

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 930**

21 Número de solicitud: 201731369

51 Int. Cl.:

**A01K 61/50** (2007.01)

**A23K 50/80** (2006.01)

**A23K 10/20** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**29.11.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**30.05.2019**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**10.12.2019**

Fecha de concesión:

**08.01.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**15.01.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA  
(100.0%)**

**C/ Corazón de María, 8  
28002 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**TUR ESTRADA, Ricardo;  
RODRIGUES DOS SANTOS DOMINGUES, Pedro  
Miguel;**

**ALMANSA BERRO, Eduardo;  
LAGO ROUCO, M<sup>a</sup> Jesús;  
GARCÍA FERNÁNDEZ, Pablo y  
PÉREZ RIAL, Evaristo**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Nuria**

54 Título: **Procedimiento para el cultivo de paralarvas del pulpo común Octopus vulgaris**

57 Resumen:

Procedimiento para el cultivo de paralarvas del pulpo común Octopus vulgaris hasta el momento de su asentamiento (fase bentónica) basado en una dieta de presas que comprenden los caprelidos Phtisica marina y Caprella equilibra y/o gammaridos del género Jassa spp. Las condiciones de luz, renovación de agua, temperatura entre otros factores están optimizados para obtener la máxima supervivencia de las paralarvas.

ES 2 714 930 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el cultivo de paralarvas del pulpo común *Octopus vulgaris*

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el cultivo larvario del pulpo común (*Octopus vulgaris*). En particular, se refiere a un protocolo de cultivo que permite llegar a la fase de asentamiento de las paralarvas de esta especie. La presente invención pertenece, por tanto, al sector de la acuicultura.

### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) es una especie con elevado potencial para la diversificación en acuicultura debido a su rápido crecimiento, elevada fecundidad, fácil adaptación a la cautividad, elevado precio de mercado y alta demanda. El engorde industrial del pulpo se inició en 1996 en Galicia, al noroeste de España. Este interés surge a partir de resultados obtenidos por investigadores del Instituto Español de Oceanografía, IEO (Iglesias, J. y Fuentes, L. (2014) "*Octopus vulgaris* paralarval culture," in *Cephalopod Culture*, eds J. Iglesias, L. Fuentes, and R. Villanueva (New York, NY; Heidelberg; Dordrecht; London: Springer), 427–450.), en experiencias piloto en las que se comprobó que juveniles de 750 g alcanzaban la talla comercial (de 2,5-3 kg) en sólo 4 meses. Siguiendo los avances marcados por estos resultados iniciales, durante 1997 se obtuvo una producción de 12 toneladas métricas (t) localizadas principalmente en las Rías Bajas gallegas (García-García, J. *et al* (2004) Cost analysis of octopus ongrowing installation in Galicia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 531-537).

25 Sin embargo, el potencial de este tipo de producción es muy limitado, debido a que el suministro de individuos para engorde es totalmente dependiente de los juveniles capturados en el medio natural. Debido a estos motivos, este tipo de producción se ve reducida a tan solo 4,5 t en 2012 y sin datos significativos en la actualidad. Otro aspecto que limita esta producción es la ausencia de una dieta artificial para adultos, dependiente actualmente de presas congeladas de bajo valor comercial (ej. crustáceos, peces, etc.). No obstante, los últimos estudios en este campo van mejorando los resultados obtenidos con dietas artificiales (Cerezo Valverde, J., & García, B. G. (2017) High feeding and growth rates in common octopus (*Octopus vulgaris*) fed formulated feeds with an improved amino acid profile and mixture of binders. *Aquaculture Research*,

30  
35

48(7), 3308-3319). La solución a todos estos problemas pasa por la producción de juveniles a través de técnicas de cultivo, en lugar de capturarlos desde el medio natural. Sin embargo, la alta mortalidad (prácticamente del 100%) en los primeros días de vida impide la producción de juveniles a nivel comercial (Iglesias y Fuentes, 2014).

5

Por todo esto, la viabilidad de la acuicultura del pulpo a nivel comercial depende principalmente de incrementar la supervivencia de los individuos durante la fase de vida conocida como paralarva. Esta fase se caracteriza porque los individuos viven en la columna de agua (son planctónicos). La duración de esta fase depende mucho de la temperatura y de la dieta, pudiendo durar unos 65-70 días a 20°C (Iglesias y Fuentes, 10 2014). Inicialmente estos individuos tienen una fisonomía característica (Figura 1), pesando entre 0,20-0,30 mg de peso seco y presentando 3 ventosas en cada brazo. Cuando los pulpos superan los 9 mg de peso seco y muestran unas 18-20 ventosas adquieren la forma típica de un pequeño pulpo adulto y emigran al fondo (se hacen bentónicos,), entrando en la fase juvenil. Llegados a este punto, es importante aclarar que una parte de la bibliografía sobre el cultivo de pulpo común ha sido producida en Japón (Okumura, S., *et al.* (2005) Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* sp. and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture* 244, 147–157). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que la población de Japón es una especie diferente denominada ahora *Octopus sinensis* (Amor, M. D. *et al.* (2017). Morphological assessment of the *Octopus vulgaris* species complex evaluated in light of molecular-based phylogenetic inferences. *Zoologica Scripta*, 46(3), 275-288), por lo cual cualquier comparación ha de hacerse con precaución, pues los resultados han sido diferentes y poco reproducibles en la población 20 europea (Iglesias y Fuentes, 2014).

25

La mortalidad en la fase de paralarva parece estar relacionada con aspectos zootécnicos y/o nutricionales. En las primeras fases de vida, los mejores resultados se han obtenido con presas vivas, siendo las mejor aceptadas hasta la fecha las larvas (zoeas) de crustáceos decápodos y especialmente de la centolla (*Maja* sp). La primera vez que se logró cerrar el ciclo de *O. vulgaris* bajo condiciones de cautividad fue en 2001 usando zoeas de centolla como presa, pero en dicho ensayo sólo dos pulpos alcanzaron la edad adulta. Otros autores han obtenido resultados similares, pero sin superar nunca el 5% de supervivencia en el asentamiento (Iglesias y Fuentes, 2014). También hay que 30 añadir que estas experiencias no han sido replicables, pues los resultados posteriores

35

han mostrado una gran variabilidad (Garrido, D., *et al.* (2016). Meta-analysis approach to the effects of live prey on the growth of *Octopus vulgaris* paralarvae under culture conditions. *Reviews in Aquaculture* doi:10.1111/raq.12142). A todo esto, se suma que en todas ellas, se han usado zoeas de crustáceos como la centolla que no son viables a escala comercial dado el coste y la dificultad de su obtención a gran escala.

Hasta el día de hoy, la única presa comercialmente viable es la *Artemia* sp., un pequeño crustáceo fácil de conseguir y muy usado en acuicultura para alimentar a las larvas de peces. Sin embargo, los ensayos realizados con esta *Artemia* sp. no han conseguido el crecimiento ni la supervivencia necesarios para lograr el asentamiento de las paralarvas, a pesar de los numerosos intentos de enriquecer su perfil nutricional. Otra alternativa al uso de estas presas ha sido el diseño de microdietas inertes artificiales (0,5-2 mm de diámetro) con un perfil nutricional adecuado para el desarrollo de la larva. Diversos estudios han intentado esta vía pero hasta el momento no se han observado mejoras significativas en la supervivencia y crecimiento, posiblemente debido a un sumatorio de causas como la baja aceptación, la poca flotabilidad o la falta de un perfil nutricional adecuado. Recientemente, se ha solicitado una patente (ES 2 599 603) que propone un nuevo tipo de dieta inerte, mejorando resultados anteriores. Sin embargo, los resultados obtenidos por esta dieta (2,5 mg de peso seco a los 73 días) aún están lejos de los 9,5 mg de peso seco a los 45 días obtenidos en los estudios previos con zoea de centolla. Por todo lo dicho, es necesario identificar presas alternativas que puedan producirse bajo cautividad a un coste razonable o que sean abundantes y fáciles de conseguir en el medio natural.

