

# EFFECTO DE LOS FOSFOLÍPIDOS MARINOS SOBRE BIOMARCADORES NUTRICIONALES Y DE ESTRÉS FISIOLÓGICO DE LAS PARALARVAS DEL PULPO COMÚN (*OCTOPUS VULGARIS*) BAJO CONDICIONES DE CULTIVO ESTANDARIZADAS EN TRES CENTROS

D. Garrido<sup>1</sup>, I. Varó<sup>2</sup>, AE. Morales<sup>3</sup>, MC. Hidalgo<sup>3</sup>, JC. Navarro<sup>2</sup>, F. Hontoria<sup>2</sup>, O. Monroig<sup>2</sup>, J. Iglesias<sup>4</sup>, J.J. Otero<sup>4</sup>, A. Estévez<sup>5</sup>, J. Pérez<sup>5</sup>, M.V. Martín<sup>1</sup>, C. Rodríguez<sup>6</sup>, E. Almansa<sup>1</sup>, G. Cardenete<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Canarias, Vía Espaldón, Dársena Pesquera PCL 8, 38180 Santa Cruz de Tenerife. E-mail: diego.garrido@ca.ieo.es

<sup>2</sup>Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS-CSIC), 12595 Ribera de Cabanes.

<sup>3</sup>Departamento de Zoología, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva, 18071 Granada.

<sup>4</sup>Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Subida a Radio Faro 50, 36390 Vigo.

<sup>5</sup>IRTA Sant Carles de la Ràpita, Ctra. Poble Nou, km. 5.5, 43540, Sant Carles de la Ràpita.

<sup>6</sup>Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología. Facultad de Ciencias, 38206, Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna.

## Abstract

The effect of enrichment of *Artemia* with marine phospholipids (LC60) on growth, survival and biomarkers of nutritional condition (RNA/DNA) and physiological stress (stress proteins (HSP70), antioxidant enzymes and lipid peroxidation in *Octopus vulgaris* cultured paralarvae was assed under a standardized protocol in three facilities. Hatchlings' dry weight and nearly all biomarkers studied showed significant differences among centres. On the other hand, after 15 days of rearing, dietary significant differences in specific growth rate (SGR) of paralarvae were found, with an increment of SGR in the group fed *Artemia* enriched with LC60, as well as higher levels in GPXT and GR activity. However, the diet did not affect significantly survival at 30 days. The biomarkers of nutritional condition and physiological stress displayed differences among centres. The results point out that the SGR of paralarvae were positively influenced by marine phospholipids as enrichment of *Artemia*, although no positive effect of LC60 on survival was observed.

## Resumen

El efecto del enriquecimiento de la *Artemia* con fosfolípidos marinos (LC60), sobre el crecimiento, la supervivencia y los biomarcadores de condición nutricional (ARN/ADN) y de estrés fisiológico (proteínas de estrés (HSP70), enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica) en paralarvas cultivadas de pulpo común (*Octopus vulgaris*) se evaluó bajo un protocolo estandarizado en tres centros. Las paralarvas recién eclosionadas mostraron diferencias significativas entre centros en peso seco y en la mayor parte de los biomarcadores analizados. Por el contrario, en paralarvas cultivadas de 15 días, se encontraron diferencias significativas debidas a la dieta, presentando un incremento en la tasa de crecimiento específica (TCE) en el grupo alimentado con *Artemia* enriquecida con LC60 y mayores niveles de actividad GPX T y GR. Sin embargo, la dieta no tuvo efecto en la supervivencia de las paralarvas. Los biomarcadores de condición nutricional y de estrés fisiológicos presentaron diferencias entre los centros. Los resultados indican que el uso de fosfolípidos marinos como enriquecimiento de *Artemia* mejora el crecimiento de las paralarvas, si bien no se observa un efecto positivo de dicho tratamiento sobre la supervivencia de las mismas.

## Justificación

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) presenta características de interés para la diversificación de la producción acuícola, aunque la elevada mortalidad registrada en sus primeras fases de vida impiden avanzar en su cultivo. Dado que las altas tasas de mortalidad podrían estar relacionadas con el perfil lipídico inadecuado de las presas empleadas como alimento durante su cultivo, así como debido a la necesidad de encontrar biomarcadores adecuados que indiquen el estado de salud de las paralarvas durante las primeras fases de desarrollo, el objetivo de este estudio ha sido evaluar el efecto del enriquecimiento de *Artemia* con fosfolípidos marinos (Marine Lecithin LC60) sobre el crecimiento, supervivencia y biomarcadores de condición nutricional (ARN/ADN ratio) y de estrés fisiológico (proteínas de estrés HSP70), enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica en paralarvas cultivadas, bajo un protocolo estandarizado en tres centros.

## Material y métodos

Tres centros de investigación: IRTA (Investigación y Tecnología Agroalimentaria), TF (Centro Oceanográfico de Canarias) y VG (Centro Oceanográfico de Vigo) capturaron en aguas costeras próximas a cada centro ejemplares adultos de pulpo común para obtener las paralarvas. Las paralarvas fueron cultivadas durante 30 días en tanques de 500L cilindro-cónicos negros a una densidad de 6 paralarvas/L. En IRTA los cultivos se llevaron a cabo en circuito cerrado (IRTAMar<sup>TM</sup>), mientras que TF y VG usaron circuito abierto. En todos los centros se empleó un caudal de 1L/min de 18h a 8 h, fotoperiodo de 12L:12O, iluminancia de 700 lx, aireación suave y sistema de cultivo con agua verde ( $2.5 \cdot 10^5$  cél /mL de *Nannochloropsis sp.*). *Artemia* (Sep-Art EG INVE Aquaculture, Bélgica) de distintas edades, según los días de cultivo de las paralarvas, fue enriquecida con fitoplacton (*Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis sp.*) como tratamiento control, o con fosfolípidos marinos (Marine Lecithin LC60 (LC60), Phospho Tech Laboratoires, Francia). Durante los primeros 15 días se usaron nauplios de *Artemia* enriquecidos y los días restantes metanauplios de *Artemia* de 4 días. Se tomaron muestras de paralarvas a 0, 15 y 30 días para determinar peso seco, tasa de crecimiento específica (TCE) y los biomarcadores: ARN/ADN, proteínas de estrés (HSP70), actividad catalasa (CAT), glutatión peroxidasa total (GPX T) y selenio dependiente (GPX Se), glutatión reductasa (GR) y peroxidación lipídica (MDA), según las metodologías descritas en Reis et al. (2014) y Varó et al. (2013).

