

# **DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN PIENSO EXTRUSIONADO PARA LA ALIMENTACIÓN Y CRECIMIENTO DEL PULPO COMÚN (*Octopus vulgaris*)**

**Pablo Querol Ordoñez**

Directoras: Dra. Ana Tomás Vidal y Dra. Silvia Martínez Llorens

Esta tesis ha sido presentada para optar al grado de Doctor por la  
Universitat Politècnica de València.

**Valencia, Mayo 2014**



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**ICTA**







UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Dña. Ana Tomás Vidal y Dña. Silvia Martínez Llorens, Profesoras Titulares de la Universidad Politécnica de Valencia.

Informan:

Que la Tesis Doctoral titulada DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN PIENSO EXTRUSIONADO PARA LA ALIMENTACIÓN Y CRECIMIENTO DEL PULPO COMÚN (*Octopus vulgaris*) ha sido realizada por D. Pablo Querol Ordoñez en el Departamento de Ciencia Animal bajo su dirección y que, una vez revisado y comprobado el trabajo, consideran que reúne los requisitos necesarios para la obtención del grado de Doctor, por lo que autorizan su presentación.

Y para que así conste firman el presente informe en Valencia a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de dos mil catorce.

Fdo. Dra. Ana Tomás Vidal

Fdo. Dra. Silvia Martínez Llorens



**Ever tried, ever failed. No matter.**

**Try again, fail again. Fail better.**

**(S. Beckett)**



## AGRADECIMIENTOS

Antes de empezar, pido disculpas a todo aquel que olvide mencionar en estas líneas, pues muchos son los que han ayudado directa o indirectamente a que esto que tienes en tus manos sea posible...a todos ellos, GRACIAS!!

Y ahora, como dijo Jack *El destripador* "...vayamos por partes":

En primer lugar quiero agradecer muy especialmente al Dr. Miguel Jover, por la confianza depositada en mí durante todo este tiempo que he trabajado en el GAB con vosotros. A la Dra. Ana Tomás y la Dra. Silvia Martínez, mis directoras de Tesis, mis jefas...me disteis la oportunidad de empezar este camino en el 2008 cuando realicé el PFC, y desde entonces me habéis guiado, ayudado y soportado durante estos años e incluso hemos sobrevivido al naufragio del *Enterprise!!...GRACIAS.*

Gracias a Andrés "Bigking", tal vez la persona con la que más horas de trabajo he compartido en estos años, entre viajes a por pulpos, pescas eléctricas, la aventura en las bateas de mejillones, infinidad de camiones de agua con *Conan* y el *Hormigueta*, atravesar la península 6 veces en apenas 8 días en busca de seriolas, montar y desmontar sistemas, horas y horas en la sala de piensos haciendo "ganchitos"...y siempre encontrando alguna tontería para reírnos...te gusta la carlota??

Gracias a toda la gente del IRTA; Isasi, Guillem y Josep Lluís, por la ayuda prestada en todos los ensayos que hemos realizado allí en Tarragona. Del mismo modo a mis compañeros pulperos del IMIDA; Jesús y Piedad, que fueron ayuda fundamental para conseguir engañar a los pulpos y que se comieran nuestro pienso por primera vez.

Como dijo Don Vito Corleone (y tenía razón) "...la familia es lo más importante", y yo tengo la suerte de tener una de las mejores, a quienes debo agradecer el apoyo y los ánimos durante estos años, los cuales no han sido siempre fáciles, ya que en un principio mis queridos amigos los pulpos no ponían mucho de su parte y se empeñaban en suicidarse de mil formas diferentes!!

Madre, Pater, Luchi, Laura y María (omito tu apodo por que no sé quién puede llegar a leer esto) OS QUIERO!!...Ah!! y a mis cuñaditos también...que no se me enfade nadie!! ;)

Una mención aparte merecen las dos mujeres más guapas de Valencia, mis yayas. Las dos siempre con una sonrisa en la cara cuando les hablaba de lo que hacía con "los bichos", y eso que sospecho que no siempre llegasteis a comprender muy bien de que os estaba hablando. También a mis abuelos, que no han podido ver el final de este camino, pero que de alguna forma han ayudado a que no me saliera de él, gracias.

Ah Yaya!!, debes saber que tus galletas *PRINCIPE* te hicieron muy famosa en el departamento, a la hora del café.



Existe un refrán que dice “No hay mejor espejo que el amigo viejo”...y yo creo que me reflejo un poco en todos y cada uno de los GRANDÍSIMOS amigos que tengo, y a los que solamente puedo estar agradecido.

Alf, sé que aun te debo una cena, o tal vez más de una...por haber sido mi traductor oficial en todos los artículos (aunque algún revisor dijera que no tenías ni idea de inglés...), pero tú sabes que no te pienso invitar, así que tendrás que conformarte con este agradecimiento por escrito, grazie bambino!!

Silvi, gracias por cogerme bajo su ala y enseñarme tantísimas cosas, desde nuestros inicios trabajando con sargos en el lejano 2008. KHALA SIQUI. Gracias muy especiales también al Tio George, por tu ayuda incondicional en cualquier momento o situación, ya sabes Jorgito “si no hay Whisky...”

Gracias a Vic y Mamen, por convertirse por sorpresa en amigos en vez de compañero de trabajo, y haber compartido conmigo tantos momentos inolvidables, como la clase práctica de Mamen sobre la forma correcta de beber tequila, o la demostración de cómo puede complicarse una noche con Vic, cuando el Madrid pierde en la *Champions*.

Gracias a mis profesoras de idiomas particulares Marina Morini y Laura Biscotto, gracias a las cuales ya domino perfectamente...el castellano. Y a Nacho, nuestro “técnico privado” siempre listo para cualquier problema con el ordenador.

Y ahora viene toda la tropa de “Animalicos” que habitan o han habitado este departamento:

Gracias a Todopoderoso, Papito, Nacho “risitas”, Raquel, Antonio, Inma, Sergio, Cristina, Maxim...sois muchos los que habéis tenido que aguantarme mientras trabajabais en nutrición...espero haberos ayudado. De todos vosotros aprendí algo, y con alguno en especial aprendí a tener paciencia...jeje. Gracias a Paty, Ilaria, Bea, David, Fer, Mexi, Mara, Estrella, Carmen, Vicen, Fede, Noe, Javi...por todas las innumerables comidas en granjas, excursiones y demás, sin duda necesarias para aguantar estos años. Gracias a Tati, porque desde que empezamos juntos el primer día de clase en Agrícolas en 2003, siempre la ves riendo, y eso te alegra las mañanas.

Gracias a mis amigos de siempre; Javi, Carmen, Sergio, Reyes, María, Alf, Marta, Carlos, David, Fran, que para mí son parte fundamental de mi vida, y con los que he podido desahogarme y sonreír en infinidad de ocasiones. Gracias a Dani y Gabo, por esos almuerzos esporádicos pero memorables. Gracias a mi belga favorita, a la que no vemos tanto como quisiéramos, pero que se hace notar aun estando a tantos km. Gracias a Nachete y Chache, porque han conseguido hacer de las “noches de papas” un pilar fundamental en mi nutrición.

A mis pequeños amigos, Willy, Manuel, Sra. Tito, Lula I, Lula II, “El breve” y Lula III, gracias por vuestra compañía diaria y cariño incondicional.

Y a ti Ros, que te voy a decir...nada que no sepas o quede muy pomposo, ni tampoco nada que sea demasiado "curso"...a ti Ros, solo puedo decirte que soy muy afortunado por haber podido compartir este largo camino contigo.

Y sobre todo gracias a los pulpos, pequeños invertebrados inteligentes y puñeteros, que me habéis quitado el sueño en muchas ocasiones. Gracias por comeros el pienso.

Así pues, finalmente, y como dijo Lina Morgan:

"...agradecidooooo y emocionadooo  
so-la-men-te puedo deciiiiir...  
GRACIAS POR VENIR!!!"



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	
<b>RESUM</b> .....	
<b>SUMMARY</b> .....	
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Importancia de la especie.....	3
1.2 Generalidades.....	7
1.3 Nutrición.....	13
<b>CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>29</b>
2.1 Justificación.....	31
2.2 Plan de trabajo.....	33
<b>CAPÍTULO 3. PRUEBAS DE ACLIMATACIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 4. PRUEBAS DE ACEPTACIÓN</b> .....	<b>49</b>
4.1 Primer ensayo de aceptación de dietas extrusionadas.....	55
4.2 Inclusión de harina de pescado y krill en dietas extrusionadas: ensayo de aceptación.....	63

<b>CAPÍTULO 5. PRUEBAS DE ENGORDE Y OPTIMIZACIÓN.....</b>	<b>71</b>
5.1 Estudio del crecimiento y la eficiencia alimentaria de <i>Octopus vulgaris</i> con dietas secas.....	73
5.2 Efecto de la inclusión de harina de calamar en piensos extrusionados para el pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ).....	85
5.3 Efecto del nivel de yema de huevo en piensos extrusionados sobre el crecimiento y la composición corporal del pulpo ( <i>O. vulgaris</i> ).....	101
<b>CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>

---

## RESUMEN

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) es una especie marina con un gran potencial para la comercialización debido a su calidad nutritiva, su gran apreciación por el público y su alto valor económico. Sin embargo la ausencia de una producción a escala industrial está limitada por la viabilidad de las larvas y la ausencia de un alimento artificial adecuado.

Con el fin de encontrar un pienso extrusionado para la alimentación del pulpo, se llevaron a cabo las diferentes pruebas que engloban la presente tesis doctoral.

Tras la realización de diversos ensayos de aclimatación en un sistema de recirculación, se realizaron las pruebas de aceptación y engorde en laboratorios con sistemas abiertos.

Se llevaron a cabo dos pruebas de aceptación de piensos extrusionados de composición sencilla, donde se observó como la mezcla de gelatina y maltodextrina proporcionaba al pienso las condiciones físicas necesarias para la manipulación del alimento, así como que el uso de la yema de huevo potenciaba la aceptación e ingesta de los mismos. Se probaron fuentes proteicas como la harina de pescado y la harina de krill, tanto de manera individual como conjunta, observándose los mejores resultados de aceptación y de tasa específica de crecimiento (TEC = 0,66 %/día), cuando ambas fuentes proteicas se presentaban conjuntamente en el pienso.

Tras los ensayos de aceptación se realizaron tres pruebas de engorde, intentando mejorar con éstos los resultados de crecimiento. En primer lugar, se evaluó la inclusión de harina de pescado y harina de krill en diferentes proporciones, obteniendo que un pienso con el triple de pescado que de krill, presenta mejores tasas de alimentación absoluta y por ende mejores crecimientos (TAA = 9,15 g/día, TEC = 0,63 %/día). Se observó cómo un nivel del 20 % de maltodextrina en la formulación de la dieta, proporcionaba un exceso de carbohidratos que podrían estar interfiriendo en el metabolismo de los pulpos, limitando su crecimiento.

Posteriormente, se evaluó la inclusión de la harina de calamar en los piensos extrusionados, por sus altos niveles en arginina, el

aminoácido más limitante para el pulpo. Si bien el uso de calamar produjo tasas de crecimiento considerables ( $TEC = 0,69 \text{ \%/día}$ ) con ambos piensos, también se observó un mayor engrasamiento de la glándula digestiva del pulpo, debido posiblemente a una peor utilización de los nutrientes

Dado el alto nivel de grasa que presenta la yema de huevo y con los resultados obtenidos en la prueba anterior, se realizó un último ensayo, reduciendo el contenido de yema de huevo, de un 30 % a un 10 y un 20 %. Un 10 % fue insuficiente para lograr una ingesta adecuada, y con un 20 % los crecimientos fueron menores que en pruebas anteriores ( $TEC = 0,39 \text{ \%/día}$ ), sin embargo el engrasamiento de la glándula digestiva fue menor.

Con todo ello, en la presente tesis se establecen las bases para una futura formulación de piensos secos para pulpos, donde la gelatina, la maltodextrina y la yema de huevo tendrán un papel fundamental, y las fuentes proteicas como la harina de pescado, krill y calamar (o otras), deberán combinarse para lograr mayores ingestas y crecimientos.



## RESUM

El polp comú (*Octopus vulgaris*) és una espècie marina amb un gran potencial per a la comercialització debut al seua calitat nutritiva, la gran apreciació per el públic i el seu alt valor econòmic. No obstant la absència d'una producció industrial de dita espècie, esta limitada per la viabilitat de les larves, i la absència d'un aliment artificial adequat.

Per tal d'aprofundir en el desenvolupament d'un pinso extrusionat per a la alimentació del polp, es van dur a terme les diferents proves que engloben la present tesi doctoral.

Després de la realització de diversos assajos d'aclimatació en un sistema de recirculació, es va decidir realitzar les proves d'acceptació i engreixament en laboratoris amb sistemes oberts.

Es van fer dos proves d'acceptació de pinsos extrusionats de composició senzilla, on es va observar com la mescla de gelatina i maltodextrina proporcionava al pinso les condicions físiques necessàries per a la correctamanipulació de l'aliment del polp, així com que l'ús del rovell d'ou potenciava l'acceptació i la ingesta dels mateixos.

Es van provar fonts proteiques com la farina de peix i la farina de Kril, tant de manera individual com conjunta, observant els millors resultats d'acceptació i de taxa específica de creixement ( $TEC = 0,66 \text{ \%/dia}$ ) quan ambdues fonts proteiques es presentaven conjuntament en el pinso.

Després dels assajos d'acceptació es realitzaren tres proves d'engreixament, tractant de millorar amb estos resultats de creixement. En primer lloc es va avaluar la inclusió de farina de peix i farina de kril en diferents proporcions, obtenint que un pinso amb el triple de peix que de kril, presenta millors taxes d'alimentació absoluta i per tant millors creixements ( $TAA = 9,15 \text{ g/dia}$ ,  $TEC = 0,63 \text{ \%/dia}$ ). Es va vore com un nivel del 20 % de maltodextrina en la formulació de la dieta, va proporcionar un excés de carbohidrats que haurien interferit en el metabolisme dels polps, limitant el seu creixement.

Posteriorment es va avaluar la inclusió de la farina de calamar en els pinsos extrusionats, degut en gran mesura als seus alts nivells en arginina, el qual és un aminoàcid essencial per al polp. Si bé l'ús del calamar produeix taxes de creixement considerables (TEC = 0,69 %/dia) amb tots dos pinsos, també va ocasionar un major engreixament de la glàndula digestiva del polp, podent ocasionar una pitjor assimilació dels nutrients.

Donat l'alt nivell de greix que presenta el rovell d'ou, es va realitzar una última prova, reduint el contingut de rovell d'ou, s'un 30% a un 10 i un 20%. Un 10% va ser insuficient per a aconseguir una ingesta adequada, i que amb un 20% els creixements són menors que en proves anteriors (TEC = 0,39 %/dia) però també ho va ser el engreixament de la glàndula digestiva.

Amb tot açò, s'estableixen les bases per a una futura formulació de pinsos secs per a polps, on la gelatina, la maltodextrina i el rovell d'ou tindran un paper fonamental, i les fonts proteiques com la farina de peix, kril i calamar (o unes altres), hauran de conjugarse per a aconseguir majors ingestes i creixements.

## SUMMARY

The common octopus (*Octopus vulgaris*) is a marine species with high marketing potential due to its nutritional value, great public appreciation and high economic value. This potential largely stems from the lack of current industrial production, due to the reduced viability of the larvae and the absence of suitable large-scale artificial feed.

The different tests performed in this thesis aim to investigate in the development of extruded feed for octopus.

After performing various tests of acclimatization in recirculation systems, several acceptance and growth tests were carried out in open systems.

In two acceptance tests on extruded diets with simple composition, we assessed that the mixture of gelatin and maltodextrin provided with necessary physical conditions the octopus nutrition, while the use of egg yolk enhanced acceptance and intake thereof. Several protein sources were investigated, including fish and krill meal. We found out that the best acceptance results and specific growth rates (TEC = 0.66 % / day) were obtained when both protein sources were present in the feed.

Following the acceptance experiments, several tests were performed with the aim to optimize growth outcomes. First, the inclusion of fish and krill meal in different proportions was evaluated. Diets with a 3:1 fish/ krill meal ratios resulted in better absolute feed rates of therefore higher growths ( 3FMK , TAA = 9, 15 g / day , TEC = 0.63 % / day ) . A percentage of 20 % of maltodextrin in diet provided an excess of carbohydrates that might be interfering with the metabolism of octopuses, limiting their growth.

Then the inclusion of squid meal in extruded diets was evaluated, motivated by its high levels of arginine, which is an essential amino acid for octopus. Even though the use of squid produced considerable growth rates (TEC = 0.69 % / day ), it also caused greater fattening of the digestive gland, which can ultimately causes worse nutrients assimilation.

## SUMMARY

---

Taking into account the high fat levels in egg yolk, a last test was conducted to evaluate lower egg yolk percentages (30%, 20% and 10 %) As expected, we observed that 10% is insufficient for attaining adequate intakes, while 20% still promotes lower growths than reported previously, but simultaneous reductions of fattening were successfully achieved (TEC = 0.39 %/day).

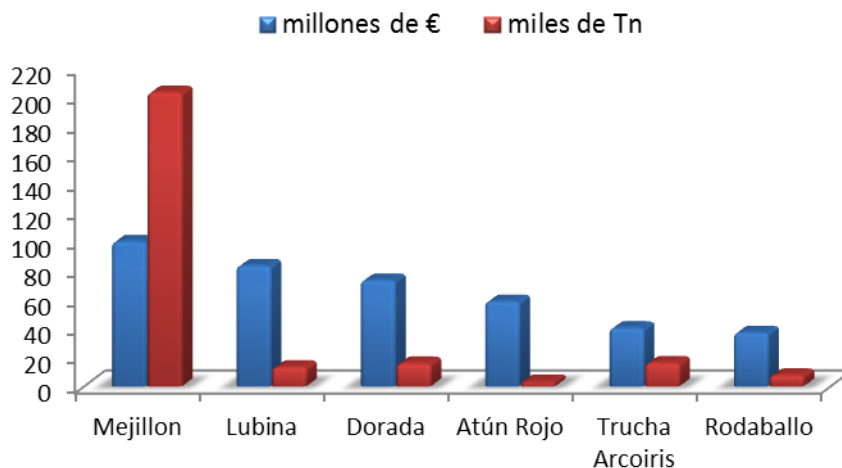
Whereupon, the present thesis establishes the basis for the future development of dry diets for octopuses, in which gelatin, maltodextrin, egg yolk will have a key role. Moreover, protein sources, such as fish, krill and squid meal (or similar) must be conjugated to achieve higher intakes and growth.

## 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 IMPORTANCIA DE LA ESPECIE

La producción acuícola española en 2012 generó una cantidad de producto para su comercialización de 266.684 toneladas, la cual representó una ganancia económica de 489 millones de euros. Dentro de este volumen de venta la mayor parte estuvo representada por la acuicultura marina, cuyo volumen de negocio fue superior a las 249.000 toneladas, con un precio de venta total de 429 millones de euros, y donde destaca por encima de todo, la producción del mejillón con más de 200.000 toneladas (Figura 1).



**Figura 1.** Producción acuícola en España durante 2012 (MAGRAMA, 2014).

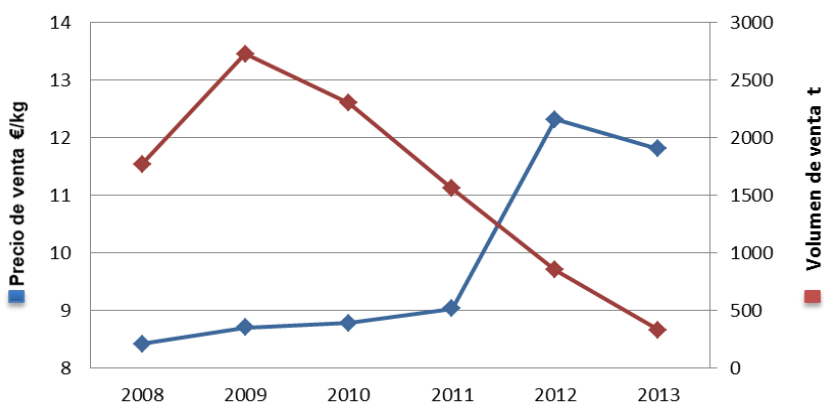
Dada la baja explotación de la producción del pulpo, el volumen de producto en relación a la producción total de la acuicultura española, representó apenas el 0,002 % de la misma ya que no alcanzó las 5 toneladas, lo que se tradujo en 19.397 euros (MAGRAMA, 2014). La gran mayoría de las ventas de pulpo provienen de las capturas realizadas en el medio, generalmente por nasas o arrastre. Los

ejemplares que se presentan a la venta al público suelen tener una talla comercial de entre 2 y 3 kg de peso.

El mercado de los cefalópodos representó el 4 % del mercado mundial de productos marinos en 2010. Los principales consumidores de cefalópodos según FAO (2012) son España, Italia y Japón. Tailandia es el principal exportador de calamar, Mauritania y Marruecos los principales exportadores de pulpo.

En los grandes mercados españoles, como *Mercamadrid, S.A.*, se ha visto como el volumen de venta caía en los últimos años, debido a la escasa producción acuícola de esta especie, y a la disminución de la tasa de capturas del medio natural, posiblemente debido a la sobrepesca a la que ha sido sometida la especie, la cual limita su capacidad de propagación.

En la Figura 2 se observa como a partir del año 2009 el volumen total de negocio cayó de las 2.728 t a 852 t en apenas 3 años.

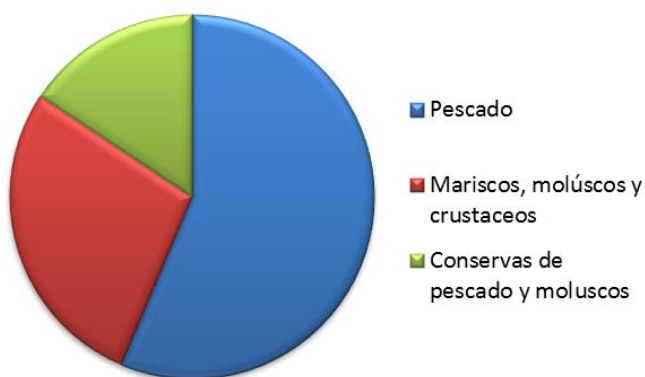


**Figura 2.** Evolución de los precios y volumen de venta del pulpo en España (Mercamadrid, 2013).



Como consecuencia, el precio de mercado fue aumentando conforme descendía el volumen disponible para la venta, hasta que subió drásticamente, situándose cerca de los 12,32 €/kg de media en el año 2012 (Mercamadrid, 2013).

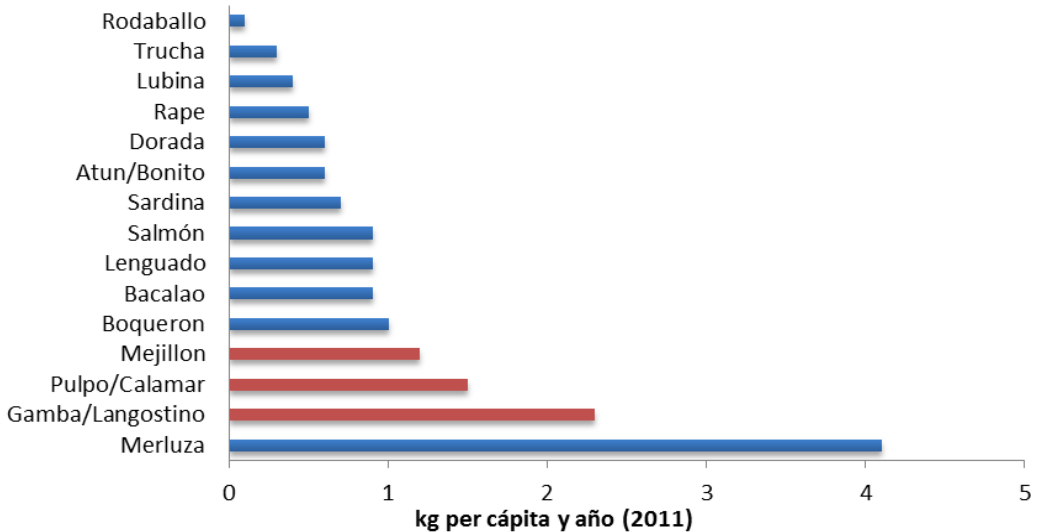
En relación al consumo de productos acuícolas en España durante el año 2011, fue de un total de 1230 millones de kg, lo cual supuso un gasto de más de 9000 millones de euros, donde el consumo de pescado fresco supuso casi la mitad con 544,5 millones de kg (Martín Cerdeño, 2012). Así, el consumo *per cápita* fue de 26,8 kg, lo que supuso un gasto por habitante de 196,2 €. En la alimentación diaria, predominan los pescados con una clara mayoría, frente a los mariscos, moluscos y crustáceos y frente a las conservas (Figura 3).



