

**Efectos de la
luz en la distribución, supervivencia y marcadores de
estrés en paralarvas de pulpo común
(*Octopus vulgaris*)**

**Effects of the light on the distribution, survival and stress
markers on common octopus paralarvae
(*Octopus vulgaris*)**

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2016/2017

Isabel María Morgado Carrillo

Tutorizado por Eduardo Almansa Berro y Antonio Lorenzo Hernández.

Grado en Biología. Septiembre 2017.

Indice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Objetivos.....	8
Material y método	9
1. Mantenimiento de reproductores y obtención de las puestas.....	9
2. Ensayos con paralarvas.....	9
2.1. Experiencia Refugios: Con refugio vs. Sin refugio	12
2.2. Experiencia intensidad: 320 lux vs. 1010 lux.....	12
2.3. Experiencia Luz blanca vs. Luz roja.....	13
2.4. Experiencia Luz natural vs. Luz artificial.....	15
3. Análisis estadístico.....	16
4. Determinación de marcadores secundarios de estrés.....	16
4.1. Realización del homogeneizado.....	16
4.2. Proteína	17
4.3. Lactato	18
4.4. Glucosa	18
Resultados	20
1. Experiencia Refugios: Con refugio vs. Sin refugio.....	20
2. Experiencia intensidad: 320 lux vs. 1010 lux	25
3. Experiencia Luz blanca vs. Luz roja	29
4. Experiencia Luz natural vs. Luz artificial	36
Discusión.....	42
Conclusiones.....	45
Conclusions.....	46
Bibliografía.....	46

Resumen

El primer período de alimentación de las especies acuáticas cultivadas se caracteriza por altas tasas de crecimiento pero también por altas mortalidades. Por esta razón es la etapa para la cual se requiere un control más estricto de las condiciones ambientales y nutricionales. Debido a que las primeras etapas de muchas especies de la acuicultura son predadores visuales, establecer las condiciones de iluminación adecuadas durante el primer período de alimentación es de suma importancia.

Octopus vulgaris es una especie candidata en el mundo de la acuicultura, debido a su gran demanda en el mercado, sin embargo las altas tasas de mortalidad en su cultivo en sus primeros días de vida, ponen de manifiesto la dificultad de que la especie prospere favorablemente.

Este trabajo trata de determinar, bajo diferentes condiciones de intensidad, color y naturaleza de la luz, cuáles son las condiciones más óptimas para el crecimiento y desarrollo de la especie, además de para su supervivencia. Para ello se utilizaron tubos de metacrilato de 40 L, filtros neutros, refugios de PVC para las paralarvas, luz blanca y roja e intensidades de 320 y 1010 lux. Estas experiencias tuvieron una duración de tres días y se introdujeron 30 paralarvas/tubo de edades de entre 0 y 30 días.

Obteniéndose resultados diferentes en función del tratamiento aplicado, edad de las paralarvas y horas de muestreo.

Por otra parte, se analizaron biomarcadores de estrés secundarios de las paralarvas que sobrevivieron a los tratamientos, como glucosa y lactato, con la intención de medir el grado de estrés que les producía estos tratamientos a las paralarvas. Estos resultados son diferentes en paralarvas expuestas a los mismos tratamientos en función de la edad, por lo que es posible observar una adaptación diferente según el nivel de desarrollo de estos organismos.

Palabras clave: Paralarvas de *Octopus vulgaris*, luz, biomarcadores estrés secundarios, supervivencia, acuicultura.

Abstract

The first feeding period of aquatic cultured species is characterized by high growth rates but also by high mortalities. For this reason it is the stage for which a tighter control of the environmental and nutritional conditions is required. Because early stages of many aquaculture species are visual predators, setting the adequate lighting conditions during the first feeding period is of paramount importance.

Octopus vulgaris is a candidate species in the world of aquaculture, due to its high demand in the market, however the high mortality rates in the first moments of life in its cultivation, show the difficulty of the species to flourish favourably.

This work tried to determine, under different conditions of intensity, color and nature of light, which factors optimize the growth and the development of this species, in addition to its survival. For this, methacrylate tubes of 40 L, neutral filters, PVC shelters for the paralarvae, white and red light and intensities of 320 and 1010 lux were used. These experiments lasted for three days and were introduced 30 paralarvae/tube of ages between 0 and 30 days. Different results were obtained depending on the treatment applied, age of the paralarvae and hours of sampling.

In addition, secondary stress biomarkers of the paralarvae that survived the treatments, such as glucose and lactate, were analysed with the intention of measuring the degree of stress that these treatments caused to the paralarvae. These results are different in paralarvas exposed to the same treatments in function of the age, reason why it is possible to observe a different adaptation according to the level of development of these organisms.

Keywords: *Octopus vulgaris* paralarvae, light, secondary stress biomarkers, survival, aquaculture.

Introducción

En este trabajo centraremos la atención en la especie *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797), la cual tiene gran interés en el campo de la Acuicultura. Dicho interés radica principalmente en tres factores: alta fecundidad, rápido crecimiento y alto precio, debido a la alta demanda en el mercado, tanto a nivel europeo (España, Portugal, Italia,...) como a nivel mundial (Japón, Corea, México,...). (FAO, 2011; Iglesias & Fuentes, 2014).

El problema de esta especie es su enorme tasa de mortalidad bajo condiciones de cautividad, en la mayoría de los casos, del 100% en sus primeras fases de vida, lo cual supone un gran obstáculo para su desarrollo a nivel comercial (Iglesias et al., 2014).

En estas primeras fases, los individuos reciben el nombre de paralarvas (Villanueva & Norman, 2008) y son considerados miembros del meroplancton, ya que solo pasan parte de su vida en el plancton. Tras esta fase de vida, a los 50-60 días de vida pasan a una fase de asentamiento, tras la cual pasan a formar parte del bentos, dependiendo sobre todo, de la temperatura (Villanueva & Norman, 2008).

Recientemente, se han realizado diversos estudios a nivel de zootecnia, nutrición, fisiología y condiciones de vida en su hábitat natural, aunque no ha sido suficiente para cerrar su ciclo de vida en cautividad (Iglesias et al., 2014 ; Roura et al., 2012, 2016, 2017; Garrido et al 2016 y 2017; Varo et al 2017; García-Fernández et al 2017; Morales et al. 2017; Perales-Raya et al., 2017; Sykes et al., 2017; Monroig et al., 2017; Reis et al., 2015; Martin et al., 2017; Tur et al., 2017; Nande et al., 2017).

Estos estudios han puesto de manifiesto que no solo la nutrición es importante, sino que las condiciones ambientales como la temperatura, salinidad, densidad de paralarvas, forma de tanque, tipo de dieta, aireación, circulación del agua, etc,... también pueden afectar de forma diferente al crecimiento y supervivencia de esta especie.

Estudios recientes llevado a cabo en las poblaciones de larvas salvajes por Roura et al. (2016) muestran que las paralarvas nacen en la costa, donde permanecen a 20 - 40 m de profundidad, los primeros 15 - 20 días de vida; llegadas a esta edad se desplazan a mar abierto, donde se localizan a unos 100 - 200 m de profundidad durante el día, encontrándose individuos en la superficie solamente por la noche. Estos datos sugieren

que en el medio natural, estos animales se encuentran en unas condiciones de iluminación muy específicas, las cuales deberían ser tomadas en cuenta a la hora de cultivar en cautividad.

Desde el punto de vista del sistema visual, los cefalópodos coloides, como el pulpo, poseen sofisticados ojos tipo cámara (Bundelmann 1996) cuya agudeza visual y capacidad de formación de imagen es similar a la de los vertebrados (Sweeney et al., 2007), por lo que se espera que la intensidad de la luz sea un factor a tener en cuenta para ambos grupos de animales. En larvas de algunas especies de peces, la maduración ontogenética de los ojos se corresponde con la aparición de la función digestiva (Roo et al., 1999) y, en general, se acepta que cada especie de pez tiene su propia intensidad lumínica óptima durante el período larvario en medio de cultivo (Boeuf y Le Bail, 1999). Por otra parte, los efectos de la intensidad de la luz sobre las tasas de depredación, crecimiento y supervivencia de los cefalópodos jóvenes no se conocen tan bien como la de los peces cultivados. La *Sepia officinalis* recién nacida se alimenta de *Mesopodopsis slabberi* a intensidades de luz tan bajas como 25 lux de luz blanca (Márquez et al., 2007a) o simplemente cuando el medio acuático contiene microalgas bioluminiscentes (Fleisher y Case 1995).

En el caso de *Octopus vulgaris*, Márquez et al. (2007b) mostró la importancia de la intensidad de la luz en la predación de las paralarvas de un día de edad alimentadas con *Artemia sp.*, ya que la tasa de depredación disminuye cuando el ensayo se realiza en oscuridad. Sin embargo, este resultado se obtuvo con una configuración experimental de bajo volumen, por lo que el efecto de la intensidad de la luz en condiciones de cultivo aún no se ha investigado.

Otro factor a tener en cuenta, es el espectro de la luz. Las larvas de peces poseen más de un pigmento visual en sus retinas después de la eclosión (Helvik et al., 2001, Valen et al., 2014), de modo que es posible que puedan percibir los colores, pero otras especies expresan sólo un pigmento visual antes de la metamorfosis (Evans et al., 1993). Como consecuencia, la composición espectral de la luz durante el primer periodo de alimentación puede determinar el éxito del cultivo. Las longitudes de onda azules parecen ser más óptimas para el crecimiento y la supervivencia (Villamizar et al., 2011, Sierra-Flores et al., 2016). En lo que respecta a los cefalópodos, se ha visto que sólo

tienen un pigmento visual en sus retinas con un pico máximo de absorción alrededor de 480 nm que corresponde con el azul (Hamasaki, 1968; Chung y Marshall, 2017). Esto sugiere que son ciegos al color (Messenger et al., 1973, Mäthger et al., 2006). Sin embargo, Stubbs y Stubbs (2016) han propuesto recientemente que los cefalópodos presentan una configuración del ojo que puede permitir una cierta visión del color a través de una aberración cromática causada por la forma de su pupila. Por lo tanto, la visión del color en cefalópodos no puede ser completamente descartada en este momento, y su papel potencial en la captura de presas por paralarvas y juveniles se encuentra por investigar.

Otro factor a destacar para cualquier depredador visual, es el fotoperiodo al que esté sometido, ya que limita el tiempo durante el cual la detección de presas puede ser efectiva. Además, en los peces, los ciclos circadianos luz-oscuridad afectan a la neurofisiología de las larvas en relación con el estrés y los ritmos metabólicos (y probablemente el crecimiento) (Pittman et al., 2013). Sin embargo, el efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento larval varía de leve a fuerte dependiendo de la especie (Villamizar et al., 2011; Cañavate et al., 2006; Barlow et al., 1995). En cefalópodos, los estudios sobre los efectos del fotoperiodo durante el primer período de alimentación son mucho más limitados y solo se conoce en crías de *Sepia officinalis*, en las que se pudo observar una limitación de la tasa de ingestión de alimentos debido a una corta duración del día (Koueta and Boucaud-Camou 2003).

Al realizar un repaso a la bibliografía actual acerca de este tema, se puede ver que hay muy pocos estudios relacionados con las condiciones de iluminación bajo cultivo y que pueden influir muchos factores, tales como la intensidad, el color de la luz, el color de las paredes o el fondo del tanque. Todos estos factores, junto a la falta de estandarización dan lugar a diferencias entre los trabajos realizados que impiden una comparación adecuada entre ellos. De esta forma encontramos condiciones muy dispares, como pueden ser: tanque blanco y 40 W de intensidad (Carrasco et al, 2014), tanque gris e intensidad natural (Iglesias et al, 2014) y tanque negro con 60-250 lux (De Wolf et al, 2011). Fernandez-Lopez et al., 2005 sugieren que el aumento de la intensidad de luz puede ser beneficioso para la supervivencia y el desarrollo de la especie, no obstante, los mejores resultados de estos autores se obtienen a 6000 lux, intensidad

muy lejana a las condiciones naturales de estos seres (que como media pueden estar entre 10 lux para 100 metros y unos 300 - 600 lux cerca de la superficie durante el día). También es necesario mencionar que, los mejores resultados en cultivos (obtención de bentónicos) se han obtenido con 1000 lux y agua verde en el tanque (Iglesias y Fuentes, 2014). También se ha sugerido que la utilización de tanques negros tanto para *O. vulgaris* como para *O. aegina* muestra una mejoría que preceden al empleo de otros colores de tanque (Okamoto, Kawamura, Anraku & Tanaka, 2001). En estos estudios se ha observado que la tendencia habitual observada en las paralarvas bajo condiciones de cultivo es mantenerse cerca de la superficie del agua, lo cual no parece coincidir con las observaciones hechas en el medio natural. Por esta razón, en el presente estudio se pretende observar si los cambios en las condiciones de iluminación favorecen la migración vertical de las paralarvas hacia zonas más profundas.