## Resultados y discusión

Las paralarvas recién eclosionadas (Día 0) mostraron diferencias significativas entre centros para: peso seco, ARN/ADN, HSP70 y para todos los biomarcadores de estrés oxidativo, excepto GR (Tabla 1A). En cuanto a las paralarvas cultivadas durante 15 días (Tabla 1B), se encontraron diferencias significativas entre dietas mostrando los individuos alimentados con LC60 mayor TCE, al igual que mayor actividad GPX T y GR. Sin embargo, no hay evidencias de estrés oxidativo. Por otra parte, se encontraron diferencias entre los centros para los biomarcadores de condición y estrés estudiados excepto para CAT (Tabla 1B). Finalmente, después de 30 días de cultivo no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los grupos Control y LC60 (datos no mostrados).

**Tabla 1.** Peso seco (mg), TCE (% Peso seco/día), ARN/ADN, HSP70 (AU/ng proteína), CAT, GPX T, GPX Se y GR (mU/mg proteína) y MDA (nmol/g tejido fresco) de paralarvas de *O. vulgaris* cultivadas a día 0 y 15 de cultivo en diferentes centros y alimentadas con *Artemia* enriquecida con fitoplacton (Control) o fosfolípidos marinos (Marine Lecithin, LC60).

A DIA 0												
	IRTA			TF			VG					
Peso seco	0.32	±	0.03	a	0.22	±	0.03	b	0.32	±	0.02	a
ARN/ADN	9.98	±	2.71	a	4.50	±	0.81	b	9.72	±	2.81	a
HSP70	18.91	±	3.68	a	2.89	±	0.42	b	3.86	±	1.39	b
CAT	3.37	±	0.27	ab	2.43	±	0.65	b	4.18	±	0.96	a
GPX T	25.75	±	0.92	ab	22.36	±	4.71	b	35.16	±	6.40	a
GPX Se	17.58	±	0.32	a	11.75	±	5.48	b	27.68	±	5.43	a
GR	4.74	±	0.79		6.21	±	1.90		7.22	±	2.01	
MDA	13.78	±	1.63	ab	20.89	±	6.38	a	9.67	±	1.98	b

  

B DIA15																					
	IRTA		TF		VG		Anova 2 vías														
	Control	LC60	Control	LC60	Control	LC60	Die.	Cent.	Int.												
TCE	4.3	±	0.4	5.0	±	0.3	4.0	±	0.9	5.3	±	1.1	5.2	±	1.7	6.4	±	0.8	*		
ARN/ADN	16.3	±	1.3	17.1	±	4.1	8.1	±	0.8	6.9	±	1.4	11.8	±	4.0	13.1	±	4.6		*	
HSP70	25.8	±	4.6	19.5	±	9.3	3.9	±	1.0	3.7	±	2.8	6.2	±	3.3	2.4	±	0.7		*	
CAT	9.9	±	3.3	9.2	±	2.3	13.6	±	2.9	13.2	±	2.8	10.3	±	1.0	15.2	±	5.0			
GPX T	27.6	±	0.5	32.1	±	4.0	21.7	±	0.6	22.6	±	0.7	32.3	±	2.8	37.1	±	6.0	*	*	
GPX Se	19.1	±	0.7	21.8	±	3.8	10.2	±	2.8	14.0	±	0.2	23.3	±	3.7	27.7	±	2.6	*	*	
GR	5.4	±	0.5	5.8	±	0.3	3.2	±	0.6	4.8	±	1.1	2.9	±	0.5	4.5	±	1.9	*	*	
MDA	25.5	±	2.3	25.9	±	0.9	30.4	±	5.2	30.1	±	1.2	20.9	±	5.9	17.5	±	5.8		*	

Datos presentados como media ± desviación estándar; n=3; Diferentes letras indican diferencias significativas entre los centros. \* Indica diferencias significativas en las variables Dieta y Centro (p<0.05).

## **Bibliografía**

Reis, D.B., I. García-Herrero, R. Riera, B.C. Felipe, C. Rodríguez, A.V. Sykes, M.V. Martín, J.P. Andrade y E. Almansa. 2014. An insight on *Octopus vulgaris* paralarvae lipid requirements under rearing conditions. *Aquaculture Nutrition*, doi 10.1111/anu.12205

Varó, I., J.C. Navarro, J. Iglesias, J.J. Otero, J. Sánchez, E. Almansa, O. Monroig, F. Hontoria, A. Morales y G. Cardenete. 2013. Studies on the characterization of biomarkers of nutritionally-derived stress in paralarval cultures of the common octopus (*Octopus vulgaris*). En *Larvi' 2013. Ghent (Belgium)*, 2-5 September 2013.

## **Agradecimientos**

Al proyecto OCTOPHYS (Ref. AGL2010-22120-C03-01) financiado por el MINECO (Gobierno de España) y a la Beca FPI del Instituto Español de Oceanografía de la que disfruta Diego Garrido Lorenzo (BOE, 3 de noviembre de 2011).