**Figura 3.** Consumo per cápita en 2011 en España (Martín Cerdeño, 2012).

Los datos de consumo *per cápita* de las principales especies, muestran una gran similitud entre diferentes pescados, con consumos que rondan el kilo por habitante y año (Figura 4), con una predominancia de la merluza. Pero también se observa la importancia de moluscos y crustáceos en la alimentación anual,

donde el consumo de gambas, pulpo, calamar y mejillón es superior al de la mayoría de los principales pescados, tanto de mar como de agua dulce (Martín Cerdeño, 2012).



**Figura 4.** Consumo per cápita de los principales productos (Martín Cerdeño, 2012).

Los altos consumos de pulpo, demuestran una buena apreciación del producto por los consumidores, lo cual unido a su alto valor nutritivo y al aumento significativo en el precio de venta, ha situado al pulpo como una especie de gran valor en el mercado, y sin duda en una especie de futuro para la acuicultura.

Por lo tanto, es indispensable profundizar en la investigación en dos aspectos diferentes pero igual de importantes, como son:

- ✘ Lograr cerrar el ciclo vital, para poder cubrir las necesidades del mercado, sin tener que depender del medio, y por lo tanto, evitar la sobreexplotación de esta especie.

- ✘ Hallar un alimento eficiente y económico con el que se consigan continuos y altos crecimientos, tanto en la fase pelágica como en la fase bentónica.

## 1.2 GENERALIDADES

Los moluscos constituyen uno de los principales filos animales, después de los artrópodos. Existen más de 50.000 especies vivas, además de las 35.000 ya extintas. Este grupo abarca desde las formas más sencillas y microscópicas a organismos gigantescos como el calamar gigante de más de 18 m (*Architeuthis*). Habitan multitud de hábitats desde zonas del trópico a zonas polares, pero todos ellos presentan una característica común, su cuerpo blando, ya sea desnudo o resguardado por un exoesqueleto o concha (Hickman *et al.*, 1990). Dentro de este filo aparece una de las clases más numerosas, con más de 700 especies, los cefalópodos (Cephalopoda) (Nesis, 1987).

Los cefalópodos son invertebrados marinos, cuyo nombre deriva del griego y se caracterizan por una morfología muy particular, formada básicamente por una cabeza (*kephalé*), y unas extremidades o patas (*podós*). Presentan una simetría bilateral y tienen un excelente sentido de la vista, llegando a tener unas estructuras en los ojos muy similares a los vertebrados. Gracias a la gran diferenciación de sus centros nerviosos y su complejo sistema cerebral, los cefalópodos, y especialmente los octópodos, adquieren fácilmente reflejos

condicionados según la situación, incluso pueden llegar a distinguir figuras geométricas.

Existen tres subclases de cefalópodos: Ammonoideos, Nautiloideos y Coleoideos. Los Ammonoideos están extintos, mientras que dentro de la subclase Nautiloidea sobreviven unas 7 especies dentro del orden Nautilida. El resto de cefalópodos que hoy en día pueblan las aguas pertenecen a los Coleoideos (Hickman *et al.*, 1990), de los cuales destacan tres órdenes de gran importancia comercial:

- ✘ Sepíidos: Cuerpo redondeado con aletas, 8 brazos y 2 tentáculos (Sepias, jibias)
  
- ✘ Téutidos: Cuerpo cilíndrico, con 8 brazos y 2 tentáculos (Calamares)
  
- ✘ Octópodos: Cuerpo corto sin aletas, 8 brazos (Pulpos)

### 1.2.1 IDENTIDAD TAXONÓMICA

Reino: Animalia

Filum: Mollusca

Clase: Cephalopoda

Subclase: Coleoidea

Superorden: Octobranchia

Orden: Octopoda

Suborden: Incirrina

Familia: Octopodidae

Subfamilia: Octopodinae



**Figura 5.** Ejemplar de *Octopus vulgaris* en el medio natural.

Género: ***Octopus***

Especie: ***Octopus vulgaris***

### 1.2.2 BIOLOGÍA Y HÁBITAT

El crecimiento de *Octopus vulgaris* muestra dos fases de crecimiento diferenciadas, una inicial de tipo exponencial (fase planctónica) y otra logarítmica (fase bentónica). La fase de crecimiento exponencial se prolonga más allá del asentamiento sobre el fondo y el paso a los hábitos bentónicos, llegando a una edad que oscila entre los 5 y 6 meses (Hernández López, 2000). Una de las mayores ventajas que presenta la producción de cefalópodos es su ciclo vital, el cual dura

entre 1 y 3 años, gracias a sus elevadas tasas de crecimiento (Iglesias *et al.*, 1997) que en la fase bentónica supone un aumento del 13 % de su peso corporal cada día (Vaz-Pires *et al.*, 2004). Así, ingiriendo alimento natural, en 3 ó 4 meses puede alcanzar la talla comercial (2,5-3 kg) partiendo de ejemplares de 750 g de peso inicial (Iglesias, 2000). Esto es gracias a la eficiencia alimentaria de la especie, la cual se encuentra entre 30-60 g peso corporal/100 g alimento (García García & Cerezo Valverde, 2006). Los pulpos son carnívoros, que se alimentan principalmente de otros moluscos, peces y pequeños crustáceos (Grassé, 1985).

*O. vulgaris*, así como muchos otros octópodos, son animales bentónicos que habitan multitud de zonas del planeta, zonas de aguas cálidas tropicales, subtropicales y templadas (Mangold *et al.*, 1998), siendo las principales zonas de explotación las cuencas central y occidental del Mediterráneo, la costa noroccidental africana y las costas del Japón (Voss, 1973). Suelen habitar zonas costeras, hasta profundidades de 200 metros, presumiblemente zonas que ofrezcan refugios naturales, donde esconderse de posibles predadores. Cada individuo posee su propio refugio, aunque suelen cambiar continuamente de hábitat con el fin de encontrar mejores presas. Viven solos y no forman grupos (Mather, 1993), únicamente se agrupan en los periodos reproductivos, donde migran hacia aguas más someras (Tanaka, 1958; Mangold, 1983; Guerra, 1992).

Los pulpos no presentan una gran tolerancia a variaciones del medio, no toleran concentraciones de sal menores de 27 g/l, por lo que nunca habitarán zonas donde se mezclen aguas continentales con

marinas (Vaz-Pires *et al.*, 2004). Su rango óptimo de temperaturas se encuentra entre 16 y 21 °C (Aguado Giménez & García García, 2002; García García *et al.*, 2009).

Otro parámetro físico químico del agua que puede afectar a la vida del pulpo, son los niveles de compuestos nitrogenados en el agua, ya que los cefalópodos son amoniotéticos (García García *et al.*, 2011), es decir, excretan desechos nitrogenados derivados del catabolismo de aminoácidos en forma de amoniaco, por lo que dada la alta toxicidad del mismo, necesitan disponer de grandes cantidades de agua para su dilución.

### 1.2.3 ADAPTACIÓN A LA CAUTIVIDAD

El pulpo presenta una buena adaptación a la vida en cautividad. Incluso ya sea en acuarios de vidrio, tanques de fibra de vidrio, raceways o jaulas marinas (Iglesias, 2000). Independientemente del sistema donde se estable, no deben superar densidades de 10 kg/m<sup>3</sup> (Otero *et al.*, 1999) y dado su carácter huidizo, debe presentar refugios (como macetas de barro o tubos de PVC) donde el pulpo pueda resguardarse individualmente, para evitar la competencia territorial.

Los pulpos deben estar separados por sexos a la hora de la estabulación, si se trata de pulpos adultos para evitar tener hembras fecundadas, las cuales se dedican enteramente a la reproducción.

El sistema debe disponer de una adecuada renovación de agua que asegure concentraciones de oxígeno elevadas ( $> 5$  mg/l) (Nesis, 1987). Para aumentar el nivel de oxígeno en agua se pueden utilizar aireadores, pero siempre de superficie, para evitar que puedan quedar atrapadas burbujas en el manto de los pulpos, lo cual podría producirles úlceras.

La calidad del agua en estabulación es de suma importancia (Vaz-Pires *et al.*, 2004), ya que los pulpos son muy sensibles a las altas concentraciones de compuestos nitrogenados. Por lo que la instalación debe disponer de un buen sistema de filtrado para mantener estos compuestos ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) en niveles mínimos.

Otros parámetros que se deberían vigilar en un sistema de recirculación, son las concentraciones de metales, especialmente cobre y estaño, las cuales pueden ser letales para los pulpos (como para la mayoría de moluscos) (Slater & Buttlig, 2011) al igual que los niveles de fosfatos (TONMO, 2014).



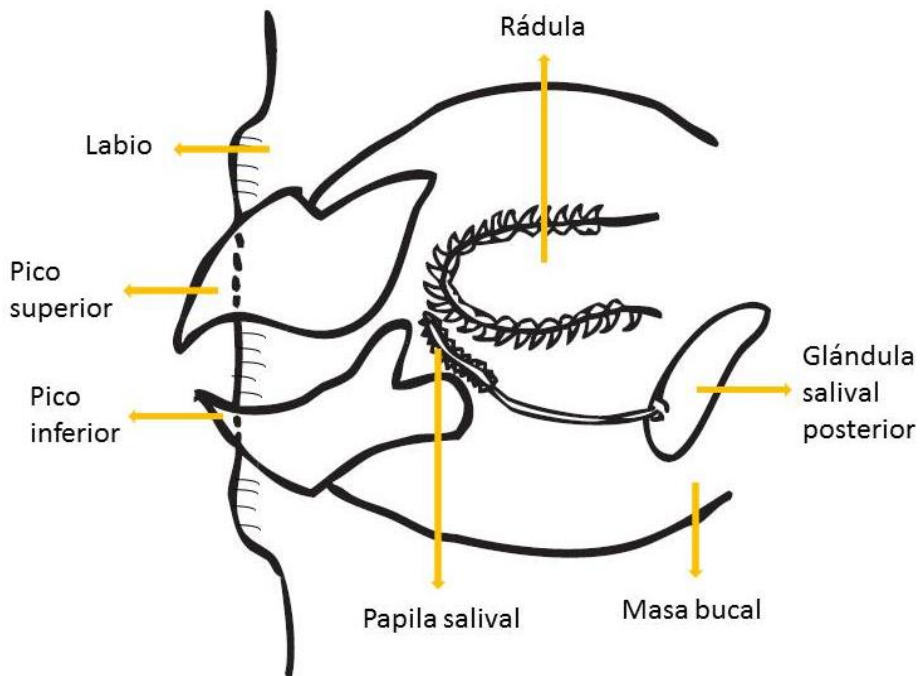
## 1.3 NUTRICIÓN

### 1.3.1 ALIMENTACIÓN Y FISIOLÓGÍA DIGESTIVA

Los pulpos nadan gracias a una expulsión violenta de agua de la cavidad del manto a través del sifón (el cual es móvil), permitiéndoles controlar la dirección que toman en cada momento (Hickman *et al.*, 1990). Gracias a este potente sistema de propulsión y a su capacidad de mimetizarse con el medio, son buenos predadores, mayormente de pequeños crustáceos, moluscos y ocasionalmente peces pequeños (Mangold, 1983), los cuales atrapan con sus tentáculos y roen gracias a sus mandíbulas en forma de pico de loro (Grassé, 1985). El pulpo es un predador nocturno, aunque también oportunista, preparado para comer en cualquier momento si le surge la ocasión (Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983).

Los pulpos, tienen una forma muy particular de alimentarse, la cual comienza con la captura e inmovilización de la presa, para lo cual se ayudan de los tentáculos y de los labios de la boca, que están estriados para ayudar a mantener el control sobre la misma. Además, las glándulas salivares posteriores secretan una potente neurotoxina que provocan la parálisis de la presa (Altman & Nixon, 1970). La sustancia tóxica es una glicoproteína que recibe el nombre de cefalotoxina (Guerra, 1975; Morishita, 1978). Esta sustancia es expulsada a través de la papila salival la cual presenta unos diminutos dientes en su extremo, que le ayudan en la perforación y paraliza a la presa en 30 - 45 segundos (MacGinitie, 1938). Además, en las secreciones de las glándulas salivares posteriores se han

encontrado diferentes tipos de enzimas proteolíticas, las cuales ayudan a la ruptura de los ligamentos musculares de las presas (Romanini, 1952). Estas enzimas actúan en la boca del pulpo a un pH básico de 7, produciendo una hidrólisis alcalina (Hamdan *et al.*, 2013). Se desconoce cuál es la función exacta de las glándulas salivares anteriores, pero están asociadas a la producción de mucosa (Mangold & Young, 1998).



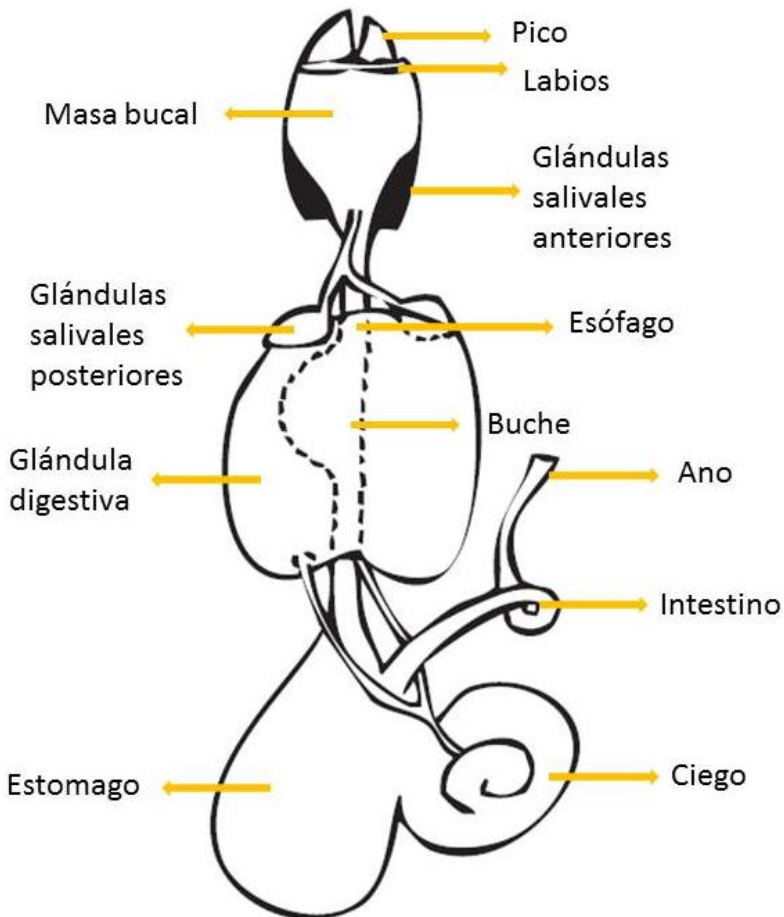
**Figura 6.** Esquema de la boca del pulpo.

Segregadas estas enzimas digestivas, empiezan a desmenuzar el alimento gracias a un sistema bucal especial, formado por un pico en forma de loro y una lengua dentada o rádula (Figura 6).

El alimento desmenuzado desciende por el tracto digestivo, el cual tiene forma de U (Figura 7), donde los órganos se distribuyen en dos zonas: la descendiente, formado por el esófago y el estómago, y la ascendente, formada por el ciego y un pequeño intestino (Bidder, 1966; Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983).

A lo largo del proceso digestivo, tienen lugar dos hidrólisis diferentes realizadas por diferentes enzimas digestivas con actividad proteasa, en casi todas las partes del tracto. Primero se produce una hidrólisis básica en la boca del pulpo (pH 8) gracias a las secreciones de las glándulas salivares posteriores, tras la cual se produce una hidrólisis ácida (pH 5) en diferentes órganos, principalmente en la glándula digestiva y el estómago. El hecho de que esta actividad proteasa se desarrolle en distintos órganos y a distinto pH, demuestra la existencia de distintas enzimas proteasas a lo largo del tracto, lo que prueba la importancia de la proteína en su metabolismo, el cual, está basado principalmente en el uso de aminoácidos (Hamdan *et al.*, 2013).

Mientras el alimento desciende por el esófago gracias a los movimientos peristálticos, será transformado por glándulas digestivas, hasta llegar a un ensanchamiento del mismo, conocido como buche, donde tendrán lugar unas reacciones similares a las pancreáticas y hepáticas. Aquí se almacenarán los alimentos parcialmente digeridos antes de llegar al estómago.



**Figura 7.** Esquema del sistema digestivo del pulpo.

Una vez en el estómago, el bolo alimenticio es atacado por más enzimas proteasas, con actividad pepsina, procedentes del ciego y la glándula digestiva (Caruso *et al.*, 2004). Después el alimento pasa al ciego (forma de espiral) donde se filtrarán las partes nutritivas, las cuales se almacenarán en la glándula digestiva, y los desechos avanzarán por el intestino hasta el ano donde serán excretados ayudados por los sifones (Bidder, 1966; Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni, 1983).

### 1.3.2 NECESIDADES NUTRITIVAS

El análisis de la composición corporal de una especie, da una primera aproximación sobre sus necesidades nutritivas. El pulpo presenta una composición corporal formada básicamente por agua (80 % de su masa corporal) y proteína (alrededor de un 15 %), lo que en peso seco serían 800 g de proteína por kg (Iwasaki & Harada, 1985; García García & Cerezo Valverde, 2006; Prato *et al.*, 2010). El hecho de presentar esta composición indica que el pulpo necesitará grandes aportes de proteína en su dieta.

El metabolismo de los cefalópodos es esencialmente proteico, por lo que los requerimientos aminoácídicos para la síntesis proteica son muy elevados, y más del 90% de las proteínas sintetizadas son retenidas y utilizadas para su desarrollo (Houlihan *et al.*, 1990), logrando elevadas tasas de crecimiento y a la vez obteniendo energía a partir del metabolismo de los aminoácidos para sus procesos biológicos (O'dor 1984; Cerezo Valverde *et al.*, 2013). Destacan entre ellos la arginina, lisina y leucina, como aminoácidos esenciales y glutamina y aspartato, como no esenciales (Villanueva *et al.*, 2004; Cerezo Valverde *et al.*, 2013).

Los lípidos, tienen una representación corporal inferior al 1 % (Prato *et al.*, 2010), donde los lípidos polares son más abundantes que los neutros (Cerezo Valverde *et al.*, 2012a), destacando los fosfolípidos y el colesterol (Estefanell, 2012).

A pesa de la baja concentración, los lípidos tienen una gran importancia, ya que el pulpo presenta grandes concentraciones de

ácidos grasos de cadenas largas HUFAs (Nash *et al.*, 1978) y entre estos ácidos grasos poliinsaturados, destacando el ácido eicosapentaenóico (EPA: 20:5n-3), ácido docosahexaenóico (DHA: 22:6n3) y el ácido araquidónico (ARA: 20:4n-6) (Nash *et al.*, 1978; Miliou *et al.*, 2007; Prato *et al.*, 2010; Cerezo Valverde *et al.*, 2012a; Petza *et al.*, 2011), los cuales le confieren un alto valor nutritivo, y por ende, un alto valor comercial.

Los pulpos presentan una digestión de los lípidos lenta e ineficiente (O'dor, 1984) dada la ausencia de emulsionantes en su tracto digestivo (Vonk, 1962). En general, los cefalópodos presentan una capacidad muy limitada para hidrolizarlos (Ballantyne *et al.*, 1981; O'dor, 1984; Navarro & Villanueva, 2000), excepto en su glándula digestiva, donde existe mayor actividad lipasa (Hamdan *et al.*, 2007), y donde se almacenan en mayor proporción (Bidder, 1966; Cerezo Valverde *et al.*, 2008) para poder usarlos como fuente de energía (García-Garrido *et al.*, 2010). La clase lipídica predominante en la glándula digestiva son triacilglicéridos (Cerezo Valverde *et al.*, 2012a) los cuales son movilizados en condiciones de ayuno (Castro *et al.*, 1992).

El resto de la composición corporal consiste en sales minerales (2 %) y carbohidratos (1 %) (Lee, 1994), los cuales son metabolizados rápidamente excepto una pequeña porción que se almacena en el músculo en forma de glucógeno (O'dor, 1984). El hecho de que se almacene poca cantidad de carbohidratos puede ser debido a una capacidad limitada de glucogénesis (Morillo-Velarde *et al.*, 2011). Estas reservas almacenadas son utilizadas como fuente de energía

para actividades explosivas como la predación o la propulsión para huir de otros depredadores (Wells *et al.*, 1983; Morillo-Velarde *et al.*, 2011).

### 1.3.3 ESTUDIOS CON ALIMENTO NATURAL

Los conocimientos sobre la alimentación de los pulpos han aumentado mucho en los últimos años gracias a la gran cantidad de ensayos e investigaciones que se han llevado a cabo. Desde la década de los ochenta, se ha realizado un mayor esfuerzo investigador y se ha profundizado más en los aspectos nutricionales y metabólicos de esta especie.

La alimentación del pulpo en estado salvaje, es la base sobre la que hoy se basa la composición de los piensos artificiales, ya que indica las necesidades nutritivas que tiene la especie. Los primeros estudios en este ámbito fueron realizados por Nigmatullin & Ostapenko (1976). Al analizar el contenido estomacal de unos 2000 ejemplares descubrieron que el 53,6 % de las presas eran crustáceos, un 25,5 % eran peces, un 9,5 % eran moluscos no cefalópodos y un 7,5 % eran cefalópodos, principalmente ejemplares jóvenes de su misma especie. Guerra (1978) estudió también la alimentación del pulpo en el medio natural, siendo un 80 % crustáceos, un 12 % pescado y un 8 % cefalópodos. En otros estudios el alimento predominante en el estómago eran peces (Hernández López, 2000), y en otras ocasiones bivalvos (Ambrose & Nelson, 1983), lo que demuestra que el pulpo se alimenta de las presas de las que dispone en su entorno.

Las pruebas en cautividad con alimento natural comenzaron con la determinación de los alimentos que el pulpo aceptaba e ingería, donde quedó patente una preferencia muy marcada por los crustáceos (Guerra, 1978), y la aceptación sin problemas de otros alimentos como peces y moluscos gasterópodos, lamelibranquios y ocasionalmente cefalópodos, llegando a producir canibalismo (Taki, 1941; Altman, 1967; Nixon, 1969).

Guerra (1978) comprobó como el pulpo prefiere presas vivas a muertas, esto puede deberse al movimiento de la presa, el cual activa sus instintos depredadores, aunque tras un tiempo de ayuno, no presenta ningún tipo de rechazo.