Toda esta controversia y variabilidad, junto con los datos recientes aportados en los trabajos de larvas salvajes por autores como Roura (2016) sugieren que son necesarios más estudios para optimizar las condiciones de iluminación en el cultivo de estas especies y su influencia en el crecimiento y supervivencia.

Las condiciones de iluminación no solo pueden afectar a la captura de las presas, sino también al estado fisiológico de las paralarvas dando lugar a situaciones estresantes que pueden influir en la viabilidad del cultivo. En este sentido, la respuesta primaria fisiológica a estas perturbaciones en la mayoría de las especies se origina de forma rápida, en forma de secreción de catecolaminas, seguida de una elevación de los niveles de corticosterona cuando el estrés persiste de forma crónica. Los efectos varían entre las especies pero, en general, la corticosterona estimula el transporte de Na⁺ a través de las branquias, mucosa del intestino y riñón. Los efectos secundarios de estos eventos hormonales desembocan en una alteración del balance homeostático del metabolismo (respuesta secundaria) de proteínas, carbohidratos y lípidos. Las reservas de carbohidratos son almacenadas en forma de glucógeno, que es modificado durante el estrés, dando lugar a glucosa y, posteriormente, como producto de la glicólisis, proveniente del piruvato, a lactato. La respuesta del estrés en peces como el pez arcoíris, *Melatoenia boesemani*, ha mostrado que los valores de glucosa y lactato aumentaban con el tiempo en base a un índice de correlación alto, siendo estos buenos indicadores

de medición de estrés (Wells & Pankhurts, 1999). Del mismo modo, en crustáceos como *Cancer pagurus* y en peces como la carpa común, *Cyprinus carpio*, con estrés inducido, se observa que la respuesta láctica se desarrolla de forma rápida, aumentando al poco tiempo de estimulación de estrés, mientras que la glucosa incrementa de forma más pausada en el tiempo (Patterson, Dick & Elwood, 2007; Nematollahi, Van Pelt & Komen, 2013).

Recientemente, una colaboración entre el IEO de Tenerife, la Universidad de Vigo y el CIIMAR de Oporto han identificado la presencia de catecolaminas y corticosterona, así como de sus receptores y rutas de síntesis en paralarvas de pulpo común bajo diferentes condiciones de estrés (Tur et al., 2017). Sin embargo las técnicas para medir la presencia de estas hormonas necesitan aún de su estandarización para facilitar su medición, mientras que los marcadores de tipo secundario (glucosa, lactato, osmolaridad) son muy sencillos de cuantificar. Además estos últimos se mantienen en el tiempo (días), mientras que nuestros resultados sugieren que la secreción de hormonas en paralarvas de pulpo llega a durar solo unos minutos para las catecolaminas y unas 24 horas para la corticosterona.

Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo general el análisis del efecto que tienen diferentes condiciones de iluminación en las migraciones verticales, la supervivencia y los biomarcadores de estrés secundario (glucosa y lactato) en paralarvas de *Octopus vulgaris*.

Estos parámetros se analizaron bajo las siguientes condiciones:

- Presencia o ausencia de refugios que les permitan resguardarse bajo unas condiciones de iluminación determinadas.
- Respuesta ante distintas intensidades de luz (320 y 1010 lux).
- Respuesta ante diferentes colores de luz (rojo vs. Blanco).
- Efecto de la luz artificial frente a la luz natural.
- Comparar los resultados obtenidos en cada experiencia con paralarvas de diferentes edades, teniendo como propósito averiguar si existe una adaptación diferente en función del estadio de vida.
- Analizar el efecto de las condiciones descritas en los biomarcadores de estrés secundario (glucosa y lactato).

Material y método

Todos los experimentos se realizaron conforme a la ley española 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos, la cual a su vez está basada en la directiva de la Unión Europea sobre bienestar animal (Directiva 2010/63 -/UE).

1. Mantenimiento de reproductores y obtención de las puestas

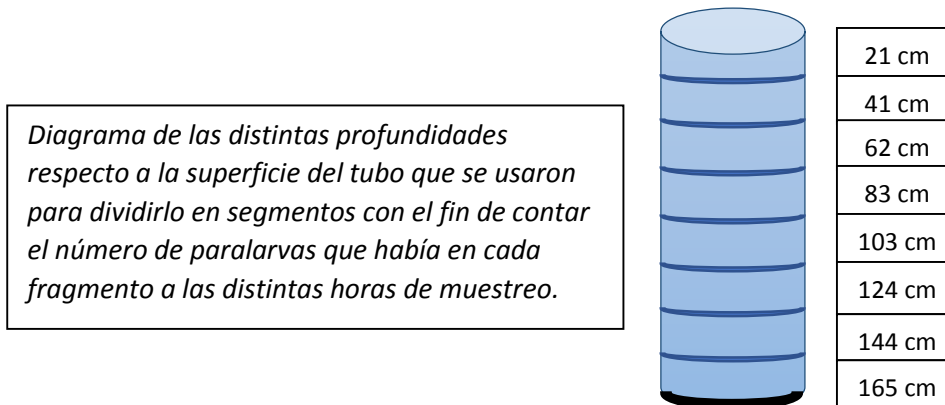
Los reproductores de *O. vulgaris* (700 a 2000 g) fueron capturados en la isla de Tenerife, España, por pescadores artesanales y se transfirieron a tanques circulares de fibra de vidrio de 1000L a razón de dos hembras por macho, con pesos similares. Los tanques forman parte de un sistema de flujo con un caudal de 6L/min, en el que el agua entró en el tanque desde su parte superior (cubierta parcialmente con una red sombreada) y sale por la parte inferior a través de una malla para evitar escapes. El fotoperiodo es de tipo natural (desde 10h de luz: 14h oscuridad hasta 11h luz: 13h oscuridad); la temperatura media del agua es $20.69 \pm 1.04^{\circ}\text{C}$, salinidad $36.8 \pm 0.14 \text{‰}$, y alimentación *ad libitum*, consistente en una mezcla de 50% de calamar (*Opalescens doryteuthis*) y 50% de cangrejo (*Cancer pagurus*). Como guaridas son utilizados tuberías de PVC donde también depositarán la puesta.

Se comprueba la presencia de masas de huevos una vez por semana, para minimizar el estrés de los reproductores. Una vez que se observa que se ha producido la puesta, la hembra es aislada con dicha puesta durante la incubación (un mes aproximadamente). Cuando comienza la eclosión, se retiran las larvas del tanque de la hembra diariamente para asegurar que el día de la siembra en los tanques experimentales, todas las larvas sean recién eclosionadas.

2. Ensayos con paralarvas

Las larvas de 0 días usadas en los ensayos de luz se toman directamente del tanque de la hembra. Para conseguir larvas de mayor edad, estas fueron criadas en tanques de 1000 L cubiertos por una red sombreada para evitar la exposición de las paralarvas a estímulos de luz. Estos tanques forman parte de un sistema de flujo con un caudal de 60ml/ 5", en el que el agua entra por la parte superior y sale por la parte inferior a través de una malla para evitar escapes. La temperatura media del agua es $20.69 \pm$

1.04°C, salinidad 36‰, y alimentación consistente en *Artemia sp.* enriquecida con fitoplancton T-Iso liofilizado.



Para estudiar el efecto de la luz en el comportamiento de las paralarvas y en sus marcadores de estrés, se sembraron las paralarvas en tubos cilíndricos de metacrilato (3 mm de grosor) de 165 cm de altura, 25 cm de diámetro y con un círculo negro colocado en el fondo para evitar la reflexión de la luz en el metacrilato del fondo. En estos tubos se introdujeron 40 L de agua salada filtrada. Para cada tratamiento tenemos tres réplicas, donde eran introducidas 30 paralarvas/tubo. La iluminación de cada tubo difería según el experimento, por lo que será descrita en su apartado correspondiente.

Con el fin de estudiar posibles cambios en la distribución vertical de las paralarvas bajo diferentes condiciones de iluminación, se dividió el tubo en diferentes secciones (ver diagrama) y se llevó a cabo un recuento de paralarvas en cada una de ellas a diferentes horas del día que serán descritas en los apartados correspondientes a cada experimento. Posteriormente, estos números fueron traducidos a porcentajes respecto al total que había en el tubo en ese momento.

Con el fin de evitar corrientes de agua en la columna que pudieran influir en la dispersión de las larvas, se eliminó la aireación del tanque y la renovación, por lo que cada experimento duró 3 días, ya que es el tiempo en el que el nivel de oxígeno se mantiene en niveles adecuados para la supervivencia de las paralarvas. Se usó agua filtrada a 1 micra para rellenar los tanques con salinidad natural ($36,8 \pm 0,14$ psu) y una temperatura de $20.69 \pm 1.04^\circ\text{C}$.

En cuanto a la alimentación, se usó *Artemia sp.* enriquecida con fitoplancton (T-Iso liofilizado, easvalgae, Cádiz, Spain) con una concentración de 0,15 artemia/ml, de tal forma, que como cada tubo tenía 40 L, introducíamos unas 6000 individuos por tubo, en una toma al día. En el caso de las paralarvas de mayor edad mantenidas en los tanques de 1000 L, hasta los 10 días de edad, las paralarvas fueron alimentadas con metanauplius de 24 horas mientras que para aquellas que superaban los 10 días de edad, se usó artemia de 4 días.

Determinación de la supervivencia y toma de muestras

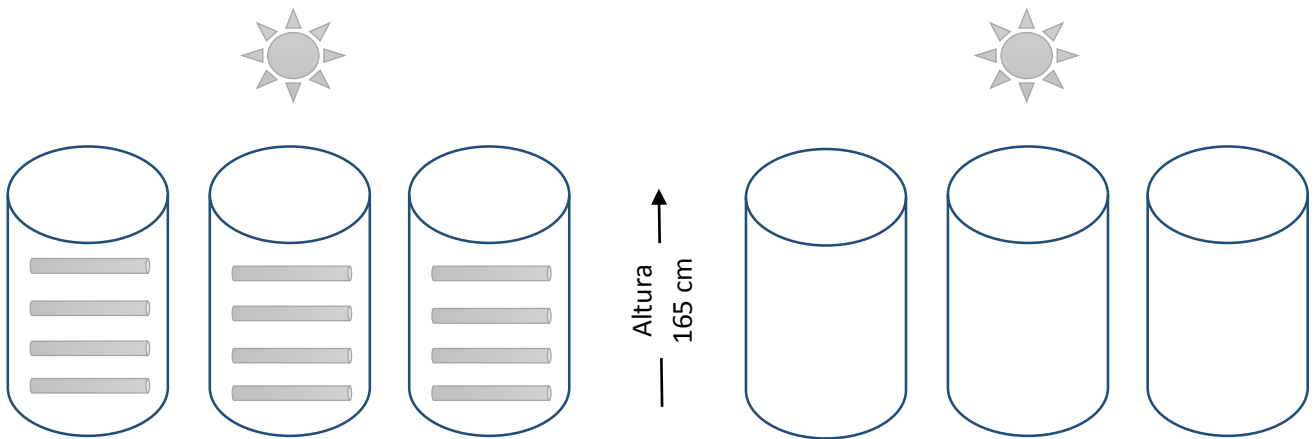
La supervivencia fue estimada al finalizar el tiempo requerido para cada experiencia, mediante el recuento de paralarvas vivas y muertas por cada tubo.

Para este recuento, los tubos fueron sifonados uno a uno, y el agua se hizo pasar por mallas de 500 micras para así, concentrar todas las paralarvas en un cubo, y realizar el conteo de las vivas.

El número de paralarvas vivas fue traducido a porcentajes, para finalmente obtener los datos en forma de media \pm SD para cada uno de los tratamientos. Además, se aplicaron métodos estadísticos con estos resultados mediante el programa informático para el análisis de datos SPSS, usando una t-Student para muestras independientes con el fin de encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$).

