

Las enzimas digestivas como indicadores del estado nutricional en paralarvas de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797

E. Morote¹, M. Rodríguez¹, J. M. Mancera², F. J. Moyano³ y J. L. Muñoz¹

¹ IFAPA Centro El Toruño. Junta de Andalucía. Carretera nacional IV, km 654. E-11500 El Puerto de Santa María (Cádiz), España. Correo electrónico: morote@icm.csic.es

² Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz. Avda. República Saharaui, s/n. Apdo. 40. E-11510 Puerto Real (Cádiz), España.

³ Departamento de Biología Aplicada. Universidad de Almería. Edificio científico-técnico II-B. Carretera de Sacramento, s/n. E-04120 La Cañada de San Urbano (Almería), España.

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

RESUMEN

El cultivo del pulpo común *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 no plantea problemas en cuanto a la adaptación de ejemplares a cautividad, engorde de juveniles, maduración sexual y puesta. Sin embargo, la tasa de mortalidad larvaria es muy elevada. La determinación de los cambios en las actividades enzimáticas durante el desarrollo larvario puede ser útil para establecer el momento óptimo del destete y para comprender la dependencia de la larva de fuentes de enzimas exógenas. Con el objetivo de determinar las capacidades digestivas de las paralarvas de pulpo se han llevado a cabo experimentos para evaluar el efecto en ellas de distintas dietas. Éstas estaban compuestas por diferentes combinaciones de *Artemia salina* (L., 1758), *Moina salina* Daday, 1888 y zoeas de crustáceos, así como microcápsulas de dieta artificial. Determinado el peso húmedo de las paralarvas, se midió la actividad de proteasas y tripsina en ejemplares individuales para valorar la capacidad digestiva sobre los distintos tratamientos. Los resultados mostraron que la secreción enzimática estaba influida por la edad y el tipo de alimentación. Se deduce, pues, que las proteasas pueden ser usadas como índice de calidad de la puesta y la tripsina como indicador de que las paralarvas se están alimentando.

Palabras clave: Alimentación, cefalópodos, cultivo, fase larvaria, actividad de proteasas, tripsina.

ABSTRACT

Digestive enzymes indicating nutritional condition in octopus paralarvae Octopus vulgaris Cuvier, 1797

Experiments were conducted to evaluate the effect of different diets in *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae. Diets were composed of different combinations of *Artemia salina* (L., 1758), *Moina salina* Daday, 1888 and crab zoea, as well as artificial food. Wet weight of the paralarvae was recorded. Protease and trypsin activity were determined in a number of individuals to assess changes in the digestive use of food. Results show that enzyme secretion was affected both by age and the type of food. It is deduced that protease activity can be used as spawning quality index, and that trypsin activity gives information about whether paralarvae are feeding.

Keywords: Cephalopoda, culture, larval stages, feeding, protease activity, trypsin.

INTRODUCCIÓN

El pulpo común, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, es una especie muy frecuente en nuestras aguas, con una amplia distribución en el Atlántico y el Mediterráneo. Su maduración y su desarrollo sexual están ligados a factores medioambientales, como temperatura, salinidad y fotoperiodo (Guerra, 1987), y la época de puesta se sitúa entre abril y septiembre, principalmente. El número de huevos que puede poner una hembra varía entre 100 000 y 500 000, cada uno de unos 2 mm de longitud al comienzo del desarrollo y en torno a 3 mm antes de la eclosión.

Los cefalópodos han sido siempre muy explotados en nuestro país, pues se han apreciado como uno de los recursos marinos más exquisitos, alcanzando un elevado valor económico. Esta intensa explotación ha requerido medidas de regulación para minimizar el impacto producido en las poblaciones naturales y potenciar la importación o la acuicultura como posibles alternativas.

El cultivo del pulpo no plantea problemas en cuanto a la adaptación de ejemplares a cautividad, engorde de juveniles, maduración sexual y puesta. Sin embargo, la tasa de mortalidad larvaria es muy elevada y esto obstaculiza la producción de juveniles a partir de las paralarvas eclosionadas en cautividad. A escala experimental se han realizado algunas experiencias exitosas, donde un número reducido de paralarvas han alcanzado el estado juvenil o adulto; pero estas experiencias no han podido ser repetidas, y mucho menos ampliadas a escala industrial, pese al gran interés existente en el sector (Iglesias, Sánchez y Otero, 1997; Rodríguez y Carrasco, 1999 no publicado; Moxica *et al.*, 2002).