A partir de ahí, comenzaron a llevarse a cabo pruebas de engorde, donde los alimentos utilizados en diversos ensayos (García García & Aguado Giménez, 2002; García García & Cerezo Valverde, 2004, 2006; Miliou *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006; Mazón *et al.*, 2007; Pham & Isidro, 2009; Prato *et al.*, 2010; Estefanell *et al.*, 2011b) con alimento natural han sido principalmente: cangrejo (*Carcinus mediterraneus*, *Maja crispata* o *Liocarcinus depurator*), calamar (*Loligo gahi*) y pequeños peces pelágicos divididos en dos grupos, pescados blancos poco engrasados como la boga (*Boops boops*) y el múgil (*Liza aurata*) y pescados azules con altos niveles lipídicos, como la sardina (*Sardina pilchardus*) o la alacha (*Sardinella aurita*).

En general, los más utilizados han sido la boga y el cangrejo, debido en parte a sus altos contenidos proteicos, pero también por sus altos coeficientes de digestibilidad, tanto de la materia seca, como de la



proteína y los lípidos (Mazón *et al.*, 2007), superando el 90 % en todos los casos. Aunque el motivo principal es la gran aceptación que presentan por parte del pulpo y su disponibilidad en el mercado.

Es precisamente con estos alimentos con los que se han obtenido las Tasas específicas de crecimiento (TEC) más elevadas, siendo de 1,5 y 1,9 el porcentaje de peso corporal que aumenta diariamente (%/día) con boga (García García & Aguado Giménez, 2002; Estefanell *et al.*, 2011a, respectivamente) y de 2,1 y 2,6 %/día con cangrejo (*C. mediterraneus*, García García & Cerezo Valverde (2006) y *M. crispata*, Prato *et al.* (2010)).

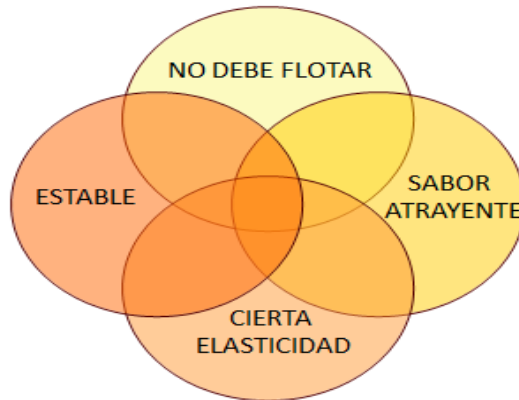
Por otra parte, también se ha observado como los pulpos tienen ingestas más elevadas conforme aumenta el régimen de temperaturas (García García & Aguado Giménez, 2002), como ocurre principalmente en los animales poiquiloterms. Si bien se ha visto unas ingestas elevadas a 19 °C (García García & Aguado Giménez, 2002), los resultados mostrados por Miliou *et al.* (2005) sitúan la temperatura óptima para la mayor tasa de ingesta en 21,8 °C independientemente del peso del pulpo.

También se han obtenido resultados referentes a la importancia del ayuno durante la fase de engorde (García García & Cerezo Valverde, 2004) los cuales indican que hacer ayuno 2, 1 o ningún día, no afecta al crecimiento del pulpo, pero sí mejora sensiblemente el índice de conversión, lo que a la larga es un ahorro económico.

### 1.3.4 ESTUDIOS CON DIETAS ARTIFICIALES

Dado que la alimentación con una dieta natural, no es ni ecológicamente sostenible ni económicamente rentable para poder desarrollar una actividad industrializada del engorde del pulpo, y que la alimentación diaria no puede estar sujeta a las disponibilidades del mercado, en los últimos años se han realizado bastantes estudios con dietas artificiales, ya sean piensos húmedos, semi-húmedos o piensos secos extrusionados.

Debido a las particularidades de la alimentación del pulpo, los piensos deben cumplir con unas condiciones físicas (Figura 8) para evitar rechazos.



**Figura 8.** Características de las dietas artificiales.

El pienso no tiene que flotar, puesto que el pulpo es un animal bentónico, que se alimenta en estado natural depredando en el fondo marino. Debe ser estable, esto implica que debe ser resistente para evitar que se desmenuce y permanezca íntegro todo el tiempo que el

alimento este en el agua. Debe tener cierta elasticidad, para que durante la manipulación, el pienso no se disgregue por el sifonado, y no debe ser muy duro, ya que sino el pulpo no podría roerlo. Además, debe tener un sabor atrayente que incite al animal a comerlo, o por lo menos que enmascare aquellas materias primas usadas habitualmente en los piensos para acuicultura que no sean de “su agrado”.

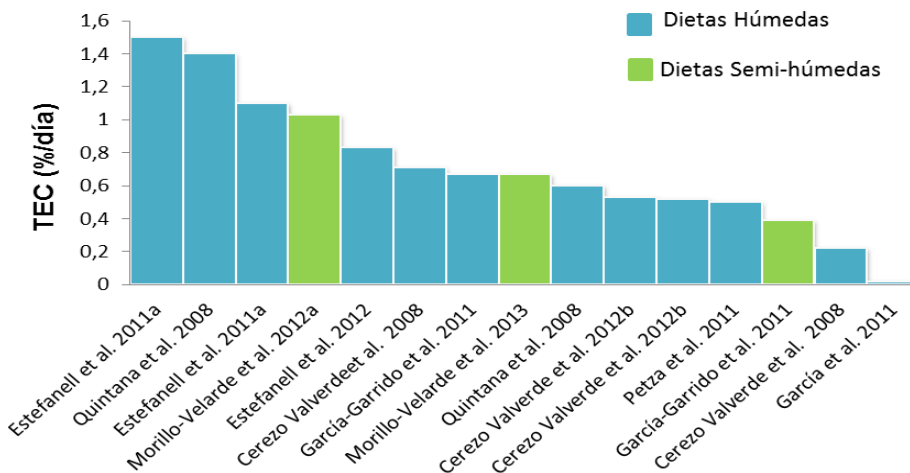
Primero se probaron los piensos húmedos, con un alto contenido en agua (alrededor de un 70 %), lo cual a priori, proporciona una buena textura y por lo tanto mayor aceptación. Estos estaban realizados de forma sencilla a partir de alimento natural troceado o triturado, mezclado con agua y algún tipo de aglomerante, como el alginato o la gelatina.

Quintana *et al.* (2008) formularon dos piensos húmedos, uno a base de calamar y otro de camarón, ambos aglutinados con gelatina, obteniendo una buena tasa específica de crecimiento con el pienso de calamar, un 1,4 %/día (Figura 9). Este crecimiento tan elevado, se debió presumiblemente a la riqueza en arginina y glutamina que presenta el calamar (Cerezo Valverde *et al.*, 2013), muy superior a la que presentan el resto de alimentos habitualmente usados en esta especie.

Posteriormente, se empezaron a probar piensos húmedos con diferentes ingredientes proteicos en la misma formulación y con diferentes aglomerantes. Cerezo Valverde *et al.* (2008) probaron un pienso con gelatina y otro con alginato, ambos con una mezcla de

boga y gamba (*Hymenopenaeus muelleri*). El pienso con alginato logró mejor TEC que el pienso con gelatina (0,71 frente a 0,22 %/día).

Los buenos resultados obtenidos con el alginato se volvieron a presentar en un estudio realizado por Estefanell *et al.* (2011a), con dos piensos realizados con boga salvaje y con boga de descarte. Con ambos se obtuvieron valores de TEC superiores a 1 %/día, siendo mayor el crecimiento con el pienso de boga de descarte. En una prueba posterior, Estefanell *et al.* (2012) lograron un TEC de 0,83 %/día con un pienso realizado con boga y cangrejo aglutinado con alginato y Cerezo Valverde *et al.* (2012b) obtuvieron menores crecimientos con dos piensos mezclados con alginato y realizados con boga con bajo y alto contenido lipídico (0,53 y 0,52 %/día respectivamente). Ambos estudios mostraron el buen resultado de la boga como ingrediente proteico en la elaboración de piensos semi-húmedos para el pulpo (Figura 9).



**Figura 9.** Resumen de experimentos con las mejores tasas específicas de crecimiento en *O. vulgaris*, obtenidas por diferentes autores.

Aunque, no siempre se obtuvieron buenos resultados, ya que el uso de alginato en la composición de piensos también ha presentado crecimientos negativos (García *et al.*, 2011).

Posteriormente empezaron a probarse las harinas, para lograr de una manera lógica, una industrialización de la fabricación de piensos, evitando la utilización de alimentos frescos perecederos. Se probaron diferentes harinas y en distintas proporciones, ya sea añadiendo un 10 % de harina de pescado a la formulación, aunque sin lograr crecimientos positivos (García *et al.*, 2011), o harina de calamar como único ingrediente (Petza *et al.*, 2011) en un pienso aglutinado con agua y alginato, el cual mostró tasas de crecimiento específico de 0,5 %/día (Figura 9).

Al igual que el uso de harinas es un paso adelante en la obtención de un alimento más industrializado, la disminución de la humedad (piensos semi-húmedos) es un objetivo indispensable para disminuir tanto el riesgo de proliferación de patógenos en los piensos, como el mayor deterioro de los mismos, o los gastos de almacenamiento.

Los estudios con piensos semi-húmedos (los cuales contienen una cantidad de humedad cercana al 50 %), han dado valores positivos de crecimiento, tanto si se empleaba gelatina como alginato, al igual que ocurría con los piensos húmedos (Quintana *et al.*, 2008; Estefanell *et al.*, 2011a).

Así, mientras García Garrido *et al.* (2011) presentaron mejores resultados con el alginato frente a la gelatina, en piensos realizados

con una mezcla de pescado hidrolizado y pasta de calamar (0,67 frente a 0,39 %/día), Morillo-Velarde *et al.* (2012a) obtuvieron valores de TEC de 1,03 %/día con un pienso a base de pota (*Todarodes sagittatus*) y alacha aglutinada con gelatina. Ambos ingredientes proteicos fueron añadidos al pienso en forma de liofilizados. Además, este pienso contenía otro ingrediente, el cual había mostrado en anteriores trabajos una gran aceptación por parte del pulpo, que lo convertía en un gran atrayente: yema de huevo liofilizada (Morillo-Velarde *et al.*, 2013). Resultados obtenidos mediante pruebas de aceptación de ingredientes, donde se evaluaron formatos sencillos de piensos formados por gelatina agua y el ingrediente a estudiar. En ellos destacó el pienso con yema de huevo con un TEC de 0,67 %/día (Figura 9).

Estos trabajos probaron que materias en forma de harinas (Petza *et al.*, 2011) o de productos que han sido sometidos a procesos de calor, como los liofilizados o pasteurizados (Morillo-Velarde *et al.*, 2012a), se pueden emplear para la alimentación del pulpo. Además de la importancia que tiene la adición a las formulaciones de algún atrayente para aumentar la ingesta, como puede ser la yema de huevo (Morillo-Velarde *et al.*, 2012a, 2013) o la boga (Estefanell *et al.*, 2012; Cerezo Valverde *et al.*, 2012b).

Los resultados obtenidos en los últimos años, han generado discrepancias sobre cuál es el aglomerante óptimo, ya que con ambos se han obtenido resultados positivos de crecimientos (Figura 9), siendo los más elevados los obtenidos por Estefanell *et al.* (2011a) con un pienso húmedo con alginato (TEC = 1,5 %/día) y por

Morillo-Velarde *et al.* (2012a) con un pienso semi-húmedo aglutinado con gelatina (TEC = 1 %/día). Sin embargo, hay otras consideraciones a tener en cuenta, ya que si bien ambos aglomerantes han conseguido dar estabilidad y una buena textura a los piensos, se ha visto como el uso de alginatos en dietas con *Octopus maya* provoca peores digestibilidades y peor aceptabilidad de los mismos (Rosas *et al.*, 2008).

A pesar de los buenos resultados obtenidos por los piensos húmedos y semi-húmedos, hay que tener en cuenta otros aspectos para evaluar su utilidad y su eficacia, como el hecho de que los ingredientes usados en su fabricación, son materias primas limitadas en cuanto a su producción y en otros casos destinadas al consumo humano (p.e. boga, alacha, cangrejo, gamba, camarón...). Para poder realizar un pienso artificial, debe haber disponibilidad de las materias primas que se van a necesitar en todo momento, ya que el objetivo es lograr una industrialización de la producción del pulpo, y para ello es necesario una producción de piensos a gran escala. Además, estas materias primas deben tener un precio razonable, por lo que deben elegirse materias de abundante producción y no destinadas al consumo humano, lo cual podría disparar sus costes.

Los piensos secos, deben ser un paso más allá en la obtención de una alimentación eficiente y económica. Todas las especies que se producen de manera industrializada se alimentan con piensos secos, ya que éstos son más sencillos de producir y más económicos de almacenar. Debido a sus bajos niveles en agua, no precisan de

cámaras frigoríficas para evitar su deterioro, en periodos no muy largos de tiempo y en condiciones climáticas moderadas.

Hasta la elaboración de la presente Tesis doctoral, los resultados obtenidos en alimentación con piensos secos en pulpos no habrían sido positivos. En *O. maya* (Domingues *et al.*, 2007) obtuvieron tasas específicas de crecimiento negativas (-0,06 %/día), con un pienso a base de calamar (*Loliguncula brevis*), pescado hidrolizado, camarón y lecitina de soja.

Por todo ello, el estudio de piensos secos es sin duda, una puerta hacia una producción de pulpos a mayor escala. Para ello, será necesario adaptar las características físicas de los piensos extrusionados para peces, teniendo en cuenta: la flotabilidad, dureza, gomosidad y palatabilidad, que el pulpo precisa.



## 2. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO



## 2.1 JUSTIFICACIÓN

La menor captura de pulpos en el medio natural, unida a la escasa producción de esta especie a nivel industrial, ha aumentado considerablemente el precio del pulpo en el mercado hasta superar los 12 €/kg en 2012 (Mercamadrid, 2013). Este alto precio unido a la gran aceptación que presenta este producto en la sociedad española, y en otros mercados como el japonés, el francés, el griego, o el italiano, han convertido al pulpo en una especie muy interesante a nivel mundial.

No obstante, la producción a gran escala está limitada por dos factores, uno es la supervivencia de las paralarvas debido al desconocimiento de un alimento eficaz para las mismas, y el otro es la alimentación de los sub-adultos, ya que se precisa de un pienso artificial económico y nutritivo, que pueda llevar a los pulpos a talla comercial en el menor tiempo posible, sin necesidad de recurrir al alimento natural.

Dados los grandes avances que se han dado en los últimos años en el diseño de piensos húmedos para pulpos, donde se han estudiado desde distintos aglomerantes que proporcionaron una textura adecuada al pienso, a ingredientes proteicos o formatos de ingredientes, como pueden ser harinas, liofilizados, etc. El siguiente paso es por tanto plasmar estos conocimientos en el diseño de un pienso seco extrusionado que facilite la industrialización de la especie, ya que simplificaría la producción de los piensos y abarataría los costes.

Por todo ello, en la presente Tesis doctoral se planteó la siguiente investigación **con los objetivos de:**

- ✘ Determinar el mejor sistema de estabulación para *O. vulgaris* dentro de un sistema en recirculación.
- ✘ Diseñar un pienso extrusionado, con las cualidades físicas apropiadas, para las particularidades de la alimentación del pulpo.
- ✘ Estudiar la aceptabilidad de piensos extrusionados de composición sencilla.
- ✘ Conocer la aceptabilidad y crecimiento de *O. vulgaris* alimentado con piensos realizados con diferentes ingredientes proteicos, como la harina de pescado, la de krill o la de calamar.
- ✘ Evaluar la digestibilidad y la eficiencia nutritiva de los piensos formulados.
- ✘ Determinar cómo afectan los piensos extrusionados a la composición corporal de *O. vulgaris*.

### 2.2 PLAN DE TRABAJO

La investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral está enmarcada dentro de los planes (2009 - 2013) de la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), más concretamente dentro de los proyectos, OPTIPULPO y NUTRIPULPO. Dichos planes tienen entre sus finalidades el estudio y optimización de piensos para sub-adultos de *O. vulgaris*, coordinando distintas instituciones de investigación de diferentes comunidades autónomas de España, entre las que se encuentra el Grupo de Acuicultura y Biodiversidad de la Universitat Politècnica de València.

Para la realización de los ensayos, se contó con las instalaciones del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València y con la colaboración del Instituto Murciano de la Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) en San Pedro del Pinatar (Murcia) y del Institut de la Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) en Sant Carles de la Ràpita (Tarragona).

Para abordar los objetivos marcados, se estableció un plan de trabajo (Figura 10), en el cual se desarrollaron tres tipos de ensayos diferentes a lo largo de la fase experimental:



**Figura 10.** Organigrama de las diferentes pruebas de la presente Tesis doctoral.

Se planteó estudiar, en primer lugar, la adaptación del pulpo a diferentes tipos de instalación en un circuito cerrado de agua de mar, como es la granja de peces del Departamento de Ciencia Animal de la UPV. Posteriormente, se realizaron pruebas de corta duración para ver el comportamiento del pulpo frente a un pienso extrusionado, y así poder evaluar sus cualidades físicas. Y por último, tras las pruebas de aceptación, se plantearon pruebas de mayor duración, donde se ensayaron piensos mejorados siempre con respecto a los anteriores, siendo evaluados tanto el crecimiento como las posibles variaciones en la composición corporal de los pulpos.

Los resultados obtenidos de acuerdo con el plan de trabajo se muestran en los siguientes capítulos:

**Pruebas de aclimatación.** Adaptación de la especie a distintos alojamientos dentro de un sistema de recirculación cerrado, en las instalaciones del GAB (Grupo de Acuicultura y Biodiversidad) en la UPV.

**Pruebas de aceptación.** Hace referencia a dos pruebas de corta duración, donde se estudió la aceptación de piensos extrusionados por parte de esta especie:

*“Primer ensayo de aceptación de dietas extrusionadas”*. Durante 15 días se probaron dos piensos extrusionados (YM y MYG), realizados a base de maltodextrina, gelatina y yema de huevo. Se estudiaron las características de ambos piensos en el agua, así como la ingesta, los parámetros de crecimiento y eficiencia alimentaria de los pulpos alimentados con estos.

Los resultados de este trabajo fueron publicados en *Aquaculture Research*:

**Querol P.**, Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde J., Martínez-Llorens S., Moñino A.V, Jover M., Tomás A. (2012) First assessment of acceptance of dry extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). doi: 10.1111/are.12006.

“Inclusión de harina de pescado y krill en dietas extrusionadas: ensayo de aceptación.”. Se evaluaron tres piensos extrusionados con diferentes inclusiones de harina de pescado y harina de krill (FM,K y FMK) durante 15 días. Fueron estudiados los parámetros de crecimiento, alimentación y eficiencia de los piensos.

Los resultados de este trabajo fueron publicados en *Aquaculture Research*:

**Querol P.**, Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde J., Martínez-Llorens S., Moñino A.V., Jover M. & Tomás A. (2012) Inclusion of fish meal and krill in extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): assessment of acceptance. doi: 10.1111/are.12093.

**Pruebas de engorde y optimización.** Agrupa distintas pruebas diseñadas con piensos formulados a partir de los resultados obtenidos en la fase anterior, con el fin de aumentar la ingesta de piensos extrusionados, y por lo tanto, el crecimiento de esta especie:

“Estudio del crecimiento y la eficiencia alimentaria de *Octopus vulgaris* con piensos secos.”. Se realizó un engorde de 6 semanas con 2 piensos extrusionados y una dieta control a base de alimento natural. Los piensos probados estaban compuestos por gelatina y maltodextrina como aglomerantes, yema de huevo como atrayente, y harina de pescado y krill como fuente proteica (FMK y 3FMK).

Se estudiaron los parámetros de crecimiento, alimentación y eficiencia, así como las variaciones en la composición corporal de los pulpos al final de la prueba.



Los resultados de este trabajo fueron publicados en *Aquaculture Research*:

**Querol P.**, Gairin I., Guerao G., Jover M. & Tomás A. (2013) Growth and feed efficiency of *Octopus vulgaris* fed on dry pelleted. doi: 10.1111/are.12269

“Efecto de la inclusión de harina de calamar en piensos extrusionados para pulpo (*O. vulgaris*)” Durante un ensayo de 4 semanas de duración, se evaluaron dos piensos extrusionados con harina de calamar y harina de pescado (FMS y 3FMS). Los resultados obtenidos con estas pruebas fueron comparados con una dieta basada en alimento natural (cangrejo y boga).

Se estudiaron los parámetros crecimiento, así como las variaciones en la composición corporal de los pulpos y la digestibilidad de las dietas en estudio.

Los resultados de este trabajo fueron publicados en *Aquaculture Research*:

**Querol P.**, Gairin I., Guerao G., Monge R., Jover M. & Tomás A. (2014) Effect of two extruded diets with different fish and squid meal ratio on growth, digestibility and body composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). doi: 10.1111/are.12407

“Efecto del nivel de yema de huevo en piensos extrusionados sobre el crecimiento y la composición corporal del pulpo (*O. vulgaris*).”. Prueba de engorde de 4 semanas, donde se evaluó el efecto de la disminución del nivel de yema de huevo en dos piensos extrusionados diseñados en función de formulaciones anteriores. Se evaluaron parámetros de crecimiento y eficiencia de los piensos, así como variaciones en la composición corporal y digestibilidad de las dietas.

### 3. PRUEBAS DE ACLIMATACIÓN



### 3.1 INTRODUCCIÓN

Al principio de la fase experimental se desarrollaron diversos ensayos, que tenían como objetivo evaluar el comportamiento de los pulpos en distintos alojamientos dentro de un sistema de recirculación, con el fin de determinar los mejores resultados en cuanto a estabulación, tanto en manejo como en adaptación de los pulpos, para en una fase posterior, poder realizar pruebas de engorde con piensos secos extrusionados.

Estas pruebas fueron realizadas íntegramente en el Laboratorio de Acuicultura de la Universitat Politècnica de València, a lo largo de los años 2009-2011.

### 3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Para las diferentes pruebas, fueron utilizados pulpos pescados en las aguas de Benicarló (Castellón) y en Les Cases d'Alcanar (Tarragona), por pescadores de la zona mediante nasas. Tras su captura, se seleccionaron los de menor tamaño, intentando mantener una homogeneidad de los pesos sin superar el kilo y medio (Figura 11).



**Figura 11.** Pesaje de los pulpos tras la pesca.

El transporte de los animales hasta el laboratorio de acuicultura, se realizó siempre con los pulpos alojados en mallas individuales, para evitar la agresividad de unos ejemplares con otros, dentro de una cuba de transporte, con aporte de oxígeno constante regulado con un caudalímetro y en total oscuridad para intentar evitarles cualquier estrés.

Durante el transporte (Figura 12) se realizaron comprobaciones regulares de la temperatura del agua y del oxígeno disuelto, intentando mantener siempre un nivel de oxígeno disuelto en agua cercano a los 7,5 mg/l.



**Figura 12.** Diferentes medios utilizados para el transporte de los pulpos.

Antes de comenzar las pruebas, los pulpos tuvieron una fase de aclimatación de entre 7-10 días, durante la cual fueron alimentados con alimento natural: boga, cangrejo (*L. depurator*), pescadilla (*Merluccius merluccius*) o bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) (Figura 13), según disponibilidad del mercado.



**Figura 13.** Alimento natural durante la fase de adaptación.

Una vez se iniciaron las pruebas de alojamientos, los pulpos fueron alimentados con alimento natural (boga o cangrejo) o pienso, una vez al día, a las 9.00 h, y los restos o alimento no ingerido se retiraban a las 13.00 h. Diariamente se registraba el comportamiento de cada animal, observando si se mostraba receptivo a la hora de suministrar el alimento, si lo comía o sólo lo manipulaba, y su comportamiento dentro de su alojamiento (si intentaba escapar, si estaba tranquilo...).