Por último, otro aspecto imprescindible es la necesidad de contar con un procedimiento o protocolo de cultivo estandarizado que se haya demostrado eficaz. A este respecto, los estudios han sido numerosos, como queda de manifiesto en la revisión antes indicada de Iglesias y Fuentes (2014), aunque los resultados siguen siendo insuficientes. En esta línea, estudios recientes (Garrido, D., *et al.* (2017). Assessment of stress and nutritional biomarkers in cultured *Octopus vulgaris* paralarvae: effects of geographical origin and dietary regime. *Aquaculture*, 468, 558-568) propusieron un protocolo estandarizado comparando sus resultados en distintas poblaciones de pulpo (atlánticas y mediterráneas). Este protocolo, ha servido de base a diferentes ensayos llevados a cabo dentro del proyecto OCTOWELF (AGL2013-49101-C2-1-R. MINECO. Gobierno de España).

La invención que se presenta a continuación hace uso de una nueva presa, que es fácil de recolectar del medio natural debido a su abundancia en determinados nichos marinos y además consigue unos valores de crecimiento en paralarvas superiores a los de la *Artemia* sp., y próximos a los obtenidos con zoeas de crustáceos decápodos, permitiendo su asentamiento al superar los 9 mg de peso seco a los 65-75 días de edad. También se propone un protocolo de cultivo mejorado en base a estudios previos que ha permitido incrementos significativos de la supervivencia de las paralarvas a lo largo de todo el periodo planctónico y hasta el momento del asentamiento.

10

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

El procedimiento para el cultivo larvario del pulpo común *Octopus vulgaris* de la presente invención ha permitido obtener una mejora significativa en la viabilidad de las primeras fases de vida del pulpo (denominada paralarva), superando el cuello de botella que hasta el momento ha sido la supervivencia de las paralarvas para el cultivo comercial de esta especie.

Los inventores han encontrado que la utilización de novedosos parámetros de cultivo y, en especial, de nuevas presas (alimentos) ha permitido obtener elevadas tasas de supervivencia y crecimiento en paralarvas de pulpo, respecto a los cultivos precedentes de esta especie.

El término paralarva en la presente invención se refiere al estado de desarrollo del pulpo común *Octopus vulgaris* desde el momento en que ha abandonado las cubiertas del huevo (eclosión) hasta su asentamiento total sobre el fondo del mar o tanque (fase bentónica). No se puede hablar de periodo larvario ya que no sufren una metamorfosis propiamente dicha, por lo que se usa el termino paralarva para diferenciarlo de la fase juvenil-adulta. La paralarva vive en la columna de agua, por lo que también se denomina “fase plantónica”. La duración de esta fase depende mucho de las condiciones de cultivo (temperatura del agua, luz, volumen de cultivo, etc.) y de la dieta. Como ejemplo, se puede decir que a 20°C y una dieta adecuada, la duración de esta fase es de 65-75 días (Iglesias y Fuentes, 2014). Inicialmente estos individuos tienen una fisonomía característica (Figura 1), pesando entre 0,2-0,3 mg (peso seco). Cuando lo pulpos superan los 9 mg de peso seco, se considera que han alcanzado la fase de

asentamiento (normalmente esto ocurre entre los 65-75 días de edad). En ese momento comienzan a adquirir la forma típica de un pequeño pulpo adulto (Figura 6) y migran al fondo (se hacen bentónicos). A partir de este momento comen principalmente en el fondo del tanque (y no en la columna de agua ) y tienden a buscar un refugio (algún tipo de oquedad), mostrando preferencia por las zonas con poca iluminación.

Previamente al asentamiento, hay una fase intermedia que podemos denominar como pre-asentamiento que comienza cuando la paralarva tiene un peso seco entre 6 y 9 mg, que suele ocurrir desde los 50-70 días de vida y dura hasta el momento del asentamiento,. Esta fase de pre-asentamiento se caracteriza porque la paralarva comienza a hacer migraciones al fondo sin llegar a asentarse totalmente y culmina al alcanzar la fase de asentamiento.

Un vez asentados, comienza la fase juvenil (bentónica). En esta fase los individuos pasarán a alimentarse de crustáceos como cangrejos y camarones de pequeño tamaño (alrededor de 1 cm de longitud) y también se puede empezar a suministrar dieta inerte basada en estos mismos crustáceos congelados o algún tipo de pienso específico para cefalópodos (Iglesias y Fuentes, 2014). No obstante, la presente invención se refiere al procedimiento de cultivo hasta el asentamiento de las paralarvas. Para la presente invención, en particular, se han identificado los gammaridos del género *Jassa* spp., preferiblemente *Jassa falcata* y *Jassa marmorata*, y dos géneros de caprélidos: *Phtisica* spp. y *Caprella* spp., preferiblemente *Phtisica marina* y *Caprella equilibra* como nuevas presas para el cultivo de paralarvas de pulpo.

Tanto los gammaridos como caprélidos pertenecen al grupo de los Anfípodos.

Luego, la presente invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de paralarvas del pulpo común *Octopus vulgaris* emplazadas en un tanque de cultivo que contiene agua, caracterizado dicho procedimiento porque comprende la adición de presas seleccionadas de:

- gammaridos del género *Jassa* spp.,
  - caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. o
  - combinaciones de ellos
- a dicho tanque de cultivo.

35

Preferiblemente, los gammaridos del género *Jassa* spp. son seleccionados de entre *Jassa falcata* y *Jassa marmorata*.

5 Preferiblemente, los caprélidos del género *Phtisica* spp. son *Phtisica marina* y los caprélidos del género *Caprella* spp. son *Caprella equilibra*.

Estas presas se pueden adicionar como único alimento o en combinación con *Artemia* sp. u otras zoeas de crustáceos (por ejemplo cuando el número de presas obtenidas no sea suficiente o las paralarvas al nacer no tengan un tamaño que les permita capturar e ingerir la presa). En el caso de ambas presas, se puede emplear las densidades más habituales descritas en el estado de la técnica y que pueden oscilar entre 0,1 y 1 individuos/mL (preferiblemente alrededor de 0,5 individuos/mL). Como se indica en el estado de la técnica, conviene darlo en varias tomas, preferiblemente entre 3 y 5 tomas al día.

15 En el caso de adicionar combinaciones (mezcla) de gammaridos del género *Jassa* spp. y caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. se administra preferiblemente entre un 1 y un 10% del total de número de presas en forma de caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. y entre el 90 y el 99% de gammaridos del género *Jassa* spp. Más preferiblemente, se administra un 5% de caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. y un 95% de gammaridos del género *Jassa* spp.

25 En una realización preferida, los gammaridos se adicionan desde un día comprendido entre 1-10 días de vida de la paralarva hasta el asentamiento de las mismas, mientras que los caprélidos se adicionan desde los 20-30 días de vida y hasta el asentamiento de las mismas.

30 Cuando se administran los gammaridos junto con los caprélidos, las proporciones utilizadas de unos y otros son preferiblemente las indicadas anteriormente. El comienzo de la alimentación con gammaridos del género *Jassa* spp puede variar entre el día 1 (día de eclosión del huevo) y los 10 días de edad tal y como se ha comentado. Este comienzo de alimentación puede variar entre dichos días de vida atendiendo al tamaño de las paralarvas al nacer y su capacidad para atacar e ingerir la presa, algo que el experto en la materia puede ver fácilmente mediante observación del comportamiento de las paralarvas.

En otra realización preferida de la invención, se administran los gammaridos del género *Jassa* spp. desde el primer día de vida de las paralarvas y hasta su asentamiento y los caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. se empiezan a administrar desde el día 10 de vida hasta su asentamiento. Preferiblemente, la proporción entre los gammaridos del género *Jassa* spp. y caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. cuando se administran conjuntamente es la indicada anteriormente.

En otra realización preferida de la invención, se administran tanto los gammaridos del género *Jassa* spp. como caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. desde el día 30 de vida de las paralarvas y hasta su asentamiento. Preferiblemente, la proporción entre los gammaridos del género *Jassa* spp. y caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. cuando se administran conjuntamente es la indicada anteriormente.

