndez, M., E. Tuñón y M. Luaces-Canosa. Estudio de los efectos del peso inicial y el sexo sobre el comportamiento, la mortalidad y el crecimiento del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en cultivo industrial. IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 276-277. Cádiz, mayo 2003.
- Rodríguez, C.; Carrasco, J.F. Y Rodríguez, M. Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en jaula. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 268-269, Cádiz, mayo 2003.
- Roo, F.J.; Socorro, J. Y Alonso, C. Histología del sistema digestivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) alimentadas con distintos tipos de presas vivas. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 285-286, Cádiz, mayo 2003.
- Sánchez, F.J. “La investigación en el pulpo”. Revista MAR. Nº 419 Septiembre 2003. Pp.54-59

Tuñón, E., M. Luaces-Canosa & M. Rey-Méndez. Estudio del comportamiento individual en el cultivo industrial de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) utilizando la implantación de microchips para su identificación. V Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas. Edts. M. Rey-Méndez, J. Fernández-Casal, M. Izquierdo & A. Guerra. 2003. Págs.: 223-227.

Villanueva, R., Riba, J., Ruíz-Capillas, C., González, A.V., Baeta, M. 2003. Composición de aminoácidos en *Octopus vulgaris* durante su desarrollo inicial. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, pp. 239-240, Cádiz, mayo 2003.

2004:

Carro M., Roo J., Socorro J. y Izquierdo M. (2004). Infección del nemertino parásito, *Carcinonemertes sp.*, sobre hembras ovadas de cangrejo blanco *Plagusia depressa* (Fabricius, 1775): Ciclo biológico y efecto sobre la puesta. XIII Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Las Palmas de Gran Canaria. 21 al 24 de septiembre de 2004.

Carro M., Socorro J., Roo J., Montero D. y Izquierdo M. S. (2004). Biología de la reproducción del cangrejo blanco *Plagusia depressa* (Fabricius, 1775) y cangrejo moro *Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758) en el litoral de Gran Canaria. XIII Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Las Palmas de Gran Canaria. 21 al 24 de septiembre de 2004

Carro, M. Evaluación de la viabilidad del cultivo de zoeas de Cangrejo Moro (*Grapsus grapsus*), Cangrejo Blanco (*Plagusia depressa*), Carnada De Vieja (*Xanto spp*) y Camarón (*Palaemons elegans*) como alimento en la fase inicial del cultivo de paralarvas de Pulpo (*Octopus vulgaris*). Tesis de Master. III Master Universitario Internacional en Acuicultura, Las Palmas de Gran Canaria 2004.

Cerezo, J. y García García, B. 2004. Influence of body weight and temperature on post-prandial oxygen consumption of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 233(1-4), 599-613.

- Iglesias J., J.J. Otero, C. Moxica, L. Fuentes, and F. J. Sánchez (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Journal of Aquaculture International*, vol 12: 481-487.
- Oltra R., Roig M., Alemany F., y Mezquita F. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en el puerto de Denia (Alicante). VII Foro dos recursos mariños e da acuicultura das Rías Galegas. 2004. O Grove (Pontevedra).
- Quinteiro, J., R. Amor, J. Rodriguez-Castro & M. Rey-Méndez. Variación genética en el adn mitocondrial de *Octopus vulgaris*, Cuvier 1797. VII Foro dos recursos mariños e da acuicultura das rías galegas". 2004. O Grove (Pontevedra).
- Semmens JM, Pecl GT, Villanueva R., Jouffre D, Sobrino I, Wood JB, Rigby PR. (2004) Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. *Marine and Freshwater Research*, 55: 367-377.
- Socorro, J; Roo, J., Izquierdo, M. S., García, J., Carro M., Valencia, A. and Fernández-Palacios, H. (2004). Effect Of Different Live Prey, *Grapsus Grapsus* Linnaeus 1758 And *Plagusia Depressa* Fabricius, 1775 Zoeas, Over Histology And Biochemical Composition Of Common Octopus, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 Paralarvae. Xi International Symposium On Fish Nutrititon And Feeding *Thailandia, mayo 2004*
- Socorro, J., Roo, J., Izquierdo, M.S., Alonso, C., García, J., Carro M., Fernández-Palacios, H. y Molina, L. (2004). Estado Actual y Perspectivas de Futuro del Cultivo del Pulpo *Octopus Vulgaris* Cuvier, 1797. En Canarias. Simposium Avances en nuevas especies. Madeira, Portugal. Septiembre 2004
- Villanueva R., Riba J, Ruíz-Capillas C, González AV, Baeta M. (2004) Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture* 242: pp 455-478.