Dada la sensibilidad que presentan los pulpos a las condiciones del medio y a sus variaciones bruscas, se realizaron controles diarios de los principales parámetros físicos químicos del agua (Tabla 1), mostrándose éstos dentro de unos niveles adecuados:

**Tabla 1.** Rangos de los parámetros del agua durante las pruebas.

Temperatura	18 - 24 °C
Salinidad	34 - 39 ‰
pH	7,8 - 8,2
Oxígeno	6,5 - 7,8 mg/l
Amonio	< 0,01 mg/l
Nitritos	< 0,1 mg/l
Nitratos	10 - 40 mg/l

Las pruebas de alojamientos se realizaron dentro de un sistema de recirculación cerrado, independiente (excepto la prueba de tanques individuales explicada más adelante (Cap. 3.3.4). El volumen de agua era de unos 5.500 - 6.000l. El filtrado del agua (Figura 14) se realizó con un biofiltro (biobolas y esponjas) de aproximadamente 400 l de volumen, además de un skimmer (fraccionador de proteínas) para ayudar a eliminar los compuestos orgánicos disueltos en el agua, y un ultravioleta, para esterilizarla. Se utilizaron tanques de fibra de vidrio de 750 l como base en todos los sistemas.



**Figura 14.** Componentes de filtración del agua del sistema.

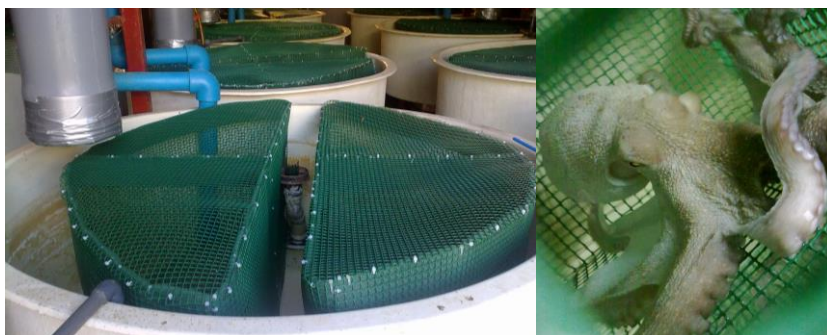
### 3.3 ALOJAMIENTOS

Cuatro alojamientos diferentes se probaron a lo largo de diversos ensayos con alimento natural y piensos extrusionados: tanques divididos con mallas, tanques compartimentados con metacrilato, cubos y tanques individuales.



### 3.3.1 TANQUES DIVIDIDOS CON MALLAS

Se realizaron manualmente compartimentos con malla de plástico, dividiendo la jaula en 4 secciones circulares (Figura 15), con lo cual el tanque quedaba dividido en 4 secciones independientes. Los laterales superiores de cada sección estaban forrados con estropajo, y se cosió una tapa de malla a la parte superior para evitar intentos de fuga. Cada compartimento tenía una sección de PVC que hacía las veces de refugio para los pulpos. El agua entraba al tanque a través de una sección de PVC de un metro de longitud, relleno de biobolas (filtro biológico), alojando a las colonias de bacterias nitrificantes (*Nitrosomonas sp* y *Nitrobacter sp*).



**Figura 15.** Detalle de los tanques divididos con mallas.

### 3.3.2 TANQUES COMPARTIMENTADOS CON METACRILATO

Los tanques de fibra de vidrio de 750 l fueron divididos en 4 secciones con planchas de metacrilato perforadas (Figura 16) para que el agua fluyera a lo largo de todo el tanque. Las planchas de metacrilato estaban adheridas a las paredes del tanque y a su base con silicona, y las juntas estaban reforzadas con escuadras de aluminio para darle mayor estabilidad y agarre a las paredes del tanque. Dentro de cada sección, se colocó un refugio de barro (Figura 16) que hacía las veces de escondite para los pulpos. Para evitar fugas, el sistema disponía de secciones de malla plástica pegadas con silicona en la base del tanque y alrededor del desagüe y de lonas negras en su parte superior, que a su vez les proporcionaba oscuridad.

El agua pasaba previamente por un filtro de biobolas de un metro de altura aproximadamente.



**Figura 16.** Detalle del sistema de Tanques compartimentados.

### 3.3.3 CUBOS

En el sistema formado por cubos, el agua accedía a los mismos mediante unas tuberías ramificadas en 4, conectadas a la tubería general del sistema. Dentro de los tanques de fibra de vidrio, se alojaron 4 cubos de 90 l de capacidad (Figura 17), perforados a lo largo de su contorno y a cierta altura para permitir la salida del agua, y marcar el nivel superior de agua del cubo. Dentro de los cubos se colocaron secciones de tubos de PVC como escondite para los pulpos. Para evitar fugas y visualizar los animales se fabricaron tapas adaptadas con malla de plástico.



**Figura 17.** Detalle del sistema de Cubos.

### 3.3.4 TANQUES INDIVIDUALES

El último sistema utilizado fueron tanques de fibra de vidrio de 1750 l, llenos hasta la mitad de su volumen (Figura 18). En esta ocasión y dada la ausencia de peces en el resto de la instalación, se dispuso para esta prueba de todo el volumen de agua del laboratorio 60.000 - 70.000 l así como sus propios filtros; tanto biológico, de 24 m<sup>3</sup> (6 x 2 x 2 m), como mecánico o rotatorio de tambor, con una luz de 70 micras. Los tanques tenían aireación en superficie, para evitarla acumulación de burbujas en el manto de los pulpos y se les proporcionó macetas de barro como refugio. Se alojó un animal por tanque con el objetivo de proporcionarles un volumen mayor de agua que en pruebas anteriores.



**Figura 18.** Detalle del sistema de Tanques individuales.

### 3.4 RESULTADOS

De los resultados obtenidos a lo largo de los distintos ensayos se obtuvo una conclusión clara: la mala adaptación de los pulpos a un sistema en recirculación, independientemente de cual sea su alojamiento.

Prácticamente en la totalidad de los animales, y en un plazo relativamente breve de 2 - 3 semanas, los pulpos comenzaban a experimentar unos síntomas de apatía, falta de interés por la alimentación, además de comportamientos erráticos y/o extraños de los pulpos, los cuales comenzaban a presentar heridas y llagas, e incluso a auto mutilarse.

Dada la diferencia de alojamientos probados, y al control exhaustivo de los parámetros del agua, la conclusión a la que se llegó, fue la posible existencia de algún parámetro de la calidad del agua, el cual no estaba siendo controlado en los análisis diarios, y las variaciones del mismo estaban ocasionando estos síntomas.

Las mediciones diarias en un sistema en recirculación como el presente, comprueban los valores de temperatura, oxígeno, pH y salinidad, los cuales raramente varían si todo funciona correctamente. Los pulpos son muy sensibles a las concentraciones bajas de oxígeno disuelto (< 5 mg/l, Nesis, 1987), por lo que, cabía pensar que una mala renovación de agua podría estar causando estos síntomas, pero, los niveles siempre se presentaron en torno a 6,7 mg/l de oxígeno disuelto. Por otro lado y dado que el consumo de

oxígeno prácticamente se duplica entre las 6-16 h después de haber comido (Cerezo Valverde & García García, 2004), y las mediciones de los parámetros se realizaron a primera hora de cada día por lo que, es posible que se originasen picos momentáneos durante los cuales el aporte de oxígeno por renovación fuera insuficiente.

El hecho de que durante los ensayos la salinidad no descendiera de un 34‰, descarta cualquier efecto negativo de este parámetro, ya que el nivel mínimo de tolerancia pulpo se sitúa alrededor del 27 ‰ (Boletzky & Hanlon, 1983).

Por otro lado, están las mediciones de compuestos nitrogenados como el amonio, amoniaco, nitritos y nitratos, de los cuales se llevó un control exhaustivo, ya que altas concentraciones de nitritos podrían matarlo. Los análisis de compuestos nitrogenados no mostraron anomalías en el agua que pudieran estar causando este comportamiento de los pulpos.

Tampoco el fotoperiodo parece haber podido ser la causa de esta mala adaptación a un circuito cerrado de mar, ya que el laboratorio tiene un ciclo de luz aproximado de 12L/12O, y los pulpos tenían refugios para su mayor comodidad.

También podría ser como consecuencia de una presencia elevada en el agua de algún metal como el cobre, el cual es altamente tóxico (Slater & Buttlng, 2011) o de fosfatos derivados del fósforo presente en el alimento y en las heces (Mazón *et al.* 2007), quienes pueden

ser dañinos para los pulpos, al igual que para otros invertebrados (TONMO, 2014).

Estos resultados llevaron a buscar otras opciones para realizar las pruebas con los piensos extrusionados, como fueron el sistema cerrado de agua de mar del IMIDA en Murcia (el cual dispone de un emisario submarino para renovar el agua de la instalación a voluntad, que proporciona una renovación diaria del 10%), donde se realizaron las pruebas de aceptación de los piensos y el sistema abierto de agua de mar del IRTA en Tarragona, donde se realizaron las pruebas de engorde y optimización.





## 4. PRUEBAS DE ACEPTACIÓN



4.1

---

Primer ensayo de aceptación de dietas  
extrusionadas.

## PUBLICACIÓN I:

First assessment of acceptance of dry extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797).

P. Querol, S. Morillo-Velarde, J. Cerezo Valverde, S. Martinez-Llorens, A. V. Moñino, M. Jover & A. Tomás (2012a)

*Aquaculture Research* doi:10.1111/are.12006

#### 4.1.1 INTRODUCCIÓN

La alimentación del pulpo es todavía uno de los mayores obstáculos para el desarrollo de la producción de esta especie, ya que el uso continuado de materias primas procedentes de la pesca es técnica y económicamente insostenible.

Una alternativa son los piensos húmedos, los cuales se basan en una mezcla de calamar o pescado troceado, con algún tipo de aglutinante como pueda ser el alginato o la gelatina, y agua (Cerezo Valverde *et al.*, 2008, Quintana *et al.*, 2008, García *et al.*, 2010, Estefanell *et al.*, 2011) con buenos resultados de aceptación.

La incorporación a los piensos de saborizantes pueden hacerlos más atractivos para los pulpos (Cerezo Valverde *et al.*, 2008), y de acuerdo a un reciente estudio, uno de los atractantes más eficaces para esta especie es la yema de huevo (Morillo-Velarde *et al.*, 2013).

Un paso más allá en la alimentación de esta especie puede ser la preparación y uso de piensos secos extrusionados, con los cuales, ya se han observado en estudios previos con *O. maya*, ingestas regulares, aunque sin lograr crecimientos (Domingues *et al.*, 2007).

Es necesario investigar más a fondo este tipo de piensos para asegurar, tanto una buena aceptación, como un crecimiento adecuado. De igual modo, es preciso estudiar la cohesión y la estabilidad del pienso en el agua, con el fin de facilitar la manipulación por parte del pulpo (García García & Cerezo Valverde,

2006), así como facilitar los procesos productivos de las empresas dedicadas a la alimentación de especies marinas, con el fin de lograr disminuir los costes de producción y almacenamiento.

### 4.1.2 MATERIAL Y MÉTODOS

La prueba de alimentación se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) de Murcia (España), con 15 pulpos (*O. vulgaris*), de un peso promedio inicial de  $592,4 \pm 105,2$  g, los cuales fueron capturados del medio natural y alojados en un sistema de recirculación de agua de mar. Ante la imposibilidad material de poder utilizar el mismo sistema de alojamiento para todos los ejemplares, se decidió utilizar dos sistemas diferentes, pero ambos con unas condiciones de calidad del agua idénticas, y condiciones necesarias para no generar ningún tipo de estrés o de inadaptación. Uno de ellos estaba compuesto por ocho tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 93 l donde se probó el pienso YM, y el otro por siete acuarios de vidrio rectangulares de 165 l donde se probó el pienso MYG. Ambos sistemas tenían las mismas condiciones de luz artificial (de 8:00 h a 14:00 h) y tubos de PVC que hacían las veces de refugio. Los pulpos necesitaron un período de 5 días para adaptarse a las condiciones de la instalación, durante los cuales fueron alimentados con boga y sardina. La temperatura del agua fue de  $18,3 \pm 1,3$  °C y la concentración de oxígeno fue de  $7,2 \pm 0,5$  mg/l.

Los piensos se fabricaron con un extrusor semi-industrial; Clextral FC45, en el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat

Politécnica de València. Los piensos extrusionados tenían un diámetro de 1 cm y 4 - 5 cm de longitud y su composición se presenta en la Tabla 2. La yema de huevo fue elegida como atrayente, basándose en los resultados de (Morillo-Velarde *et al.*, 2013), y la maltodextrina y gelatina como aglutinantes.

**Tabla 2.** Formulación y composición de los piensos experimentales.

	YM	MYG
<b>Ingredientes (%)</b>		
Yema de huevo	75	30
Gelatina	0	40
Maltodextrina	25	30
<b>Composición proximal (% materia seca)</b>		
Humedad (%)	12,5	17,1
Proteína bruta (%)	27,7	54,3
Grasa bruta (%)	40,2	11,8
Cenizas (%)	2,6	1,6

Yema de huevo: yema de huevo pasteurizada (IGRECA SAS),  
Gelatina: PILARICA S.A., Maltodextrina: PRAL S.A..

El ensayo se llevó a cabo durante dos semanas, donde los pulpos se alimentaron diariamente a las 9:00 h, con una tasa del 1 - 2 % de su peso corporal, y el alimento no consumido se retiró y se pesó a las 13:00 h, para poder calcular la ingesta diaria. Se aplicó a los datos un factor de corrección de la desintegración y la ganancia de humedad (FC) de los piensos, de acuerdo con Cerezo Valverde *et al.* (2008).

Los índices de crecimiento y los parámetros nutritivos se calcularon con las siguientes fórmulas:

Incremento de peso:  $IP = Pf - Pi$ ;

Tasa de alimentación absoluta:  $TAA = I/t$ ;

Tasa de alimentación relativa media:  $TAR = TAA * 100 / Pm$ ;

Tasa de crecimiento absoluto:  $TCA = (Pf/Pi)/t$ ;

Tasa específica de crecimiento:  $TEC = (LnPf - LnPi) * 100 / t$ .

Índice de eficiencia alimentaria  $IEA = (Pf - Pi) * 100 / I$ ;

Índice de conversión:  $IC = I / (Pf - Pi)$ ;

donde Pf = peso final en g; Pi = peso inicial en g; PM = peso medio en g; t = tiempo en días; I= ingesta en g (alimento suministrado-(alimento recogido x FC)).

El crecimiento y los parámetros nutritivos fueron analizados mediante un ANOVA one-way, y la prueba de Newman-Keuls se utilizó para evaluar las diferencias específicas entre los piensos con niveles de significación de  $p < 0,05$  (Statgraphics, Statistical Graphics System, Version Plus 5.1, Herndon, Virginia, USA).

### 4.1.3 RESULTADOS

A lo largo del ensayo se produjeron 3 bajas (2 en el grupo MY y 1 en el grupo MYG) por intentos de fuga, reduciendo el número de individuos a 6 por cada tratamiento.

El pienso MYG mostró una disgregación despreciable (0,7 %) tras 4 horas sumergido en agua, frente al 12,2 % de disgregación que



mostró el pienso YM. Los factores de corrección (FC) fueron de 0,7094 ( $\pm 0,0008$ ) y 0,8921 ( $\pm 0,0049$ ) para los piensos MYG y YM, respectivamente.

El consumo diario del pienso YM (Tabla 3) fue similar al del pienso MYG, siendo 4,34 y 3,94 g/día respectivamente y la eficiencia alimentaria del pienso MYG fue mayor que la del pienso YM (83,9 % frente a 50,7 %). Así, los resultados de crecimiento fueron superiores en el caso del pienso realizado con gelatina, posiblemente debido a la composición nutricional de los dos piensos (45 %PB de MYG respecto a 24,2 %PB de MY) o a la mayor estabilidad del mismo.

**Tabla 3.** Parámetros de crecimiento de los pulpos alimentados con los dos piensos experimentales.

	YM	MYG
IP (g)	33,58 $\pm$ 5,39	50,25 $\pm$ 6,61
TAA (g/día)	4,34 $\pm$ 0,31	3,94 $\pm$ 0,38
TAR (%/día)	0,70 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,05
TCA (g/día)	2,24 $\pm$ 0,63	3,35 $\pm$ 0,44
TEC (%/día)	0,35 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,57 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
IEA (%)	50,74 $\pm$ 5,92 <sup>a</sup>	83,9 $\pm$ 7,25 <sup>b</sup>
IC	2,15 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	1,22 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>

Valores (n = 6, media  $\pm$  ES). IP, incremento de peso; TAA, tasa de alimentación absoluta; TAR, tasa de alimentación relativa; TCA, tasa de crecimiento absoluta; TEC, tasa específica de crecimiento; IEA, índice de eficiencia alimentaria; IC, índice de conversión.

Todos los resultados anteriores sugieren que el uso combinado de yema de huevo (como atrayente) y la gelatina (como aglutinante) en dietas artificiales para *O. vulgaris*, puede ser una buena base para formular y producir piensos secos más nutritivos y complejos en un futuro próximo. Los resultados también muestran que es posible preparar piensos extrusionados para el pulpo, lo que sería en última instancia beneficiosa para reducir los costes de alimentación y producción de esta especie y para mejorar la sostenibilidad.



Inclusión de harina de pescado y krill en dietas extrusionadas: ensayo de aceptación.

## PUBLICACIÓN II:

Inclusion of fish and krill meal in extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): assessment of acceptance.

P. Querol, P. S. Morillo-Velarde, J. Cerezo Valverde,  
S. Martinez-Llorens, A. V. Moñino, M. Jover & A. Tomás (2012b)

*Aquaculture Research* doi:10.1111/are12093

#### 4.2.1 INTRODUCCIÓN

La harina de pescado se utiliza en los piensos para peces debido a su alto nivel proteico (más de 60 %), con el fin de lograr un contenido de proteína en la dieta de alrededor de 35 - 55 % (Tacon & Cowey, 1985). El 83 % (peso seco) de la composición corporal de *O. vulgaris* es proteína, lo que da más importancia si cabe a la inclusión de ingredientes proteicos en las dietas para obtener tasas de crecimiento adecuadas y también debido a la baja digestibilidad de los lípidos que presentan los cefalópodos (O ' Dor *et al.*, 1984; Mazón *et al.*, 2007).

Un pienso debe ser atractivo y palatable para el pulpo, y esto se puede lograr mediante el uso de materias primas similares a los alimentos que ingieren durante su vida salvaje (por ejemplo, pequeños peces, moluscos bivalvos y crustáceos). Además, la harina de krill es uno de los atrayentes más utilizados en la realización de piensos de peces, debido a su alta palatabilidad y su alto nivel proteico (65,9 a 72,9 %) (Yoshitomi, 2004; Liu *et al.*, 2011). Todas estas razones sugieren que el uso combinado de harinas de pescado y de krill como ingredientes proteicos en la nutrición del pulpo es suficientemente razonable.

Por ello, en el presente trabajo se estudia la inclusión de harina de pescado y harina de krill en piensos extrusionados para pulpos con el fin de mejorar su crecimiento.

### 4.2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

La prueba se realizó en las instalaciones del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) en Murcia (España), con 23 pulpos (*O. vulgaris*) de un peso promedio inicial de  $580 \pm 123$  g, quienes fueron capturados en el mar Mediterráneo y alojados en un sistema de recirculación de agua de mar. Se utilizaron dos sistemas diferentes de alojamiento; catorce pulpos se ubicaron en tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 93 l de volumen, donde se probaron dos dietas artificiales diferentes en 2 grupos de 7 animales: el pienso K (harina de krill) y el pienso FM (harina de pescado). Además, nueve acuarios de vidrio de 165 l de volumen se utilizaron para probar el pienso FMK (que contenían tanto harina de pescado como harina de krill). Ambos sistemas tenían las mismas condiciones de luz artificial (de 8:00 h a 14:00 h) y todos los pulpos tuvieron un tubo de PVC como un refugio.

Previo al comienzo de la prueba hubo un periodo de 5 días de adaptación a las condiciones de la instalación, durante los cuales fueron alimentados con boga y sardina. La temperatura del agua fue de  $18,4 \pm 0,9$  °C y la concentración de oxígeno fue de  $6,8 \pm 0,5$  mg/l.

Los piensos experimentales K, FM y FMK, fueron fabricados con un diámetro de 1 cm y longitudes de 4 - 5 cm, en el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València, utilizando un extrusor semi-industrial Cleextral FC45. Los piensos contenían diferentes proporciones de harinas de pescado y de krill

con el objetivo de estudiar su aceptación, mejorar la composición nutricional y aumentar los crecimientos (Tabla 4).

La composición de los piensos fue realizada en base a los piensos experimentales probados en la prueba anterior (Cap.4.1), utilizando yema como un atrayente y maltodextrina y gelatina como aglutinantes. Los tres piensos probados en este ensayo fueron iso-proteicos (48 %PB) y también iso-lipídicos (aproximadamente 13 %GB).

**Tabla 4.** Formulación y composición proximal de los piensos experimentales.

	FM	K	FMK
<b>Ingredientes (%)</b>			
Yema de huevo	30	30	30
Gelatina	30	300	30
Maltodextrina	20	20	20
Harina de pescado	20	0	10
Harina de Krill	0	20	10
<b>Composición proximal (% materia seca)</b>			
Humedad (%)	15,2	17,1	20,7
Proteína Bruta (%)	57,8	55,5	60,2
Grasa Bruta (%)	15,3	16,5	16,3
Cenizas (%)	4,4	2,9	4,1

Yema de huevo: yema de huevo pasteurizada (IGRECA SAS), Gelatina: PILARICA S.A., Maltodextrina: PRAL S.A., Harina de pescado: COCERVA S.C., Harina de krill: AKER SEAFOODS ANTARCTIC S.A..



El ensayo se llevó a cabo durante dos semanas, donde los pulpos fueron alimentados diariamente a las 9:00 h, con 1 - 2 % de su peso corporal, y a las 13:00 h, el alimento no consumido se retiró y pesó para poder calcular la ingesta diaria. Se aplicó a los datos un factor de corrección de la desintegración y la ganancia en humedad (FC) de los piensos, de acuerdo con Cerezo Valverde *et al.* (2008).

El crecimiento y los parámetros nutritivos fueron analizados mediante un ANOVA one-way y la prueba de Newman-Keuls se utilizó para evaluar las diferencias específicas entre los piensos con niveles de significación de  $p < 0,05$  (Statgraphics, Statistical Graphics System, Version Plus 5.1, Herndon, Virginia, USA).

### 4.2.3 RESULTADOS

Los piensos mostraron niveles de disgregación insignificantes (0,9 % en el caso de FMK) o muy bajos (3,32 y 4,25 % para los piensos K y FM, respectivamente) después de 4 horas en agua. Esto indica una buena estabilidad, con factores de corrección (FC) de 0,7509 ( $\pm 0,0055$ ) para el pienso FM, 0,7333 ( $\pm 0,0054$ ) para el pienso K y 0,7126 ( $\pm 0,0162$ ) para el pienso FMK.

Respecto a la aceptación de los piensos, la del pienso K fue peor que los demás, ya que sólo tres de los siete animales presentaron una ingesta diaria regular, provocando una variación negativa de la biomasa viva (-10,5 g), en oposición al aumento observado en los piensos FM y FMK (254 y 357 g, respectivamente). Lo que indica

que el uso de krill generó rechazo por parte del pulpo, aunque esto no fue así cuando se mezcló con harina de pescado.

El valor promedio del incremento de peso (IP) obtenido por los tres piensos fue de 54 g, 9,3 % de aumento con respecto al peso inicial, donde destacan los valores correspondientes al pienso FMK (59 g, aumento de 10 % del peso inicial) los cuales son ligeramente superiores (Tabla 5).