En una realización preferida, la densidad de paralarvas en el tanque de cultivo es de entre 3-7 paralarvas/litro con el fin de optimizar el número total de presas con una buena relación nº de presas/paralarva, así como evitar el estrés de los individuos. En el caso de los tanques de asentamiento (ver detalles más adelante), la densidad de individuos se reducirá siendo preferible una densidad 0,1 y 0,5 paralarvas por litro.

En una realización preferida, se suministran al tanque de cultivo un total de unos 3-5 individuos de estas presas (bien sean gammaridos del género *Jassa* spp., caprelidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. o combinaciones de ellos) por paralarva/día, distribuyendo las tomas de forma que siempre haya presas disponibles en el tanque. Para lograr esto, la primera toma se ajusta haciendo una aproximación sobre el número de presas remanentes en el tanque del día anterior, oscilando el número total de tomas al día entre 1 y 4 preferiblemente. A modo de ejemplo. Si existen 300 paralarvas en el tanque, el número de presas a añadir por día sería 900 (300x3) en caso de que se suministraran 3 presas por paralarva/día. Estas 900 presas se añadirían repartidas entre 1 a 4 tomas preferiblemente.

Preferiblemente, el tamaño de las presas suministradas variará en función del tamaño/edad de las paralarvas. En una realización preferida, en una primera fase, desde el día 1 de vida hasta los 20-30 días de edad, se adicionan gammaridos del género

*Jassa* spp. entre 1-4 mm de longitud total (distancia entre el telson y la mitad de los ojos). A partir de este punto (20-30 días de edad) y hasta los 50-70 días se adicionan gammaridos de entre 2 y 8 mm de longitud y caprelidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. entre 4 y 30 mm de longitud. Finalmente, entre los 50 y 70 días de vida y hasta el asentamiento la dieta se restringe de nuevo a gammaridos con un tamaño entre 1 y 4 mm de longitud total. Este último cambio se debe a observaciones realizadas en paralarvas recién asentadas, las cuales aparentemente se vuelven más vulnerables durante el período de asentamiento, pudiendo ser atacadas en el fondo del tanque por los gammaridos de mayor tamaño.

5  
10

En una realización preferida, los tanques de cultivo usados entre el primer día de vida y la fase de pre-asentamiento (entre 6-9 mg de peso seco y unos 50-70 días de vida) son preferiblemente troncocónicos y de color negro con un volumen que puede estar preferiblemente entre 100 y 1000L. En una realización más preferida, aquellas paralarvas que alcancen 6 mg de peso seco (suele ocurrir entre 50 y 70 días) se irán transfiriendo de forma individual a otro tanque de cultivo (denominado en adelante tanque de asentamiento). Este tanque de asentamiento tendrá, fondo plano y preferiblemente tendrá un color claro (ej. Gris) y una forma rectangular o cuadrangular, más preferiblemente tendrá entre 200 y 400 L de volumen, altura entre 40-60 cm, y estará parcialmente cubierto con una malla o lona. Estos tanques de asentamiento serán preparados previamente, rellenándolos con agua del tanque original (agua madurada) y se incluirán preferiblemente guaridas (ej. Tubos de PVC de 1-2 cm de diámetro) y pequeñas piedras para enriquecer el hábitat. Todo esto permitirá minimizar el estrés asociado al cambio de tanque.

15  
20  
25

Otro aspecto importante en el protocolo de esta invención es que el fondo de los tanques se mantiene sin sifonar (es decir, sin aspirar los restos de comida y larvas que pueda haber en el fondo) durante todo el cultivo de las paralarvas. De esta manera se deja que las presas que sobrevivan lo colonicen y mantengan limpio, ya que al ser detritívoros consumen la materia orgánica depositada en él, evitando la proliferación de patógenos. Esto a su vez mejora el bienestar de las paralarvas al eliminar el posible estrés causado por el proceso de sifonado.

30  
35

En una realización preferida del procedimiento de la invención, durante el cultivo de la paralarva se ilumina el tanque de forma artificial mediante una lámpara o luz colocada

sobre el borde del tanque (en lugar de una posición central), provocando un cambio en el ángulo de incidencia de luz sobre la superficie y dando lugar a condiciones de luz heterogéneas dentro de la columna de agua, debido a los cambios en la reflexión y refracción de la luz. Preferiblemente, se usará una lámpara fluorescente (blanco frío).

5

Preferiblemente, los niveles de intensidad de la luz suministrada varían entre 40 y 800 lux (69-1436 W/m<sup>2</sup>). Más preferiblemente, los niveles utilizados van desde 600 a 800 lux (1077-1436 W/m<sup>2</sup>) para los primeros 10-15 días de vida de las paralarvas y entre 300 y 600 lux (517-1077 W/m<sup>2</sup>) a partir de los 10-15 días de vida. En el momento que se observan las primeras paralarvas en pre-asentamiento (entre 6-9 mg y a los 50-70 días de vida), la luz se reduce a un rango entre 40 y 300 lux (69-517 W/m<sup>2</sup>) y se mantiene así hasta que todas las paralarvas se han asentado o se han transferido al tanque de asentamiento.

15

Una vez transferidas las paralarvas a los tanques de asentamiento, se mantendrá la misma posición de la lámpara y la última intensidad usada en los tanques troncocónicos (40 a 300 lux, esto es, 69-517 W/m<sup>2</sup>). El fotoperiodo en todo el desarrollo de la paralarva (desde el primer día de vida) hasta el asentamiento tendrá entre 10 y 14 horas de luz, preferiblemente de 8:00 a 22:00h.

20

Respecto al resto de condiciones del agua de cultivo, el porcentaje de renovación y el uso de agua verde constituyen también un aspecto importante. En ambos casos, se pueden encontrar numerosas variantes de los protocolos en la bibliografía, pero no hay ensayos que permitan ver diferencias entre unos y otros. Por todo esto, en la presente invención se propone un protocolo que varía ambos aspectos (renovación y agua verde) en función del desarrollo de la paralarva.

25

Preferiblemente, durante los dos primeros días no se efectúa ningún tipo de renovación de agua en los tanques. Posteriormente, se renueva un 20% diario hasta los 5 días de vida de las paralarvas y de ahí se vaya incrementando hasta llegar al 100% diario a los 10-15 días. Esta renovación se mantiene al 100% hasta los 30 días y a partir de ahí, la renovación se deja abierta de forma permanente (24 horas) lo que representa una renovación diaria de un 200% aproximadamente. Este porcentaje de renovación se mantendrá hasta que las paralarvas se asienten o sean transferidas a los tanques de asentamiento (al alcanzar entre 6 y 9 mg de peso seco y sobre los 50-70 días de vida).

35

Este porcentaje de renovación (alrededor de 200% al día) se mantendrá igual en los tanques de asentamiento.

5 El comienzo de la renovación se hará preferiblemente al mediodía (sobre las 12:00) después de las labores rutinarias de mantenimiento (medida de oxígeno, temperatura, etc.) y las primeras tomas de alimento, a no ser que haya una caída de oxígeno (por debajo de los 5,8 mg/L), en cuyo caso se abrirá el caudal lo antes posible y se mantendrá el tiempo previsto, pudiendo ampliarse si los niveles de oxígeno no superan los 5,8 mg/L.

10 La recirculación del agua del tanque de cultivo puede realizarse mediante un sistema que puede funcionar tanto en circuito cerrado (mediante recirculación del agua) como en circuito abierto. En este último caso deberá usarse un sistema de filtración que evite la entrada de sedimento o cualquier organismo vivo, especialmente de aquellos que puedan ser potencialmente patógenos. La salida del agua del tanque se realizará  
15 mediante un filtro de salida preferentemente un tubo en posición central y con una luz de malla entre 300-400 micras, preferentemente de 300 micras.

A su vez, y de forma preferida, el procedimiento hace uso de la técnica del agua verde, técnica consistente en la adición de una mezcla de microalgas (fitoplancton),  
20 preferiblemente *Isochrysis* spp y *Nannochloropsis* spp.

La adición de microalgas se realiza preferiblemente una vez al día (desde el primer día de vida de las paralarvas) si fuera necesario y la cantidad añadida es la necesaria para obtener una concentración entre 0,7 y 1,5 x 10<sup>6</sup>cls/mL siendo preferible 1 x 10<sup>6</sup>cls/mL. Preferiblemente, la adición de algas se realiza a la misma hora cada día (una vez  
25 cerrada la renovación) y solo si es necesario para alcanzar el nivel de concentración de las mismas antes mencionado. A partir de los 30 días se elimina la adición de microalgas y tampoco se añadirán al tanque de asentamiento.