## ANEXO

### **Informe de las actividades realizadas en la Comunidad Valenciana desde el otoño de 2004 al verano de 2005, no incluidas en el Informe Final del Plan Nacional de Pulpo (2004).**

Frederic Alemany, Francesc Mezquita, Mireia Roig y Rafael Oltra Departament de Microbiologia i Ecologia. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València.

#### **Introducción**

Desde el otoño de 2004 hasta el verano de 2005 se realizaron dos engordes de pulpo en jaula flotante en el puerto de Dénia, cuyos resultados no se recogieron en el Informe Final del Plan Nacional de Pulpo. En el primero de ellos se mantuvo separados machos y hembras; en el segundo se proporcionó distinta dieta a dos grupos de juveniles, y además se practicó un despesque parcial en el tramo final del engorde, con objeto de favorecer la supervivencia y la producción. No obstante, por encima de la información que se haya podido obtener sobre la influencia del sexo o la dieta, el objetivo principal de ambos engordes fue mejorar la supervivencia y el crecimiento.

La escasez de lugares protegidos en la costa ha hecho que el estudio, como los anteriores, se haya desarrollado en el puerto de Dénia (Alacant). Se efectuó en esta localidad por encontrarse en un área con gran tradición en la captura de pulpo y por la necesaria cobertura obtenida de la Autoridad Portuaria y la Cofradía de Pescadores. El trabajo en el interior de un puerto ofrece ventajas como la protección y la facilidad de acceso, pero también abre incógnitas como la posible influencia del tráfico marítimo en el estrés de los animales.

## Resumen

En el primer engorde (octubre 2004-enero 2005, 94 días) se obtuvo un incremento medio de peso de 652 g/mes, supervivencia de 40,8 % e índice de conversión (IC) de 5,2. En el segundo (marzo-junio 2005, 86 días), se efectuó un despesque parcial a los 65 días, retirando los animales de más de 2,9 kg (aproximadamente un tercio del total). El incremento de peso fue de 975 g/mes, la supervivencia del 53,6 % y el IC 4,6.

## Material y Métodos

Se utilizó una jaula de sección rectangular de 11,7 m<sup>3</sup>, con dos compartimentos y 208 refugios. La jaula se ubicó cerca de la bocana del puerto, en una zona con buena renovación. El primer engorde tuvo lugar entre octubre de 2004 y enero de 2005 (94 días). La temperatura varió entre 19 °C al principio y 9 °C al final. Los juveniles fueron capturados a lo largo de dos semanas mediante arrastre en aguas de Dénia y fueron separados por sexo. Se les proporcionó una dieta variada de peces, crustáceos y moluscos en un porcentaje aproximado de 79:17:4 %. El segundo engorde se realizó entre marzo y junio de 2005 (86 días). La temperatura varió entre 14 y 23 °C. El tiempo de captura fue de 2 días para los pulpos del Grupo 1 y 6 días para el Grupo 2, que también inició el engorde 6 días más tarde. Al Grupo 1 se le proporcionó una dieta con mayor contenido de crustáceos (60:39:1 %, peces:crustáceos:moluscos, respectivamente) que al Grupo 2 (85:14:1 %). Dentro de cada grupo se determinó el sexo de los animales, obteniéndose datos separados para machos y hembras. A los 65 días se realizó un despesque parcial, retirando los individuos de más de 2,9 kg (aproximadamente una tercera parte del total). En todos los casos la densidad inicial se situó alrededor de 10 kg/m<sup>3</sup>.

En ambos engordes la ración diaria de alimento (entre el 5 y 10 % de la biomasa) se ajustó en función del consumo observado. Mediante bandejas depositadas en el fondo de la jaula se retiró diariamente los restos de alimento y posibles cadáveres de pulpo.