**Tabla 5.** Parámetros de crecimiento de los pulpos alimentados con los piensos experimentales.

	FM	K	FMK
IP (g)	50,90 ± 15,90	52,33 ± 20,53	59,00 ± 13,44
TAA(g/día)	3,30 ± 0,39	3,10 ± 0,51	3,84 ± 0,33
TAR (%/día)	0,54 ± 0,04	0,58 ± 0,06	0,62 ± 0,04
TCA (g/día)	3,63 ± 1,13	3,74 ± 1,46	4,21 ± 0,96
TEC (%/día)	0,52 ± 0,14	0,67 ± 0,18	0,66 ± 0,12
IEA (%)	101 ± 23,80	116 ± 30,72	106 ± 20,11
IC	1,38 ± 0,33	0,95 ± 0,42	1,17 ± 0,27

Los datos del grupo K corresponden a los pulpos que aceptaron el pienso. Valores (FM (n = 7), K (n = 3), FMK (n = 9); media ± ES) IP, incremento de peso; TAA, tasa de alimentación absoluta; TAR, tasa de alimentación relativa; TCA, tasa de crecimiento absoluta; TEC, tasa específica de crecimiento; IEA, índice de eficiencia alimentaria; IC, índice de conversión.

El índice de conversión (IC) de todos los piensos estudiados fue bueno y osciló entre 1,4 - 0,9, demostrando la gran eficiencia de las dietas secas en la alimentación del pulpo.

El presente ensayo ha manifestado que el krill afecta a la aceptación del pienso pudiendo generar rechazo. El uso de yema de huevo y

harina de pescado contribuyó de alguna manera a camuflar el efecto negativo del krill en la aceptación del pulpo, ya que se observó un aumento en la ingesta diaria (TAA) y el crecimiento diario (TCA) cuando se utilizaron conjuntamente estas materias. Estos resultados se pueden aplicar a la selección de los ingredientes para formular futuros piensos secos, los cuales combinen una estabilidad en el agua y buenos crecimientos, con adecuados perfiles nutricionales y una buena aceptación.

## 5. PRUEBAS DE ENGORDE Y OPTIMIZACIÓN



Estudio del crecimiento y la eficiencia  
alimentaria de *Octopus vulgaris* con  
piensos secos.

### PUBLICACIÓN III:

Growth and feed efficiency of *Octopus vulgaris* fed on dry pelleted.

P. Querol, I. Gairin, G. Guerao, M. Jover & A. Tomás (2013)

*Aquaculture Research* doi:10.1111/are.12269

### 5.1.1 INTRODUCCIÓN

La investigación actual para mejorar el crecimiento del pulpo con dietas artificiales se centra en dos objetivos: encontrar potenciadores del sabor, con el fin de evitar rechazos (Cerezo Valverde *et al.*, 2008) y cubrir las altas necesidades proteicas (balance de aminoácidos) especialmente relevantes, ya que los pulpos son animales exclusivamente carnívoros y utilizan este nutriente tanto como fuente de energía, como para la creación de tejidos (George-Zamora *et al.*, 2011; Cerezo Valverde *et al.*, 2013).

El tipo de alimento natural que el pulpo ingiere durante su vida salvaje se ha incorporado a las dietas artificiales en diferentes formatos, con el objetivo de evitar rechazos y hacer las dietas más atractivas para el pulpo. Se han desarrollado estudios en esta línea incorporando, calamar (*Loligo gahi*) (García *et al.*, 2010; Quintana *et al.*, 2008), (*Lolliguncula brevis*) (Rosas *et al.*, 2007), boga (Cerezo Valverde *et al.*, 2008), camarón (*Palaemonetes varians*) (Quintana *et al.*, 2008) o gambas (*Hymenopenaeus muelleri*) (Cerezo Valverde *et al.*, 2008).

Por otra parte, estudios muy recientes han evaluado la eficacia de la yema de huevo como atrayente, tanto en piensos semi-húmedos, con un 54 % de aumento del peso inicial en 42 días (Morillo-Velarde *et al.* (2012a), como en piensos secos (Cap. 4.1 y 4.2), donde se vio la buena aceptación lograda gracias a la yema de huevo.



Con el fin de continuar con el desarrollo de los piensos extrusionados, con una formulación adecuada para el pienso (Cap. 4.1 y 4.2) que evita la disgregación durante la ingesta (García García & Cerezo Valverde, 2006; Fiorito & Gherardi, 1999), junto con una textura adecuada gracias al uso conjunto de maltodextrina y gelatina (Cap. 4.1), y vista la escasa aceptación de los piensos realizados sólo con krill como fuente proteica y el buen crecimiento producido por el pienso que mezclaba harina de pescado y harina de krill sin reducir la aceptación (Cap. 4.2), el siguiente paso consistirá en mejorar la formulación de los piensos extrusionados. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio será evaluar si el aumento de la inclusión de harina de pescado con respecto a la harina de krill, produce mejores resultados que un pienso con las mismas proporciones de dichas harinas.

### 5.1.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares de pulpo (*O. vulgaris*) fueron capturados cerca de la bahía de los Alfacs, en el Delta del Ebro, España, durante abril de 2011. Se alojaron en el sistema abierto de agua de mar del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). En la fase de aclimatación a las condiciones del laboratorio, fueron alimentados con múgil y cangrejo (*L. depurator*) durante 10 días antes del comienzo de la prueba. Dieciocho pulpos con un peso similar ( $955,8 \pm 85,5$  g) fueron seleccionados para la prueba.

Se probaron dos piensos extrusionados (3FMK y FMK) realizados con maltodextrina, gelatina, yema de huevo, harina de pescado y

krill. La diferencia entre los piensos fue la relación entre la harina de pescado y la harina de krill, el pienso 3FMK contenía el triple de harina de pescado que el pienso FMK.

Según los resultados de algunos autores, la taurina es particularmente alta en los tejidos de pulpo, con valores de 64 a 75 g AA / kg proteína en *O. vulgaris* (Cerezo Valverde *et al.*, 2013) y de 65 a 80 g AA / kg proteína en *O. maya* (George-Zamora *et al.*, 2011). Por ello, y con el fin de promover el crecimiento muscular, ambas formulaciones contenían un 2 % de taurina (Tabla 6).

**Tabla 6.** Composición (%) de las dietas experimentales.

	FMK	3FMK
Yema de huevo	29,4	29,4
Gelatina	29,4	19,6
Maltodextrina	19,6	9,8
Harina de pescado	9,8	29,4
Harina de krill	9,8	9,8
Taurina	2	2

Yema de huevo: yema de huevo pasteurizada (IGRECA SAS), Gelatina: PILARICA S.A., Maltodextrina: PRAL S.A., Harina de pescado: COCERVA S.C., Harina de krill: AKER SEAFOODS ANTARCTIC S.A., Taurina: Sigma-Aldrich logistik.

Los piensos tenían un diámetro de 1 cm y 4 - 5 cm de longitud, y se fabricaron utilizando un extrusor semi-industrial; Clextral FC45 en el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València.

Al otro grupo de pulpos se le aportó alimento natural congelado (dieta control), el cual consistía en mújil y cangrejo (*L. depurator*).

Los pulpos fueron separados en 3 grupos, 6 para cada dieta, y se alojaron en tanques de fibra de vidrio individuales de 300 l de volumen. Cada uno contenía un tubo de PVC como refugio. La temperatura del agua fue de  $19,2 \pm 1,3$  °C, el caudal (600 l/h) fue constante para mantener el oxígeno disuelto en  $6,9 \pm 0,4$  mg/l y la salinidad a 37 ‰.

Durante las 6 semanas que duró la prueba, los pulpos que consumían los piensos extrusionados fueron alimentados diariamente a las 09:00 h, con una tasa de alimentación del 1 - 2 % de su peso corporal, y los pulpos que comían alimento natural fueron alimentados con una tasa del 10 % de su peso corporal en el caso del mújil y con una del 15 % en el caso del cangrejo. El alimento no consumido se recogió a las 13:00 h, se secó y se pesó, para calcular la ingesta diaria real. Se realizaron muestreos de peso cada 14 días para controlar su crecimiento.

La composición proximal (humedad, proteína bruta, grasa bruta y cenizas) de los piensos y los pulpos (glándula digestiva (GD) y músculo) se analizó al inicio de la prueba, y de otros tres ejemplares de cada grupo al final de la misma.

Para la composición de la dieta control se analizaron por separado el pescado entero y el cangrejo sin carcasa, y el valor final se basó en la cantidad de días que se alimentó con cada tipo de alimento.

La glándula digestiva se extrajo y se homogeneizó, y los tentáculos (músculo) fueron cortados y triturados en trozos pequeños hasta que se obtuvo una muestra homogénea.

Piensos, glándulas digestivas y músculo se analizaron de acuerdo a los procedimientos de la AOAC (1997). La humedad se determinó mediante el secado de la muestra en una estufa a 105 °C hasta peso constante, las cenizas se obtuvieron por incineración en un horno mufla a 550 °C hasta peso constante, la proteína bruta (N x 6,25) por el método de Kjeldahl después de una digestión ácida (Kjeltec 2300 Analizador automático, Tecator Höganäs, Suecia) y el contenido en grasa bruta se extrajo con dietiléter (1043 Soxtec unidad de extracción, Tecator).

Se calculó la ingesta real de cada alimento, tras aplicar a los datos un factor de corrección (FC) de acuerdo con Cerezo Valverde *et al.* (2008).

El crecimiento y los parámetros nutritivos fueron analizados mediante un ANOVA one-way y el test de Newman-Keuls se utilizó para evaluar las diferencias específicas entre los piensos con un nivel de significación de  $p < 0,05$  (Statgraphics, Statistical Graphics System, Version Plus 5.1, Herndon, Virginia, USA).

### 5.1.3 RESULTADOS

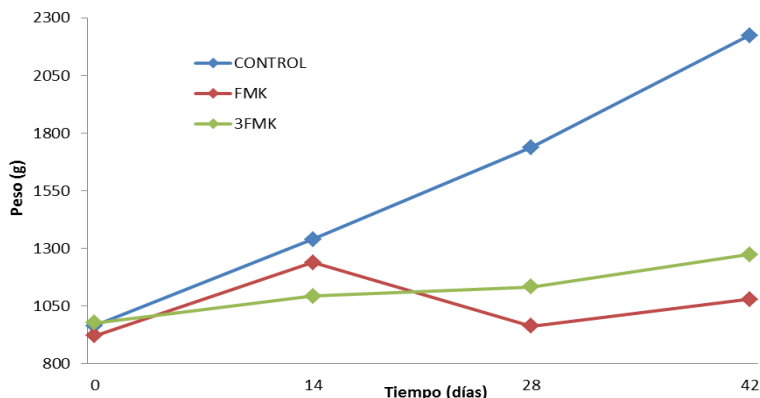
La composición nutricional de los piensos se puede ver en la Tabla 7. Los dos piensos extrusionados presentaron una humedad similar (3FMK de 12,6 % y FMK de 15 %) y elevado contenido de proteína bruta (55 y 58 %, en peso seco), similares a los del alimento control (57,2 %). Por otro lado, ambos piensos presentaron mayor contenido en grasa bruta que la dieta control, 15 y 21 % frente a 10 %.

**Tabla 7.** Composición nutricional de las dietas experimentales (% materia seca).

	CONTROL	FMK	3FMK
Humedad (%)	78,2	15,0	12,6
Proteína bruta (%)	57,2	55,3	58,7
Grasa bruta (%)	11,0	15,0	21,7
Cenizas (%)	18,3	4,1	6,8

Los piensos FMK y 3FMK mostraron una gran cohesión y estabilidad con porcentajes de disgregación muy bajos en las pruebas realizadas, siendo éstos de 5,47 % y 4,17 % de su peso seco inicial después de 4 horas sumergidos en agua.

La tasa de supervivencia después de la prueba fue del 83 % (la mortalidad se debió a escapes) y se observó una buena aceptación aparente de ambos piensos por parte de los pulpos. La dieta control presentó un incremento de peso notablemente más alto (1.258 g) que los piensos experimentales (158 g con FMK y 296 g con 3FMK, Fig. 19).



**Figura 19.** Evolución de los pesos de los distintos grupos.

El hecho de que el pienso 3FMK presentara prácticamente el doble de crecimiento que el pienso FMK se podría explicar por el mayor consumo observado (Tabla 8, TAA = 9,15 g/día respecto a 7,85 g/día; TAR= 0,81 % respecto al 0,78 %).

**Tabla 8.** Parámetros nutricionales y de crecimiento para cada grupo experimental.

	CONTROL	FMK	3FMK
IP (g)	1258 ± 216,84 <sup>b</sup>	158 ± 63,89 <sup>a</sup>	296 ± 97,92 <sup>a</sup>
TCA (g/día)	29,95 ± 5,16 <sup>b</sup>	3,76 ± 1,52 <sup>a</sup>	7,05 ± 2,33 <sup>a</sup>
TEC (%/día)	1,98 ± 0,27 <sup>b</sup>	0,37 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,21 <sup>a</sup>
TAA(g/día)	132,8 ± 9,19 <sup>b</sup>	7,9 ± 1,30 <sup>a</sup>	9,2 ± 2,35 <sup>a</sup>
TAR (%/día)	8,35 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,18 <sup>a</sup>
IEA(%)	22,5 ± 3,03 <sup>a</sup>	47,0 ± 15,5 <sup>b</sup>	77,7 ± 22,46 <sup>c</sup>
IGD (%)	6,35 ± 1,17	5,36 ± 0,96	5,56 ± 1,51

Valores (n = 5); media ± ES). IP, incremento de peso; TCA, tasa de crecimiento absoluta; TEC, tasa específica de crecimiento; TAA, tasa de alimentación absoluta; TAR, tasa de alimentación relativa; IEA, índice de eficiencia alimentaria; IGD, índice de la glándula digestiva.

La mayor ingesta de los pulpos alimentados con el pienso 3FMK, propició un TEC más elevado (0,63 %/día), traducándose este en un aumento del 31 % sobre el peso inicial en 42 días. De igual modo la eficiencia alimentaria fue casi el doble para el pienso 3FMK, siendo esta de 77,6 % frente a 47 % del pienso FMK.

Respecto a los parámetros biométricos, no hubo diferencias significativas en los valores de IGD entre los pulpos alimentados con los piensos extrusionados y el grupo control (Tabla 8).

El análisis de la composición proximal de los pulpos (Tabla 9) mostró que los alimentados con piensos secos presentaron un porcentaje de proteína y lípidos en el músculo similar a los observados en el grupo control e inicial. El porcentaje de humedad, proteína y cenizas en la glándula digestiva (GD) de los grupos 3FMK y FMK, fue significativamente menor que en el control ( $P < 0,05$ ). Otra diferencia relevante, pero no significativa se observó en el nivel de grasa bruta de la glándula digestiva, el cual fue considerablemente mayor en los pulpos alimentados con piensos extrusionados que en los alimentados con la dieta de control.

**Tabla 9.** Composición del músculo y de la glándula digestiva de los pulpos alimentados con las dietas experimentales (%en húmedo).

	Inicial	CONTROL	FMK	3FMK
<b>Músculo</b>				
Humedad (%)	81,40	82,02 ± 1,18	84,10 ± 1,59	82,66 ± 1,38
Proteína bruta (%)	15,71	15,24 ± 1,02	12,65 ± 1,50	13,52 ± 1,26
Grasa bruta (%)	0,14	0,21 ± 0,16	0,31 ± 0,03	0,25 ± 0,12
Cenizas (%)	2,20	1,79 ± 0,13	1,46 ± 0,32	1,4 ± 0,23
<b>GD</b>				
Humedad (%)	70,26	63,72 ± 2,76 <sup>b</sup>	59,99 ± 1,19 <sup>ab</sup>	57,56 ± 1,21 <sup>a</sup>
Proteína bruta (%)	18,74	19,98 ± 1,06 <sup>b</sup>	15,57 ± 0,85 <sup>a</sup>	16,88 ± 0,92 <sup>a</sup>
Grasa bruta (%)	2,09	1,81 ± 0,18	5,61 ± 1,75	3,78 ± 1,31
Cenizas (%)	2,20	4,22 ± 1,05 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,10 <sup>a</sup>

(Los valores presentado en la tabla son la media ±ES, n=3).Valores en la misma línea con diferente superíndice son significativos. GD, glándula digestiva.

El presente estudio mostró que es posible realizar un engorde de pulpos con piensos secos extrusionados durante un periodo prolongado de tiempo, mostrando resultados de crecimiento que se acercan a los obtenidos por dietas húmedas y semi-húmedas.

A pesar de que los piensos secos muestran cualidades favorables para una producción industrial de la especie, es necesario optimizar la composición de éstos, así como aumentar las ingestas, para acercarse a los resultados de crecimiento deseados.





Efecto de la inclusión de harina de calamar en  
piensos extrusionados para pulpo  
(*O. vulgaris*).

## PUBLICACIÓN IV:

Effect of two extruded diets with different fish and squid meal ratio on growth, digestibility and body composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797).

P. Querol, I. Gairin, G. Guerao, R. Monge, M. Jover & A. Tomás

*Aquaculture Research* doi:10.1111/are.12407

### 5.2.1 INTRODUCCIÓN

En las pruebas anteriores (Cap. 4.2 y 5.1) se ha podido ver cómo la mezcla de las fuentes proteicas harina de pescado y harina de krill proporcionaba buenos resultados de crecimiento, sin embargo la harina de krill como ingrediente proteico principal en la composición del pienso no aporta tan buenos resultados, cuando aparece (Cap. 4.2). Por ello, hay que buscar otras fuentes proteicas que agraden más al pulpo, como podría ser la harina de calamar.

Mientras que la harina de pescado es la principal fuente de proteína por excelencia en la acuicultura, la harina de calamar presenta un alto contenido en proteína y un buen balance de aminoácidos, más específicamente, contiene altas cantidades de arginina, el cual es uno de los aminoácidos esenciales más limitante para la alimentación de los cefalópodos, ya que es deficiente en las materias primas más comúnmente utilizadas en la fabricación de piensos marinos (Cerezo Valverde *et al.*, 2013). La inclusión de pota en dietas semi-húmedas para *O. vulgaris* se tradujo produjo altos crecimientos, 400 g en 42 días (Morillo-Velarde *et al.*, 2012a).

Así, el presente estudio evalúa el efecto de la inclusión de harina de calamar en diferentes proporciones en dos piensos, sobre el crecimiento, la digestibilidad y la composición corporal del pulpo (*O. vulgaris*).

### 5.2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Los pulpos (*O. vulgaris*) fueron capturados durante la primavera de 2012, en la bahía dels Alfacs del Delta del Ebro y fueron trasladados a un sistema de agua de mar abierto en las instalaciones del IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria) en Tarragona (España). Durante el periodo de aclimatación (10 días) los ejemplares fueron alimentados con cangrejo (*C. mediterraneus*) y no se observó mortalidad.

Dieciocho ejemplares distribuidos en tres grupos (seis por grupo) fueron colocados en tanques rectangulares de fibra de vidrio de 300 l, los cuales contenían tubos de PVC como refugios. La temperatura del agua fue de  $20,3 \pm 1,2$  °C, y el flujo de agua (600 l/h) fue constante para mantener el oxígeno disuelto en  $7,1 \pm 0,3$  mg/l y la salinidad a 37 ‰. Dos grupos fueron alimentados con piensos experimentales, FMS y 3FMS, y el grupo de control se alimentó 4 días con cangrejo (*C. mediterraneus*) y 2 días con boga. Durante los 28 días que duró la prueba, los pulpos se alimentaron diariamente (de lunes a sábado) con los piensos artificiales a las 9:00 h y a las 15:00 h, y el alimento no consumido era recogido a las 13:00 h y las 19:00 h. El hecho de que la cantidad diaria de alimento se dividiera en dos tomas, fue para evitar que los pulpos sólo prestaran atención a uno de los dos pellets, ya que si el pulpo no coge la comida cuando es administrada, ya no la consume. De este modo se aseguró que el pulpo capturara toda la dosis diaria. El grupo de control se alimentó sólo una vez al día, a las 9:00 h.

Los pulpos se pesaron individualmente cada 14 días. Durante los últimos 10 días del experimento se recolectaron las heces de los tres tratamientos con un salabre y tras la eliminación del agua, se congelaron hasta que se realizó el análisis.

Los piensos extrusionados eran pellets cilíndricos (1 cm de diámetro y 4 - 5 cm de longitud) preparados en el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València, utilizando un extrusor semi-industrial; Clextral FC45. La diferencia de composición entre las dos piensos fue la relación entre la harina de pescado y la harina de calamar: el pienso 3FMS contenía el triple de harina de pescado que de calamar, mientras que el pienso FMS contenía el mismo porcentaje de ambas harinas. (Tabla 10).

**Tabla 10.** Composición (%) de las dietas experimentales.

	FMS	3FMS
Yema de huevo	29,4	29,4
Gelatina	19,6	19,6
Maltodextrina	9,8	9,8
Harina de pescado	19,6	29,4
Harina de calamar	19,6	9,8
Taurina	2	2

Yema de huevo: yema de huevo pasteurizada (IGRECA SAS), Gelatina: PILARICA S.A., Maltodextrina: PRAL S.A., Harina de pescado: COCERVA S.C., Harina de calamar: Max Nollert®, Taurina: Sigma-Aldrich logistik.

Al igual que en capítulo anterior (Cap. 5.1), y con el fin de promover el crecimiento muscular, ambas formulaciones contenían 2 % de taurina.

El uso harina de pescado y de calamar en los piensos, además de ser una fuente de proteína animal ampliamente utilizada en la acuicultura, es rica en los aminoácidos presentes en la carne del pulpo (Villanueva *et al.*, 2004; Cerezo Valverde *et al.*, 2013). La arginina, lisina y leucina son los principales aminoácidos esenciales en los cefalópodos, y los principales aminoácidos no esenciales, la glutamina y el aspartato (Tabla 11), los cuales están en nivel adecuado en la harina de pescado y calamar. La composición de aminoácidos de las materias primas en la dieta control (la boga y cangrejo), están incluidos en la misma Tabla.

**Tabla 11.** Contenido en aminoácidos de las materias primas (g de AA /100 g de muestra(materia seca)).

	Harina pescado	Harina calamar	Cangrejo	Boga
<b>Esenciales</b>				
Arginina	5,86	6,62	5,88	7,35
Histidina	4,95	1,27	1,41	2,77
Isoleucina	3,40	1,47	1,82	3,88
Leucina	6,55	3,42	3,04	7,06
Lisina	6,01	2,80	3,32	8,80
Metionina	2,30	0,90	0,87	2,46
Fenilalanina	3,73	1,88	1,94	2,98
Treonina	3,55	1,85	2,29	4,19
Valina	3,88	2,17	2,11	4,42
<b>No esenciales</b>				
Alanina	4,32	4,63	2,88	5,51
Aspartato	6,97	4,01	4,55	10,11
Cisteina	0,56	3,42	1,22	2,48
Glicina	1,02	10,73	2,85	4,51
Glutamina	9,99	9,08	6,03	14,61
Prolina	2,87	5,14	2,52	3,01
Serina	3,41	2,30	2,01	4,22
Tirosina	2,67	1,07	1,88	2,58

Harina de pescado: COCERVA S.C., Harina de calamar: Max Nollert®, Cangrejo: *Carcinus mediterraneus*, Boga: *Boops boops*.

En cuanto a la composición nutritiva de los piensos extrusionados, fue de un 60% en proteína bruta y en torno al 21 % grasa bruta en materia seca (Tabla 12). La composición nutricional de la dieta



control se calculó de acuerdo a la proporción suministrada de cangrejo y el pescado y consistió en un 70 % de proteína bruta y un 12 % de grasa bruta.