La determinación de los cambios en las actividades enzimáticas durante el desarrollo larvario puede ser útil para establecer el momento óptimo del destete y para comprender la dependencia de la larva de fuentes de enzimas exógenas (obtenidas del alimento vivo). Además, sirve para detectar las deficiencias fisiológicas que hacen morir a los organismos. Las proteasas son las enzimas encargadas de hidrolizar las proteínas y son de suma importancia en animales que poseen un metabolismo proteínico, como es el

caso del pulpo. Así, el estudio de la actividad proteasa informa no solo de la actividad específica de esas enzimas, también de la producción endógena de las mismas. Esta producción está influida, entre otros factores, por la talla del animal, la temperatura del agua y la alimentación (Alarcón, Díaz y Moyano, 1997). Diversos autores han observado en larvas de peces una disminución de la tripsina relacionada con el ayuno o provocada por una alimentación no adecuada (Pedersen y Hjelmeland, 1988; Zambonino Infante *et al.*, 1996), por lo que los valores de esta enzima pueden ser indicativos de la idoneidad de la alimentación del animal.

Actualmente, los esfuerzos de investigación se centran en estudiar la alimentación ideal de las paralarvas de pulpo, tanto en tamaño como en composición, y en la determinación de los requerimientos nutricionales en esta fase planctónica. Con el objetivo de establecer las capacidades digestivas de las paralarvas de pulpo se pretende definir y cuantificar los niveles enzimáticos de paralarvas en fase planctónica. Esto permitiría ampliar el conocimiento sobre las deficiencias que muestran las paralarvas en su cultivo y la elevada tasa de mortalidad, que actualmente es el factor limitante en el desarrollo del cultivo integral del pulpo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de *O. vulgaris* (captura, reproducción y cultivo de paralarvas)

La captura de especímenes subadultos (500 g de peso medio) de *O. vulgaris* fue llevada a cabo mediante buceo en la bahía de Algeciras (suroeste de la península Ibérica), entre enero y mayo de 2004.

Después de un periodo de aclimatación y engorde, cuando se observaron puestas en el interior de los refugios, se procedió al aislamiento de éstas junto con las hembras respectivas en tanques individuales mantenidos en penumbra hasta el momento de la eclosión.

Simultáneamente, se procedió al mantenimiento de especies que servirían de alimento a las paralarvas cultivadas: zoeas de crustáceos, como el centollo *Maja squinado* Herbst, 1788 y el

camarón *Palaemon serratus* Pennant, 1777, *Artemia salina* (L., 1758), *Moina salina* Daday, 1888 y huevos y larvas de lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858.

Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos para los que se eligieron, de entre todas las puestas, aquéllas cuyas paralarvas presentaban a priori mejor apariencia externa (turgencia del cuerpo, tamaño y movilidad). Cada experimento se llevó a cabo con ejemplares de una misma puesta, y los cultivos de cada tratamiento se realizaron por duplicado. En el transcurso de los experimentos la temperatura del agua se mantuvo entre 21 y 22 °C. El alimento se introdujo por primera vez a las 3 h de vida de las paralarvas. Los tipos de dietas suministradas se detallan en la tabla I.

Toma de muestras

Las muestras de paralarvas fueron tomadas los días 1 (entre 0 y 3 h después de la eclosión), 3, 7 y 10 de vida (excepto en el experimento A, que finalizó en el día 7 por la escasa supervivencia). Las paralarvas fueron sacrificadas mediante inmersión en agua de mar a -4 °C, lavadas con agua destilada y depositadas sobre papel secante

para eliminar el exceso de agua de la cavidad del manto.

Análisis biométrico

Para determinar el crecimiento se procedió a pesar cinco paralarvas de cada tratamiento y día de muestreo en una microbalanza (Sartorius Research R200D) tras eliminar el exceso de agua con papel secante.

Análisis bioquímicos

Para los análisis bioquímicos se tomaron 50 paralarvas de cada tratamiento y día de muestreo. Las muestras fueron congeladas a -20 °C, liofilizadas durante 24 h a -100 °C (con Maxy-Dry FTS Systems) y conservadas en oscuridad a temperatura ambiente.