De dos a tres veces por semana se determinó la temperatura en la columna de agua y aproximadamente una vez al mes se pesaron individualmente todos los pulpos. No se mantuvo a los animales en el agua a temperaturas superiores a 23 °C, a partir de las cuales se produce pérdida de peso y aumento de la mortalidad (Aguado y García, 2002).

Con los resultados obtenidos se ha calculado la tasa intrínseca de crecimiento (G, %/día) de la manera habitual (Cerezo y García, 2003). La tasa relativa de alimentación se ha calculado como  $TRA (\%) = (\text{Alimento por día}) \cdot 100 / ((B_f + B_i) / 2)$ , donde  $B_i$ ,  $B_f$  son las biomazas inicial y final. El índice de conversión (IC) se ha obtenido dividiendo el alimento correspondiente a cada superviviente por el incremento de peso medio. Como los engordes han sufrido cierta mortalidad, también se han calculado G e IC en base a las variaciones de biomasa (G-Biomasa, IC-Biomasa), variable que responde tanto al incremento de peso por crecimiento como a las pérdidas por mortalidad.

## Resultados

En el primer engorde los resultados fueron peores en el grupo de machos. Su supervivencia (30,3 %) fue notablemente inferior a la de las hembras (52,2 %). Al principio las hembras sufrieron mayor mortalidad pero a mediados del engorde la mortalidad remitió en este grupo y se disparó en los machos (figura 1). La biomasa de los animales muertos supuso 87 kg en machos y 27 en hembras. El peso de los animales muertos solía ser inferior al de la media del grupo al comienzo del engorde, pero aumentaba a medida que transcurría éste, aproximándose a la media o superándola (figura 2). El peso medio final, el incremento mensual y la tasa de crecimiento fueron ligeramente superiores en los machos supervivientes (tabla I), sin embargo el índice de conversión, claramente mayor en machos (6,8 *versus* 4,2) y las variables G-biomasa y IC-Biomasa, ponen de manifiesto un peor aprovechamiento del alimento y una peor producción en el grupo de machos, debido a las pérdidas de biomasa por mortalidad.



En el segundo engorde se realizó un despesque parcial a los 65 días, retirando 15 ejemplares por encima de 2,9 kg en el Grupo 1, que totalizaban 48 kg, y 19 en el Grupo 2 que pesaban 61,5 kg (tabla II). Los resultados fueron peores en el Grupo 1, alimentado con mayor porcentaje de crustáceos. La supervivencia, entendida como el porcentaje total de individuos recuperados, fue menor en el Grupo 1 (38,6 %) que en el Grupo 2 (67,4 %). La mortalidad se produjo sobre todo en la primera parte del engorde (figura 3) y en especial en el Grupo 1, afectando a animales de peso generalmente inferior al de la media (figura 4). El peso medio final fue similar en ambos grupos (3,3 y 3,4 kg), pero la tasa de crecimiento (1,78 y 2,08 %/día en los grupos 1 y 2, respectivamente) y el índice de conversión (6,1 vs 3,9) fueron mejores en el Grupo 2. Los resultados en G-biomasa y IC-biomasa evidencian las diferencias a favor del Grupo 2 (tabla II).

Por lo que respecta a las diferencias entre sexos dentro de cada grupo, en el primero la supervivencia fue mayor en machos, mientras que en el segundo lo fue en hembras (figura 3). El peso medio final y G fueron ligeramente mayores en machos en ambos grupos (tabla II). No se observaron puestas en ninguno de los engordes.