En una realización preferida, la concentración de oxígeno en el agua de cultivo se  
30 mantiene siempre mayor de 5,5 mg/L (y preferentemente mayor de 6 mg/L). Como máximo se puede alcanzar hasta el 100% de saturación, mediante un aireador con flujo moderado, pues de lo contrario, hay peligro de anoxia y mortalidad masiva de las paralarvas.

En otra realización preferida, la salinidad del agua será la natural del agua del mar (alrededor de de 35-36 g/L) evitando caídas bruscas de pueden provocar mortalidades masivas.

- 5 En otra realización preferida, la temperatura del agua de cultivo se mantiene siempre entre 18-22°C.

Para determinar el peso seco de las paralarvas, que se usa como referencia para las diferentes fases del cultivo, se toma una muestra de paralarvas del tanque  
10 (preferiblemente entre 10-30 paralarvas) que serán anestesiadas (Cl<sub>2</sub>Mg 1,5% en agua de mar) y sacrificadas (Cl<sub>2</sub>Mg 3,5% en agua de mar) siguiendo las indicaciones de Fiorito et al., (2015). Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research—A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. Laboratory animals, 49(2\_suppl), 1-90. Estas larvas serán deshidratadas en estufa (100°C durante  
15 20h) y pesadas en balanza de precisión.

El procedimiento o protocolo de cultivo de la presente invención resulta ventajoso con respecto a los protocolos ya conocidos. En relación a las presas usadas, su gran ventaja sobre otras anteriores (ej. Zoea de centolla) es que son muy fáciles de conseguir, pues  
20 se producen de forma natural y masiva en las bateas, cetáreas y depuradoras de mejillón de las rías gallegas (Camacho, A. P., Gonzalez, R., & Fuentes, J. (1991). Mussel culture in Galicia (NW Spain). Aquaculture, 94(2-3), 263-278). Además se trata de una especie de amplia distribución geográfica y con variaciones de abundancia estacionales cuyo pico máximo coincide con el período natural de eclosión del pulpo, habiéndose  
25 descrito hasta 30 individuos por cm<sup>2</sup> en el mediterráneo (Scinto, A., Benvenuto, C., Cerrano, C., & Mori, M. (2007). Seasonal cycle of *Jassa marmorata* Holmes, 1903 (Amphipoda) in the Ligurian Sea (Mediterranean, Italy). Journal of Crustacean Biology, 27(2), 212-216).

30 Ambos grupos de anfípodos (gammaridos y caprelidos) se obtienen con facilidad de las cuerdas empleadas en las bateas del cultivo de mejillón situadas en las rías gallegas. Por su parte, los gammaridos también pueden obtenerse en los canales de salida de cetáreas para el mantenimiento de crustáceos y de depuradoras de mejillón. Para obtener esto anfípodos basta con sumergir las cuerdas o masas de mejillón en un  
35 tanque con agua (25-50 L) y agitarlas suavemente, lo cual provoca que la mayoría se

separen de ellas y vayan a las paredes del tanque. Estos tanques se transportarán hasta las instalaciones de cultivo usando preferiblemente un pequeño aireador para evitar bajadas de oxígeno.

- 5 Una vez en las instalaciones de cultivo, los anfípodos muestran una fácil adaptación a la cautividad y no necesitan condiciones especiales de mantenimiento. Preferiblemente se mantendrán en tanques de cultivo similares a los del asentamiento aunque sin cubrir y con una mayor renovación (unas 10-12 renovaciones al día). Se pueden alimentar de pienso de pescado o de carne de peces o moluscos suministrada *ad libitum*, evitando  
10 que queden demasiados restos sin consumir en el fondo.

La recolección de las presas del tanque de almacenamiento de las mismas se puede llevar a cabo por diferentes procedimientos. El primero es mediante sifonado de las paredes y fondo del tanque de almacenamiento de las presas. Los anfípodos se  
15 concentrarán en una malla cuya luz puede variar según el tamaño de presa que se esté buscando. Este sistema se usará preferiblemente para las presas de mayor tamaño. El segundo sistema de recogida consiste en un concentrador que utiliza el propio tubo de salida del agua del tanque de cultivo. En las paredes de este tubo se coloca una malla que permita entrar a las presas (y cuya luz de malla puede variar según el tamaño de  
20 presa deseado) y en el fondo (salida) del tubo se coloca una malla menor (preferiblemente de 200 micras) que las retiene dentro del tubo. Una vez las presas están en la parte interior del tubo, este se sacará y las presas se pasaran a un recipiente para añadirlas al tanque de paralarvas. En ambos casos (sifonado y concentrador) se intentará evitar que la presa entre en contacto con el aire, ya que esto puede dar lugar  
25 a que acumulen burbujas de aire en el exoesqueleto, lo cual impediría que puedan sumergirse, dificultando su captura por parte de las paralarvas.

Mediante el procedimiento de la presente invención, se ha conseguido unos datos de supervivencia de >90% a los 40 días de edad, >80% a los 50 días y >65% a los 60 días de edad. Estos resultados son superiores, incluso a los mejores obtenidos hasta ahora  
30 con centolla y por tanto, superiores a los obtenidos con *Artemia* sp. (la única dieta comercialmente viable) cuyas paralarvas raramente superan los 30 días de edad. En relación al crecimiento, el protocolo de invención propuesto obtiene unos incrementos de peso entre un 5 y un 6% de su peso seco al día. Estos valores, están por debajo del 7-8% obtenido por los anteriores autores con zoea de centolla, pero son superiores a  
35 muchos de los obtenidos con *Artemia* sp. (3-4% en la mayoría de los casos) y los

estudios confirman que son suficientes para lograr el asentamiento, aunque con un retraso de unos 10-20 días respecto a las alimentados con zoea de centolla. A pesar de esta diferencia, la facilidad de obtención de la presa propuesta (anfípodos) frente a la dificultad de obtener zoeas de centolla, colocan a los anfípodos con una clara ventaja para avanzar en su cultivo a escala comercial.

La alta disponibilidad natural de las presas utilizadas en el procedimiento de la presente invención permitiría una producción industrial (al menos a pequeña o mediana escala). También existe la posibilidad de llevar a cabo una producción multitrófica asociada a las bateas y cetareas (un cultivo conjunto de diferentes especies donde los excedentes o desechos de una especie son aprovechados para alimentar a otras, reduciendo el impacto y aumentando la rentabilidad).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1:** Muestra una foto de una paralarva recién eclosionada de pulpo común *O. vulgaris* donde se puede apreciar su fisonomía característica.

**Fig. 2:** Muestra fotos de ejemplares adultos de *Jassa falcata* (A) y *Jassa marmorata* (B).

**Fig. 3:** Muestra fotos de ejemplares adultos de *Phtisica marina*, macho y hembra (A) y *Caprella equilibra*, macho y hembra (B).

**Fig. 4:** Gráficas que muestran el crecimiento en mg de peso seco de paralarvas de pulpo en diferentes experimentos: 4A: Un grupo control con paralarvas alimentadas exclusivamente con *Artemia* sp. hasta el día 40 de vida y un grupo experimental alimentadas con *Artemia* sp. y zoea hasta el día 30 y posteriormente con anfípodos exclusivamente desde el día 31 al 50. Las barras indican la desviación estándar. 4B:

Paralarvas alimentadas hasta el día 25 con un tratamiento control (*Artemia* sp.) y un tratamiento experimental con *Artemia* sp. hasta los 8 días y anfípodos desde los 9 a 25 días edad.