Extractos enzimáticos

Los extractos se realizaron con paralarvas individuales. Se procedió a homogeneizar las paralarvas en agua destilada en un homogeneizador mecánico (Kontes) con micropistilos para *eppendorfs* de 1,5 ml de capacidad y en baño de hielo a 4 °C. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min a 4 °C y se

Tabla I. Hembras de las que proceden las paralarvas de los distintos tratamientos, fecha de eclosión de las paralarvas, características de los tanques de cultivo y descripción de los tratamientos suministrados a cada grupo. (A): metanauplios de *A. salina* enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados DC SuperSelco; (h/l): huevos y larvas de menos de 48 h de vida de *S. senegalensis*; (M): *M. salina*; (Zv): zoeas vivas de centollo recién eclosionadas y de hasta 24 h de vida; (Zm): zoeas de centollo recién eclosionadas y de hasta 24 h de vida, sacrificadas y congeladas a -80 °C; (Zc): zoeas de camarón recién eclosionadas; (Da): dieta artificial a base de pienso de 400 µm de diámetro, rico en DHA y EPA (de Maripro).

Hembra	Fecha	Tratamiento	Alimento	Forma del tanque	Capacidad (l)	Renovación del agua
1	Jun-2004	A1	A+Zm	Circular	200	Circuito abierto
	Jun-2004	A2	A+ h/l	Circular	200	Circuito abierto
2	Ago-2004	B1	A	Rectangular	50	10 % diario
	Ago-2004	B2	A+Da+Zc	Rectangular	50	10 % diario
3	Sep-2004	C1	A+M	Rectangular	50	10 % diario
	Sep-2004	C2	Zv	Circular	50	10 % diario
	Sep-2004	C3	A+Zv+Zc	Rectangular	50	10 % diario

guardó el sobrenadante a -20°C hasta su posterior utilización.

Actividad proteasa total

La actividad de proteasas fue medida por triplicado en cinco extractos individuales por cada día y dieta suministrada según una modificación del método de Kunitz (1947), usando como sustrato FTC-caseína al 0,3 % disuelta en tampón citrato 50 mM pH:6,0 e incubando durante 2 h a 37°C . Se detuvo la reacción con ácido tricloroacético (TCA) al 20 %, se centrifugó, se diluyó en Tris-HCl 500 mM pH:8,5 y se leyó en fluorímetro (Thermolab Systems) a una longitud de onda de 485/538 nm (EX/EM). La actividad se expresó en unidades relativas de fluorescencia (urf) por paralarva.

Actividad de tripsina

Se tomaron los extractos individuales de 10 paralarvas de cada dieta y día de cultivo. La actividad de tripsina fue medida en los extractos utilizando Bis-(CBZ-Ala-Arg) 2-Rhod-110 (Molecular Probes; R6508) disuelto en dimetil-sulfoxido (DMSO) a pH:8,0 (Tris-HCl 50 mM + 10 mM CaCl_2). La reacción comenzó añadiendo 20 μl de extracto enzimático al *buffer* con el sustrato, en triplicados, y se leyó la fluorescencia a 496/520 nm (EX/EM) durante 10 minutos en un fluorímetro (Thermolab Systems). La actividad se expresó en urf por paralarva.

Tratamiento de los datos

Los datos fueron tratados con el paquete estadístico SPSS. Cuando los datos se aproximaron a la normalidad se compararon las medias mediante anova (caso del peso húmedo y las proteasas), seguido del test de Bonferroni. Cuando los datos no fueron normales (caso de la tripsina) se aplicaron los tests no paramétricos de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis. El nivel de significación fue de 0,05.

RESULTADOS

Crecimiento en peso

Se observaron grandes diferencias en peso húmedo entre individuos recién eclosionados procedentes de las distintas puestas. Los individuos del experimento A (nacidos al principio del verano) alcanzaron un peso húmedo de 1,18 mg (desviación estándar d. e.: 0,084), mientras que el de los individuos del experimento C (nacidos al final de verano) fue 0,90 mg (d. e.: 0,071).

En la tabla II se muestra el peso húmedo de las paralarvas de cada dieta suministrada en los tres experimentos durante los días del cultivo. En general, se observa una disminución del peso en todos los experimentos y dietas desde el día 3 del cultivo hasta el día 7, momento en el que se invierte la tendencia y los valores aumentan hasta el día 10, registrándose pesos parecidos a los que presentaban las paralarvas en el momento de la eclosión. El peso no registró diferencias significativas al final de los experimentos A y B con respecto al comienzo ($P > 0,05$), aunque sí se encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) en la dieta C3 respecto a las dietas C1 y C2.

Actividad de Proteasas

Se midió la actividad de proteasas en las presas suministradas como alimento. En *A. salina* y *S. senegalensis* fue 100 veces menor que la actividad registrada en zoeas de centollo congeladas un mes a -80°C , y 200 veces menor que en zoeas de centollo vivas.