Una vez realizado el conteo, las paralarvas vivas fueron anestesiadas con agua helada y lavadas con agua destilada, para posteriormente ser introducidas en crioviales de 1,5 ml, congeladas en nitrógeno líquido antes de ser almacenadas en un ultracongelador a -80° C para su posterior análisis de biomarcadores secundarios de estrés.

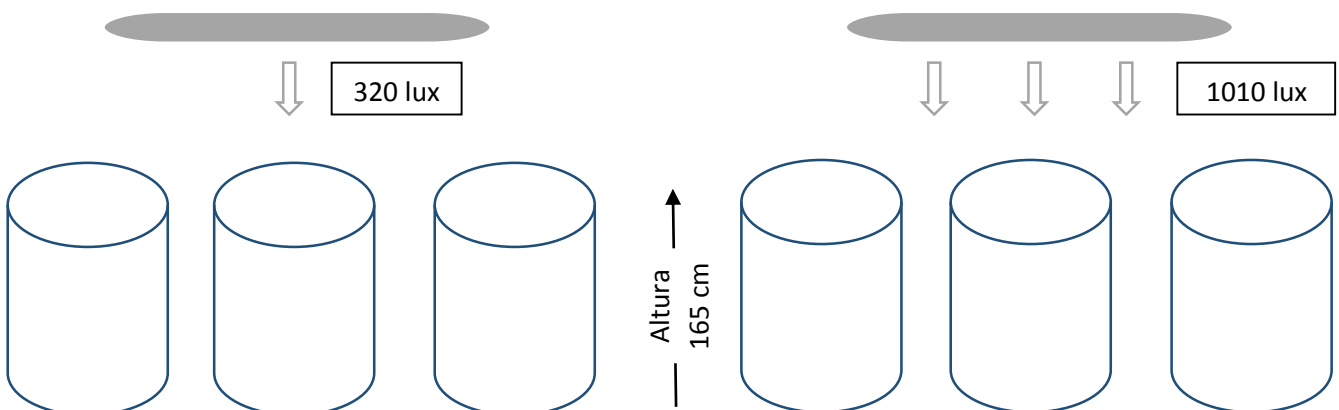
2.1. Experiencia Refugios: Con refugio vs. Sin refugio



Esta serie de experimentos se realizaron con paralarvas de 0, 10 y 20 días de edad, con muestreos a tres horas diferentes del día: 9:00, 11:00 (una hora después de ser alimentadas) y 15:00; con una duración de tres días cada experimento, contando el día de la siembra.

Se llevaron a cabo en una sala con iluminación natural que entraba por ventanas y una claraboya en el techo, de manera que las paralarvas estaban expuestas a un fotoperiodo de luz natural. Para este experimento, en tres de estos tubos de experimentación, fueron colocados una serie de tubos de PVC cilíndricos de 3 cm de diámetro y 16 cm de largo. De esta forma, con la intención de que las paralarvas lo usasen como refugio, se colocaron 4 de estos tubos distribuidos de forma vertical a lo largo del tubo de metacrilato que contenía las paralarvas.

2.2. Experiencia intensidad: 320 lux vs. 1010 lux

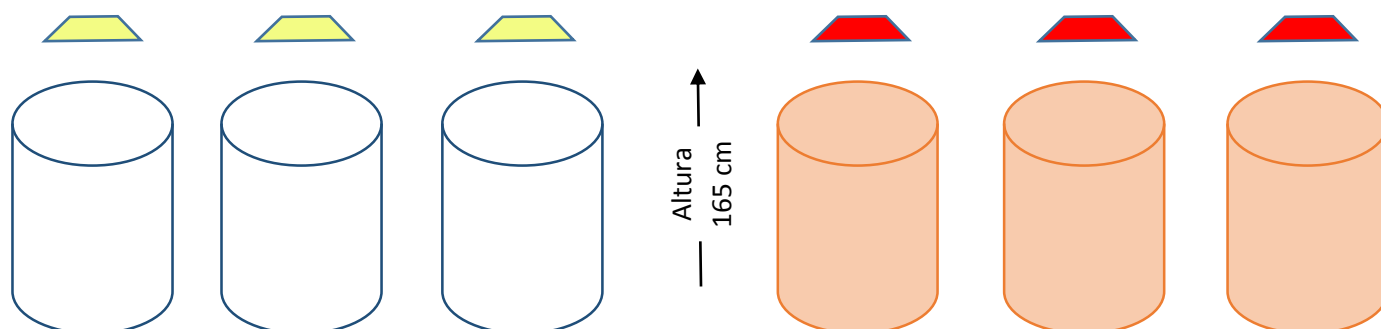


Como podemos ver en la ilustración superior, para esta serie de experimentos se aplican dos tratamientos de distintas intensidades, siéndoles aplicada una luz con 320 lux de intensidad a tres de los tubos, y otra luz con 1010 lux a los otros tres, esto se llevó a cabo mediante la colocación de filtros neutros (298.15 ND Lee Filters) en los focos LED Aquatlantis modelo Easyled universal 1450 mm 24 V – 72 W que fueron usados para el experimento. De esta forma, se colocaron cuatro filtros para obtener 320 lux de intensidad, y solo uno para obtener 1010 lux. Además, los tubos fueron separados tres a tres por un plástico negro, para impedir que la intensidad de un tratamiento afectara al otro.

Los experimentos fueron realizados con paralarvas de 0, 10 y 20 días de edad, a las mismas horas de muestreo y duración en días del experimento que las expuestas en el apartado 2.1.

Por otro lado, se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas luz LED : 12 horas luz nocturna. Esta luz nocturna provenía de focos Leddy Tube Marina de 6W, 50/60 Hz y 220-240 V (intensidad en torno a 100 lux).

2.3. Experiencia Luz blanca vs. Luz roja



Como se muestra en la ilustración superior, el diseño experimental constó de un total de 6 tubos de 40 L de agua salada filtrada, de los cuales, tres fueron expuestos a luz blanca, y tres a luz roja.

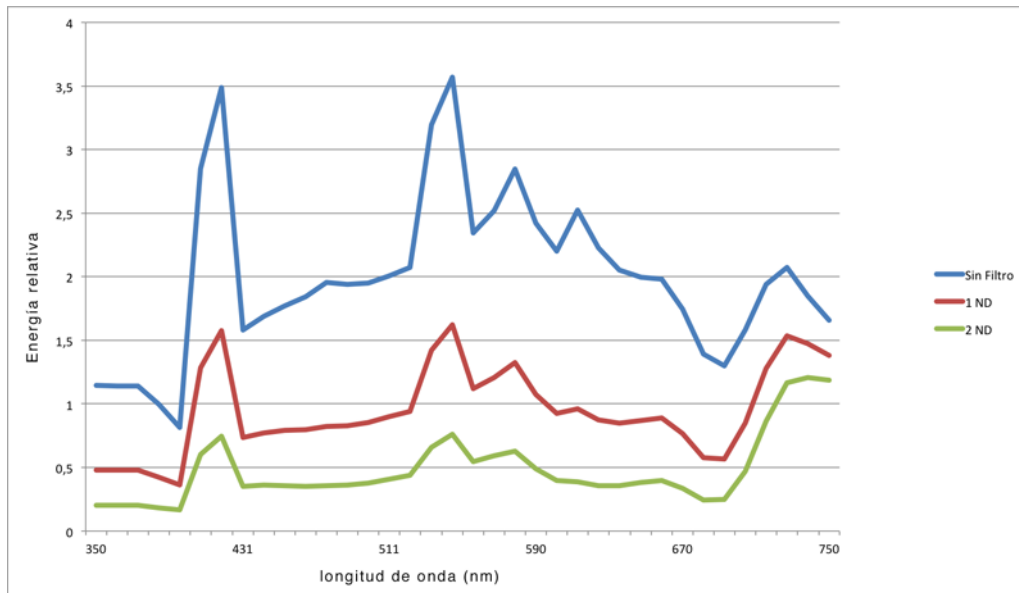
Tras los experimentos explicados en los apartados 2.1 y 2.2., hubo la posibilidad de ampliar el ensayo a 30 días (antes era 20) y por ello se cambiaron los días a 15 y 30 en

lugar de 10 y 20 como se habían estado usando hasta ahora. Además, los muestreos correspondientes a los experimentos con paralarvas de 0 y 15 días de edad, se realizaron a las 9:00, 11:00 (una hora después de ser alimentadas) y 15:00. Mientras que en los experimentos con paralarvas de 30 días de edad se realizaron muestreos a cuatro horas distintas en lugar de tres (10:00, 11:30, 14:00 y 17:00) dado que se observó un comportamiento diferente de las paralarvas en horas más avanzadas de la tarde respecto al que se había observado hasta ese momento durante la mañana. Además, estos ensayos tuvieron una duración de tres días, contando el día de la siembra.

En cuanto al fotoperiodo, se aplicaban 12 horas de luz color : 12 horas luz nocturna. La luz de color provenía de bombillas LED GU10, RGBW, 4.5W con luz blanca (660 – 700 lux) o roja (290 – 380 lux) y protegidos por focos de aluminio de 10 cm de diámetro. Estos focos se situaban a una distancia de 14 cm del agua. Mientras que la luz nocturna se obtenía de focos Leddy tube marine de 6 W, 50/60 Hz y 220-240 V (entorno a 100 lux).

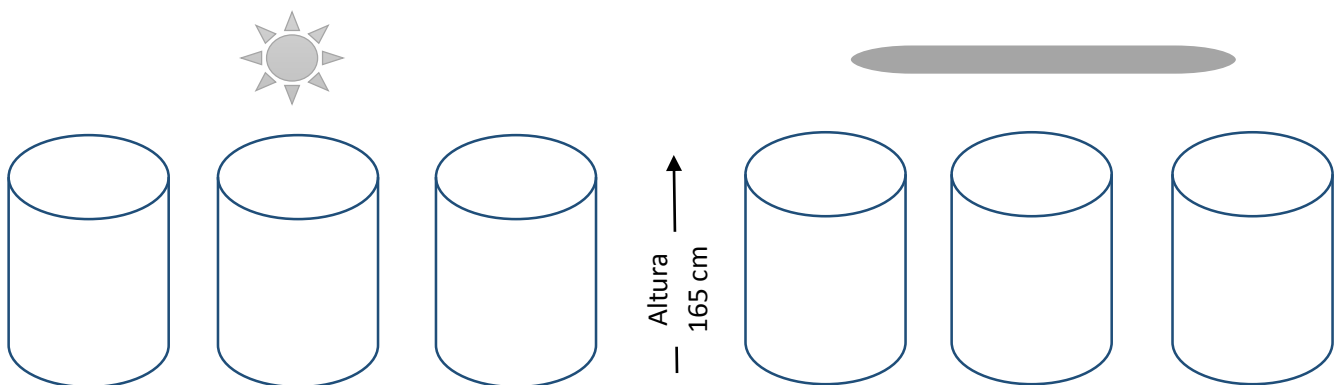
Mediciones previas llevadas a cabo con un radiómetro mostraron que la intensidad de la luz roja era casi la mitad de la luz blanca, por lo que fueron colocados filtros neutros (298.15 ND Lee Filters) con la intención de igualar las intensidades, siendo colocados cuatro de estos filtros en los focos de luz blanca y dos en los de luz roja. Los valores de reducción de intensidad mediante la colocación de filtros se muestran en la figura A.

Figura A. Energía relativa tras la colocación de filtros en función de la longitud de onda de la luz de origen.



Los tubos estaban situados en un habitáculo habilitado para el experimento, de tal forma que se encontraban en total oscuridad, y las paralarvas solo estaban sometidas a la luz proveniente de los focos LED que incidían desde la parte superior de los tubos.

2.4. Experiencia Luz natural vs. Luz artificial



Estos experimentos fueron realizados con paralarvas de 0, 15 y 30 días, a las mismas horas de muestreo que las explicadas en el apartado 2.3.

Para esta experiencia, tres tubos fueron colocados en una sala con iluminación natural que entraba por ventanas y una claraboya en el techo, de manera que las paralarvas

estaban expuestas a un fotoperiodo de luz natural (desde 50 lux hasta 2500 lux a lo largo del día); mientras que los otros tres tubos fueron colocados en una sala destinada al cultivo de fitoplancton, la cual tenía las paredes cubiertas por focos fluorescentes Daylight Polilux XL F36W/860, de manera que los tubos fueron colocados a determinadas distancias de las paredes, para que recibieran una intensidad de 1000 lux por todos los lados en los que incidía la luz en el tubo.