5 **Fig. 5:** Esquema que muestra los tanque de cultivo usados en la invención. 5A: Tanque troncocónico usado desde el primer día de edad hasta que las larvas entran en la fase de asentamiento (6-9 mg de peso seco, que suele ocurrir entre 50-70 días de vida). En el esquema se representa la entrada de agua (1) y la fuente de luz (2), la aireación central (3), el tubo central (4) provisto de un filtro y el desagüe exterior que permite regular la altura del agua (5). 5B: Tanque de asentamiento donde son transferidas las larvas hasta que alcanzan la fase de asentamiento (por encima de los 9 mg de peso seco). En el esquema se representa la entrada de agua (1) y la fuente de luz (2), las guaridas, tanto colgantes como depositadas en el fondo (3), el tubo central provisto de un filtro (4) y el desagüe exterior que permite regular la altura del agua (5).

15

**Fig. 6:** Paralarvas en fase de asentamiento. En la B) se observan además tubos de PVC usados como refugios.

## EJEMPLOS

20

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

25 Ejemplo 1: Ensayo cultivo larvario pulpo conocido en el estado de la técnica (Garrido, D. et al. (2017). *Aquaculture*, 468, 558-568):

30 Experimento llevado a cabo en tanques troncocónicos de 500L de volumen, paredes y fondo negro, aireación suave-moderada en posición central. Uso de agua verde (fitoplancton) y una renovación del 150% día durante todo el experimento (30 días) con agua filtrada a 1 micra mediante filtros de cartucho. Para la luz se usó un fluorescente de luz blanca fría de 36W situado en la parte superior central del tanque. Se utilizó una única intensidad de 700 lux durante todo el experimento. La alimentación se basó en *Artemia* sp. enriquecida con microalgas frente a otra enriquecida con un fosfolípido marino. La *Artemia* sp. se suministró en 3 tomas separadas a lo largo del día. La

supervivencia a los 30 días de edad estuvo entre el 0,14-3,77%, mientras que el índice de crecimiento mostró un incremento de peso seco entre el 3,9 y 6,4% al día.

5 Ejemplo 2: Ensayo de control: cultivo larvario pulpo común (Tanque de 1000L) utilizando *Artemia sp.* exclusivamente como presa desde el día 1 hasta el día 40 de vida de las paralarvas

Experimento llevado a cabo en tanque troncocónico de 1000L de volumen, paredes y fondo negro, aireación en posición central y moderada evitando que la corriente creada por las burbujas de aire impidan a las paralarvas moverse libremente por el tanque (Figura 5A). Una densidad de 5 paralarvas/litro y con unos valores para el oxígeno disuelto que oscilaron entre 5,5-6,7mg/L para un rango de temperatura de 18,5-21,3°C y una salinidad de 35 g/L (durante todo el período experimental). Se empleó agua verde hasta los 30 días, con una concentración de 10<sup>6</sup> cis/mL de *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis aff. galbana* en el momento de la adición de las microalgas. Este procedimiento fue igual que en el anterior ensayo (ensayo del estado de la técnica), pero las modificaciones en la renovación en este segundo ensayo afectaron a su concentración. Estas diferencias consistieron en mantener cerrado el tanque los dos primeros días, teniendo lugar lo que podríamos denominar como una “maduración” del tanque (1.<sup>a</sup> diferencia con el procedimiento del estado de la técnica). Transcurridos este período se empieza a renovar (con agua filtrada a 1 micra con filtros cartucho), empezando con una tasa de renovación del 15-20% del volumen del tanque (10mL/s durante 5 horas) durante los siguientes 5 días, aumentando el tiempo de manera paulatina hasta llegar al 100% de la renovación a los 15 días. Este porcentaje se mantiene así hasta el día 30, a partir del cual se lleva a cabo una renovación continua (24h al día) que representa una renovación en torno al 200% al día y que se mantendrá hasta el cierre del tanque a los 40 días de vida (2.<sup>a</sup> diferencia). La salida del agua se hizo a través de un tubo central con una malla de 300 micras y el nivel del agua se mantiene gracias a un tubo exterior.

30 Para la luz se usó un fluorescente de luz blanca fría de 35W situado sobre el borde del tanque (en lugar de una posición central) provocando un cambio en el ángulo de incidencia de luz sobre la superficie y dando lugar a condiciones de luz heterogéneas dentro de la columna de agua, (3.<sup>a</sup> diferencia). Los valores de intensidad usados durante el ensayo quedarían englobados en tres niveles de intensidad Los niveles utilizados van

desde 600 a 800 lux (1077-1436 W/m<sup>2</sup>) para los primeros 15 días de vida y entre 300 a 600 lux (517-1077 W/m<sup>2</sup>) para el intervalo entre 15 y 40 días de vida. (4.<sup>a</sup> diferencia). Tuvo un fotoperíodo de 14:10 (luz:oscuridad), entre las 8:00 y las 22:00h desde el primer día de vida hasta el final del ensayo.

5

La alimentación durante todo el ensayo (40 días) se basó en *Artemia* sp. engordada durante 7 días con *Isochrysis aff. galbana* y suministrada a las paralarvas con una densidad de 0,5 individuos/mL, distribuyendo las tomas de forma que siempre haya presas disponibles en el tanque lo que daba un rango entre 1-4 tomas/día. El tanque se decide cerrar a los 40 días debido a que el índice de crecimiento (IC) no se incrementaba más de un 4% al día, manteniéndose entre 1 y 1,5 mg de peso seco (Ver Figura 4A). La supervivencia a esa edad fue del 65%.

10

Ejemplo 3: Ensayo cultivo larvario pulpo común (Tanque de 1000L) utilizando *Artemia* sp. y zoeas de centolla desde el día 1 hasta el día 30 y con los anfípodos de la presente invención a partir del día 31.

15

Este ensayo se realizó simultáneamente con el ensayo anterior y usando las mismas condiciones de cultivo, con el fin de comparar el efecto de las diferentes presas. En este caso la *Artemia* sp. se complementó con zoeas de centolla (0,1 individuos/mL) hasta los 30 días de edad (sin embargo, dada la dificultad para conseguir las zoeas estas solo se pudieron añadir al tanque en 10 de los 30 primeros días, lo que redujo el crecimiento previsto). A partir de entonces se comenzó a suministrar exclusivamente anfípodos. Por un lado los gammaridos del género *Jassa* spp. (preferiblemente *J. falcata* y *J. marmorata*) que representaban un 95% del número total de individuos y los caprelidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. (preferiblemente *Phtisica marina* y *Caprella equilibra*) que representaron un 5% del número total de individuos. Los gammaridos alcanzaban entre 2 y 8 mm de longitud y los caprelidos de entre 4 y 30 mm de longitud. En el caso de los anfípodos, el protocolo de alimentación consistió en el suministro de unas 3-5 presas por paralarva/día, distribuyendo las tomas de forma que siempre haya presas disponibles en el tanque, lo que daba un rango entre 1-4 tomas/día (5.<sup>a</sup> diferencia respecto al estado de la técnica).

20

25

30

A partir de los 55 días de edad se empezaron a observar paralarvas que superaban los 6 mg de peso seco y que empezaban a migrar hacia el fondo. Estos individuos se fueron

35

transfiriendo a un tanque nuevo denominado Tanque de asentamiento (Figura 5B) de 400L, forma cuadrangular, altura de 50 cm, fondo plano, color gris y cubierto con una malla de sombreo en  $\frac{3}{4}$  partes de su superficie. Este tanque fue rellenado con agua del tanque original y se incluyeron guaridas (Tubos de PVC de 1-2 cm) en el fondo del tanque o colgando de hilos en la vertical, así como pequeñas piedras para enriquecer el hábitat. La densidad de individuos fue de 0,1 paralarvas/L. En este punto, se ha visto que las paralarvas se vuelven vulnerables (al menos temporalmente) y pueden ser atacadas por las presas de mayor tamaño, por lo que se les suministra solo gammaridos de 4 mm máximo de longitud (6.<sup>a</sup> diferencia).

10

En este tanque de asentamiento se mantuvo un porcentaje de renovación similar a la que había en el tanque inicial a partir de los 30 días de edad de las paralarvas, es decir una renovación continua (24h) que renueva un 200% aproximadamente del volumen total del tanque cada día. La salida del agua se hizo a través de un tubo central con una malla de 300 micras. Con respecto a la iluminación, esta se redujo en el tanque inicial a un rango entre 40 y 300 lux (69-517 W/m<sup>2</sup>) en el momento en que se observaron las primeras paralarvas en pre-asentamiento (a los 55 días y sobre los 6 mg de peso seco). Una vez transferidas al tanque de asentamiento, la intensidad se mantuvo en torno a los 40 lux (69 W/m<sup>2</sup>) con el mismo fotoperiodo del tanque inicial (14:10) (7.<sup>a</sup> diferencia).