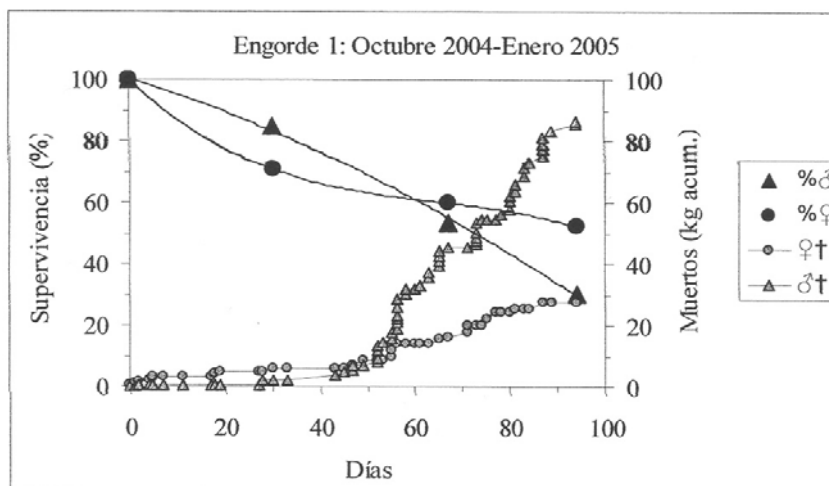


Figura 1. Variación de la supervivencia en el primer engorde y de la biomasa acumulada de los animales muertos.

Grupos	Machos	Hembras
Número inicial	99	92
Peso medio (g) y desv. estnd.	554 ± 134	554 ± 129
Biomasa (kg)	54,8	51,0
Peso medio final	2.693 ± 577	2.538 ± 682
Biomasa final	80,8	121,8
Incremento de peso (g/mes)	683	633
Supervivencia (%)	30,3	52,2
G (%/día)	1,68	1,62
G-Biomasa	0,41	0,93
IC	6,8	4,2
IC-Biomasa	16,7	5,6
TRA (%)	6,8	4,9

Tabla I. Datos, tasas e índices resultantes del engorde efectuado entre octubre de 2004 y enero de 2005 (94 días).

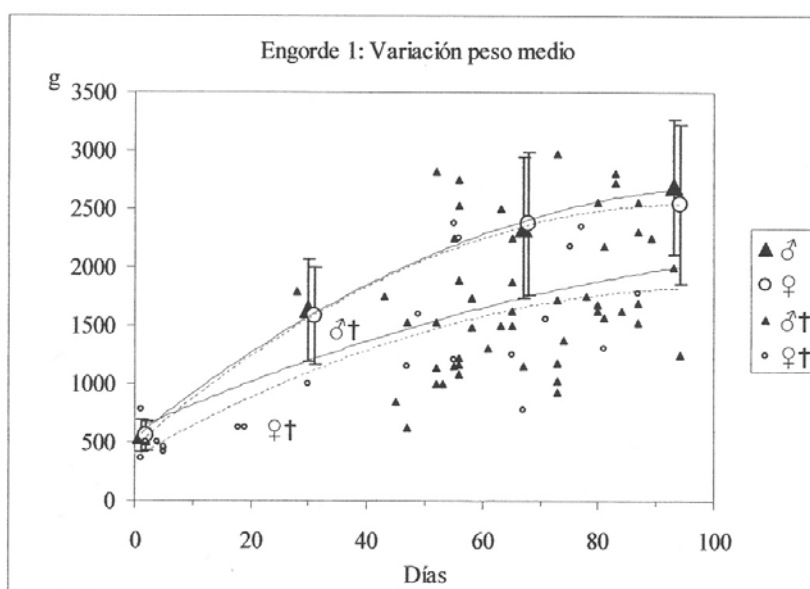


Figura 2. Variación del peso medio en el primer engorde. También se ha representado el peso de los individuos muertos.