En el caso de la luz artificial, el fotoperiodo consistía en 12 horas de luz : 12 horas de oscuridad, con la intención de que ambos fotoperiodos (luz natural y artificial) fueran de duraciones similares.

3. Análisis estadístico

En los estudios de migración, la estadística es muy compleja al haber muchas comparaciones. Está previsto hacer una PERMANOVA si estos datos se llegan a publicar, pero ahora no ha sido posible por falta de tiempo.

En cuanto a los biomarcadores de estrés secundario, se aplicó una t-Student para muestras independientes para el análisis de las cantidades de glucosa y lactato obtenidas.

4. Determinación de marcadores secundarios de estrés

En cuanto a los marcadores secundarios, se analizó la cantidad de glucosa y lactato que presentaban las muestras que fueron guardadas en crioviales a -80° C tras el recuento de las paralarvas vivas para obtener los datos de supervivencia.

Solo se pudieron hacer estos ensayos en los dos últimos experimentos, debido a que no fue posible tomar las muestras en los ensayos previos.

Además, en algunos casos no se pudo realizar estadística debido a una alta mortalidad de las paralarvas, sobretodo en el experimento con luz natural y artificial. Debido a esto, se obtuvieron pocos individuos con los que realizar los análisis, y por tanto, hubo falta de réplicas con las que aplicar métodos estadísticos.

4.1. Realización del homogeneizado

Para estos análisis, primero se realizaban homogeneizados a partir de las muestras de los crioviales, para ello, se introducían las paralarvas en un tubo homogeneizador y se

añadía un volumen determinado de agua destilada en función del número de paralarvas que contuviese la muestra. Después, se homogeneizaban las paralarvas con un taladro de columna Cevik Pro F12 941, manteniendo el tubo homogeneizador en contacto con hielo para así asegurar que la muestra estuviera a una temperatura de 4°C aproximadamente.

Tras este proceso, se introducía el resultado en tubos eppendorf para así pasar a un proceso de centrifugación a 13.200 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 minutos a 4°C. Del extracto final se sacan alícuotas de 50 µl en eppendorf de 2 ml que serán almacenados en un ultracongelador a -80°C.

4.2. Proteína

Se determinó de cada extracto de homogeneizado a partir del reactivo de Bradford y de una recta de calibrado de albúmina de concentración 1,47 mg ml⁻¹. El procedimiento para realizar la recta consistió en pipetear en 8 eppendorf de 1,5ml, en este mismo orden, la albúmina, una disolución tampón (H₂O destilada en este caso), H₂O destilada y por último añadir el reactivo de Bradford, con el fin de realizar una recta de calibrado con los datos de absorbancia obtenidos de cada muestra, a través de la cual obtener los datos A y B necesarios para el cálculo de la concentración de proteína.

Paralelamente, para analizar las muestras, se siguió el mismo procedimiento añadiendo en cada caso H₂O, Bradford y muestra de paralarvas. Posteriormente se traspasó 570 µl de cada uno de los eppendorf con muestras a 3 pocillos de microplaca (190 µl /pocillo de microplaca). Para las lecturas se utilizó el lector de microplacas BioTek Synergy H.T y las absorbancias se leyeron a una longitud de onda de 550nm.

Una vez obtenidos los resultados, a partir de la recta de calibrado y las absorbancias, se calcularon las concentraciones de cada muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{proteína } \mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{Abs} - A) / B$$

Donde Abs es el valor de la absorbancia de cada una de las muestras, A el término independiente de la recta de regresión y B la pendiente de la recta.

4.3. Lactato

Se estimó midiendo las absorbancia de cada muestra mediante un lector de microplaca. Para ello se utilizó un reactivo de trabajo (RT), que consistió en la mezcla de una disolución tampón de 4-Clorofenol (4 mmol/L) y PIPES ph 7,5 (50 mmol/L) con un vial de enzimas Lactato oxidasa (800 U/L), peroxidasa (2000 U/L) y 4-Aminofenazona (0,4 mmol/L), y un patrón primario acuoso de lactato de concentración 10 mg/dl.

Se utilizaron eppendorf de 1,5 ml en los que se pipetearon las cantidades que se muestran en la *tabla 2*, seguidamente se mezclaron a partir de un vortex y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente (25°C). La absorbancia fue medida a partir del lector de microplaca BioTek Synergy H.T con una longitud de onda de 505 nm. De cada eppendorf se introdujeron 760 µl en la microplaca (190 µl/pocillo) haciendo un total de 4 pocillos/eppendorf.

$$[\text{Lactato (mg/dl)}] = \frac{\text{Abs Muestra} - \text{Abs Blanco}}{\text{Abs Patrón} - \text{Abs Blanco}} \times 10 [\text{Patrón}]$$

Tabla 1: Cantidades utilizadas para el análisis de glucosa y lactato de las muestras de paralarvas.

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón	-	10 µl	-
H₂O	-	10 µl	-
Muestra	-	-	20 µl
Reactivo (RT)	1 ml	1 ml	1 ml

4.4. Glucosa

Se utilizó un procedimiento muy similar al del lactato, midiendo las absorbancias a partir de cubetas de plástico mediante un espectrofotómetro. Se utilizó un reactivo de trabajo (RT), que contenía la mezcla de una disolución tampón de TRIS pH 7,5 (4 mmol/L), ATP (2,1 mmol/L) y Magnesio (Mg²⁺) con un vial de enzimas de NAD⁺ (2 mmol/L), Hexoquinasa (1000 U/L) y glucosa-6-fosfato (1000 U/L) y un patrón primario de glucosa de concentración 100 mg/dl. Se pipetearon las cantidades indicadas en la *tabla 2* en eppendorf de 1,5ml, se dejaron incubar 10 minutos a temperatura ambiente (25°C) y, posteriormente se traspasaron a cubetas de 1,0 cm de paso de luz, cuya absorbancia fue leída con una longitud de onda de 340 nm.

La concentración se calculó mediante las absorbancias del patrón, del blanco y de las muestras y la concentración del patrón (100 mg/dl) siguiendo la fórmula siguiente:

$$[Glucosa (mg/dl)] = \frac{Abs Muestra - Abs Blanco}{Abs Patrón - Abs Blanco} \times 100 [Patrón]$$

Los datos obtenidos de glucosa y lactato se obtuvieron en función de los mg de homogeneizado que se realizaron en cada caso, y la cantidad analizada se presentan en función de la proteína de cada homogeneizado.

Resultados

1. Experiencia Refugios: Con refugio vs. Sin refugio

En esta experiencia introducimos pequeños tubos de PVC en el interior de los tubos de experimentación, con la intención de ver si las paralarvas se introducen dentro y lo usan a modo de refugio. Aunque no se vio que esto sucediera, se anotaron igualmente datos sobre la distribución vertical de las paralarvas a lo largo del tubo de 165 cm, para ver si la presencia de los tubos de PVC producía un mayor desplazamiento de las paralarvas a lo largo del tubo.

Además, en esta experiencia se usaron paralarvas de 0, 10 y 20 días de edad, con la finalidad de ver si existe una adaptación diferente al tratamiento en función de la edad, hora de muestreo o tratamiento aplicado.

En lo que respecta a la supervivencia, no se aprecian muchas diferencias en cuanto al porcentaje de paralarvas que sobreviven a los tratamientos con y sin refugio, aunque existe una tendencia hacia la mayor supervivencia sin la colocación de refugios (*Tabla 2*). Además, debido a la alta variabilidad de los datos, no se obtuvieron resultados significativamente diferentes.

Tabla 2.

Porcentaje de paralarvas que sobreviven a tratamientos con y sin refugio.

SUPERVIVENCIA		
Edades	Con refugio	Sin refugio
0 días	99 ± 1,92	98 ± 3,85
10 días	70 ± 8,82	84 ± 6,94
20 días	62 ± 1,92	69 ± 6,94

Los resultados representan las medias ± S.D. ($n=3$). No se obtienen valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) en ninguno de los resultados.

En cuanto a la distribución vertical de las paralarvas a lo largo del tubo, podemos observar cómo el movimiento es mayor cuanto mayor edad tienen las paralarvas, de forma que observando los porcentajes en superficie (los primeros 21 cm) podemos ver cómo con 0 días de edad estos se encuentran entorno al 90% (*tabla 3*), mientras que

con 10 días vemos hasta un 52% (*tabla 4*), y con 20 días hasta un 36% de paralarvas en superficie (*tabla 5*).

En paralarvas de 0 días de edad no se aprecian diferencias en cuanto a los tratamientos aplicados (*tabla 3*).

A 10 y 20 días se observan bajadas a partir del segundo día, lo cual coincide con el ensayo de luz artificial con luz natural (*tabla 4 y 5*).

En resumen, las diferencias no son muy marcadas en cuanto al tratamiento aplicado, pero las que existen son más apreciables con 20 días de edad que con 0 días, edad en la que apenas existen diferencias, ni en movimiento vertical, ni en supervivencia.

Tabla 3: distribución vertical de paralarvas de 0 días de edad en tratamientos con y sin refugios.

		EDAD: 0 DÍAS					
Día	Profundidad (cm)	CON REFUGIO			SIN REFUGIO		
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
Día 1	21	100 ± 0,00			100 ± 0,00		
	41						
	62						
	83	Paralarvas sembradas a las 11:00.			Paralarvas sembradas a las 11:30.		
	103						
	124						
	144						
	165						
Día 2	21	97 ± 2,45	96 ± 4	96 ± 3,87	99 ± 2,14	95 ± 5,64	93 ± 2,37
	41	2 ± 2,62	3 ± 5,0	1 ± 2,22	1 ± 2,14	1 ± 2,14	2 ± 4,28
	62	1 ± 2,22	1 ± 2,51	2 ± 2,62	1 ± 2,14	1 ± 2,22	
	83			1 ± 2,22	1 ± 2,22		
	103				1 ± 2,14	1 ± 2,41	
	124					1 ± 2,41	
	144						
	165						
Día 3	21	91 ± 7,22	94 ± 2		91 ± 4,19	94 ± 2,52	
	41	6 ± 7	6 ± 2,4		5 ± 4,55	5 ± 0,48	
	62	3 ± 3			5 ± 0,41	2 ± 2,62	
	83			A las 12 se comienzan a sifonar los tubos.			A las 12 se comienzan a sifonar los tubos.
	103						
	124						
	144						
	165						

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Tabla 4: distribución vertical de paralarvas de 10 días de edad en tratamientos con y sin refugios.

		EDAD: 10 DÍAS								
Profundidad (cm)		CON REFUGIO			SIN REFUGIO					
Día 1	21	100 ± 0,00			100 ± 0,00					
	41									
	62									
	83	Paralarvas sembradas a las 12:00.			Paralarvas sembradas a las 12:30.					
	103									
	124									
	144									
	165									
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00			
Profundidad (cm)		CON REFUGIO			SIN REFUGIO					
Día 2	21	100 ± 0	91 ± 8,15	77 ± 3,78	97 ± 2,18	89 ± 1,84	77 ± 9,33			
	41		1 ± 2,51	3 ± 4,44	3 ± 2,18	7 ± 4,42	4 ± 0,91			
	62		5 ± 4,36	7 ± 3,18		4 ± 4,17	2 ± 3,98			
	83		2 ± 2,89	5 ± 5,84			9 ± 6,01			
	103		2 ± 2,89	6 ± 2,33			4 ± 0,91			
	124			2 ± 2,89			3 ± 2,67			
	144									
	165									
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00			
Profundidad (cm)		CON REFUGIO			SIN REFUGIO					
Día 3	21	80 ± 5,04	65 ± 3,48	65 ± 8,15	83 ± 10,25	76 ± 25,44	52 ± 4,87			
	41	2 ± 2,89	7 ± 7,2		5 ± 4,77	4 ± 3,57	5 ± 4,71			
	62	5 ± 0	8 ± 5,12	5 ± 4,79	5 ± 1,51	2 ± 3,85	15 ± 11,00			
	83	2 ± 3,04	7 ± 6,27	5 ± 8,25	2 ± 2,75		11 ± 2,12			
	103	2 ± 3,04	6 ± 7,27	11 ± 6,52		5 ± 3,99	8 ± 8,39			
	124	5 ± 5,00	5 ± 4,84	9 ± 7,99	4 ± 3,64	11 ± 13,80	6 ± 6,70			
	144	5 ± 0,15	2 ± 2,75	5 ± 4,71	2 ± 2,75	2 ± 3,85	2 ± 3,21			
	165									
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00			

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Tabla 5: distribución vertical de paralarvas de 20 días de edad en tratamientos con y sin refugios.