20

En ninguno de los ensayos descritos, se sifona el fondo del tanque de las paralarvas. El objetivo es reducir el estrés de las paralarvas y también permitir que los anfípodos puedan colonizar el fondo del tanque, ya que al ser detritívoros ayudan a mantener limpio el fondo de restos orgánicos evitando la proliferación de posibles patógenos (8.<sup>a</sup> diferencia).

25

Los anfípodos (gammaridos y caprelidos) fueron obtenidos de las bateas, y depuradoras empleadas en el cultivo de mejillón de las rías gallegas. Se mantuvieron en tanques de 1000L similares a los de la Figura 5B (Tanques de asentamiento), pero sin cobertura y con 10 renovaciones de su volumen total al día. El alimento se basó en pienso de pescado y restos de moluscos *ad libitum*. Para alimentar a las paralarvas, los anfípodos eran capturados mediante dos sistemas. Los de mayor tamaño se obtenían mediante sifonado de las paredes y el fondo del tanque y se concentraban en una malla. El segundo sistema de recogida consistía en un concentrador que utiliza el propio tubo de salida del agua del tanque donde se almacenan las presas. En las paredes de este tubo

35

se colocó una malla de 500 micras que permitía entrar a las presas y en el fondo del tubo (salida) se colocó una malla de 200 micras que las retiene dentro del tubo. Una vez las presas están en la parte interior del tubo, éste se saca del tanque y las presas se concentra en un recipiente antes de añadirlas al tanque de las paralarvas mediante  
5 jarras plásticas de 1-2 L. (9.<sup>a</sup> diferencia).

Los datos de este ensayo mostraron una supervivencia superior al 90% a los 40 días de vida y entorno al 65% a los 60 días de vida. El Índice de crecimiento mostró un incremento de peso entre un 5 y 6% al día llegando a los 5 mg de peso seco a los 50  
10 días de edad (Figura 4A) y obteniéndose posteriormente paralarvas con pesos secos superiores a los 9 mg entre los 65 y 75 días de edad.

Ejemplo 4: Ensayo de control: cultivo larvario pulpo común (Tanque de 100L) utilizando *Artemia* sp. exclusivamente como presa desde el día 1 hasta el día 25 de vida de las paralarvas :  
15

Este ensayo se llevó a cabo con las mismas condiciones de cultivo descritas en los dos ejemplos anteriores, con la diferencia de que el volumen de los tanques fue de 100 L, en lugar de 1000L y se usaron tres réplicas en lugar de una sola. El ensayo tuvo una  
20 duración de 25 días. Al igual que en el ejemplo 2, se usó un tratamiento control, solo con *Artemia* sp. engordada durante 7 días con *Isochrysis aff. galbana*. Los resultados de crecimiento de las paralarvas fueron similares a los del ejemplo 2 como puede observarse en la Figura 4B con el peso seco en torno a 1 mg a los 25 días de vida.

25 Ejemplo 5: Ensayo cultivo larvario pulpo común (Tanque de 100L) utilizando *Artemia* sp. desde el día 1 hasta el día 8 y con los anfípodos de la presente invención entre los días 9 y 25 días de vida:

30 Este ensayo se llevó a cabo de forma paralela y con las mismas condiciones de cultivo descritas en el ejemplo 4, con el fin de comparar la *Artemia* sp. con un tratamiento experimental que usaba los mismos anfípodos del género *Jassa* spp. del ejemplo 3. La diferencia es que en esta ocasión, estos anfípodos se le empezaron a suministrar a partir del día 8 de vida, pues fue cuando se observó que una mayoría de larvas ingerían  
35 este tipo de presa (esto lo puede ver fácilmente el experto en la materia observando el

comportamiento de la paralarva o bien realizando el protocolo explicado en el siguiente ejemplo a fin de para saber cuándo empezar a suministrar la presa). En este caso, la alimentación durante los primeros 8 días consistió únicamente en *Artemia* sp. (del mismo tipo que el ejemplo 4) y entre los 9-10 días se alimentaron con una mezcla de  
 5 *Artemia* sp. (75%del total de individuos) y anfípodos (25%) del género *Jassa* spp. de entre 1-3 mm de longitud. A partir de los 10 días, las larvas comenzaron a alimentarse exclusivamente de estos anfípodos bajo las mismas condiciones del ejemplo 3 (3-5 presas/paralarva/día), hasta el cierre del cultivo. Los resultados de crecimiento de las paralarvas en este ejemplo fueron similares a los del ejemplo 3 como puede observarse  
 10 en la Figura 4B con una índice de crecimiento de 6,7% y una supervivencia del 70% a los 25 días.

Ejemplo 6: Ensayo de captura e ingestión de anfípodos a distintas edades

15 Paralelamente al resto de experimentos, se llevó a cabo un nuevo experimento con el fin de poder determinar con más exactitud la edad en la que las paralarvas son capaces de capturar e ingerir los anfípodos del género *Jassa* spp. y si puede haber diferencias entre puestas. Con este fin, se compararon paralarvas obtenidas de dos hembras distintas, las cuales presentaron diferentes pesos iniciales en el momento de la eclosión.  
 20 Las paralarvas de la primera hembra pesaron de media 0,24 mg de peso seco, mientras que las paralarvas de la segunda hembra tenían una media de 0,29 mg de peso seco inicial (ambas dentro de los márgenes habituales de peso en esta especie). Ambos grupos de paralarvas se colocaron en tanques separados de 100L bajo las mismas condiciones de cultivo de los ejemplos anteriores 2 a 5 y a una densidad de 4 larvas por  
 25 litro. En ambos casos se suministraron Anfípodos del género *Jassa* spp. (20-30%) junto con *Artemia* sp. (80-70%) desde el primer día de vida a la densidad de 3-5 presas/paralarva.

En ambos casos se observó que todos los anfípodos eran capturados. Aquellas  
 30 paralarvas que habían capturado alguna presa y la mantenían durante 2-3 minutos se extraían del tanque (con presa incluida) y se observaban a la lupa (40 aumentos) para confirmar que tenían alimento en su aparato digestivo. Los detalles técnicos para esta observación se encuentran en Nande, M. *et al* (2017). Prey Capture, Ingestion, and Digestion Dynamics of *Octopus vulgaris* Paralarvae Fed Live Zooplankton. *Frontiers in*  
 35 *Physiology*, 8, 573. En el presente ejemplo, se observó que las paralarvas recién

eclosionadas de 0,24 mg de peso seco atacaban la presa desde el primer día de vida, pero el porcentaje de ingestión era de solo un 30%, por lo que se podría considerar demasiado pronto para suministrar dicha dieta. Por otro lado, las paralarvas con 0,29 mg de peso seco mostraron un rango de ingestión del 80% desde el primer día de vida, lo que se considera adecuado para empezar a suministrar los anfípodos del género *Jassa* spp.

Este ensayo pone de manifiesto que el inicio de alimentación con estos anfípodos puede variar de una puesta a otra y sería recomendable, aunque no necesario, un ensayo de captura e ingestión paralelo para optimizar el inicio de alimentación con esta presa. No obstante estas presas (anfípodos) podrían comenzar a administrarse desde el primer día.