Respecto a los valores de las paralarvas recién eclosionadas procedentes de las distintas puestas, y antes de recibir alimentación, se observan valores de proteasas muy distintos, con los registros más bajos en las paralarvas procedentes de la hembra A (principios de verano) y los más elevados en las paralarvas procedentes de la hembra B (mediados de verano). La actividad de proteasas de las paralarvas de pulpo cultivadas en cada experimento para cada día de muestreo se muestra en la tabla III.

Se analizó tanto el efecto entre dietas de un experimento para cada día de muestreo como el

Tabla II. Media del peso húmedo (mg) \pm desviación estándar (d. e.) en paralarvas individuales de pulpo en los experimentos A, B y C, para cada día de muestreo, alimentados con distintas dietas (1: A1, B1 o C1; 2: A2, B2 o C2; 3: C3). (***) : diferencias estadísticamente significativas entre las dietas en el transcurso del experimento ($P < 0,001$).

Día	Dieta	A	B	C
1	–	1,18 \pm 0,08	1,68 \pm 0,18	0,90 \pm 0,07
3	1	1,36 \pm 0,21	1,26 \pm 0,09	0,84 \pm 0,11
	2	1,40 \pm 0,07	–	0,92 \pm 0,04
7	1	0,92 \pm 0,08	1,06 \pm 0,05	1,14 \pm 0,18
	2	1,17 \pm 0,12	1,20 \pm 0,19	1,00 \pm 0,19
	3	–	–	1,30 \pm 0,23 ***
10	1	–	1,04 \pm 0,11	1,28 \pm 0,25
	2	–	1,26 \pm 0,11	1,12 \pm 0,25
	3	–	–	1,56 \pm 0,17 ***

efecto de cada dieta a lo largo de todo el cultivo. En el experimento A no hubo un aumento de la actividad proteásica al final del cultivo, y tampoco se vieron diferencias significativas entre las dos dietas aplicadas en el transcurso del cultivo ($P > 0,05$). En el experimento B, sin embargo, sí se observó un aumento de las actividades enzimáticas al final del experimento ($P < 0,05$) pese a que no hay diferencias significativas entre las dietas suministradas ($P > 0,05$), aunque las actividades de las paralarvas de la dieta B2 son ligeramente superiores a las de la dieta B1. Es en el experimento C donde se vieron grandes diferencias, tanto de la actividad de proteasas de cada dieta a lo largo del cultivo, con un aumento progresivo de las actividades desde el

momento de la eclosión ($P < 0,001$), como en la comparación de las tres dietas entre sí el día 10 del cultivo ($P < 0,05$). Las diferencias fueron altamente significativas, sobre todo el día 10 del cultivo en las dietas C1 y C3, con actividades proteásicas en torno a los 400 urf/paralarva, en contraposición con los niveles de actividad para ese mismo día de las paralarvas de la dieta C2, que fueron bastante más bajos (150 ± 55 urf/paralarva).

Actividad de tripsina

Las paralarvas procedentes de cada puesta mostraron valores muy diferentes de la actividad de

Tabla III. Actividad media de proteasas (urf/paralarva) y desviación estándar (d. e.) en paralarvas individuales de pulpo de los experimentos A, B y C alimentados con distintas dietas, para cada día de muestreo. Actividad medida en cinco paralarvas distintas por grupo excepto en las larvas de 7 días del grupo A2, donde se realizaron cuatro.

Días	Proteasas	Experimento A		Experimento B		Experimento C		
		A1	A2	B1	B2	C1	C2	C3
1	Media	32,89	32,89	164,30	164,30	59,61	59,61	59,61
	d. e.	15,42	15,42	27,65	27,65	8,88	8,88	8,88
3	Media	22,99	41,87	187,23	–	–	144,97	–
	d. e.	8,39	13,04	20,22	–	–	23,44	–
7	Media	26,88	35,08	106,60	154,50	214,49	186,66	283,42
	d. e.	13,65	16,53	28,88	46,05	79,74	68,71	45,14
10	Media	–	–	196,87	260,73	388,89	150,59	403,77
	d. e.	–	–	66,94	92,13	100,87	54,72	93,95

tripsina antes de recibir alimentación, siendo las paralarvas del experimento C las que presentan valores mayores; las paralarvas de los experimentos A y B presentan actividades muy parecidas entre sí. La actividad de tripsina de las paralarvas de pulpo cultivadas en cada experimento para cada día de muestreo se muestra en la tabla IV.