**Tabla 12.** Composición en macronutrientes de las dietas (% materia seca).

	CONTROL	FMS	3FMS
Humedad (%)	76,5	18,6	13,4
Proteína bruta (%)	71,1	60,8	61,5
Grasa bruta (%)	12,8	20,1	21,4
Cenizas (%)	15,3	7,0	6,3

Al final de la prueba de alimentación la mitad de los pulpos de cada grupo fueron analizados enteros, y de la otra mitad se analizaron por separado músculo y glándula digestiva. La glándula digestiva se extrajo y se homogenizó, los brazos (músculo) y los pulpos enteros, fueron troceados y mezclados hasta lograr muestras homogéneas.

Los piensos, glándulas digestivas, tentáculos y pulpos enteros fueron analizados de acuerdo con la metodología de la AOAC (1997). Procedimientos: materia seca (105 °C hasta peso constante), cenizas (incinerados a 550 °C hasta peso constante), proteína bruta (N x 6.25) por el método de Kjeldahl después de una digestión ácida (Kjeltec 2300 Auto Analyser, Tecator Höganäs, Suecia) y la grasa bruta se extrajo con dietiléter (unidad de extracción Soxtec 1043, Tecator).

El coeficiente de digestibilidad aparente de los dos piensos artificiales se determinó por el método Cenizas insolubles en ácido (Atkinson *et*

*al.*, 1984), a partir del estudio del pienso y de las heces recogidas durante la prueba con un salabre, las cuales una vez secas fueron congeladas hasta el análisis.

El perfil de aminoácidos de las principales materias primas y los piensos, se analizó de acuerdo con Bosch *et al.* (2006), utilizando un sistema de HPLC Waters (Waters 474, Waters, Milford, MA, EE.UU.) que consta de dos bombas (Modelo 515, Waters), un auto muestreador (Modelo 717, Waters), un detector de fluorescencia (Modelo 474, Waters) y un módulo de control de la temperatura. El ácido aminobutírico fue añadido como patrón estándar interno antes de la hidrólisis. Los aminoácidos fueron derivatizados con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo carbamato (AQC). La metionina y la cisteína se determinaron por separado como metionina sulfona y ácido cisteico después de la oxidación con ácido perfórmico. Los aminoácidos se separaron con una columna de fase inversa C-18 (Waters Acc. Tag 150 mm x 3,9 mm) y luego se transformaron en metionina y cisteína.

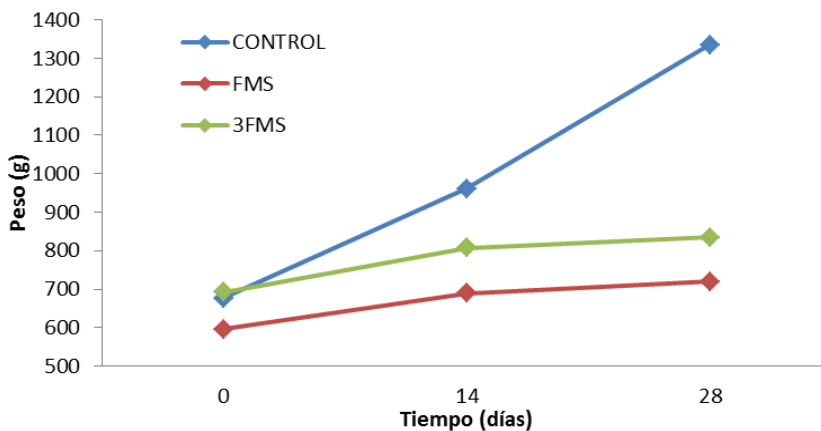
La ingesta real se estimó después de aplicar un factor de corrección (FC), de acuerdo con Cerezo Valverde *et al.* (2008).

El crecimiento y los parámetros nutritivos fueron analizados mediante un ANOVA one-way y la prueba de Newman-Keuls se utilizó para evaluar las diferencias específicas entre los piensos con niveles de significación de  $p < 0,05$  (Statgraphics, Statistical Graphics System, Version Plus 5.1, Herndon, Virginia, USA).

## 5.2.3 RESULTADOS

El presente ensayo se limitó a 28 días debido a un notable e inesperado incremento en la temperatura del agua de la bahía (24 °C) que provocó una caída importante en la ingesta.

La Figura 20 muestra la evolución de los pesos de los pulpos alimentados con los tres tratamientos. Los animales alimentados con piensos extrusionados presentan comportamientos similares, mientras que el crecimiento del grupo de control fue mucho más alto (659 frente a 124 y 143 g).



**Figura 20.** Evolución del peso de los pulpos a lo largo de la prueba.

La tasa específica de crecimiento obtenida con ambos piensos fue idéntica (0,69 %/día). Y mientras que la ingesta fue superior en el caso del pienso FMS (7,3 frente a 6,3 g/día), el índice de eficiencia del alimento fue más elevado en el caso del pienso 3FMS (76,9

frente a 62,9), lo que provocó que ambos parámetros se compensasen produciendo idénticos TEC (Tabla 13).

El grupo control presento una mayor ingesta de alimento diario (47,4 g/día), siendo la ingesta de proteica diaria de 7 g/día, duplicando la de los grupos FMS y 3FMS, lo que pudo limitar el crecimiento de éstos. La cantidad de ingesta de lípidos de los tres grupos fue muy similar, entre 1,1 - 1,5 g/día.

**Tabla 13.** Parámetros nutricionales y de crecimiento para cada grupo experimental.

	CONTROL	FMS	3FMS
IP (g)	659 ± 104,28 <sub>b</sub>	124 ± 19,31 <sup>a</sup>	143 ± 102,75 <sup>a</sup>
TCA (g/día)	23,54 ± 3,72 <sup>b</sup>	4,41 ± 0,96 <sup>a</sup>	5,09 ± 3,67 <sup>a</sup>
TEC (%/día)	2,53 ± 0,63 <sup>b</sup>	0,69 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,42 <sup>a</sup>
TAA(g/día)	47,4 ± 10,71 <sup>b</sup>	7,3 ± 1,69 <sup>a</sup>	6,3 ± 2,40 <sup>a</sup>
TAR (%/día)	4,53 ± 0,29 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,15 <sup>a</sup>
IEA(%)	54,0 ± 15,24 <sup>a</sup>	62,9 ± 17,80 <sup>a</sup>	76,9 ± 43,72 <sup>a</sup>
IGD (%)	6,18 ± 0,51	5,33 ± 0,62	5,82 ± 0,61

(media ± ES, n= 6). IP, incremento de peso; TCA, tasa de crecimiento absoluta; TEC, tasa específica de crecimiento; TAA, tasa de alimentación absoluta; TAR, tasa de alimentación relativa; IEA, índice de eficiencia alimentaria; IGD, índice de la glándula digestiva.

El perfil de aminoácidos de los piensos extrusionados parece ser apropiado para los requisitos de pulpo, ya que el porcentaje de los principales aminoácidos esenciales (arginina, lisina y leucina) y aminoácidos no esenciales (glutamina y aspartato) fueron más elevados que los aportados por el alimento natural, (Tabla 14). Dado que la composición nutricional en cuanto a aminoácidos fue

adecuada, el bajo crecimiento comparado con el alimento natural se debió presumiblemente a un menor consumo general del alimento.

**Tabla14.** Contenido en aminoácidos de las distintas dietas (g de AA /100 g de muestra(materia húmeda)).

	CONTROL	FMS	3FMS
<b>Esenciales</b>			
Arginina	1,57	3,88	4,13
Histidina	0,34	1,34	1,84
Isoleucina	0,42	1,22	1,53
Leucina	0,81	2,49	3,03
Lisina	0,79	2,46	3,02
Metionina	0,22	0,78	0,99
Fenilalanina	0,48	1,48	1,81
Treonina	0,53	1,41	1,71
Valina	0,54	1,60	1,92
<b>No esenciales</b>			
Alanina	0,92	3,54	3,81
Aspartato	1,10	3,24	3,83
Cisteina	0,54	0,78	0,54
Glicina	1,56	6,73	6,26
Glutamina	1,85	5,59	6,16
Prolina	0,92	6,20	6,49
Serina	0,54	1,79	2,07
Tirosina	0,39	0,80	1,04

El efecto de los piensos en la composición corporal de los pulpos se puede ver en la Tabla 15. El contenido de humedad muscular fue de un 80 % sin diferencias significativas entre tratamientos. Los dos

piensos extrusionados mostraron una humedad en glándula digestiva similar, con valores significativamente más bajos que los del grupo control (61,7 % frente al 57,8 y el 59,5 % de FMS y 3FMS, respectivamente). Por otro lado, los pulpos alimentados con el pienso 3FMS presentaron contenidos de humedad más bajos.

La proteína del músculo varió del 14 al 17 %, la proteína de la glándula digestiva varió entre un 15 % y un 24 % y la de los pulpos enteros fue de 13 al 18 %, mostrando el grupo control diferencias estadísticas, con los valores más altos.

Los dos piensos artificiales fueron casi idénticos en términos de composición del músculo y la glándula digestiva, pero fueron significativamente diferentes en términos de pulpo entero.

Mientras que los tres tratamientos produjeron resultados similares de grasa en el músculo y en los pulpos enteros, los pulpos alimentados con los piensos artificiales presentaron niveles de lípidos considerablemente más altos en la glándula digestiva (20,8 y 19,4 % para el FMS y 3FMS, respectivamente), siendo prácticamente el doble del valor producido por el alimento natural (9,8 %).

En lo referente a la digestibilidad de las dietas, el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) de la materia seca fue ligeramente superior para el pienso 3FMS (89 % frente al 86,9 % del pienso FMS). No se pudo calcular el CDA para el grupo control debido a problemas en la conservación del alimento natural durante el transporte, pero ésta oscila alrededor del 95% (Mazón *et al.*, 2007).

**Tabla 15.** Composición proximal del músculo, la glándula digestiva y corporal de los pulpos alimentados con las dietas experimentales (% materia húmeda).

	CONTROL	FMS	3FMS
<b>Músculo</b>			
Humedad (%)	80,17 ± 0,34	81,52 ± 1,46	81,40 ± 0,94
Proteína bruta (%)	16,56 ± 0,39 <sup>a</sup>	14,76 ± 1,12 <sup>b</sup>	14,27 ± 0,25 <sup>b</sup>
Grasa bruta (%)	0,47 ± 0,09	0,50 ± 0,08	0,52 ± 0,22
Cenizas (%)	1,95 ± 0,09	2,22 ± 0,20	1,92 ± 0,09
<b>GD</b>			
Humedad (%)	61,70 ± 1,38 <sup>a</sup>	57,83 ± 0,50 <sup>b</sup>	59,50 ± 1,00 <sup>b</sup>
Proteína bruta (%)	23,77 ± 0,20 <sup>a</sup>	15,95 ± 1,55 <sup>b</sup>	16,20 ± 1,49 <sup>b</sup>
Grasa bruta (%)	9,81 ± 1,81 <sup>a</sup>	20,86 ± 2,04 <sup>b</sup>	19,36 ± 0,88 <sup>b</sup>
Cenizas (%)	1,63 ± 0,11	1,40 ± 0,14	1,46 ± 0,05
<b>Pulpo entero</b>			
Humedad (%)	78,36 ± 0,84 <sup>a</sup>	78,92 ± 1,04 <sup>a</sup>	82,15 ± 1,10 <sup>b</sup>
Proteína bruta (%)	17,54 ± 0,52 <sup>a</sup>	15,86 ± 0,28 <sup>b</sup>	13,80 ± 1,03 <sup>c</sup>
Grasa bruta (%)	1,33 ± 0,21	1,70 ± 0,42	0,99 ± 0,61
Cenizas (%)	2,01 ± 0,19	1,93 ± 0,14	1,74 ± 0,02

(Media ±ES, n=3) Valores en la misma línea con diferente superíndice presentan diferencias significativas.

Los resultados ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar mezclas de harina de pescado y harina de calamar en la fabricación de piensos secos para el pulpo. Los crecimientos de los pulpos alimentados con los piensos secos fueron considerables, presentando una buena aceptación y altos coeficientes de digestibilidad de la materia seca. Sin embargo se observó un

engrasamiento de la glándula digestiva, con respecto a los alimentados con la dieta natural.





Efecto del nivel de la yema de huevo en  
piensos extrusionados sobre el crecimiento y  
la composición corporal del pulpo  
(*O. vulgaris*).



### 5.3.1 INTRODUCCIÓN

En el anterior estudio de la presente tesis doctoral se observó cómo los piensos probados producían una buena aceptación, pero también un aumento excesivo de la cantidad de lípidos acumulados en la glándula digestiva (Cap. 5.2) lo cuales, dependiendo del tipo de los mismos, puede producir problemas en la aceptación y el crecimiento (Morillo-Velarde *et al.*, 2014), reduciendo el crecimiento. Los lípidos se acumulan principalmente en forma de triglicéridos y colesterol, quienes tienen un papel más estructural a nivel celular que como fuente de energía (Morillo-Velarde *et al.*, 2012b). Esto, unido al hecho de que el pulpo digiere mal los piensos con altos contenidos lipídicos (la yema de huevo tiene un nivel de grasa del 53 % en peso seco), y de que el alimento debe ser rico en proteína de alta calidad, se planteó la presente prueba, donde se compararon dos piensos secos extrusionados (H10 y H20) con menores cantidades de yema de huevo (10 % y 20 % respectivamente) de las utilizadas en capítulos anteriores (30 %) y mezclando las diferentes ingredientes proteicos usados en ensayos anteriores (Cap. 5.1 y 5.2).

### 5.3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares de pulpo de roca fueron capturados en las costas de les Cases d'Alcanar (Tarragona) y transportados a las instalaciones del IRTA (San Carles de la Rápita) en el otoño del 2012. Fueron alojados en un sistema abierto de agua de mar, en tanques individuales de fibra de vidrio de 300l de volumen, los cuales contenían una sección de tubo de PVC como refugio. La temperatura

media del agua fue de  $18,5 \pm 0,9$  °C y el caudal fue constante (600 l/h para mantener el oxígeno disuelto en  $7,0 \pm 0,6$  mg/l y la salinidad a 37 ‰.

Tras una fase de adaptación (7 días), donde los 18 pulpos fueron alimentados con cangrejo (*L. depurator*), comenzó la fase experimental de 4 semanas. Los pulpos se alimentaron diariamente (de lunes a sábado) en dos tomas, a las 9:00 h y a las 15:00 h, y el alimento no consumido era recogido a las 13:00 h y las 19:00 h.

Se ensayaron tres dietas: dos piensos extrusionados (Tabla 16) con dos proporciones distintas de yema de huevo (10% y 20%), y una dieta control a base de cangrejo (*L. depurator*) y boga.

**Tabla 16.** Composición de las dietas experimentales (%).

	H20	H10
Yema de huevo	20	10
Gelatina	10	10
Maltodextrina	10	10
Harina de Pescado	15	15
Harina de Krill	20	25
Harina de Calamar	20	25
Taurina	2,5	2,5
Vitaminas	2,5	2,5

Yema de huevo: yema de huevo pasteurizada (IGRECA SAS), Gelatina: PILARICA S.A., Maltodextrina: PRAL S.A., Harina de pescado: COCERVA S.C., Harina de krill: AKER SEAFOODS ANTARCTIC S.A., Harina de calamar: Max Nollert®, Taurina: Sigma-Aldrich logistik y Vitaminas: Skretting España S.A.

Las piensos presentaron unos valores nutricionales muy similares entre ellos (Tabla 17), con una mayor cantidad de grasa en el pienso H20, ya que contenía un 10 % más de yema de huevo que la dieta H10.

**Tabla 17.** Composición nutricional de las dietas (% matería seca).

	CONTROL	H20	H10
Humedad (%)	76,4	18,2	20,5
PB (%)	74,2	57,3	56,5
GB (%)	12,7	12,3	7,3
Cenizas (%)	12,9	6,8	7,3

La composición nutricional de los piensos, alimento natural, pulpo inicial y pulpos (músculo y glándula digestiva), fue analizada al final de prueba siguiendo la metodología descrita por la AOAC (1997). La ingesta real se calculó aplicando un factor de corrección (FC) a los restos no ingeridos de acuerdo con Cerezo Valverde *et al.* (2008).

Diariamente fueron recogidas y congeladas las heces de los distintos tanques, a fin de poder obtener la digestibilidad de las dietas, una vez terminada la prueba.

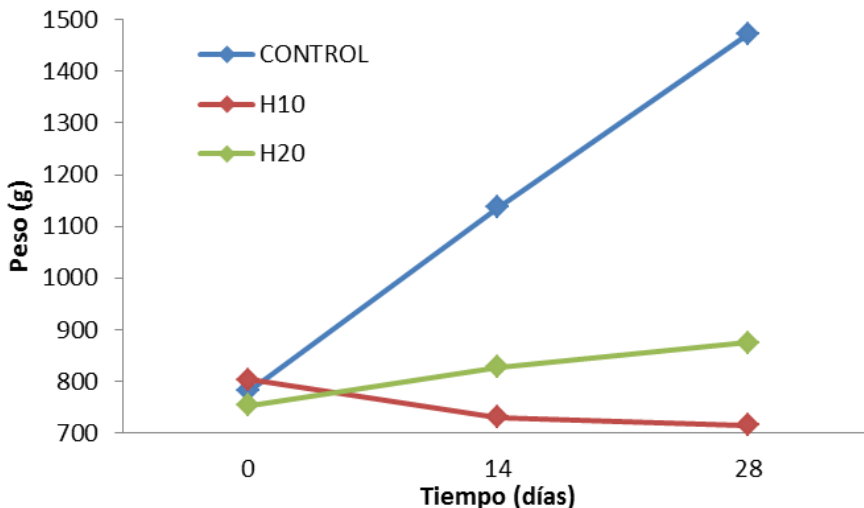
Los resultados de los parámetros de crecimiento y la composición nutricional fueron analizados estadísticamente con StatGraphics Plus 5.1 (Copyright 1994-2001, Statistical Graphics Corp.). Para estudiar las diferencias existentes entre las variables paramétricas de los tratamientos aplicados, se realizó una ANOVA one-way empleando el

test de Newman-Keuls para la comparación de medias individuales, con un nivel de significación de  $P < 0.05$ .

### 5.3.3 RESULTADOS

Los piensos mostraron niveles de disgregación muy similares a los trabajos anteriores (4 - 7 % después de 4 horas en agua), lo que indica una buena estabilidad, con factores de corrección (FC) de 0,7388 ( $\pm 0,0036$ ) para el pienso H20 y de 0,8165 ( $\pm 0,0062$ ) para el pienso H10.

Tras las 4 semanas de experimento se obtuvieron claras diferencias entre las tres dietas respecto a la evolución del peso (Figura 21), siendo el de la dieta natural muy superior al obtenido con las dietas artificiales.



**Figura 21.** Evolución del peso medio de los pulpos a lo largo de la prueba.

Los pulpos alimentados con el pienso H20 presentaron un incremento de 122 g, mientras que los alimentados con el pienso H10 mostraron un claro rechazo al pienso, produciendo una ingesta irregular durante la prueba, por lo que al final perdieron peso (-88 g).

**Tabla 18.** Parámetros nutricionales y de crecimiento para cada grupo experimental.

	CONTROL	H20	H10
Peso Inicial (g)	781 ± 39,82	754,16 ± 37,33	803 ± 40,32
IP (g)	690 ± 49,89 <sup>c</sup>	122 ± 44,11 <sup>b</sup>	-88 ± 24,57 <sup>a</sup>
TCA (g/día)	24,64 ± 1,78 <sup>c</sup>	3,36 ± 1,57 <sup>b</sup>	-3,14 ± 0,87 <sup>a</sup>
TEC (%/día)	2,25 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,39 ± 0,17 <sup>b</sup>	-0,44 ± 0,13 <sup>a</sup>
TAA(g/día)	51,79 ± 3,80 <sup>b</sup>	7,57 ± 0,76 <sup>a</sup>	3,97 ± 0,98 <sup>a</sup>
TAR (%/día)	4,58 ± 0,19 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,51 ± 0,09 <sup>a</sup>
IEA (%)	48,25 ± 4,00	65,09 ± 13,82	
IGD	5,84 ± 0,29 <sup>c</sup>	3,08 ± 0,41 <sup>b</sup>	1,88 ± 0,35 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± ES (n= 6). IP, incremento de peso; TCA, tasa de crecimiento absoluta; TEC, tasa específica de crecimiento; TAA, tasa de alimentación absoluta; TAR, tasa de alimentación relativa; IEA, índice de eficiencia alimentaria; IGD, índice de la glándula digestiva.

El crecimiento con la dieta control fue mucho mayor, 690 g en las 4 semanas de experimento, casi 25 g/día, mientras que con el pienso H20 fue alrededor de 3,5 g/día y con el pienso H10 perdieron 3 g/día (Tabla 18).

Los valores TEC reflejan la escasa ingesta observada por los pulpos alimentados con el pienso H10, siendo la tasa específica de crecimiento negativa frente a 0,39 %/día obtenido por el pienso H20.



Sin embargo, la eficiencia del alimento fue mayor en el caso del pienso extrusionado H20, aunque sin presentar diferencias significativas, con respecto a la dieta control.

En cuanto al índice de la glándula digestiva, se produjeron diferencias significativas entre los tres tratamientos, debido presumiblemente a la diferencia entre las ingestas registradas por los tres grupos experimentales, siendo mayor en el caso de los pulpos alimentados con la dieta control.

El pienso H20 presentó unos resultados elevados de digestibilidad de los macronutrientes (Tabla 19), donde destacó la elevada digestibilidad de la grasa bruta. No se pudo realizar el estudio de la digestibilidad del pienso H10 por la falta de heces debido a la escasa alimentación.

**Tabla 19.** Digestibilidad de los macronutrientes de las dietas experimentales.

	H20	Cangrejo	Boga
CD <sub>MS</sub> (%)	83,4	94,4	94,4
CD <sub>PB</sub> (%)	87	98,6	95,8
CD <sub>GB</sub> (%)	98,5	100	57,1

CD<sub>MS</sub>, coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca; CD<sub>PB</sub>, coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína bruta; CD<sub>GB</sub>, coeficiente de digestibilidad aparente de la grasa bruta.

El análisis proximal del músculo y la glándula digestiva se muestra en la Tabla 20. No se observaron diferencias significativas en el músculo de los pulpos entre los piensos secos y la dieta natural, sin embargo, la glándula digestiva presentó diferencias en cuanto a su contenido

proteico y lipídico, siendo significativamente superiores en los pulpos alimentados con la dieta natural.

**Tabla 20.** Composición nutricional del músculo y la glándula digestiva según la dieta (% materia húmeda).

	Inicial	CONTROL	H20	H10
<b>Músculo</b>				
Humedad (%)	81,51	81,94 ± 1,06	83,66 ± 0,96	82,69 ± 1,06
PB (%)	14,85	13,70 ± 1,79	12,39 ± 1,64	13,38 ± 1,76
GB (%)	0,08	0,34 ± 0,06	0,41 ± 0,08	0,39 ± 0,09
Cenizas (%)	2,10	2,08 ± 0,05	2,21 ± 0,07	1,85 ± 0,16
<b>Glándula digestiva</b>				
Humedad (%)	72,48	62,07 ± 1,78 <sup>a</sup>	68,17 ± 1,78 <sup>a</sup>	74,57 <sup>a</sup> ± 2,30 <sup>b</sup>
PB (%)	17,98	19,89 ± 0,75 <sup>b</sup>	14,66 ± 0,75 <sup>a</sup>	16,42 ± 0,98 <sup>a</sup>
GB (%)	1,19	3,16 ± 0,29 <sup>b</sup>	1,41 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,38 <sup>a</sup>
Cenizas (%)	2,35	1,63 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,63 ± 0,09 <sup>b</sup>

(media ± ES, n=6). Valores en la misma línea y diferente superíndice son significativos.