➤ **Comparativa de resultados entre experimentos de control y los de la presente invención.**

Al comparar los resultados de los experimentos basados en la presente invención con respecto al conocido en el estado de la técnica, las mejoras son claramente significativas para todos los ejemplos presentados (2, 3, 4 y 5) y que incluye ensayos tanto en 100 como en 1000L con el procedimiento de la presente invención. La supervivencia de las paralarvas en el procedimiento del estado de la técnica a los 30 días de edad (Garrido et al., 2017) está entre 0,14-3,77% (el ensayo constaba de un total de 18 tanques), dándose por cerrado el experimento a esa edad. Por el contrario, las condiciones del ensayo en tanques de 1000L de la presente invención con anfípodos obtuvieron una supervivencia de más de un 90% a los 40 días y del 65 % a los 60 días de edad. A su vez, las condiciones de cultivo en tanques de 100L con anfípodos obtuvieron una supervivencia de más de un 70% a los 25 días de edad. También, es de destacar que en el ensayo de 1000L, el tratamiento con *Artemia* sp., a pesar de tener una dieta subóptima mostró una supervivencia a los 40 días de más de un 65%, lo que indica que no es solo el uso de anfípodos lo que marca la diferencia, sino que el protocolo de cultivo también ha mejorado la supervivencia. En lo que respecta al peso, en el procedimiento del estado de la técnica (Garrido et al.,2017), se obtiene un índice de crecimiento con un incremento entre el 3,9-6,4% de peso seco por día, pero solo hay valores hasta 15 días de edad, mientras que los datos del procedimiento de la presente invención para los tanques con anfípodos, se obtiene un incremento similar a los máximos del estudio

anterior (entre el 5 y 6% de peso seco al día) para los tanques de 1000L, y un incremento de un 6.5 y 7.5% de peso seco al día para los tanques de 100L. En el caso de los tanques de 1000L, se llegaron a obtener larvas asentadas con pesos superiores a los 9 mg de peso seco entre los 65 y 75 días de vida. La Figuras 4A y 4B muestran el  
5 incremento de peso en los ejemplos 2, 3, 4 y 5 con el procedimiento de la presente invención. En este caso, también se pueden observar las diferencias entre los tratamientos con anfípodos y con *Artemia* sp.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el cultivo de paralarvas del pulpo común *Octopus vulgaris* emplazadas en un tanque de cultivo que contiene agua, caracterizado dicho  
5 procedimiento porque comprende la adición de presas seleccionadas de:
  - gammaridos del género *Jassa* spp.,
  - caprélidos de los géneros *Phtisica* spp. y/o *Caprella* spp. o
  - combinaciones de ellosa dicho tanque de cultivo.
- 10 2. Procedimiento según reivindicación 1 donde los gammaridos del género *Jassa* spp. son seleccionados de entre *Jassa falcata* y *Jassa marmorata*.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde los  
15 caprélidos del género *Phtisica* spp. son *Phtisica marina* y los caprélidos del género *Caprella* spp. son *Caprella equilibra*.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde desde el día  
20 1 de vida hasta los 20-30 días de vida de las paralarvas se adicionan gammaridos entre 1-4 mm, a partir de este momento y hasta los 50-70 días de vida se adicionan gammaridos de entre 2 y 8 mm de longitud y caprelidos entre 4 y 30 mm de longitud, desde los 50-70 días y hasta el asentamiento de las paralarvas se administran solo gammaridos con un tamaño entre 1 y 4 mm de longitud..
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde los gammaridos se adicionan desde un día comprendido entre 1-10 días de vida de la paralarva hasta el asentamiento de las mismas, mientras que los caprélidos se adicionan desde los 20-30 días de vida y hasta el asentamiento de las mismas.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde se adicionan los gammaridos desde el primer día de vida de las paralarvas hasta su asentamiento y los caprélidos se adicionan desde el día 10 de vida hasta su asentamiento.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde se adicionan  
35 tanto los gammaridos como caprélidos desde el día 30 de vida de las paralarvas hasta su asentamiento.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde, cuando se adicionan combinaciones de gammaridos y caprélidos, se administra entre un 1 y un 10% de caprélidos con respecto al número total de presas y entre el 90 y el 99% de gammaridos con respecto al número total de presas.
9. Procedimiento según reivindicación 8, donde se administra un 5% de caprélidos y un 95% de gammaridos con respecto al número total de presas.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la densidad de paralarvas en el tanque de cultivo es de entre 3-7 paralarvas/litro.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde se suministran al tanque de cultivo un total de entre 3 y 5 presas por paralarva y día.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde los tanques de cultivo usados entre el primer día de vida y hasta que los 50-70 días de vida son troncocónicos y de color negro y a partir de los 50-70 días, las paralarvas se transfieren a otro tanque de cultivo de fondo plano y color gris.
13. Procedimiento según reivindicación 12 donde la densidad de paralarvas en el tanque de cultivo de fondo plano y un color gris será de 0,1 y 0,5 larvas por litro.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el tanque de cultivo se ilumina de forma artificial mediante una luz colocada sobre el borde del tanque.
15. Procedimiento según reivindicación 14 donde los niveles de intensidad de la luz suministrada varían entre 1077 y 1436 W/m<sup>2</sup> para los primeros 10-15 días de vida de las paralarvas; entre 517 y 1077 W/m<sup>2</sup> a partir de los 10-15 días de vida y hasta los 50-70 días de vida, desde este momento y hasta el asentamiento la luz se reduce a un rango entre 69 y 517 W/m<sup>2</sup>.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el agua del tanque de cultivo se renueva de la siguiente manera:  
durante los dos primeros días no se efectúa ningún tipo de renovación de agua en los tanques, posteriormente, se renueva un 20% diario hasta los 5 días de vida de las paralarvas y de ahí se vaya incrementando hasta llegar al 100% diario a los 10-15 días,

esta renovación se mantiene al 100% hasta los 30 días y a partir de ahí, la renovación se deja abierta de forma permanente durante 24 horas al día lo que representa una renovación diaria de un 200% aproximadamente, este porcentaje de renovación se mantendrá hasta que las paralarvas se asienten.

5

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde, además, se adiciona al tanque una mezcla de microalgas *Isochrysis* spp. y *Nannochloropsis* spp. hasta obtener una concentración de las mismas entre 0,7 y 1,5 x 10<sup>6</sup>cls/mL en el momento de dicha adición.

10

18. Procedimiento según reivindicación 17 donde, se adiciona la mezcla de microalgas una vez al día.

15

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la concentración de oxígeno en el agua del tanque de cultivo es superior a 5,5 mg/L.

20

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la salinidad del agua del tanque de cultivo es de de 35-36 g/L

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la temperatura del agua del tanque de cultivo es de entre 18 y 22°C.

25

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el fondo del tanque de cultivo se mantiene sin sifonar.

30

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las presas se adicionan al tanque de cultivo desde un tanque de almacenamiento de las mismas mediante sifonado de las paredes y fondo del tanque de almacenamiento de las presas o mediante un concentrador que utiliza el propio tubo de salida del agua del tanque de cultivo, de manera que en dicho tubo se coloca una malla que permita entrar a las presas y en el fondo del tubo se coloca una malla menor (que las retiene dentro del tubo) y una vez las presas están en la parte interior del tubo, éste se sacará y las presas se pasaran a un recipiente para añadirlas al tanque de paralarvas.

35

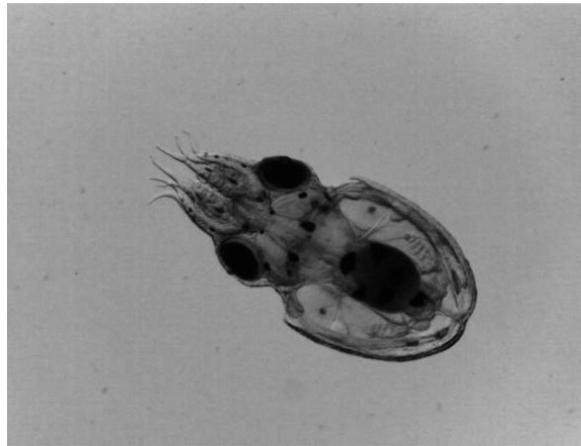


FIG. 1

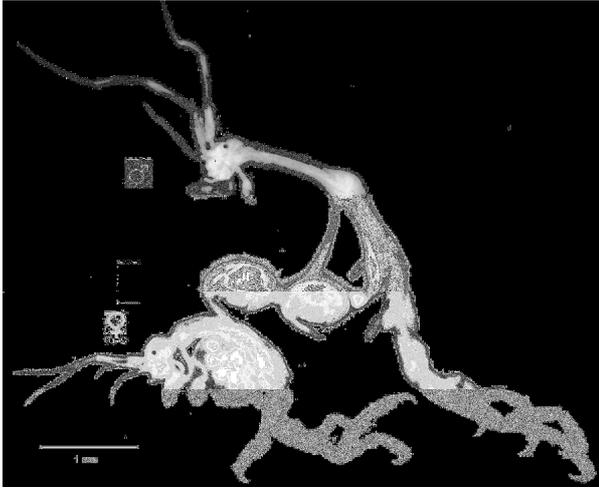


A)