También se examinó el impacto de las dietas de un experimento para cada día de muestreo y el efecto de cada dieta a lo largo de todo el cultivo. Los datos de la actividad de tripsina presentaron una gran variabilidad, ya que solo un porcentaje muy bajo de las paralarvas de cada grupo y día de muestreo registraban actividad, mientras que el resto de muestras no registraron actividad tripsina.

En todos los experimentos, los valores de actividad de tripsina de las paralarvas entre los días 1 y 3 fueron muy bajos. Los valores de las actividades el día 7 eran ligeramente superiores, aunque presentaban mayor variabilidad entre los grupos de alimentación de cada experimento, e incluso dentro de los distintos individuos del mismo grupo. Las paralarvas de los experimentos B y C, a día 10 del cultivo, presentaron valores más altos de tripsina, y con diferencias significativas entre cada dieta aplicada ($P < 0,001$). Excepto en las dietas C2 y C3, en el resto de cultivos se observó un aumento en la actividad de tripsina a medida que las paralarvas crecían ($0,001 < P < 0,01$). Este aumento al final del experimento con respecto a los niveles de la eclosión fue más acentuado en las dietas B1 y C1 ($P < 0,001$).

DISCUSIÓN

Los niveles de enzimas dependen, entre otros factores, de la especie, la edad, la temperatura y el alimento. Así, mientras algunas especies antes de nacer ya tienen ciertas enzimas que se van perdiendo a medida que el animal crece, otras, en cambio, al nacer no secretan algunos tipos de enzimas y, según la edad, éstas van apareciendo (Cousin, Baudin-Laurencin y Gabaudan, 1987; Cahu y Zambonino Infante, 1995). En paralarvas de pulpo, la mayor fuente de enzimas digestivas es la glándula digestiva, aunque las glándulas salivares también son un surtidor importante (Boucaud-Camou y Roper, 1995).

Crecimiento

La corta duración de los experimentos no permitió observar, al final de los mismos, un aumento positivo del peso en las paralarvas con respecto al momento de la eclosión. Las diferencias de peso entre individuos recién eclosionados de distintas puestas antes de recibir alimentación demuestra la importancia de la calidad de la puesta y del momento de eclosión sobre el estado de condición de las paralarvas.

La composición bioquímica del manto sufre cambios estacionales en porcentaje de agua y en contenido en proteínas y lípidos; así, un peso más elevado como el que se registra en el experimento B, con paralarvas eclosionadas a mediados del verano, podría estar indicando un almacenamiento mayor de sustancias que les otorgue una condición nutricional, en principio, más favorable. Aunque las proteínas son la reserva de energía más importante, los lípidos suministran los ácidos grasos esenciales y también los componentes de la membrana (como fosfolípidos y colesterol), y pueden ser importantes para la supervivencia de las paralarvas de cefalópodos de rápido crecimiento y ricas en fosfolípidos (Guerra, 1978; Navarro y Villanueva, 2000; Rosa, Nunes y Sousa Reis, 2002).

Las paralarvas, tras la eclosión, poseen un sistema digestivo que no está totalmente diferenciado ni es funcional (Boucaud-Camou y Roper, 1995), por lo que el animal se alimenta en sus primeros días de vida con las reservas de vitelo. Sin embargo, se ha podido observar que desde las primeras horas de vida, la paralarva de pulpo captura presas vivas y las ingiere (observación personal). También se ha comprobado que las paralarvas pueden sobrevivir en inanición durante la primera semana de vida, momento a partir del cual ya pueden morir si no ingieren alimento (Villanueva *et al.*, 2002). La progresiva disminución en peso observada hasta el día 7 está relacionada con el agotamiento de las reservas endógenas. La posterior y paulatina recuperación de peso es un indicio del aprovechamiento del alimento suministrado.

Respecto a la influencia del tipo de dieta, cabe destacar que la más completa suministrada fue la C3, compuesta por *A. salina* complementada con zoeas de *P. serratus* y zoeas de centollo vivas, y es la que produjo un mayor crecimiento. Respecto a la

Tabla IV. Actividad media de tripsina (urf/paralarva) y desviación estándar (d. e.) en paralarvas individuales de pulpo de los experimentos A, B y C alimentados con distintas dietas, para cada día de muestreo.