EDAD: 20 DÍAS															
	Profundidad (cm)	CON REFUGIO			SIN REFUGIO										
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00								
Día 1	21	Paralarvas sembradas a las 11:30.			Paralarvas sembradas a las 12:00.										
	41														
	62														
	83														
	103														
	124														
	144														
	165														
		93 ± 3,33	1 ± 1,92	2 ± 1,92	88 ± 3,85	8 ± 3,85	1 ± 1,92	3 ± 5,77	2 ± 3,85						
		57 ± 17,03	51 ± 17,93	52 ± 7,77	54 ± 14,87	36 ± 11,03	36 ± 9,40	5 ± 0,34	5 ± 8,66	2 ± 3,21	7 ± 1,05	7 ± 1,23	14 ± 4,55		
Día 2	21														
	41														
	62														
	83														
	103														
	124														
	144														
	165														
		3 ± 2,59	4 ± 3,90	5 ± 5,01	7 ± 1,05	14 ± 6,79	3 ± 5,25	2 ± 2,75	3 ± 5,77	2 ± 3,61	2 ± 3,40	2 ± 3,85			
		3 ± 4,44	6 ± 5,69	8 ± 14,43	2 ± 3,85	8 ± 8,45	17 ± 2,80	6 ± 2,94	5 ± 8,88	4 ± 3,97	2 ± 3,40	11 ± 2,45			
		6 ± 7,35	9 ± 5,48	13 ± 9,11	9 ± 9,46	8 ± 8,45	21 ± 4,18	22 ± 14,22	20 ± 18,11	17 ± 12,30	23 ± 10,73	16 ± 5,84			
		39 ± 16,59	A las 11:30 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.			A las 12:00 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.									
Día 3	21														
	41														
	62														
	83														
	103														
	124														
	144														
	165														
		10 ± 3,64	7 ± 7,15	3 ± 4,44	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	3 ± 4,81	37 ± 16,86	12 ± 13,98	9 ± 8,34	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	17 ± 8,38
		20 ± 7,27	3 ± 4,44	8 ± 7,70	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	3 ± 4,81	37 ± 16,86	12 ± 13,98	9 ± 8,34	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	17 ± 8,38
		3 ± 4,44	8 ± 7,70	3 ± 4,44	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	3 ± 4,81	37 ± 16,86	12 ± 13,98	9 ± 8,34	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	17 ± 8,38
		20 ± 7,27	3 ± 4,44	8 ± 7,70	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	3 ± 4,81	37 ± 16,86	12 ± 13,98	9 ± 8,34	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	17 ± 8,38
		3 ± 4,44	8 ± 7,70	3 ± 4,44	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	3 ± 4,81	37 ± 16,86	12 ± 13,98	9 ± 8,34	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	17 ± 8,38
		20 ± 7,27	3 ± 4,44	8 ± 7,70	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	3 ± 4,81	37 ± 16,86	12 ± 13,98	9 ± 8,34	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	17 ± 8,38
		3 ± 4,44	8 ± 7,70	3 ± 4,44	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	3 ± 4,81	37 ± 16,86	12 ± 13,98	9 ± 8,34	6 ± 10,50	12 ± 5,81	7 ± 6,36	17 ± 8,38

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

2. Experiencia intensidad: 320 lux vs. 1010 lux

En esta experiencia se usaron paralarvas de 0, 10 y 20 días de edad, con la finalidad de ver si existe una adaptación diferente a tratamientos de diferente intensidad de luz aplicada, en función de la edad, hora de muestreo y diferentes intensidades de luz.

En esta experiencia solo se obtuvieron valores significativamente diferentes en cuanto a supervivencia en las paralarvas de 20 días, las cuales obtuvieron un mayor porcentaje de paralarvas vivas en el tratamiento de 1010 lux, pero al ser solo de un 10% de diferencia entre ambos tratamientos, no hubo grandes diferencias entre los resultados. En 0 y 10 días de edad no se observan diferencias (*tabla 6*).

Tabla 6.

Porcentaje de paralarvas que sobreviven a tratamientos de intensidades de 320 y 1010 lux.

Edades	SUPERVIVENCIA	
	320 lux	1010 lux
0 días	61 ± 13,47	71 ± 10,18
10 días	54 ± 10,18	59 ± 11,70
20 días*	83 ± 0,00	93 ± 3,33

Los resultados representan las medias ± S.D. ($n=3$). Los valores en la misma fila seguida por asterisco (*) son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto al comportamiento de las paralarvas a los 0 días de edad no encontramos diferencias importantes en cuanto a los dos tratamientos (*Tabla 7*).

En paralarvas de 10 días tampoco se aprecian diferencias en cuando a descenso de estas a lo largo del tubo en los diferentes tratamientos de intensidad (*Tabla 8*).

Por otro lado, en paralarvas de 20 días de edad no se observa una influencia clara de la intensidad, obteniendo valores muy similares de porcentajes en superficie en ambos tratamientos, aunque la supervivencia es mayor a 1010 lux (*tabla 9*).

En resumen, la intensidad no parece afectar de forma importante.

Tabla 7: distribución vertical de paralarvas de 0 días de edad expuestas a diferentes intensidades de luz procedente de focos LED, por un lado tratamiento de 320 lux y por otro de 1010 lux.

EDAD: 0 DÍAS									
	Profundidad (cm)	320 lux			1010 lux				
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00		
Día 1	21	100 ± 0	97 ± 3,33		96 ± 5,09	87 ± 5,77			
	41				3 ± 3,33	6 ± 1,92			
	62								
	83	Paralarvas sembradas a las 10:00.	3 ± 3,33		Paralarvas sembradas a las 10:30.	1 ± 1,92	7 ± 5,77		
	103								
	124					1 ± 1,92			
	144								
	165								
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00		
Día 2	21	100 ± 0	93 ± 7	72 ± 6,81	100 ± 0	96 ± 6,93	76 ± 8,54		
	41		3 ± 3,6	4 ± 3,57		4 ± 6,93	2 ± 3,21		
	62								
	83		2 ± 3,85	4 ± 3,67			2 ± 3,21		
	103								
	124						2 ± 3,21		
	144								
	165		1 ± 1,92	20 ± 1,12			18 ± 6,28		
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00		
Día 3	21	100 ± 0	95 ± 5	82 ± 7,79	100 ± 0	98 ± 2,75	84 ± 11,51		
	41		5 ± 4,6	11 ± 5,12		2 ± 2,75	5 ± 0,40		
	62						7 ± 6,25		
	83			7 ± 2,96			2 ± 3,21		
	103								
	124						2 ± 3,21		
	144								
	165								
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00		

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Tabla 8: distribución vertical de paralarvas de 10 días de edad expuestas a diferentes intensidades de luz procedente de focos LED, por un lado tratamiento de 320 lux y por otro de 1010 lux.

EDAD: 10 DÍAS

	Profundidad (cm)	320 lux			1010 lux		
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
Día 1	21	100 ± 0,00			100 ± 0,00		
	41						
	62						
	83	Paralarvas sembradas a las 10:30.			Paralarvas sembradas a las 11:00.		
	103						
	124						
	144						
	165						
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
	Profundidad (cm)	320 lux			1010 lux		
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
Día 2	21	87 ± 3,85	84 ± 6	92 ± 2,95	95 ± 4,64	83 ± 11,91	80 ± 10,00
	41	8 ± 3,37	8 ± 6,5	3 ± 2,81	1 ± 2,51	6 ± 7,32	6 ± 5,38
	62	5 ± 0,48	5 ± 5,80	3 ± 2,90	1 ± 2,06	8 ± 6,75	5 ± 0,12
	83		3 ± 5,50	1 ± 2,51	3 ± 2,32	2 ± 2,75	6 ± 2,56
	103					2 ± 2,75	3 ± 5,50
	124						
	144						
	165						
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
	Profundidad (cm)	320 lux			1010 lux		
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
Día 3	21	100 ± 0	95 ± 0	98 ± 2,89	96 ± 3,51	98 ± 3,85	98 ± 3,21
	41						
	62		2 ± 3,21			2 ± 3,85	
	83		3 ± 2,97	2 ± 2,89	4 ± 3,51		2 ± 3,21
	103						
	124						
	144						
	165						
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Tabla 9: distribución vertical de paralarvas de 20 días de edad expuestas a diferentes intensidades de luz procedente de focos LED, por un lado tratamiento de 320 lux y por otro de 1010 lux.

EDAD: 20 DÍAS									
	Profundidad (cm)	320 lux			1010 lux				
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00		
Día 1	21	100 ± 0,00			100 ± 0,00				
	41								
	62								
	83	Paralarvas sembradas a las 10:30.			Paralarvas sembradas a las 11:00.				
	103								
	124								
	144								
	165								
Día 2	21	95 ± 6,40	94 ± 7	97 ± 4,81	99 ± 2,06	100 ± 0,00	99 ± 2,14		
	41	3 ± 2,32	4 ± 7,5	2,78 ± 4,81	1 ± 2,06		1 ± 2,14		
	62	3 ± 4,81	1 ± 2,06						
	83								
	103								
	124								
	144								
	165								
Día 3	21	100 ± 0			98 ± 2,03				
	41								
	62								
	83	A las 10:30 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.			A las 11:00 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.				
	103								
	124								
	144								
	165								
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00		

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

3. Experiencia Luz blanca vs. Luz roja

En esta experiencia se usaron paralarvas de 0, 15 y 30 días de edad, con la finalidad de ver si existe una adaptación diferente a tratamientos de diferente color de luz,... en función de la edad, color de luz al que son expuestas y horas del día.

En lo que respecta a la supervivencia, podemos ver en la *tabla 10* que las únicas diferencias significativas son en 0 y 15 días, aunque la respuesta es opuesta encontrándose una mayor supervivencia con el rojo a 0 días, mientras que a 15 días la mayor supervivencia tiene lugar con la luz blanca. A 30 días también hay una mayor supervivencia con luz blanca, pero la alta variabilidad impide que haya diferencias significativas.

Tabla 10.

Porcentaje de paralarvas que sobreviven a tratamientos de luz blanca y luz roja a diferentes edades.

Edades	SUPERVIVENCIA	
	Blanca	Roja
0 días*	82 ± 8,4	98 ± 1,9
15 días*	69 ± 8,4	40 ± 10,0
30 días	71 ± 10,7	57 ± 12,0

Los resultados representan las medias ± S.D. (n=3) para cada tratamiento de luz. Los valores en la misma fila seguida por asterisco (*) son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto a los marcadores de estrés secundarios, en la *figura 1*, solo se pudo hacer estadística con los datos obtenidos a los 30 días de edad, pero no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$). Además, en esta figura podemos ver que los niveles de glucosa no presentan grandes diferencias a los 15 días.

En cuanto a las paralarvas de 30 días de edad, vemos que los niveles de glucosa son mayores en las expuestas a tratamientos de luz roja (*figura 1*); además, la supervivencia fue mayor en luz blanca (*tabla 10*).

Sin embargo, en cuanto a los niveles de lactato, muestran una tendencia a aumentar con la edad (*figura 2*), aunque sin diferencias significativas ($p > 0,05$ para $n = 3$ réplicas por tratamiento a todas las edades). Se puede apreciar que en todas las edades los niveles de lactato son mayores en los tratamientos con luz blanca; además, a 0 días de

edad vemos una mayor supervivencia en el rojo y una mayor cantidad de lactato en blanco, lo que sugiere que el rojo estresa menos a las larvas a esta edad.