B)

FIG. 2



A)



B)

FIG. 3

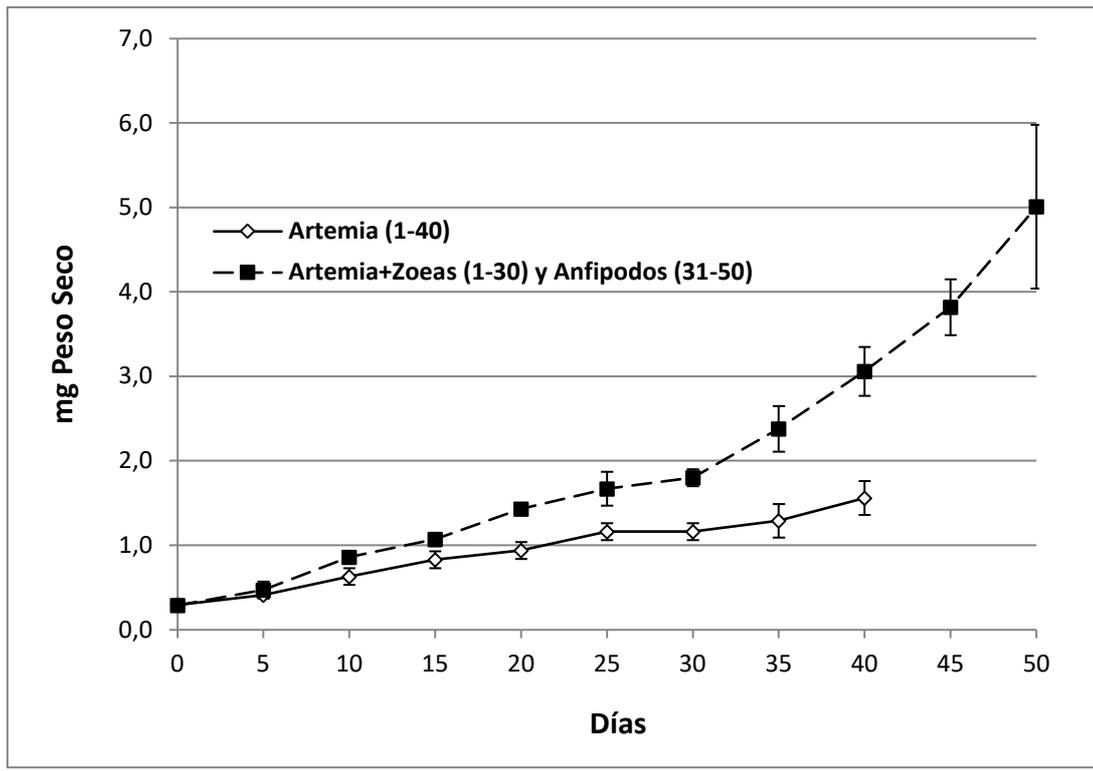


FIG. 4A

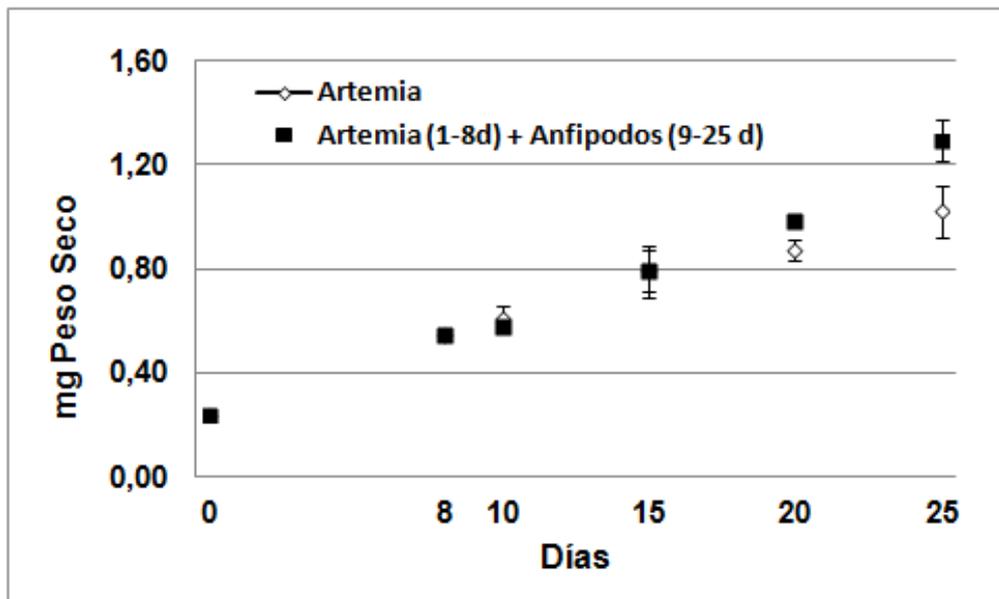


FIG. 4B

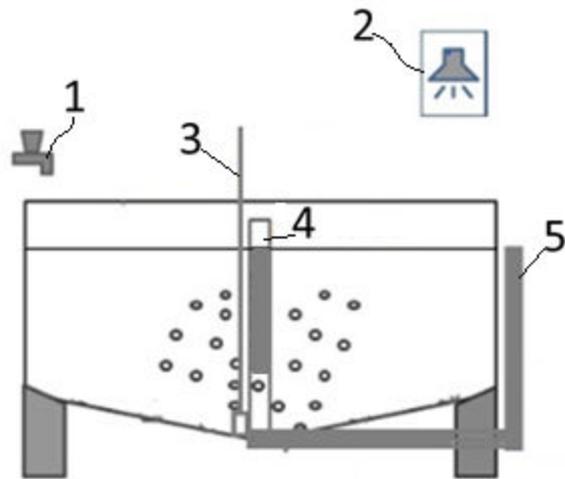


FIG. 5A

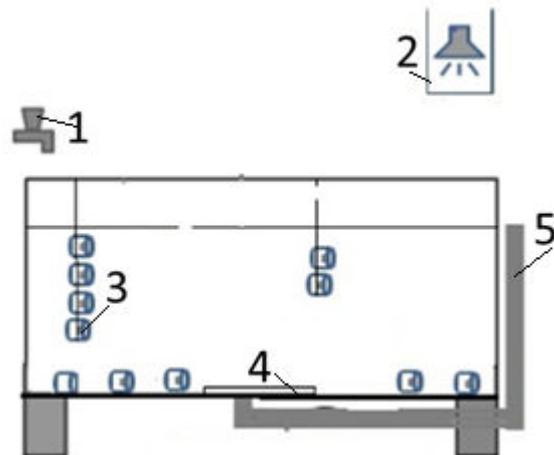
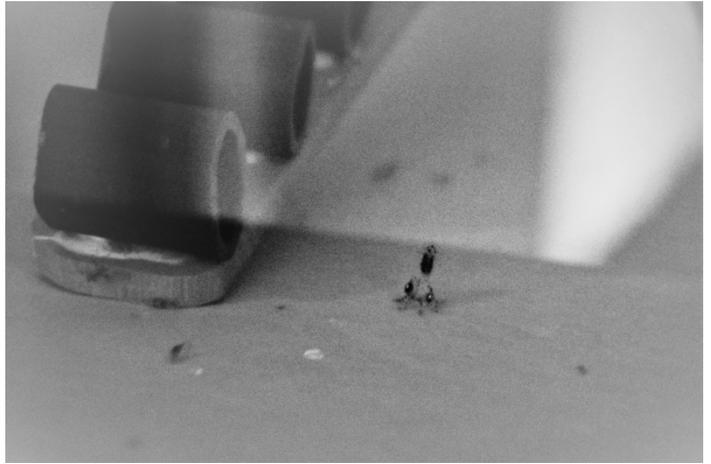


FIG. 5B



A)



B)

FIG. 6