Días	Tripsina	Experimento A		Experimento B		Experimento C		
		A1	A2	B1	B2	C1	C2	C3
1	Media	0,0062	0,0062	0,0036	0,0036	0,0169	0,0169	0,0169
	N	10	10	10	10	9	9	9
	d. e.	0,0071	0,0071	0,0018	0,0018	0,0193	0,0193	0,0193
3	Media	0,0035	0,0047	0,1171	–	–	0,1998	–
	N	10	7	8	–	–	9	–
	d. e.	0,0008	0,0029	0,1380	–	–	0,2004	–
7	Media	0,0360	0,5510	0,2414	0,2237	0,5796	0,1806	0,0953
	N	9	9	9	10	10	10	9
	d. e.	0,0403	0,5909	0,4924	0,2259	0,8030	0,0884	0,0738
10	Media	–	–	27,1437	0,5269	3,5773	0,0934	0,1439
	N	–	–	7	10	9	8	10
	d. e.	–	–	13,2665	0,5241	2,0168	0,0598	0,2496

dieta B2, en la que se probó el efecto de un pienso rico en DHA y EPA de 400 μm de diámetro, se observó que el peso húmedo de las paralarvas no mostraba ningún incremento respecto a los valores de la misma dieta sin complementar con el pienso (B1). Estos resultados indican que estos componentes no tienen efecto alguno en el peso, pese a que sí se comprobó que algunas paralarvas capturaban el pienso y lo ingerían. Se han encontrado resultados idénticos con paralarvas de pulpo en experiencias donde, además de presas vivas, se suministraban microcápsulas y éstas eran capturadas y parcialmente ingeridas, pero no se vio tampoco reflejado en un aumento de supervivencia ni de peso (Navarro y Villanueva, 2000; Villanueva *et al.*, 2002). En juveniles de cefalópodos, en cambio, sí se han probado con éxito las dietas inertes, demostrando así la adaptabilidad a este tipo de alimentación (Castro y Lee, 1994).

Actividad proteasa

Respecto a los niveles de proteasa en las presas suministradas a los cultivos de paralarvas de pulpo (*A. salina*, zoeas de centollo vivas, zoeas de centollo congeladas y huevos y larvas de lengua-do), los niveles más altos de proteasas correspondían a las zoeas de centollo vivas. Sin embargo, en el experimento C se pudo observar que

las paralarvas de los cultivos que recibieron esta alimentación (C2) no presentaron valores mayores que los que fueron alimentados con *M. salina* y *A. salina* (C1). Este dato parecería indicar que las paralarvas de pulpo, al contrario de lo que sucede en algunas larvas de peces, no incorporan enzimas exógenas a partir de las presas capturadas e ingeridas. Las larvas de peces pueden usar enzimas de sus presas para facilitar la digestión hasta que su sistema digestivo está completamente diferenciado y desarrollado (Jankarik, 1964; Dabrowski, 1984; Pedersen y Hjelmeland, 1988). El efecto de las enzimas exógenas de *A. salina* en la digestión de paralarvas de pulpo es desconocido, aunque se supone bajo por ser una especie herbívora y pese a que sí se ha comprobado que, a medida que avanza un cultivo de paralarvas en el que se suministra *A. salina*, las paralarvas ajustan sus enzimas digestivas a la cantidad de comida y la dieta que reciben (Navarro y Villanueva, 2000; Villanueva *et al.*, 2002).

Las paralarvas recién eclosionadas presentan una actividad proteasa elevada, aunque variable según la puesta de la que proceden, con valores más altos en la puesta de mitad del verano (experimento B). Durante la primera semana de vida los valores permanecen similares a los de los recién eclosionados y, a partir de este momento, coincidiendo con la desaparición de

las reservas de vitelo y el comienzo de la alimentación exógena, estos registros empiezan a reflejar la dieta suministrada. En el experimento A no es posible deducir resultados, ya que el experimento tuvo una duración muy corta y los valores no se habían estabilizado todavía. En el resto de los experimentos, a medida que el cultivo progresa, las proteasas aumentan en todos los grupos excepto en el experimento C2, en el que la curva se hace decreciente. El descenso de la actividad, tan acusado en este grupo, no puede justificarse por la dieta suministrada, pues fue la que registró la actividad proteásica de las presas más alta y la que se ha señalado como dieta ideal (Villanueva, 1994). A este respecto, consideramos que el diseño de los tanques (circulares en vez de rectangulares como el resto) pudo influir en la circulación del agua en el tanque, lo que a su vez es probable que afectara a la disponibilidad o capturabilidad de las presas.