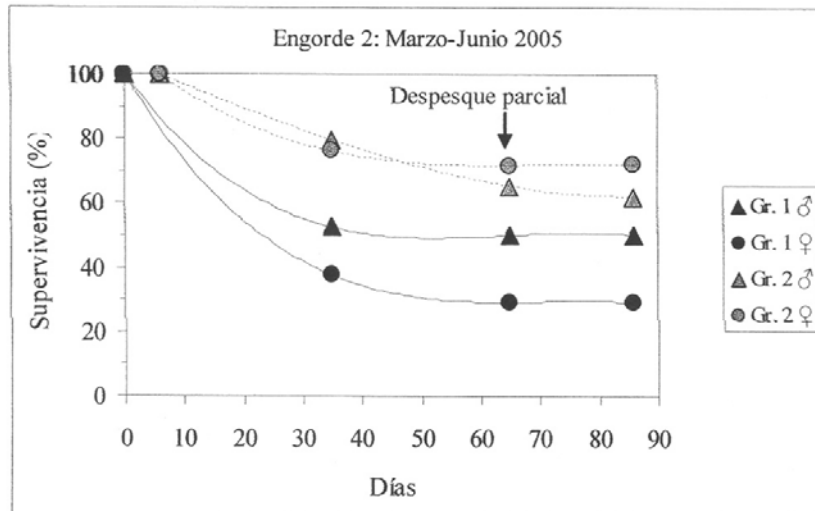


Figura 3. Variación de la supervivencia en el segundo engorde.

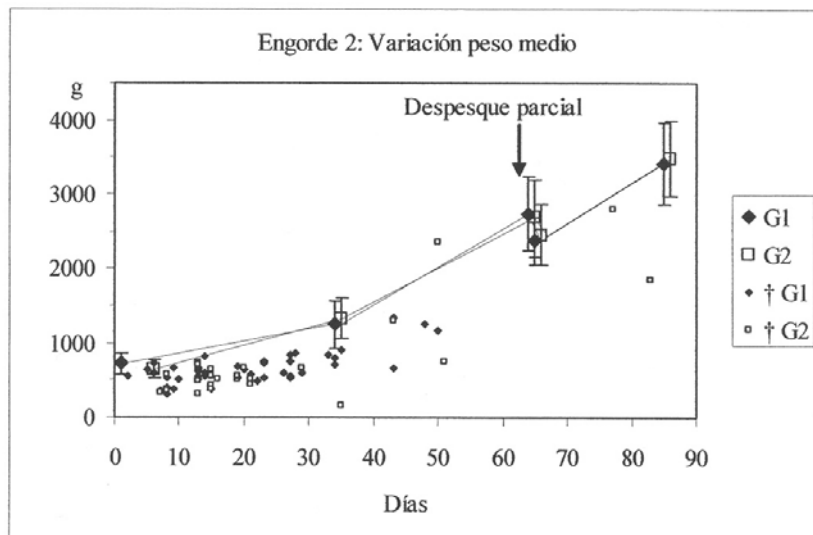


Figura 4. Variación del peso medio en el segundo engorde. También se ha representado el peso de los individuos muertos.

Tabla II. Datos del engorde efectuado entre marzo y junio de 2005. Mediante un asterisco (\*) se indica el número y biomasa de los ejemplares retirados a los 65 días. El peso medio final y las tasas e índices resultantes, se refieren al conjunto de animales recuperados en los despesques parcial y final.

Grupo (duración)	Grupo 1 (86 días engorde)			Grupo 2 (80 días)		
	Machos	Hembras	Conjunto	Machos	Hembras	Conjunto
Núm. inicial	40	48	88	49	46	95
Peso medio (g)	723 ± 136	716 ± 143	719 ± 140	638 ± 132	658 ± 124	648 ± 128
Biomasa (kg)	28,9	34,4	63,3	31,2	30,3	61,5
Núm. final	20	14	15* + 19	32	32	19* + 45
Peso med. Fin.	3.370 ± 517	3.257 ± 321	3.324 ± 445	3.436 ± 600	3.384 ± 294	3.410 ± 469
Biomasa fin.	67,4	45,6	48,0* + 65,0	110,0	108,3	61,5* + 156,8
Incremento. (g/mes)	923	886	909	1049	1022	1036
Superviv. (%)	50	29,2	38,6	65,3	69,6	67,4
G (%/día)	1,79	1,76	1,78	2,10	2,05	2,08
G-Biomasa	0,98	0,33	0,67	1,57	1,59	1,58
IC	-	-	6,1	-	-	3,9
IC-Biomasa	-	-	10,9	-	-	4,4
TRA (%)	-	-	7,2	-	-	6,1