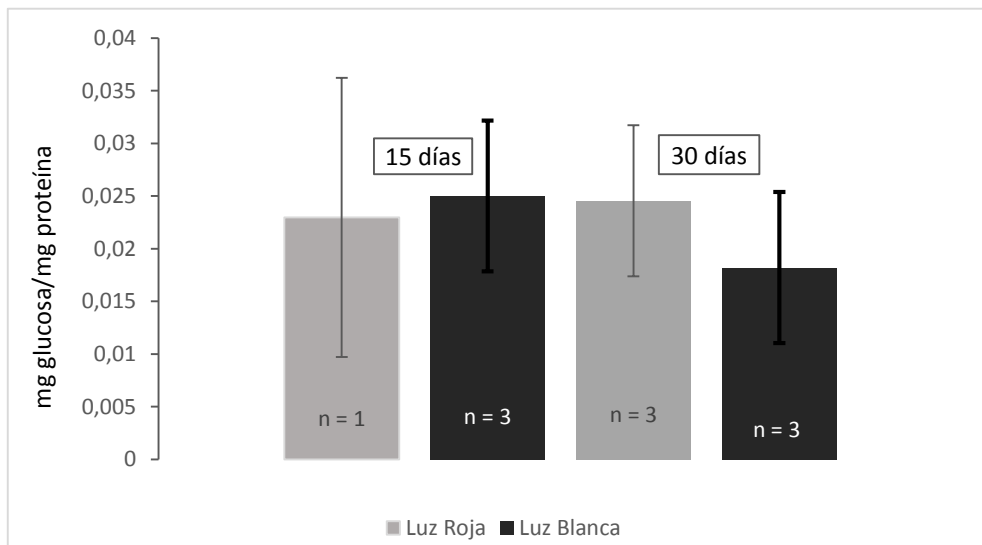


Figura 1. Mg glucosa/mg proteína en paralarvas expuestas a tratamientos de luz roja y luz blanca.

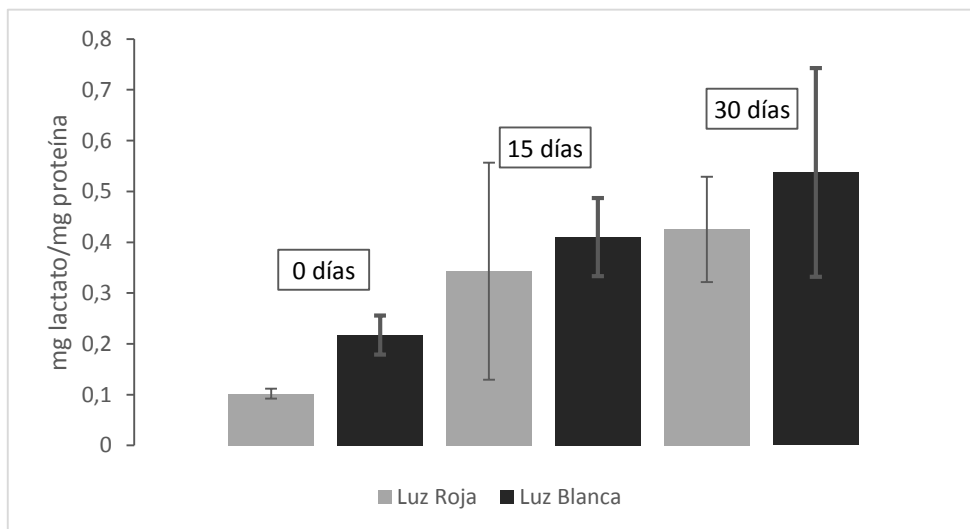


Figura 2. Mg lactato/mg proteína en paralarvas expuestas a tratamientos de luz roja y luz blanca.

En la distribución vertical correspondiente al experimento con 0 días de edad puede observarse en la *tabla 11* cómo las paralarvas expuestas a luz blanca se mantienen en superficie hasta el segundo día de experimento, mientras que en el grupo de luz roja unas pocas larvas bajan en la columna. Sin embargo, el tercer día de experimento en

ambos grupos podemos observar larvas a lo largo de la columna, aunque una mayoría (entre un 80-90%) se mantiene en superficie. Este alto porcentaje de larvas que se mantiene en la columna sugiere que no hay muchas diferencias entre los tratamientos de luz blanca y roja en el comportamiento, aunque los mejores valores de supervivencia con luz roja sugieren también que con esta edad las larvas se encuentran mejor en luz roja y que pueden tardar un poco más en adaptarse a la luz blanca (*Tabla 10*). Por último, hay que destacar que no se observó ninguna tendencia en las diferentes horas de muestreo.

En la *tabla 12*, podemos ver que las paralarvas de 15 días de edad no muestran aparentemente muchas diferencias en cuanto a la distribución vertical cuando comparamos luz blanca y luz roja, pero en ambos casos los porcentajes de larvas que se mantiene en superficie son menos que los descritos para larvas de 0 días (92% con larvas 0 días vs 74% con larvas 15 días). Esto sugiere que las larvas de mayor edad comienzan a mostrar una tendencia a migrar en la columna de agua, aunque en las condiciones del presente experimento esta tendencia es aún muy pequeña (*Tabla 10*).

Antes de comenzar con el experimento con paralarvas de 30 días (*Tabla 13*), se observó en ensayos paralelos que las paralarvas tendían a bajar en la columna de agua en horas más avanzadas de la tarde, por lo que se decidió cambiar las horas de muestreo, añadiendo una hora más, para así abarcar un rango más amplio de horas del día, siendo ahora las horas de muestreo: 10:00, 11:30, 14:00 y 17:00. De esta forma, se pudo observar que a las 17:00 existe mayor descenso en la columna de agua, pero solo en las paralarvas expuestas a la luz roja con porcentajes de solo el 10 o el 30% en superficie. En el resto de horas muestreadas también se observa un mayor descenso en el grupo de luz roja respecto a las blancas, aunque este no es tan acusado como a las 17:00. Por último, hay que señalar que desde el primer día, en el que las paralarvas se sembraron a las 9:00, hay un descenso en la columna (con un 80-90% en superficie), al contrario de lo que ocurría en las edades anteriores, en las que el primer día todas las paralarvas se mantenían en superficie.

En resumen, podemos decir que el primer día de ensayo se considera de adaptación. En 15 y 30 días hay una mayor bajada que en 0 días. Por otro lado, no se observa una influencia clara del color en 0 y 15 días, pero si se observa una mayor bajada con el

rojo a los 30 días de edad, y especialmente a las 17:00. Además, no se observa un efecto claro de cambio de comportamiento a lo largo del día, salvo cuando se incluye las 17:00 a los 30 días, pero solo en el rojo.

Los resultados superiores obtenidos en supervivencia con el rojo a los 0 días y los mayores valores de lactato en blanco, sugieren que el rojo estresa menos a las larvas a esa edad. Por el contrario, a 15 y 30 días, la supervivencia es mayor con el blanco, lo cual puede deberse a que el rojo no les permite ver bien dificultando la captura (Delabbio, 2015), lo cual no es un problema a 0 días, pues tiene aún vitelo.

Y por último, respecto a los marcadores de estrés, no hay diferencias significativas, lo cual puede sugerir que ambos grupos están bajo estrés, y que este se incrementa con la edad.

Tabla 12: distribución vertical de las paralarvas en la columna de agua bajo luz roja y blanca con 15 días de edad.

EDAD: 15 DÍAS

	Profundidad (cm)	BLANCA			ROJA		
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
Día 1	21	100 ± 0,0			100 ± 0,0		
	41						
	62						
	83	Paralarvas sembradas a las 10:00			Paralarvas sembradas a las 10:30		
	103						
	124						
	144						
	165						
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
Día 2	Profundidad (cm)	BLANCA			ROJA		
	21	76 ± 19,5	49 ± 6,8	75 ± 8,9	66 ± 9,4	73 ± 15,0	89 ± 2,2
	41	7 ± 7,5	17 ± 4,9	8 ± 2,1	10 ± 0,6	10 ± 10,5	5 ± 4,5
	62	6 ± 5,2	14 ± 7,8	4 ± 3,8	14 ± 2,2	7 ± 3,2	2 ± 2,9
	83	6 ± 5,2	4 ± 7,7	4 ± 6,8	7 ± 7,6	3 ± 3,0	5 ± 0,2
	103	6 ± 5,2	9 ± 4,8	7 ± 7,6	3 ± 2,9	7 ± 11,5	
	124		6 ± 6,7	2 ± 2,9			
	165						
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00
Día 3	Profundidad (cm)	BLANCA			ROJA		
	21	65 ± 5,7	65 ± 11,3	62 ± 11,3	72 ± 7,8	82 ± 14,2	58 ± 26,1
	41	3 ± 4,4	8 ± 9,2	8 ± 2,3	16 ± 9,0	9 ± 8,4	16 ± 18,3
	62	16 ± 8,7	12 ± 10,7	9 ± 10,1	2 ± 3,6	4 ± 3,1	14 ± 12,4
	83	3 ± 4,8	8 ± 1,4	8 ± 2,3	4 ± 3,7	5 ± 5,6	6 ± 0,3
	103	8 ± 0,4	7 ± 7,7	9 ± 8,4	2 ± 3,8		6 ± 0,3
	124	5 ± 4,6		2 ± 4,1	3 ± 4,4		
	165			2 ± 4,1			
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Tabla 11: distribución vertical de las paralarvas en la columna de agua bajo luz roja y blanca con 0 días de edad.

EDAD: 0 DÍAS												
	Profundidad (cm)	BLANCA						ROJA				
				9:00			11:00			9:00		11:00
Día 1	21	100 ± 0,0						90 ± 5,8				
	41							8 ± 6,9				
	62							2 ± 1,9				
	83	Paralarvas sembradas a las 10:00						Paralarvas sembradas a las 10:00				
	103											
	124											
	144											
165	9:00		11:00		15:00		9:00		11:00		15:00	
EDAD: 0 DÍAS												
	Profundidad (cm)	BLANCA						ROJA				
		9:00		11:00		15:00		9:00		11:00		15:00
Día 2	21	100 ± 0,0	98 ± 0,1	100 ± 0,0	95 ± 4,2	99 ± 2,2	96 ± 0,3					
	41		2 ± 0,1		2 ± 2,1	1 ± 2,2	1 ± 2,3					
	62				2 ± 2,1		1 ± 2,1					
	83						1 ± 2,0					
	103											
	124											
	144											
165	9:00		11:00		15:00		9:00		11:00		15:00	
EDAD: 0 DÍAS												
	Profundidad (cm)	BLANCA						ROJA				
		9:00		11:00		15:00		9:00		11:00		15:00
Día 3	21	80 ± 7,1	84 ± 5,8	85 ± 9,6	81 ± 2,5	91 ± 9,0	90 ± 5,7					
	41	8 ± 4,8	4 ± 3,4		11 ± 3,6	4 ± 0,2	4 ± 4,2					
	62	8 ± 1,4	5 ± 4,5	2 ± 3,6	7 ± 3,6	1 ± 2,2	2 ± 2,1					
	83	3 ± 2,6	5 ± 1,2	2 ± 2,6	1 ± 2,1	3 ± 4,4	2 ± 4,1					
	103					1 ± 2,2	1 ± 2,4					
	124		2 ± 3,8	2 ± 2,6								
	144			9 ± 4,0								
165	9:00		11:00		15:00		9:00		11:00		15:00	

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Tabla 13: distribución vertical de las paralarvas en la columna de agua bajo luz roja y blanca con 30 días de edad.