## 6. DISCUSIÓN

---



## 6.1 ELABORACIÓN Y ACEPTACIÓN DE PIENSOS EXTRUSIONADOS

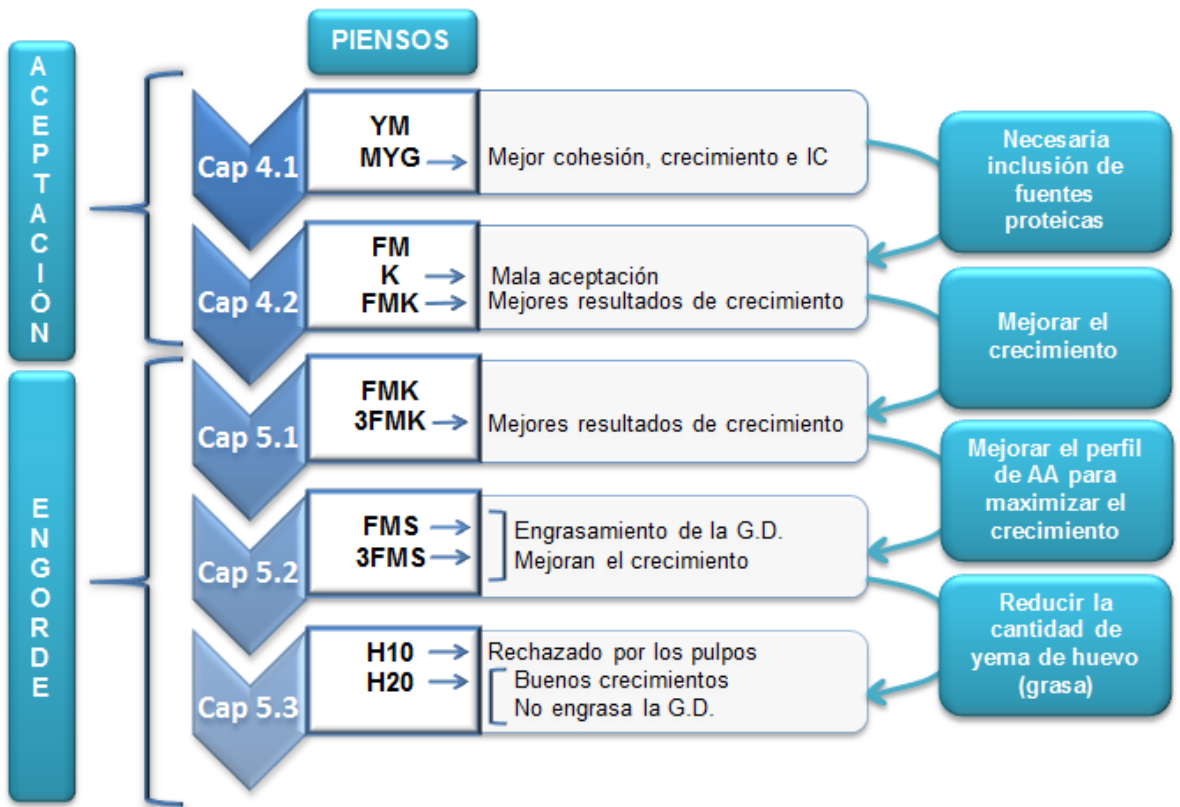
La producción industrializada de pulpo, precisa de una dieta artificial, que cumpla con las necesidades nutritivas y económicas. Los estudios llevados a cabo hasta la realización de la presente tesis doctoral, abarcan desde engordes realizados con alimento natural (García García & Aguado Giménez, 2002; García García & Cerezo Valverde, 2004, 2006; Miliou *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006; Mazón *et al.*, 2007; Pham & Isidro, 2009; Prato *et al.*, 2010; Estefanell *et al.*, 2011b), a piensos húmedos y semi-húmedos formulados con materias primas en forma de harinas (García *et al.*, 2011; Morillo-Velarde *et al.*, 2012a; Petza *et al.*, 2011). Sin embargo, el engorde de pulpo alimentado con piensos extrusionados estaba aún sin explorar.

Para poder plantearse un engorde de pulpo con piensos extrusionados, previamente había que considerar ciertas modificaciones, ya que los piensos extrusionados que hay en el mercado están pensados para la alimentación de peces, y presentan unas características físicas muy diferentes. La flotabilidad, dureza y gomosidad, son parámetros que se deben de modificar para poder llevar a cabo estudios sobre la correcta formulación de los piensos (García García & Cerezo Valverde, 2006). En dietas húmedas, ya se ha estudiado diversos aglomerantes (Cerezo Valverde *et al.*, 2008, 2012; Estefanell *et al.*, 2011a, 2012; García *et al.*, 2011; García-Garrido *et al.*, 2011; Quintana *et al.*, 2008; Morillo-Velarde *et al.*, 2012a, 2013) los cuales proporcionan al pienso una textura y dureza más apropiada para el manejo del pulpo.

La maltodextrina es uno de los aglomerantes más empleados en la realización de piensos secos extrusionados (sobre todo en el caso de los piensos de pulpo, que están compuestos por materias primas con bajo contenido en carbohidratos), ya que gracias a las altas temperaturas y presiones a las que se ve sometida la mezcla durante la fabricación de los piensos, el almidón sufre un proceso de gelatinización, proporcionando una mayor cohesión al pienso resultante.

Por lo tanto, y como se observa en la siguiente figura las pruebas llevadas a cabo en la presente tesis doctoral (Figura 22) comenzaron por estudiar el efecto de la maltodextrina de forma individual o junto con gelatina, en piensos sencillos (Cap. 4.1), debido a los buenos resultados obtenidos con este aglomerante en anteriores trabajos (Cerezo Valverde *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2008; García *et al.*, 2010).

La combinación de maltodextrina y gelatina tuvo como consecuencia una disgregación despreciable del pienso tras 4 h sumergido en agua, mientras que el uso de maltodextrina como único aglomerante ocasionó disgregaciones superiores al 12 %. La disgregación de un pienso es un parámetro muy importante a considerar, ya que el pulpo manipula el pienso durante la alimentación, desmenuzándolo y sifonándolo mientras lo ingiere. Si el alimento se disgrega fácilmente, el porcentaje de alimento ingerido disminuye.



**Figura 22.** Evolución de los trabajos realizados en la presente tesis doctoral.

Posteriormente, se comprobó que la mezcla de maltodextrina y gelatina, era eficaz en cuanto a cohesión y estabilidad del pienso (Cap. 4.2), presentando disgregaciones inferiores al 5 % en los tres piensos extrusionados.

Desde el comienzo de los estudios de aceptación se tuvo especial cuidado en elaborar piensos que tuvieran una buena presentación, es decir, que no tuvieran superficies rugosas o granuladas, ya que podrían producir rechazo, y más importante aún, que tuvieran un sabor apetecible. Para ello, se estudió el uso como atrayente de una



materia prima probada con muy buenos resultados en dietas semi-húmedas, la yema de huevo que fue probada por primera vez, en un estudio con piensos semi-húmedos de composición sencilla (agua, gelatina y yema) (Morillo-Velarde *et al.*, 2013). Posteriormente, fue incluida en la formulación de piensos semi-húmedos, realizados con alacha y pota aglutinados con gelatina, obteniendo eficiencias muy altas, superiores al 97 % y una tasa del crecimiento específico de 1 %/día (Morillo-Velarde *et al.*, 2012a).

En la presente tesis doctoral, el uso de yema de huevo como único ingrediente, a parte de los aglomerantes (gelatina y maltodextrina; MYG, Cap. 4.1), obtuvo aceptaciones del 100 %. La yema de huevo demostró tener un elevado poder atrayente para el pulpo, ya sea en formato de piensos semi-húmedos (Morillo-Velarde, 2013) como en los piensos secos extrusionados (Cap. 4.1 y 4.2).

Tras obtener una formulación estable y con buena aceptación, el siguiente paso fue estudiar el efecto que producía la inclusión de fuentes proteicas como la harina de pescado y la harina de krill (contenido en proteína superior al 60 %) en la aceptación y el crecimiento. Se pudo observar cómo el pienso realizado con harina de krill como única fuente proteica (K) generó rechazo en 4 de cada 7 pulpos, al igual que se ha observado en previos estudios con piensos que contenían krill (López *et al.*, 2009). El uso de la yema de huevo no funcionó en el caso de un pienso con únicamente krill (Cap. 4.2), pero el uso conjunto de yema de huevo y harina de pescado (FMK) proporcionó un sabor lo suficientemente diferente para que la presencia de krill no ocasionara rechazo. Este aumento en la

ingestión con el pienso FMK produjo buenos crecimientos (0,66 %/día), mejorando sensiblemente los obtenidos en la prueba anterior (0,57 %/día; Cap. 4.1), y una eficiencia alimentaria superior al 100 % (Cap. 4.2), posiblemente debido a su mayor contenido proteico.

Los resultados obtenidos en ambos experimentos (Cap. 4.1 y 4.2), presentaron datos de crecimiento muy similares (50-60 g de incremento de peso), siendo el pienso compuesto por gelatina y maltodextrina como aglutinantes, yema de huevo como atrayente, y harina de pescado y de krill como fuentes proteicas (FMK), el que presentó mayor IP (aumento de 10,16 % del peso inicial). Teniendo en cuenta que ambos ensayos no eran pruebas de engorde, la comparación con dietas húmedas previamente probadas, refleja resultados positivos, ya que se lograron crecimientos mayores a los presentados por Cerezo Valverde *et al.* (2008) y García *et al.* (2010), donde no se alcanzaron crecimientos superiores al 6 % del peso inicial en pruebas con el doble de duración.

Estos resultados obtenidos en la presente tesis Doctoral suponen un avance a estudios previos llevados a cabo con *O. maya* alimentado con piensos extrusionados, donde se observaron crecimientos negativos (-11,4 % del peso inicial) después de 40 días de ensayo (Domingues *et al.*, 2007).

El resultado más destacado de estos ensayos de aceptación, es el bajo índice de conversión, que de forma lógica presentan las dietas extrusionadas, siendo de 1,17 en el pienso FMK. Este valor fue inferior a los observados en ensayos con dietas húmedas (7,2;

Cerezo Valverde *et al.* (2008), 1,9; Estefanell *et al.* (2011a)) y en ensayos con alimento fresco (2,6 y 3,3; Pham & Isidro (2009)). Lo cual unido a los buenos resultados de crecimiento supuso un punto de partida para pruebas posteriores.

### 6.2 CRECIMIENTO DE *O. VULGARIS* ALIMENTADO CON DIETAS EXTRUSIONADAS

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de aceptación, se realizaron pruebas de engorde, manteniendo la base del pienso del capítulo 4.2 (FMK), pero intentando mejorar la formulación del mismo para obtener una eficiencia alimentaria mejor (Tabla 21).

El nivel de yema de huevo se mantuvo en un 30 % hasta la última prueba de engorde, asegurando una aceptación del 100 %. Y en lo referente a los aglomerantes utilizados a lo largo de la fase experimental, los niveles más adecuados fueron 10 % de maltodextrina y 20 % de gelatina. Estas cantidades proporcionaron al pienso la textura y dureza adecuada para la alimentación del pulpo, sin presentar disgregaciones superiores al 6 %, en cualquiera de los piensos probados (Cap. 5.1 y 5.2). Estos resultados mejoran sensiblemente los datos de cohesión obtenidos en dietas húmedas (Cerezo Valverde *et al.*, 2008) y semi-húmedas (Morillo Velarde *et al.*, 2012a), donde las disgregaciones fueron del 12 % y de 11-18 % respectivamente, debido posiblemente a la utilización de maltodextrina y la menor cantidad de agua en la realización (Tabla 21).

**Tabla 21.** Resumen de los piensos probados durante las pruebas de engorde.

	<b>Capítulo 5.1</b>		<b>Capítulo 5.2</b>		<b>Capítulo 5.3</b>	
	<b>FMK</b>	<b>3FMK</b>	<b>FMS</b>	<b>FMK</b>	<b>3FMK</b>	<b>FMS</b>
<b>Yema Huevo</b>	29,4	29,4	29,4	29,4	20	10
<b>Gelatina</b>	29,4	19,6	19,6	19,6	10	10
<b>Maltodextrina</b>	19,6	9,8	9,8	9,8	10	10
<b>Harina Pescado</b>	9,8	29,4	19,6	29,4	15	15
<b>Harina Krill</b>	9,8	9,8	0	0	20	25
<b>Taurina</b>	2	2	2	2	2,5	2,5
<b>Harina Calamar</b>	0	0	19,6	9,8	20	25
<b>Humedad (%)</b>	15	12,6	18,6	13,4	18,2	20,5
<b>Proteína Bruta (%)</b>	55,3	58,7	60,8	61,5	57,3	56,5
<b>Grasa Bruta (%)</b>	15	21,7	20,1	21,4	12,3	7,3
<b>Cenizas (%)</b>	4,1	6,8	7	6,3	6,8	7,3
<b>Duración (sem.)</b>	6	6	4	4	4	4
<b>Aceptación (%)</b>	100	100	100	100	100	0
<b>TAR (%/día)</b>	0,78	0,81	1,10	0,82	0,93	0,51
<b>TEC (%/día)</b>	0,37	0,63	0,69	0,69	0,39	-0,44
<b>IC</b>	2,46	1,39	1,67	1,69	1,7	

Composición nutricional de los piensos expresada en % peso seco. Yema Huevo, Yema de huevo pasteurizado (IGRECA SAS); Gelatina, PILARICA S.A.; Maltodextrina, PRAL S.A.; Harina Pescado, COCERVA S.C.; Harina Krill, AKER SEAFOODS ANTARCTIC S.A.; Taurina, SIGMA ALDRICH Logistic; Harina Calamar; MAX. NOLLERT®; Vitaminas, Skretting España S.A.; TAR, Tasa de alimentación relativa; TEC, Tasa específica de crecimiento; IC, Índice de conversión.

El uso de fuentes proteicas, como la harina de krill y la harina de calamar, ambas combinadas con harina de pescado en diferentes proporciones, presentó unos resultados similares en cuanto a crecimiento, mostrando valores de 0,63 y 0,69 %/día en los mejores casos (3FMK; Cap. 5.1 y 3FMS; Cap.5.2, respectivamente). La

proporción entre la harina de pescado y otra fuente proteica, tuvo especial relevancia en el caso del krill (Cap. 5.1), donde los crecimientos fueron muy diferentes entre el pienso FMK (con relación 1:1, TEC = 0,37 %/día) y el pienso 3FMK (con relación 3:1, TEC = 0,63 %/día), provocando diferencias notables en el IC. Lo cual pudo deberse a un exceso de carbohidratos en la dieta, ya que la cantidad de maltodextrina es una de las principales diferencias entre ambas formulaciones con un 10 % más en el caso del pienso FMK, mientras que los niveles nutritivos de las dietas eran muy similares. Los pulpos tienen una capacidad limitada para la glucogénesis proporcionando alrededor del 10% de gasto energético diario (Morillo-Velarde *et al.*, 2011). Si bien los resultados obtenidos por Morillo-Velarde *et al.* 2012a; Morillo-Velarde, 2013 sugieren una mala digestibilidad de carbohidratos complejos como los almidones, lo cual afectó a la digestibilidad de la materia seca. Por lo tanto, un exceso de maltodextrina (la cual proviene de la hidrólisis del almidón) podría haber afectado al metabolismo.

En el caso de la harina de calamar estas diferencias en el crecimiento y en el índice de conversión del alimento no fueron significativas (TEC = 0,69 %/día; IC = 1,67 y 1,69 para FMS y 3FMS, respectivamente), lo cual también puede ser debido a lo comentado anteriormente sobre la maltodextrina, ya que estos piensos tenían los dos la misma cantidad de aglomerante que el pienso 3FMK (Cap. 5.1).

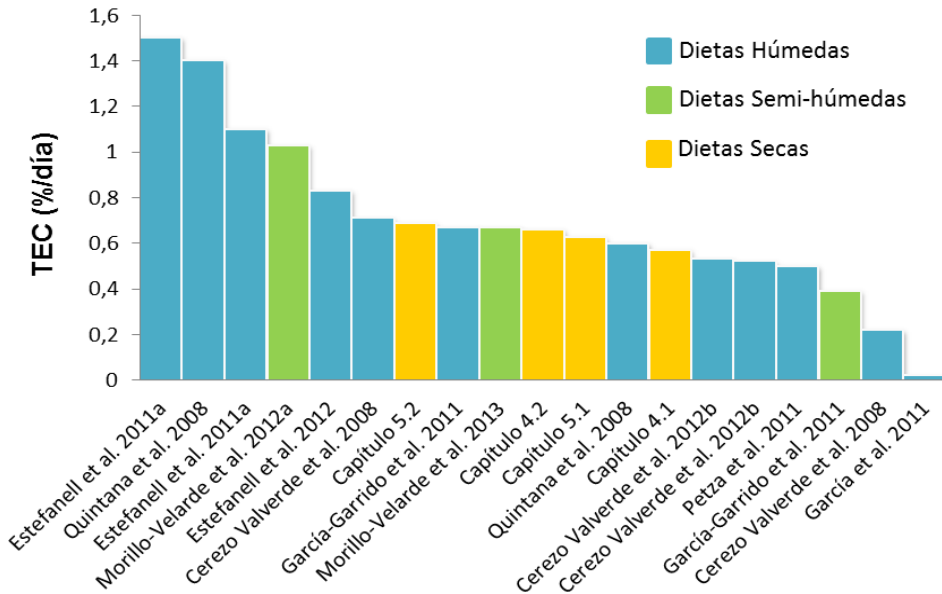
La harina de calamar presenta un perfil aminoacídico más equilibrado para la alimentación del pulpo dado que presenta altos

niveles en arginina y glutamina, los cuales son los principales aminoácidos tanto esenciales como no esenciales en el tejido muscular del pulpo con niveles de 210 y 125 g AA / kg de proteína, respectivamente (Cerezo Valverde *et al.*, 2013). También hay que destacar la alta digestibilidad de los piensos con harina de calamar, siendo el CDA prácticamente del 90 % (Cap. 5.2), lo cual unido a que la harina de calamar presenta una mayor digestibilidad *in vitro* (Hamdan *et al.*, 2013) que la harina de krill, hace que piensos con similar composición proximal puedan alcanzar mejores crecimientos.

Los crecimientos obtenidos en las pruebas de engorde, con el pienso 3FMK (Cap. 5.1), como con los piensos FMS y 3FMS (Cap. 5.2), muestran unos resultados (0,63-0,69 %/día) similares a los obtenidos en estudios previos con dietas húmedas a base de gelatina y camarón (Quintana *et al.*, 2008) obteniendo un TEC de 0,6 %/día, el cual mejoraron al probar el mismo pienso pero utilizando calamar en lugar de camarón (1,4 %/día). Esto apoya lo observado en la presente tesis donde los piensos realizados con calamar mejoraban las tasas de crecimiento, con respecto a los piensos realizados con crustáceos (harina de krill).

El buen resultado del uso de calamar en la realización de piensos también se ha visto en otros estudios, como en García-Garrido *et al.* (2011), donde probaron el uso de calamar en piensos húmedos y semi-húmedos para *O. vulgaris*, obteniendo tasas de crecimiento de 0,39 %/día aglutinándolo con gelatina y de 0,67 %/día aglutinándolo con alginato, siendo estos resultados levemente inferiores a los

obtenidos por los piensos secos con calamar probados en el Capítulo 5.2 (0,69 %/día) (Figura 23).



**Figura 23.** Resumen de experimentos con las mejores tasas específicas de crecimiento en *O. vulgaris* obtenidas por diferentes autores.

Si bien los mayores crecimientos en *O. vulgaris* se han obtenido con dietas húmedas a base de boga (Estefanell *et al.*, 2011a), donde se obtuvo un valor TEC de 1,5 %/día, existen resultados muy positivos con dietas semi-húmedas realizadas con materias primas secas que muestran nuevamente el buen resultado del uso de cefalópodos en la fabricación de piensos para pulpos (TEC = 1 %/día, Morillo-Velarde *et al.* 2012a).

La comparativa entre los piensos FMS y 3FMS con la dieta semi-húmeda probada por Morillo-Velarde *et al.* (2012a), es muy

significativa, ya que ambos experimentos se basan en composiciones en materias similares (yema de huevo, gelatina, pescado y cefalópodos) y en ambos el nivel proteico de las dietas fue superior al 60 % en peso seco. Sin embargo, la ingesta diaria fue mayor con la dieta semi-húmeda (9,7 g/día frente a 7,3 y 6,3 g/día), lo cual unido a los elevados crecimientos produjo un índice de conversión de 1.

Estos resultados confirman la idoneidad de la composición básica de los piensos probados, sobre los que habrá que trabajar para mejorar tanto la ingesta, para poder obtener crecimientos mayores y acercarnos a los mejores resultados obtenidos por las dietas húmedas, como otros aspectos sobre la composición final del pulpo, como se comenta a continuación.

### 6.3 EFECTO DE LAS DIETAS EXTRUSIONADAS EN LA COMPOSICIÓN CORPORAL

La utilización de nuevos ingredientes siempre conlleva incógnitas sobre la aceptación y el crecimiento, pero además de cómo pueden afectar a la composición final del cuerpo del animal, en este caso, el pulpo.

Los piensos artificiales fueron diseñados con el objetivo de aportar altos niveles de proteína, debido a su importancia para el crecimiento del pulpo (Lee, 1994; Domingues *et al.*, 2005; George-Zamora *et al.*, 2011) y bajos niveles de lípidos, debido a su menor capacidad para digerir y absorberlos (O'Dor *et al.*, 1984; Petza *et al.*, 2006) y dado



que dietas con altos niveles de lípidos neutros pueden causar efectos negativos en la absorción de nutrientes (García García & Aguado Giménez, 2002; Sánchez *et al.*, 2009).

Los piensos realizados con harina de pescado y krill (Cap. 5.1) presentaron un nivel proteico muy similar al alimento natural (55,3 - 58,7 %PB en peso seco), mientras que de lípidos tenían un 50 % (pienso FMK) y un 100 % (pienso 3FMK) más que el alimento natural (11 %GB en peso seco). La composición del músculo fue similar entre los tratamientos y semejantes a los observados en los pulpos iniciales. Sin embargo, en la glándula digestiva se observaron diferencias estadísticas, tanto en el nivel de proteína como en humedad y cenizas. Mostrando los niveles de grasa de los resultados una acumulación similar en la glándula digestiva por parte de los tres grupos (5,6, 3,8 y 1,81 % en peso húmedo para el grupo FMK, 3FMK y grupo control respectivamente), y muy similar a la registrada al inicio de la prueba (2,1%).

Al emplear harina de pescado y calamar (Cap. 5.2), sí se observaron diferencias estadísticas significativas en la composición proteica del músculo respecto al grupo control, aunque las mayores diferencias se observaron en la glándula digestiva, la cual presentó niveles de grasa muy elevados en ambos tratamientos, duplicando, de nuevo el de la dieta control (20,8 y 19,4 % en peso húmedo para el pienso FMS y 3FMS, respectivamente).

Similares resultados se han obtenido en otros estudios en pulpos alimentados con boga de descarte, tanto como alimento fresco (16,1 % en materia húmeda; Estefanell *et al.*, 2011b), como en dietas

húmedas (16,8 % en materia húmeda; Estefanell *et al.*, 2011a), pero en ambos casos los niveles lipídicos en las dietas fueron mayores a los presentes en los piensos secos (46,5 % y 26,3 % en peso seco, respectivamente).