La actividad de las proteasas encontrada en las paralarvas de estos experimentos fue alta, coincidiendo, así, con otros autores que encuentran, tanto en adultos como en juveniles de *O. vulgaris*, altas actividades dependientes del órgano estudiado –en el tracto y la glándula digestiva: Boucaud-Camou (1974) y Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni (1983); en la glándula salivar posterior: Sakaguchi (1968), Morishita (1972a,b) y Morishita, Ueno y Takahashi (1974)–.

Actividad tripsina

Hasta el momento no se había encontrado actividad de tripsina en paralarvas de *O. vulgaris* utilizando técnicas histoquímicas (Boucaud-Camou y Roper, 1995). Sin embargo, los resultados del presente trabajo muestran que usando análisis bioquímicos sí se pueden apreciar actividades de tripsina. El método fluorimétrico, más sensible que el espectrofotométrico empleado por otros autores (Villanueva *et al.*, 2002, 2004), ha permitido realizar medidas de esta enzima en paralarvas individuales, en contraposición con los extractos y análisis que se habían hecho hasta ahora que se basaban en grupos de paralarvas. Los resultados obtenidos muestran niveles de tripsina muy bajos en el momento de la eclosión e independientes de la puesta de la que proceden y de la fecha en

la que eclosionaron, y con una gran variabilidad entre las paralarvas de un mismo grupo. Parece existir un escaso porcentaje de individuos (20 %) en todos los grupos experimentales que presentan actividad, mientras que en el resto, ésta es prácticamente inexistente.

A partir de la primera semana de vida, la actividad de esta enzima refleja ya las diferencias entre dietas. Si se compara con larvas de peces, en algunas especies no se observa actividad de tripsina en las fases larvarias, mientras que en otras, como dorada *Sparus aurata* L., 1758, la actividad de tripsina ha sido observada a los 3-4 días tras la eclosión (Segner *et al.*, 1989; Moyano *et al.*, 1996). Los niveles de tripsina de paralarvas de pulpo con respecto a los niveles de la misma enzima en larvas carnívoras de peces, como lubina *Dicentrarchus labrax* (L., 1758), son bastante más altos en el pulpo a los 15 días de vida de ambas especies (40 mu/mg proteína en lubina frente a 460 mu/mg en pulpo) (u = unidades) (Villanueva *et al.*, 2002).

En el experimento B las paralarvas con monodieta de *A. salina* presentan valores superiores a las de la dieta complementada con zoeas de *P. serratus* y microcápsulas, sugiriendo así que, pese a que ocasionalmente sí ingirieran estas microcápsulas, ello no se refleja en una mejora de los niveles de tripsina. En otras experiencias se ha demostrado que la actividad tripsina en paralarvas de pulpo no aumentaba hasta el día 15 de cultivo (Villanueva *et al.*, 2002). Sin embargo, en el presente estudio, se han detectado aumentos progresivos desde el día 7 en todas las dietas de cada experimento, excepto en la dieta C2 (probablemente por los problemas mencionados de diseño de los tanques). En el experimento C las paralarvas de la dieta C1 son las que tienen los mayores valores de tripsina, lo que podría estar indicando que estas paralarvas se están alimentando más que las de las otras dietas.

CONCLUSIONES

Las medidas de actividad de proteasas en paralarvas recién eclosionadas son distintas según las puestas de las que proceden y el momento de eclosión, por lo que pueden ser un indicador de la probabilidad de supervivencia. La actividad de proteasas totales puede ser aceptada como un índice de condición más acertado

que el peso, ya que la actividad de esta enzima muestra diferentes respuestas según las dietas suministradas, sobre todo a partir del momento en que desaparecen las reservas vitelínicas.