## Discusión

La supervivencia en los distintos lotes, entre el 30 y 67 %, ha resultado inferior a la obtenida en otros engordes similares, con valores por encima del 80 % (Rama-Villar et al., 1997; Rey-Méndez et al., 2003; Rodríguez et al., 2003). En el engorde de otoño-invierno, con separación de sexos, la mortalidad se incrementó a partir del día 50 (figura 1) y afectó sobre todo a machos, bastantes de ellos con pesos similares o superiores a la media y por tanto adaptados a las condiciones de cría (figura 2). Aunque se observaron apareamientos con hembras a través de la malla de separación, el comportamiento reproductivo lógicamente debió verse alterado y es probable que se generara estrés, especialmente entre los machos, el 40 % de los cuales presentaba a los dos meses de engorde lesiones cutáneas ("calvas") o pequeñas mutilaciones, mientras que en las hembras sólo el 24 % tenía lesiones y su aspecto general era mejor.

No parece que la duración de la captura haya influido en la mortalidad inicial, tal como se ha observado en otras ocasiones, en las que capturas dilatadas en el tiempo favorecen la dominancia de los primeros animales y el aumento de mortalidad (Carrasco, com. pers.).

Así, en el engorde de primavera, la mortalidad durante el primer mes fue del 55 % en el Grupo 1, capturado en 2 días, y del 21 % en el Grupo 2, capturado en 6 días (figura 3), y en el engorde de otoño fue del 22 %, habiendo durado la captura 15 días (figura 1). En el engorde de primavera, el aumento del porcentaje de crustáceos en la dieta -que son la presa mayoritaria del pulpo en el medio natural (Mangold, 1983)- tampoco ha favorecido la supervivencia (en el Grupo 1 alimentado con mayor porcentaje de crustáceos, fue del 39 % Y en el Grupo 2 fue del 67 %). El despesque parcial ha tenido un efecto positivo, ya que la tasa de mortalidad mensual descendió desde 13,2 % antes del despesque a 3,3 % después. Es la mortalidad más baja en el tramo final en 4 engordes efectuados en Dénia (figura 5).

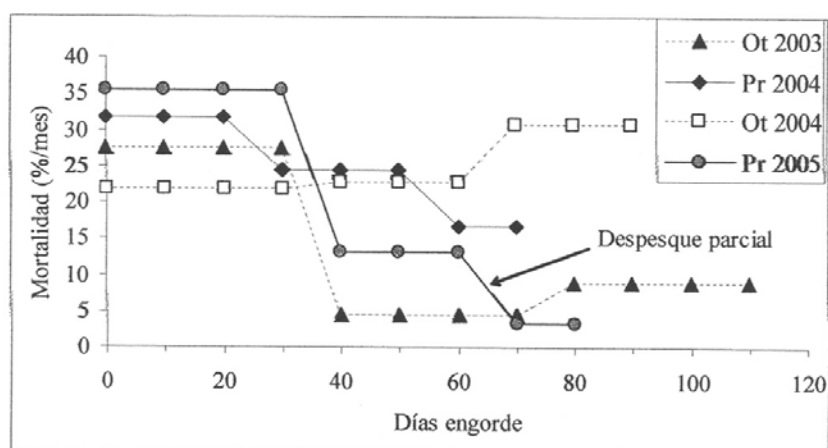


Figura 5. Variación de la mortalidad mensual. Datos de los engordes de otoño 2003 y primavera 2004, tomados de Oltra et al. (2005).

El hecho de que el 41 y 64 % de los cadáveres recogidos en el primer y segundo engorde respectivamente, presente mordiscos o mutilaciones ocasionadas por otros pulpos, hace pensar que hay una agresividad importante que podría ser causa de mortalidad. Incluso se han observado algunos casos de autofagia -fenómeno también descrito por Budelmann (1998)-, lo que corroboraría la existencia de un fuerte estrés.

La jaula se encuentra en una zona protegida, en la transición entre la bocana del puerto y las dársenas interiores. No obstante, esta sometida al zarandeo frecuente de pequeñas oscilaciones procedentes del exterior o del paso de los barcos. También es afectada por el oleaje de levante, que ocasionalmente penetra por la bocana y resuspende sedimentos, depositándose en el interior de los refugios no ocupados por los pulpos una capa negruzca de 2-4 mm en un mes. Estos vaivenes en la jaula y el tráfico marítimo podrían ser una causa de estrés y malestar para un animal bentónico como es el pulpo.