		EDAD: 30 DÍAS								
Día	Profundidad (cm)	BLANCA				ROJA				
		10:00	11:30	14:00	17:00	10:00	11:30	14:00	17:00	
Día 1	21	93 ± 2,1	93 ± 2,6	90 ± 2,1	83 ± 4,3	81 ± 16,5	88 ± 2,0	86 ± 4,0	10 ± 5,0	
	41	1 ± 2,1	1 ± 2,1	5 ± 2,2	6 ± 6,6	12 ± 14,3	5 ± 0,8	8 ± 6,6	17 ± 12,3	
	62	1 ± 2,4		1 ± 2,3	3 ± 2,5	3 ± 5,5	7 ± 2,1	5 ± 4,6	18 ± 4,0	
	83	1 ± 2,4	4 ± 3,7	3 ± 2,4	7 ± 2,5	3 ± 4,8		1 ± 2,4	31 ± 4,4	
	103	1 ± 2,1	1 ± 2,5		1 ± 2,5	1 ± 2,1			12 ± 5,6	
	124	1 ± 2,4							6 ± 1,6	
	144								5 ± 8,6	
	165									
		10:00	11:30	14:00	17:00	10:00	11:30	14:00	17:00	
	Profundidad (cm)	BLANCA				ROJA				
Día 2	21	81 ± 4,3	79 ± 3,1	76 ± 2,1	80 ± 6,2	47 ± 11,2	57 ± 15,3	63 ± 11,1	30 ± 11,5	
	41	6 ± 6,9	4 ± 4,5	8 ± 5,2	9 ± 5,0	13 ± 2,5	5 ± 4,1	9 ± 2,0	12 ± 3,4	
	62	7 ± 7,7	8 ± 9,5	7 ± 3,8	8 ± 3,0	22 ± 5,2	7 ± 6,3	17 ± 4,7	12 ± 3,4	
	83	3 ± 2,7	4 ± 4,3	4 ± 7,1	2 ± 2,7	9 ± 2,9	9 ± 10,2	2 ± 2,0	15 ± 12,0	
	103	2 ± 2,6	5 ± 4,5	3 ± 5,0		4 ± 3,2	12 ± 10,5	4 ± 3,8	8 ± 8,4	
	124	2 ± 2,7		2 ± 0,8	1 ± 2,5	2 ± 3,0	6 ± 6,3	5 ± 6,2	12 ± 7,9	
	144					4 ± 3,1	4 ± 7,7		8 ± 8,4	
	165								3 ± 4,8	
		10:00	11:30	14:00	17:00	10:00	11:30	14:00	17:00	
	Profundidad (cm)	BLANCA				ROJA				
Día 3	21	72 ± 13,6				39 ± 19,7				
	41	10 ± 2,5				13 ± 5,4				
	62					18 ± 5,0				
	83	4 ± 3,9	A las 10:30 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.				13 ± 4,5	A las 10:30 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.		
	103	10 ± 7,5				16 ± 16,8				
	124	4 ± 7,2								
	144					2 ± 3,8				
	165									
		10:00	11:30	14:00	17:00	10:00	11:30	14:00	17:00	

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

4. Experiencia Luz natural vs. Luz artificial

En esta experiencia vemos cómo afecta la naturaleza de la luz con la que son tratadas las paralarvas a su comportamiento, ya sea en función de su edad, o de la hora de muestreo o de si la luz procede de una fuente natural, o de un tubo fluorescente.

En cuanto a la supervivencia, no se encuentran diferencias en cuanto a los diferentes tratamientos aplicados a diferentes edades (*tabla 14*).

Tabla 14.

Porcentaje de paralarvas que sobreviven a tratamientos de luz natural y artificial a diferentes edades.

SUPERVIVENCIA		
Edades	Natural	Artificial
0 días	77 ± 12,0	85 ± 11,8
15 días	16 ± 7,3	9 ± 5,7
30 días	23 ± 8,8	26 ± 18,4

Los resultados representan las medias ± S.D. ($n=3$). En el experimento de 15 días de edad existe una excepción ($n = 2$) en cada tratamiento, debido a una caída inesperada de un tubo en cada tratamiento. No se obtienen valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) en ninguno de los resultados.

En cuanto a los marcadores secundarios de estrés, fijándonos en las figuras 3 y 4, se puede apreciar una tendencia pero no se pudo aplicar estadística por falta de réplicas en ninguno de los dos casos. Además, encontramos valores contradictorios en glucosa y lactato, ya que los niveles de glucosa son más altos en las paralarvas expuestas a luz natural a los 0 días de edad, sin embargo, los de lactato son más altos con luz artificial, debido a esto, se necesitaría ampliar el número de muestras.

Esto varía a los 30 días de edad, donde las paralarvas expuestas a luz artificial muestran los niveles más altos de glucosa (*Figura 3*), pese a que es en el tratamiento con luz natural el que muestra mayores niveles de lactato (*figura 4*). .

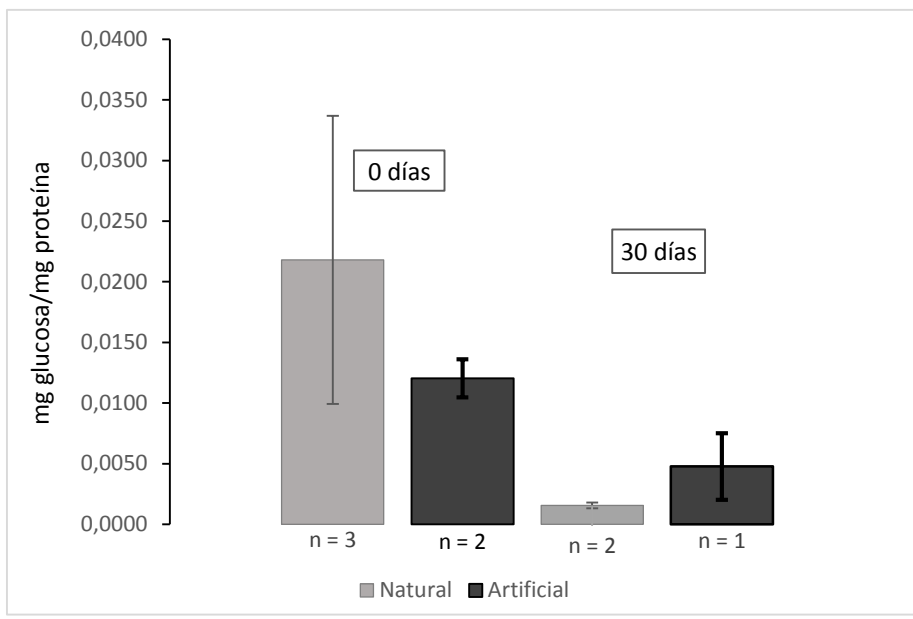


Figura 3. Mg glucosa/mg proteína en paralarvas expuestas a tratamientos de luz natural y artificial.

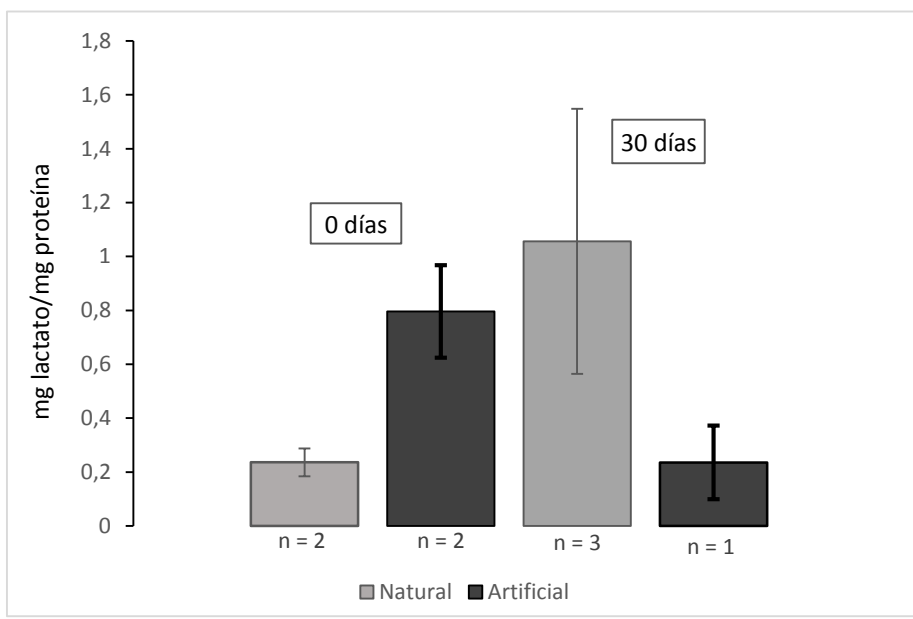


Figura 4. Mg lactato/mg proteína en paralarvas expuestas a tratamientos de luz natural y artificial.

Respecto a la posición vertical en la columna vertical, en paralarvas de 0 días no se observa una influencia clara de la diferencia de tratamiento, con valores de paralarvas en superficie muy similares para ambos tratamientos (tabla 15).

Sin embargo, a partir de los 15 días de edad se comienzan a ver diferencias en cuanto a los tratamientos, observando siempre el segundo día de ensayo, y tomando el primero como día de adaptación. A los 15 días de edad vemos cómo los porcentajes de paralarvas en superficie descienden hasta un 21% con luz natural, pese a que el mínimo con luz artificial es 75% (*tabla 15*); siendo el mínimo para ambos tratamientos con 0 días, entorno al 90% con luz natural (*tabla 15*). Sin embargo, el comportamiento es más similar a los 30 días de edad, experimento al que se le añadió una hora más de muestreo, a las 17:00, pudiéndose ver un descenso creciente de las paralarvas en función del paso de las horas del día en ambos tratamientos, obteniendo un máximo de descenso a esa hora con un 38% de paralarvas en superficie con luz natural.

Tabla 15: distribución vertical en la columna de agua de paralarvas de 0 días de edad expuestas a tratamiento de fotoperiodo natural con luz solar, y tratamiento con luz artificial procedente de focos fluorescentes.

		EDAD: 0 DÍAS						
Profundidad (cm)		NATURAL			ARTIFICIAL			
Día 1	21	97 ± 4,4	99 ± 2,1	96 ± 3,6	84 ± 18,0	91 ± 15,7	83 ± 28,9	
	41	1 ± 2,2	1 ± 2,1		1 ± 2,2	3 ± 5,2	3 ± 5,8	
	62			1 ± 2,1				
	83			1 ± 2,1	9 ± 12,6		7 ± 11,5	
	103	1 ± 2,2		1 ± 2,1	4 ± 6,8		3 ± 5,8	
	124				1 ± 2,2	3 ± 5,2	3 ± 5,8	
	144					3 5,2		
	165							
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	
Profundidad (cm)		NATURAL			ARTIFICIAL			
Día 2	21	99 ± 2,3	95 ± 6,7	90 ± 9,6	98 ± 3,2	98 ± 3,2	100 ± 0,0	
	41		3 ± 3,4	3 ± 2,5				
	62			1 ± 2,2				
	83		2 ± 3,4			2 ± 3,2		
	103	1 ± 2,3		3 ± 2,5	2 ± 3,2			
	124			2 ± 2,7				
	144							
	165			2 ± 2,7				
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	
Profundidad (cm)		NATURAL			ARTIFICIAL			
Día 3	21	100 ± 0,0			100 ± 0,0			
	41							
	62		A las 10:30 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.			A las 10:30 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.		
	83							
	103							
	124							
	144							
	165							
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Tabla 16: distribución vertical en la columna de agua de paralarvas de 15 días, expuestas a tratamientos con luz natural solar, y luz artificial procedente de focos fluorescentes.

EDAD: 15 DÍAS

	Profundidad (cm)	NATURAL			ARTIFICIAL			
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	
Día 1	21			93 ± 13,8			91 ± 11,3	
	41			3 ± 7,2			9 ± 3,4	
	62							
	83	Paralarvas sembradas a las 11:00			4 ± 1,2	Paralarvas sembradas a las 11:30		
	103							
	124							
	144							
	165							
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	
	Profundidad (cm)	NATURAL			ARTIFICIAL			
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	
Día 2	21	21 ± 11,4	57 ± 20,2	34 ± 8,1	90 ± 14,1	88 ± 17,7	75 ± 0,0	
	41	7 ± 10,1		7 ± 10,1	10 ± 14,1			
	62	20 ± 7,6	14 ± 0,0	17 ± 4,0				
	83	13 ± 1,3	21 ± 10,1			13 ± 17,7		
	103	13 ± 1,3	7 ± 10,1	17 ± 4,0			13 ± 17,7	
	124	13 ± 1,3		10 ± 14,1			13 ± 17,7	
	144	13 ± 17,7		7 ± 10,1				
	165			7 ± 10,1				
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	
	Profundidad (cm)	NATURAL			ARTIFICIAL			
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	
Día 3	21	100 ± 0,0	50 ± 23,6		100 ± 0,0	50 ± 70,7		
	41		17 ± 23,6			50 ± 70,7		
	62							
	83		17 ± 23,6	A las 12 se comienzan a sifonar los tubos			A las 12 se comienzan a sifonar los tubos	
	103							
	124		17 ± 23,6					
	144							
	165							
		9:00	11:00	15:00	9:00	11:00	15:00	

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Tabla 17. Distribución vertical en la columna de agua de las paralarvas en luz natural y artificial con 30 días de edad.