Se observa una gran variabilidad en los valores de tripsina en paralarvas de un mismo grupo, lo que hace inadecuado medir esta actividad en grupos de paralarvas. También la actividad de esta enzima entre las paralarvas de los distintos días y tratamientos presenta una gran variabilidad, por lo que no parece que sea un buen indicador de condición nutricional; sin embargo, puede suministrar información sobre si las paralarvas se están alimentando desde los primeros días de vida. Esta actividad aumenta, principalmente, tras la primera semana de vida, y varía según la dieta suministrada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca de Formación de Personal Investigador concedida a Elvira Morote y financiada por el Instituto de Formación Agraria y Pesquera de Andalucía (IFAPA), de la Junta de Andalucía.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, F. J., M. Díaz y F. J. Moyano. 1997. Studies of digestive enzymes in fish; characterizations and practical applications. *Cahiers Options Méditerranéennes* 22: 113-121.
- Boucaud-Camou, E. 1974. Localisation d'activités enzymatiques impliquées dans la digestion chez *Sepia officinalis* L. *Archives de Zoologie expérimentale et générale* 115: 5-27.
- Boucaud-Camou, E. y R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in Cephalopods. En: *The Mollusca Physiology*. A. S. M. Saleuddin y K. M. Wilbur (eds.) 5 (2): 149-187. Academic Press. Nueva York.
- Boucaud-Camou, E. y C. F. E. Roper. 1995. Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bulletin of Marine Science* 57 (2): 313-327.
- Cahu, C. L. y J. L. Zambonino Infante. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiology and Biochemistry* 14: 431-437.
- Castro, B. G. y P. G. Lee. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology* 109 (4): 1007-1016.
- Cousin, J. C. B., F. Baudin-Laurencin y J. Gabaudan. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology* 30: 15-33.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reproduction, Nutrition and Development* 24: 807-833.
- Guerra, A. 1978. Sobre la alimentación y el comportamiento alimentario de *Octopus vulgaris*. *Investigaciones Pesqueras* 42: 351-364.
- Guerra, A. 1987. La reproducción en los Moluscos Cefalópodos. En: *Reproducción en Acuicultura. Vol. 1*. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (eds.): 185-216. CAICYT. Madrid.
- Iglesias, J., F. J. Sánchez y J. J. Otero. 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris*) en el Instituto Español de Oceanografía. En: *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura* (9-11 de julio, 1997. Cartagena, Murcia, España). J. de Costa, E. Abellán, B. García, A. Ortega y S. Zamora (eds.): 221-226. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Jancarik, A. 1964. Die Verdauung der Hauptnaehrstoffe beim karpfen. *Zeitschrift für Fischerei und deren Hilfswissenschaften* 12: 602-684.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *The Journal of General Physiology* 30: 291-310.
- Morishita, T. 1972a. Studies on the distribution of proteolytic enzymes in the internal organs of Octopus. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38: 839-843.
- Morishita, T. 1972b. Studies on some properties of proteolytic enzyme from Octopus liver. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38: 1051-1056.
- Morishita, T., R. Ueno y T. Takahashi. 1974. Participation in digestion by the proteolytic enzymes of the posterior salivary gland in Octopus: I. Confirmation of the existence of protein digestive enzymes in the posterior salivary gland. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 40: 595-600.
- Moxica, C., F. Linares, J. J. Otero, J. Iglesias y F. J. Sánchez. 2002. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, en tanques de 9 m³. En: *VIII Congreso nacional de acuicultura: Acuicultura y desarrollo sostenible* (22-25 de mayo, 2001. Santander, Cantabria, España). I. Arnal Atarés, C. Fernández-Pato, C. Martínez-Tapia y C. Mosquera de Arancibia (eds.). *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 31-36.
- Moyano, F. J., M. Díaz, F. J. Alarcón y M. C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 15 (2): 121-130.
- Navarro, J. C. y R. Villanueva. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183: 161-177.
- Pedersen, B. H. y K. Hjelmeland. 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following digestion of copepods. *Marine Biology* 97: 467-476.

- Rodríguez, C. y F. J. Carrasco. 1999. Engorde de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier). Resultados de crecimiento, supervivencia y reproducción. En: *Libro de Resúmenes. 7º Congreso nacional de acuicultura. Convergencia entre Investigación y Empresa: Un reto para el Siglo XXI* (19-21 de mayo, 1999. Las Palmas de Gran Canaria, España): p. 65.
- Rosa, R., L. Nunes y C. Sousa Reis. 2002. Seasonal changes in the biochemical composition of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, from three areas of the portuguese coast. *Bulletin of Marine Science* 71 (2): 739-751.
- Sakaguchi, H. 1968. Studies of digestive enzymes of devilfish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 34: 716-721.
- Segner, H., R. Rösch, H. Schmidt y K. J. von Poeppinghausen. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *Journal of Fish Biology* 35: 249-263.
- Villanueva, R. 1994. Decapod crab zoeae as food for rearing cephalopod paralarvae. *Aquaculture* 128 (1-2): 143-152.
- Villanueva, R., N. Koueta, J. Riba y E. Boucaud-Camou. 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture* 205: 269-286.
- Villanueva, R., J. Riba, C. Ruíz-Capillas, A. V. González y M. Baeta. 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture* 242 (1-4): 455-478.
- Zambonino Infante, J. L., A. Peres, C. L. Cahu, P. Quazuguel y M. M. Le Gall. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139: 129-138.