Si bien el nivel de grasa bruta presente en los piensos artificiales fue superior al doble del presente en el alimento fresco (12,8 %GB en peso seco), la cantidad de lípidos ingeridos diariamente por los tres grupos experimentales fue muy similar (alrededor de 1,3 g/día), por lo tanto la diferencia debe radicar en la digestibilidad de los lípidos que no solo depende de la cantidad ingerida, sino también de las clases lipídicas (Mazón *et al.*, 2007; Seiça Neves *et al.*, 2010; Cerezo *et al.*, 2012a). Así pues, los buenos resultados de crecimiento (TEC = 1,5 %/día) obtenidos por Estefanell *et al.* (2011a), a pesar del alto engrasamiento de la glándula digestiva, se podría explicar en parte por el buen balance aminoacídico de la boga (Cerezo Valverde *et al.*, 2013) y en parte por una alta eficacia en la utilización de los lípidos de la dieta.

El engrasamiento de la GD los pulpos alimentados con las 3 dietas (FMS, 3FMS y alimento natural) fue inusualmente elevado, pudiéndose deber a una alimentación grasa (p.e. exceso de boga) en su vida salvaje previa al experimento. Pero también, ha sido observado este mayor engrasamiento en estudios realizados con piensos semi-húmedos con pota (Morillo-Velarde *et al.* 2012a; Morillo-Velarde, 2013), donde se vio en diferentes pruebas como los niveles de grasa en la GD llegaban al 13,7 % (peso húmedo) en pulpos alimentados con piensos de no más de un 15 % de GB (peso

seco), y aun así presentar elevados crecimientos con valores de TEC cercanos al 1 %/día, debido al buen balance nutricional de la dieta. Los lípidos se acumulan en la glándula digestiva (Cerezo Valverde *et al.*, 2012a, 2012b; Estefanell *et al.*, 2011b) y dada la limitada capacidad que presentan los cefalópodos para catabolizar los lípidos (Ballantyne *et al.*, 1981; O'Dor *et al.*, 1984; Lee, 1984), un exceso de lípidos neutros en la dieta puede dificultar el proceso digestivo. Recientemente se ha comprobado que conforme aumentaba la cantidad de grasa en la dieta, disminuía el coeficiente de digestibilidad de los lípidos neutros, llegando a ser nulo, mientras los lípidos polares presentaban buenas digestibilidades (Morillo-Velarde, 2013). Esto subraya la importancia de la inclusión en mayor medida de fosfolípidos en las dietas, los cuales, si bien tienen un papel predominante en la formación de tejidos en cefalópodos (Navarro & Villanueva 2000; 2003), también pueden contribuir a mejorar el transporte de ácidos grasos procedentes del intestino al resto de órganos (Morillo-Velarde, 2013).

Un hecho comprobado en diversos trabajos, es la aceptación que tiene la yema de huevo, tanto en dietas semi-húmedas (Morillo-Velarde *et al.* 2012a; 2013) como en piensos secos (Cap. 5.1 y 5.2). La importancia de su inclusión en la composición de las dietas para potenciar la aceptación, está fuera de toda duda, sin embargo, para lograr mejores digestibilidades las cantidades aportadas deberían revisarse, puesto que la yema de huevo tiene altos contenidos lipídicos (en torno al 53 % en peso seco), que pueden no ser adecuados para el metabolismo del pulpo.

Este fue el objetivo de la prueba planteada en el capítulo 5.3, donde se incluyó menor proporción de yema (Tabla 19), que en los experimentos anteriores (Cap. 5.1 y 5.2), y por lo tanto, menores niveles de GB en la dieta (12 y 7 %) con niveles similares de proteína (57 % en peso seco).

Los resultados mostraron que un pienso con un 10 % de yema de huevo fue insuficiente para favorecer ingestas regulares, mientras que la inclusión de niveles del 20 % de yema de huevo provocó una reducción de la ingesta (7,57 g/día frente a 9,15 g/día; Cap. 5.1), ocasionando unas tasas específicas de crecimiento menores (0,39 %/día), pero también produjo menores acumulaciones de grasa en la glándula digestiva (1,41 % peso húmedo) y mejor digestibilidad de la misma (CDA = 98,5 %).

Si comparamos estos resultados con los obtenidos por un pienso semi-húmedo elaborado con un 20 % (en peso seco) de yema de huevo (Morillo-Velarde *et al.*, 2012a), se observa como los crecimientos obtenidos por el pienso H20, distan de los obtenidos por la dieta semi-húmeda, donde la tasa específica de crecimiento fue de 1 %/día, acercándose así al valor más elevado obtenido por Estefanell *et al.* (2011a) con una dieta húmeda, 1,5 %/día.

Uno de los motivos para estas diferencias en el crecimiento, fue la eficiencia alimentaria, ya que mientras en la dieta H20 fue del 65 %, en la dieta semi-húmeda fue superior al 97 % (Morillo-Velarde *et al.*, 2012a). Además de la posibilidad de que aun presentando una composición muy similar en cuanto a la cantidad de GB en la dieta

(12,3 y 11,8, para H<sub>2</sub>O y la dieta semi-húmeda respectivamente), la presencia de alacha y pota en la composición del pienso conllevará una mejor calidad de los lípidos y por ende una menor interferencia en el crecimiento.

## CONCLUSIONES



- ✘ No ha sido posible la estabulación de pulpos en un sistema de recirculación de agua marina, independientemente del tipo de alojamiento que se utilizase, así como de los distintos sistemas de filtrado y depuración utilizados. Lo que muestra la gran importancia que presenta disponer de una tasa de renovación de agua regular en la producción del pulpo.
  
- ✘ El uso conjunto de gelatina y maltodextrina, proporcionó a los piensos extrusionados una cohesión, dureza y textura adecuadas para una buena manipulación e ingestión.
  
- ✘ La yema de huevo ha resultado un buen atrayente para piensos extrusionados, lo que se ha visto tanto en las pruebas de aceptación como en las pruebas de engorde. Si bien el nivel de la misma debe ser superior al 10 % para no empeorar las tasas de alimentación.
  
- ✘ Ha sido posible realizar engordes de pulpo incluyendo materias usadas habitualmente en la elaboración de piensos para peces como son: la harina de pescado, la harina de krill o la harina de calamar. Será importante profundizar en las proporciones entre ellas, de acuerdo con las necesidades en aminoácidos del pulpo para optimizar el crecimiento.



## CONCLUSIONES

---

- ✘ La composición nutricional del tejido muscular no se ha visto prácticamente afectada por la dieta, pero sí la glándula digestiva, cuya composición ha variado dependiendo del pienso recibido. Por lo que si bien, es necesario controlar la cantidad de grasa presente en las dietas para futuros ensayos, también lo es prestar atención a la calidad de las mismas.

## BIBLIOGRAFÍA

---



Aguado Giménez F. & García García B. (2002) Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, **10**, 361-377.

Altman J.S. (1967) The behavior of *Octopus vulgaris* Lam. in its natural habitat: a pilot study. *Underwater Association Reports of Malta*, 77-83.

Altman J.S. & Nixon M. (1970) Use of the beak and radula by *Octopus vulgaris* in feeding. *Journal of zoology*, **161**, 25-38.

Ambrose R.F. & Nelson B.V. (1983) Predation by *Octopus vulgaris* in the Mediterranean. *P.S.N.I Marine Ecology*, **4**, 251-261.

AOAC (1997) *Official Methods of Analysis* (16th ed). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.

Atkinson J.L., Hilton J.W. & Slinger S.J. (1984) Evaluation of acid-insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout. (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **41**, 1384-1386.

Ballantyne J.S., Hochachka P.W. & Mommsen T.P. (1981) Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Marine biology letters*, **2**, 75-85.

Bidder A. (1966) Feeding and digestion in cephalopods. In: *Physiology of Mollusca*, Vol. 2. Eds. Wilbur K.M., Young C.M. Academic Press, New York & London, pp. 97-124.

Boletzky S. & Hanlon R.T. (1983) A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memorial Natural Museum of Victoria*, **44**, 147-187.

Bosch L., Alegría A. & Farré R. (2006) Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *Journal of Chromatography B*, **831**, 176-183

Boucaud-Camou, E. & Boucher-Rodoni, R. (1983) Feeding and digestion in Cephalopods. In: *The Mollusca (Physiology)*. Vol. 5. Eds.

Saleudin, A.S.M., Wilbur, K.M. Academic Press, New York, pp. 149-187.

Caruso G., Giordano D., Mancuso M. & Genovese L. (2004) Studio preliminare degli enzimi digestivi di *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 ed *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca:Cephalopoda). *Biologia Marina Mediterranea*, **11**, 367-369.

Castro B.G., Garrido J.L. & Sotelo C.G. (1992) Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation. *Marine Biology*, **114**, 11-20.

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

Cerezo Valverde J., Hernández M.D., Aguado Gimenez F. & García García B. (2008) Growth, feed efficiency, and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, **275**: 266-273.

Cerezo Valverde J., Hernández M.D., García-Garrido S., Rodríguez C., Estefanell J., Gairin J.I., Rodríguez C.J., Tomás A., García García B. (2012a) Lipid classes from marine species and meals intended for cephalopod feeding. *Aquaculture International*, doi: 10.1007/s10499-011-9442-z.

Cerezo Valverde J., Hernández M.D., Aguado-Giménez F., Morillo Velarde P.S., García García B. (2012b) Performance of formulated diets with different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*. *Aquaculture Research*, doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03201.x

Cerezo Valverde J., Martínez-Llorens S., Tomás Vidal A., Jover M., Rodríguez C., Estefanell J., Gairín J.I., Domingues P.M., Rodríguez C.J. & García García B. (2013) Amino acids composition and protein quality evaluation of marine species and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquaculture International*, **21**, 413-433.

Domingues P, DiMarco F, Andrade J, Lee P (2005) The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and

body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, **13**, 423– 440.

Domingues P.M., Lopez N., Muñoz J.A., Maldonado T., Gaixola G & Rosas C. (2007) Effect of a dry pelleted diet on growth and survival Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, **13**, 273-280.

Estefanell J., Roo J., Guirao R., Afonso J.M., Fernández-Palacios H., Izquierdo M., Socorro J. (2011a) Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) fed fresh and agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and low price trash species. *Aquaculture Research*, doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03014.x

Estefanell J., Socorro J., Tuya F., Izquierdo M. & Roo, J. (2011b) Growth, protein retention and biochemical composition in *Octopus vulgaris* fed on different diets based on crustaceans and aquaculture by-products. *Aquaculture*, **322**, 91-98.

Estefanell J., Socorro J., Izquierdo M., Roo J. (2012) Growth, food intake, protein retention and fatty acid profile in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed agglutinated moist diets containing fresh and dry raw materials based on aquaculture by-products. *Aquaculture research*, doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03204.x

Estefanell J. (2012) Optimización de las condiciones de engorde y avances en el conocimiento de los requerimientos nutricionales de pulpo común *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). PhD thesis, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

FAO (2012) The state of world fisheries and aquaculture 2012. ISSN 1020-5489. Rome, 2012. ISBN 978-92-5-107225-7

Fiorito G. & Gherardi F. (1999) Prey-handling behavior of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) on bivalve preys. *Behavioural Processes*, **46**, 75-88.

García S., Domingues P., Navarro J.C, Hachero I., Garrido D. & Rosas C. (2011) Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. *Aquaculture nutrition*, **17**, e174-e187.

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

**García García B. & Cerezo Valverde J. (2004)** Influencia del número de días de ayuno a la semana sobre el crecimiento, el índice de conversión y la supervivencia en el pulpo de roca (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797). *Revista AquaTIC*, **21**, Julio –Diciembre.

**García García B. & Cerezo Valverde J. (2006)** Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on growing. *Aquaculture*, **253**, 502-511.

**García García B., Cerezo Valverde J., Aguado-Giménez F. & García García J. (2009)** Growth and mortality of common octopus *Octopus vulgaris* reared at different stocking densities in Mediterranean offshore cages. *Aquaculture Research*, **40**, 1202-1212.

**García García B., Cerezo Valverde J., Gómez E., Hernández M.D. & Aguado-Giménez F. (2011)** Ammonia excretion of octopus (*Octopus vulgaris*) in relation to body weight and protein intake. *Aquaculture*, **319**, 162–167.

**García-Garrido S., Hachero-Cruzado I., Garrido D., Rosas C. & Domingues P. (2010)** Lipid composition of the mantle and digestive gland of *Octopus vulgaris* juveniles (Cuvier, 1797) exposed to prolonged starvation. *Aquaculture International*, **18**, 1223-1241.

**García Garrido S., Hachero Cruzado I., Domingues P., López N. & Rosas C. (2011)** Effects of fish hydrolysate (CPSP®) on growth and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, **17**, e825-e839.

**George-Zamora A., Viana M.T., Rodríguez S., Espinoza G. & Rosas C. (2011)** Amino acid mobilization and growth of juvenile *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) under inanition and re-feeding. *Aquaculture*, **314**, 215-220.

**Grassé P.P. (1985).** Zoología. Ed. Masson, S.A. Barcelona. ISBN 84-311-0200-1985

**Guerra Á.** (1975) Determinación de las diferentes fases del desarrollo sexual de *Octopus vulgaris* Lamarck, mediante un índice de madurez. *Investigación Pesquera*, **39**, 397-416.

**Guerra Á.** (1978) Sobre la alimentación y el comportamiento alimentario de *Octopus vulgaris*. *Investigación Pesquera*, **42**, 351-364.

**Guerra Á.** (1992) Mollusca, Cephalopoda. In: Fauna Ibérica, Vol. 1. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC, Madrid, 327 pp.

**Hamdan M., Cerezo J., Moyano F.J., García García B. & Jover M.** (2007) Estudio de la bioquímica digestiva del pulpo común (*Octopus vulgaris*) como herramienta para la modelización in vitro de su digestión. In: Book of abstracts. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Spain, pp. 663-666.

**Hamdan M., Tomás-Vidal A., Martínez-Llorens S., Cerezo-Valverde J. & Moyano F.** (2013) Development of an in vitro model to assess protein bioavailability in diets for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture Research*, doi: 10.1111/are.12155.

**Hernández López J.L.** (2000) Biología, ecología y pesca del pulpo común *Octopus vulgaris*, Cuvier 1797 en aguas de Gran Canaria. PhD thesis, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Spain.

**Hickman C.P., Roberts L.S. & Hickman F.M.** (1990) Zoología: principios integrales. Eds. McGraw Hill Interamericana de España, S.A. ISBN 0-8016-2450-9.

**Houlihan D.F., McMillan D.N., Agnisola C., Genoio I.T. & Foti L.** (1990) Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, **106**, 251-259.

**Iglesias J., Sánchez F.J. & Otero J.J.** (1997) Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris*) en el Instituto Español de Oceanografía. In: Book of abstracts. VI Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena, Spain, pp. 221-226

**Iglesias J., Sánchez F.J., Otero J.J. & Moxica C.** (2000) Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier). Present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean aquaculture



finfish species diversification. *Cahiers Options Méditerranéennes*, **47**, 313–321.

Iwasaki M. & Harada, R. (1985) Proximate amino acid composition of the roe and muscle of selected marine species. *Journal of Food Science*, **50**, 1585-1587.

Lee P.G. (1994) Nutrition of cephalopods: Fueling the system. *Marine Behavior & Physiology*, **25**, 35-51.

Liu L., Liu C., Li J. (2012) Comparison of biochemical composition and nutritional value of Antarctic krill (*Euphausia superba*) with several species of shrimps. *Advanced Material Research*, **361**, 799-803.

López M., Rodríguez C. & Carrasco J.F. (2009). Engorde de juveniles de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) con distintas dietas naturales y artificiales. In: Book of abstracts. XII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid, Spain, pp. 170-171.

MacGinitie G.E.(1938) Notes on the natural history of marine animals. *American Midland Naturalist*, **19**, 207-219.

MAGRAMA (2014) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría General Técnica. Boletín mensual estadístico N.I.P.O.: 280-14-029-1.  
[http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/Boletin\\_Mensual\\_de\\_Estadistica\\_2014-01\\_tcm7-315566.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/Boletin_Mensual_de_Estadistica_2014-01_tcm7-315566.pdf)

Mangold K.M. (1983) *Octopus vulgaris*. In: Cephalopod Life Cycles, Vol.1. Ed. Boyle, P.R. Academic Press, London, pp. 335-364.

Mangold K. (1998) The Octopodidae from the Eastern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In: Systematics and Biogeography of Cephalopods, Vol. 2. Eds. Voss, N.A., Vecchione M., Toll, R.B., Sweeney M.J. Smithsonian Contributions to Zoology, pp. 586.

Mangold K. M. & Young R. E. (1998) The systematic value of the digestive organs. In: Systematics and biogeography of cephalopods, Vol. 1. Eds. Voss N. A., Vecchione M., Toll R. B., and Sweeney M. J. Smithsonian Contributions to Zoology, 586, 21-30.

- Martín Cerdeño V. J.** (2012) Consumo de pescados y mariscos. Diferencias sociales y territoriales. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. *Distribución y Consumo*, **124**, 5-20.
- Mather J.A.** (1993) Octopuses as predators: implications for management. In: Recent Advances in Fisheries Biology. Eds. Okutani T., O'Dor R.K., Kubodera T. Tokai University Press, Tokyo, pp. 275-282.
- Mazón M.J., Piedecausa M.A., Hernández M.D., García García B.** (2007) Evaluation of environmental nitrogen and phosphorus contributions as a result of intensive ongrowing of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, **266**, 226–235.
- Mercamadrid** (2013) Estadísticas de productos. ([http://www.mercamadrid.es/index.php?option=com\\_estadisticas&task=mensuales&Itemid=159](http://www.mercamadrid.es/index.php?option=com_estadisticas&task=mensuales&Itemid=159))
- Miliou H., Fintikaki M., Kountouris T. & Verriopoulos G.** (2005) Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, **249**, 245-256.
- Miliou H., Fintikaki T., Kountouris T., Tzitzinakis M. & Verriopoulos G.** (2007) Nucleic acids and fatty acids of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to the growth rate. *Aquaculture Research*, **38**, 1693-1701.
- Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde J., Serra Llinares R.M. & García García B.** (2011) Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Molluscan Studies*, **77**, 318–320.
- Morillo-Velarde P.S., CerezoValverde J., Hernández M.D., Aguado-Giménez F. & García García B.** (2012a) Growth and digestibility of formulated diets based on dry and freeze-dried ingredients in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, **368**, 139-144.
- Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde J., Serra Llinares R.M. & García García B.** (2012b) Changes in lipid composition of different tissues of common octopus (*Octopus vulgaris*) during short-term starvation. *Aquaculture Research*, doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03131.x.

**Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde J. & García García B. (2013)** A simple format feed to test the acceptability of ingredients for common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797). *Aquaculture Research*, doi:10.1111/are.12233

**Morillo-Velarde P.S. (2013)** *Desarrollo de piensos formulados y requerimientos nutritivos del pulpo de roca (Octopus vulgaris)*. PhD thesis, Universidad de Murcia, Spain.

**Morillo-Velarde P.S., Cerezo Valverde J. & García García B. (2014)** Utilization of diets with different fish oil content in common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) and resulting changes in its biochemical composition. *Aquaculture Research*, doi: 10.1111/are.12439.

**Morishita T. (1978)** Studies on the protein digestive enzymes of octopus, *Octopus vulgaris* Cuvier. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University*, **5**, 197-282.

**Nash D.M., Eaton C.A. & Crewe N.F. (1978)** Lipid classes and fatty acid composition of squid (*Illex illecebrosus*). Technical Report of the Fisheries and Marine Service of Canada. 8 p.

**Navarro J.C. & Villanueva R. (2000)** Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, **183**, 161-177.

**Navarro J.C. & Villanueva R. (2003)** The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, **219**, 613-631.

**Nesis K.N. (1987)** Cephalopods of the world: squids, cuttlefish, octopuses and allies. T.F.H. Publications, Neptune City, NJ. ISBN:0866220518970866220514.

**Nigmatullin C.H. & Ostapenko A.A. (1976)** Feeding *Octopus vulgaris* Lam. From the Northwest African coast. ICES C.M. 1976/K: 6.

**Nixon M. (1969)** Growth of the beak and radula of *Octopus vulgaris*. *Ibidem*, **159**, 363-379.

- O'Dor R.K., Mangold K., Boucher-Rodoni R., Wells M.J. & Wells J. (1984) Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. *Marine Behavior and Physiology*, **11**, 239–258.
- Otero J.J., Moxina C., Sánchez F.J. & Iglesias J. (1999) Engorde de pulpo a diferentes densidades de estabulación. In: Book of abstracts. VII Congreso Nacional de Acuicultura, Las Palmas de Gran Canaria Spain.
- Petza D., Katsanevakis S., Lykouri N., Spiliotis V. & Verriopoulos G. (2011) Investigation of the potential effect of diet, body mass and maturity on growth and feed performance of common octopus *Octopus vulgaris*: an information theory approach. *Aquaculture Nutrition*, **17**, e348–e361
- Pham C.K. & Isidro E. (2009) Growth and mortality of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed a monospecific fish diet. *Journal of Shellfish Research*, **28**, 617-623.
- Prato E., Portacci G. & Biandolino F. (2010) Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, **309**, 203-211.
- Quintana D., Domingues P. & García S. (2008) Effect of two artificial diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture*, **280**, 161-164.
- Rodríguez C., Carrasco J.F., Arronte J.C. & Rodríguez M. (2006) Common Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile ongrowing in floating cages. *Aquaculture*, **254**, 293-300.
- Romanini M.G. (1952) Osservazioni istochimicamente rivelabili dei fermenti delle ghiandole salivari anteriori e posteriori di *Octopus vulgaris*. *Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*, **25**, 1179-1180.
- Rosas C., Cuzon G., Pascual C., Gaxiola G., Chay D., López N., Maldonado T. & Domingues P.M. (2007) Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, **152**, 371-381.

- Rosas C., Tut J., Baeza J., Sánchez A., Sosa V., Pascual C., Arena L., Domingues P. & Cuzon G. (2008) Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, **275**, 291-297.
- Sánchez M., Hernández M.D., Cerezo Valverde J. & García García B. (2009) Protein and lipid digestibility in common octopus (*Octopus vulgaris*). In: Cephalopod international advisory council symposium. CIAC 2009, Vigo, Spain, pp 86.
- Seiça Neves M.M., Cerezo Valverde J. & García García B. (2010) Digestibility of a formulated diet with alginate as binder in octopus. In: Book of abstracts. EAS Aquaculture Europe 2010, Porto, Portugal, pp. 500-501.
- Slater M. & Buttlng O. (2011) Giant Pacific Octopus Husbandry Manual. British and Irish Association for Zoos and Aquariums Regent's Park, United Kingdom. ISSN 0963 –1712.
- Taki I. (1941) On keeping octopods in an aquarium for physiological experiments, with remarks on some operative techniques. *Venus, Kyoto*, **10**, 140-156.
- Tanaka J. (1958) On the stock of *Octopus vulgaris* Lam on the east coast of Boso Peninsula, Japan. *Bulletin of Japanese Society for the Science of Fish*, **24**, 601-607.
- TONMO (2014) The Octopus News Magazine Online. <http://www.tonmo.com/community/categories/cephalopod-care-articles.96/>
- Vaz-Pires P., Seixas P. & Barbosa A. (2004) Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture*, **238**, 221-238.
- Villanueva R., Riba J., Ruíz-Capillas C., González A.V. & Baeta M. (2004) Amino acid composition of early stages of cephalopods and effects of amino acids dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, **242**, 455-478.

Vonk H. J. (1962) Emulgators in the digestive fluids of invertebrates. *Archives Internationales de Physiologie de Biochimie et de Biophysique*, **70**, 67-85.

Voss G.L. (1973) Cephalopod resources of the world. *FAO Fisheries Circular*, **149**, 75 pp.

Wells M.J., O'Dor R.K., Mangold K. & Well J. (1983) Feeding and metabolic rate in *Octopus*. *Marine Behavior Physiology*, **9**, 305-317.

Yoshitomi, B. (2004) Utilization of Antarctic krill for food and feed. In: *More efficient utilization of fish and fisheries products*, Vol.42. Ed. Sakaguchi M. Elsevier, Kyoto, Japan, pp. 45-54.