El incremento mensual de peso se ha situado entre 633 g (engorde de otoño) y 1049 g (primavera). Estos valores son similares o ligeramente superiores a los de otros ensayos en jaulas flotantes. Por ejemplo, Rey-Méndez *et al.* (2003) obtienen un crecimiento de 603 g/mes y Rodríguez *et al.* (2003) entre 210 y 882 g/mes. En el engorde de primavera se han obtenido mejores crecimientos, seguramente debido a que el rango de temperatura (14-23°C) era más adecuado para el crecimiento (Aguado y García, 2002) que el que se dio en otoño (19-9°C). La mayor recuperación en este engorde de ejemplares de gran talla, gracias al despesque parcial y a la buena supervivencia posterior, ha permitido producir más biomasa que en pruebas anteriores (véase tabla III).

Tanto en engordes con sexos separados (otoño) como mixtos (primavera), los machos presentan un crecimiento ligeramente mayor que las hembras. Los resultados en cuanto a supervivencia registran mayor variabilidad. Rey-Méndez *et al.*, (2003) también obtienen en engordes mixtos una menor supervivencia y mayor crecimiento en machos; Rodríguez *et al.* (2003) en ensayos solo con machos registran notables variaciones en la supervivencia, entre el 59 y 83 %. En línea con los resultados de otros estudios, se corrobora el hecho de que los machos crecen algo más que las hembras, pero no se pueden obtener conclusiones respecto a la supervivencia, ni a la conveniencia de realizar engordes con sexos separados o no. En la actualidad, a nivel comercial, no se practica la separación de sexos (Luaces., com.pers.).

En la tabla III se sumarian los resultados de 4 ensayos efectuados en Dénia. Se aprecia que el crecimiento tiende a aumentar en engordes efectuados en el mismo periodo del año, probablemente en relación con mejoras en la alimentación (alimento más fresco, tamaño adecuado al de los pulpos, mayor porcentaje de crustáceos), distribución de más alimento (mayor TRA) y mejoras en el engorde (constitución de lotes homogéneos). Sin embargo, no se aprecia una mejora similar en la supervivencia. De hecho, la mayor supervivencia se obtuvo en el primer engorde. Parece por tanto, tal como se ha comentado anteriormente, que la supervivencia podría estar influenciada por factores ajenos al engorde.

Referencia	Oltra <i>et al.</i> , 2005	Oltra <i>et al.</i> , 2005	Actual estudio	Actual estudio
Periodo	Oc. 2003-En. 2004	Abril-Jun 2004	Oc. 2004-En. 2005	Marzo-Junio 2005
Duración (días)	108	67	94	83*
Temperatura (°C)	22-12	13-22	19-9	14-23
Dieta, p:c:m (%)	74:14:12	61:28:11	79:17:4	74:25:1
TRA (%)	4,2	5,8	5,7	6,5
Núm. inicial	180	187	191	183
Peso medio inic. (g)	532±220	783±283	554±131	682±138
Peso medio final	2.350±742	2.429±623	2.597±644	3.380±460
Incr. peso (g/mes)	505	737	652	975
Supervivencia (%)	59,4	56,7	40,8	53,6
Mortalidad (%/mes)	11,3	19,4	18,9	16,8
G (%/día)	1,38	1,69	1,64	1,93
IC	4,0	4,5	5,2	4,6

Tabla III. Datos globales de 4 ensayos de engorde efectuados en el puerto de Dénia. Para el último engorde (\*) se ha considerado una duración media de 83 días (véase más arriba Material y Métodos). Abreviaciones p:c:m, peces:crustáceos:moluscos.

## Bibliografía

- Aguado, F. y B. García 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International* 10: 361-377.
- Budelmann, B.U. 1998. Autophagy in Octopus. *S. Afr. J mar. Sci.* 20: 101-108.

- Cerezo, J. y B. García 2003. Crecimiento y aprovechamiento nutritivo de dietas compuestas de distintos porcentajes de cangrejo y boga en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797). En: *Libro de resúmenes. IX Congreso Nacional de Acuicultura* (Mayo 2003, Cádiz, España). pp 248-250.
- Mangold, K., 1983. Food, feeding, and growth in cephalopods. *Mem. Natl. Mus. Vic.* 44: 81-93.
- Oltra, R., M. Roig, F. Alemany y F. Mezquita 2005. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris*) en el puerto de Denia (Alicante). En: *VII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas* (Octubre 2004, O Grove, Pontevedra). M. Rey *et al.* (eds.): 251-257.
- Rama-Villar, A., V. Faya-Angueira, C. Moxica y M. Rey-Méndez 1997. Engorde del pulpo (*Octopus vulgaris*) en batea. En: *Actas VI Congreso Nacional de Acuicultura* (9-11 julio, 1997. Cartagena, España). J. de Costa *et al.* (eds.): 245-250. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Rey-Méndez, M., E. Tuñón y M. Luaces-Canosa 2003. Estudio de los efectos del peso inicial y el sexo sobre el comportamiento, la mortalidad y el crecimiento del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en cultivo industrial. En: *Libro de resúmenes IX Congreso Nacional de Acuicultura* (Mayo 2003, Cádiz, España). pp: 276-277.
- Rodríguez, C., J.F. Carrasco y M. Rodríguez 2003. Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en jaula. En: *Libro de resúmenes IX Congreso Nacional de Acuicultura* (Mayo 2003, Cádiz, España). pp: 268-269.



## **Agradecimientos**

Este proyecto ha sido financiado por JACUMAR (Planes Nacionales de Cultivos Marinos) a través de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana. Agradecemos a Manuel Luaces su valiosa colaboración.

## **Conclusiones del Proyecto de Engorde de Pulpo en Dénia (2003-2005)**

De los resultados obtenidos en los estudios efectuados en Dénia se extraen las siguientes conclusiones:

1. La fluctuación térmica anual, con temperaturas por encima de 25 °C desde mediados de junio hasta finales de septiembre, y mínimas de 12 °C en enero y febrero, limita el periodo de engorde anual a dos ciclos de 3 meses: uno desde marzo hasta primeros de junio y otro desde octubre hasta primeros de enero.
2. El crecimiento es mayor en los engordes de primavera que en los de otoño, debido a la temperatura más apropiada del ciclo primaveral. Partiendo de subadultos de 500 a 800 g de peso inicial, se pueden obtener incrementos de peso de 650 g/mes en los engordes de otoño y de 1 kg/mes en los de primavera.
3. La supervivencia ha variado entre el 40 y 60 %. Al menos dos factores experimentales han influido negativamente en la supervivencia final: la constitución de un lote de peso heterogéneo (primavera de 2004); (2) la separación de sexos (otoño 2004). Es decir, de no haberse experimentado estas variables, la supervivencia habría sido mayor. Por otra parte, se cree que la inestabilidad ambiental-climática es otra causa de mortalidad. Al menos se aprecia que la mortalidad mensual disminuye de principio a final en los engordes de primavera, coincidiendo con la llegada de buen tiempo y aumenta en los de otoño, coincidiendo con el aumento de temporales.

El mayor zarandeo de la batea en estas condiciones y la deposición de fangos reducidos en los refugios serían causa de estrés y agresividad.

4. Se han obtenido índices de conversión entre 4 y 5,2, calculados en base al alimento ingerible. Si se tiene en cuenta el alimento bruto suministrado, los valores son aproximadamente 1,8 veces mayores. Este aspecto debe mejorarse, por ejemplo ajustando la ración diaria y suministrando alimento que sea comestible en su mayor parte. Es conveniente ajustar el tamaño de las piezas suministradas al tamaño de los pulpos, pues mejora el crecimiento.
5. El despesque selectivo de individuos de talla comercial a los dos meses de engorde, tiene efecto positivo en la supervivencia del último mes de engorde y en la producción de biomasa.
6. Es recomendable la constitución de lotes iniciales de peso homogéneo. No parece conveniente la separación de sexos.