		EDAD: 30 DÍAS								
Profundidad (cm)		NATURAL				ARTIFICIAL				
Día 1	21	93 ± 5,7	76 ± 7,2	87 ± 12,6	47 ± 8,2	95 ± 5,9	91 ± 3,0	68 ± 22,7	72 ± 3,3	
	41	5 ± 4,6	12 ± 7,5	7 ± 8,6	21 ± 8,7	2 ± 2,6	6 ± 5,9	13 ± 7,2	8 ± 2,0	
	62		5 ± 5,3	3 ± 4,8	6 ± 5,1	2 ± 3,4		3 ± 4,8		
	83	2 ± 3,0	5 ± 5,0	2 ± 2,9	21 ± 11,8		3 ± 4,8	3 ± 5,8		
	103		2 ± 2,9	2 ± 2,9	5 ± 8,9			2 ± 2,9	5 ± 4,6	
	124					2 ± 3,4		6 ± 9,6	4 ± 6,1	
	144									
	165							6 ± 9,6	12 ± 4,0	
		10:00	11:30	14:00	17:00	10:00	11:30	14:00	17:00	
Profundidad (cm)		NATURAL				ARTIFICIAL				
Día 2	21	68 ± 4,6	63 ± 9,8	59 ± 5,2	38 ± 22,5	57 ± 27,9	43 ± 5,8	47 ± 15,6	56 ± 13,9	
	41	6 ± 5,0	12 ± 4,4	8 ± 9,1	15 ± 5,5	8 ± 14,4	7 ± 11,5	10 ± 18,1	3 ± 5,8	
	62	12 ± 14,0	7 ± 7,7	15 ± 3,5	7 ± 6,7	8 ± 14,4		3 ± 3,2		
	83		7 ± 0,7	7 ± 16,0	10 ± 2,9	4 ± 7,2				
	103	3 ± 5,2	2 ± 3,8		11 ± 9,8	5 ± 8,2	24 ± 14,2	10 ± 2,1	7 ± 11,5	
	124	3 ± 4,8	4 ± 7,2	8 ± 4,6	7 ± 7,7		11 ± 10,1	20 ± 14,5	3 ± 5,8	
	144	6 ± 5,0			7 ± 6,7	17 ± 6,8	7 ± 11,5		18 ± 16,8	
	165	3 ± 5,2	5 ± 4,2	3 ± 1,6	5 ± 4,2		8	14,4	10 ± 6,8	13 ± 11,5
		10:00	11:30	14:00	17:00	10:00	11:30	14:00	17:00	
Profundidad (cm)		NATURAL				ARTIFICIAL				
Día 3	21	58 ± 22				50 ± 16,7				
	41	10 ± 9								
	62									
	83	21 ± 11	A las 10:30 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.				A las 10:30 se comienzan a sifonar los tubos para el posterior recuento de paralarvas vivas, con el fin de obtener datos sobre la supervivencia.			
	103					11 ± 19,2				
	124									
	144	6 ± 9,6				39 ± 34,7				
	165	6 ± 9,6								
		10:00	11:30	14:00	17:00	10:00	11:30	14:00	17:00	

Porcentaje de paralarvas situadas a diferentes profundidades del tubo expresadas en media ± SD a cada hora de muestreo.

Discusión

En estudios anteriores realizados con peces, se pudo ver que la intensidad de la luz, el espectro o el fotoperiodo producen importantes efectos sobre su desarrollo en todos los estadios de vida (Boeuf and Le Bail 1999, Ruchin 2004, Han et al. 2005, Marchesan et al. 2005). Por ello, durante los experimentos que se describen en este trabajo fueron probados diferentes tratamientos relacionados con la naturaleza de la luz, color o intensidad de esta. Así, se puede observar cómo las paralarvas responden de forma distinta a cambios en estos parámetros. No obstante, al no haber reseñas anteriores sobre este tipo de experimento, es complicado realizar comparaciones con otros trabajos.

En cuanto a la primera experiencia, relacionada con la colocación de tubos de PVC a modo de refugio, no se observaron diferencias importantes entre tratamientos, respecto a las migraciones verticales, ni en cuanto a la supervivencia. Lo que sugiere que las larvas no hacen uso de estos refugios, ya sea porque no perciben las condiciones ambientales como dañinas o estresantes, o que las condiciones de estos refugios (ej. Demasiada oscuridad) provocan que eviten adentrarse en ellos.

Por otro lado, respecto a rangos de intensidad óptimos para la cría de larvas de especies marinas, estudios demuestran que la aplicación de luces de baja intensidad produce un desarrollo anormal de los ojos, con una disminución de la capacidad visual de estos organismos (Rahman et al, 1979; Zeutsius and Rahmann, 1984). De esta forma, estos individuos en estas condiciones presentan problemas a la hora de localizar las presas, disminuyendo la supervivencia.

Según Villamizar et al., 2010, no se pueden hacer buenas comparaciones, entre trabajos porque no hay una estandarización de las unidades de luz (lux, watts, flux,...) y por el uso de fuentes de luz de diferentes espectros (LED, halógenos,...). Sin embargo, se ha demostrado que para la acuicultura de peces se obtienen mejores resultados usando sistemas de luces LED (Delabbio, 2015), ya que permiten un mayor control de la intensidad y el espectro de luz, todo ello siempre en combinación con el color del tanque.

En el caso de *O. vulgaris*, la importancia de la intensidad de la luz para el éxito alimenticio de las paralarvas de un día de edad que se alimentan de *Artemia sp.* fue establecida por Márquez et al. (2007b), ya que la tasa de depredación de paralarvas con 24 horas de vida disminuyó drásticamente cuando las paralarvas se ensayaron en la oscuridad; por otro lado, según Sykes, 2010, la exposición a una alta intensidad, como 1200 lux, puede producir ceguera en *Sepia officinalis*. En su estudio tuvo como resultado que 100 lux fue la intensidad más óptima para esta especie. Sin embargo, en el presente trabajo se usaron 320 y 1010 lux de intensidad, sin encontrar diferencias entre tratamientos a ninguna edad, ni mortalidad de las paralarvas importantes. Esta diferencia entre especies coincide con lo indicado por Villamizar et al, 2010, cuando sugiere que la respuesta a las condiciones de iluminación es específica de la especie.

En nuestra tercera experiencia usamos dos colores distintos. En cuanto a los resultados, no se encontraron diferencias en migración en 0 y 15 días, pero sí en 30 días sobre todo a las 17:00 en rojo. Lo que sugiere que las paralarvas cambian sus patrones de comportamiento y que el color de la luz puede influir en ellos. Por otro lado, es posible que la iluminación de ambos tratamientos sea una fuente de estrés, ya que los niveles de glucosa y lactato eran altos en todas las paralarvas de diferentes edades o tratamientos. Por otro lado, es posible que el espectro utilizado afecte a la capacidad visual de las larvas ya que tienen una baja capacidad de absorción en el rojo y eso influye en última instancia, a su capacidad para detectar y cazar presas (Stubbs, 2016).

En el presente ensayo se usan dos naturalezas de luz, una natural y otra artificial, con fotoperiodos de 12 horas de luz : 12 horas de oscuridad. De este ensayo podemos señalar que a 15 días hubo una bajada en luz natural que no hubo en luz artificial, quizás debido a los cambios de intensidad que se producían a lo largo del día, mientras que con luz artificial la intensidad era siempre la misma; y a 30 días es de recalcar, que la bajada fue mayor a las 17:00, interacción similar a la que ocurre con el tratamiento de luz roja. Esto sugiere que la luz natural acelera un comportamiento de migración que en la artificial no se nota.

En cuanto a marcadores de estrés, el lactato mostró mayores niveles en paralarvas de mayor edad en tratamientos de luz roja y blanca. Es probable que se deba a que las

paralarvas de mayor edad son más sensibles a los cambios en intensidades y colores de luz, lo que les provoca un mayor estrés. Los menores niveles detectados en larvas iniciales podrían deberse a que su respuesta fisiológica no ha sido aún completamente desarrollada, como ha sido sugerido por [Tur et al., 2017](#).

El estrés también está relacionado con el tiempo de exposición, la glucosa y el lactato incrementan con el tiempo en especies como el pez arcoíris, (*Oncorhynchus mykiss*) ([M.G Wells y W.Pankhurts, 1999](#)), en este estudio, vemos como los niveles de lactato aumentan cuanto más edad tienen las paralarvas en tratamientos de luz roja y blanca.

No obstante, se requieren de más estudios para comprobar la respuesta a estos marcadores secundarios para tener una idea más fija de su desarrollo y del grado de afección que tiene sobre *O.vulgaris*

Conclusiones

La supervivencia se ve principalmente afectada por el color mejorando con el rojo a los 0 días y con el blanco a los 15 y 30 días (aunque en este último sin diferencias significativas). Las mayores cantidades de lactato con luz blanca a los 0 días podría explicar la primera diferencia, mientras que la baja sensibilidad para el rojo de estos animales podría explicar la segunda diferencia al tener más problemas para cazar (algo que no es tan importante en los primeros días al tener reserva de vitelo). Los altos valores de los marcadores de estrés a los 15 y 30 días (superiores a los 0 días y sin diferencias significativas entre tratamientos) sugieren que ambos grupos de larvas se encuentran estresadas, posiblemente debido al manejo (cambio a los tubos, etc).

Periodo de adaptación

Las paralarvas parecen necesitar de un período de adaptación después de haber sido sembradas en el tubo, ya que al principio suelen estar todas en superficie independientemente del tratamiento aplicado. Por este motivo se aconseja iniciar la toma de datos al día siguiente de la siembra (2º día del presente experimento).

Efecto de la luz natural en la migración

En general se observa una tendencia a bajar más en la columna (migración vertical) al aumentar la edad de las paralarvas, pero este efecto parece estar afectado por el tipo de luz. De esta manera, el grupo iluminado con luz natural del 4º ensayo muestra una mayor migración vertical frente al grupo de luz artificial a los 15 días de edad, mientras que a los 30 días la migración es similar en ambos grupos.

Efecto del color de luz en la migración

El grupo iluminado con luz roja (tercer ensayo) muestra una mayor migración vertical a los 30 días que el grupo de luz blanca.

Efecto de la hora del día en la migración

Por regla general no se encuentran diferencias importantes en el comportamiento de las paralarvas en los muestreos realizados a lo largo de la mañana o primeras horas de la tarde (9:00, 11:00, 13:00 y 15:00). Sin embargo, a media tarde (17:00), se observan las mayores migraciones verticales en larvas de 30 días, aunque solo tienen lugar bajo

luz natural (4º experimento) o luz artificial roja (3º experimento), mientras que no se observan cambios bajo luz artificial blanca.

El presente estudio sugiere que el tipo de iluminación puede afectar a la supervivencia, estrés y migración vertical de las paralarvas de pulpo común. La luz roja y la luz natural parecen favorecer las migraciones verticales, lo cual se supone que se asimila más al comportamiento de estos animales en su medio natural. Sin embargo la luz roja parece reducir la supervivencia. Tomados en su conjunto, estos datos sugieren que luz natural es la más adecuada para el cultivo de paralarvas bajo las condiciones ensayadas en el presente estudio.

Conclusions

Survival is mainly affected by color improving with red at 0 days and white at 15 and 30 days (although in the latter with no significant differences). The higher amounts of lactate with white light at 0 days could explain the first difference, whereas the low sensitivity to red of these animals could explain the second difference when having more trouble hunting (something that is not so important in the first days when having a veal reserve). The high values of stress markers at 15 and 30 days (greater than 0 days and without significant differences between treatments) suggest that both groups of larvae are stressed, possibly due to management (change to tubes, etc.).

Adaptation period

The paralarvae seem to need a period of adaptation after being planted in the tube, since at the beginning they are usually all surface regardless of the treatment applied. For this reason it is advisable to start the data collection the day after sowing (2nd day of the present experiment).

Effect of natural light on migration

In general there is a tendency to lower more in the column (vertical migration) as the age of the paralarvae increases, but this effect seems to be affected by the type of light. In this way, the group illuminated with natural light of the 4th test shows a greater vertical migration compared to the group of artificial light at 15 days of age, whereas at 30 days the migration is similar in both groups.

Effect of light color on migration

The group illuminated with red light (third test) shows a greater vertical migration at 30 days than the white light group.

Effect of time of day on migration

As a rule, there are no important differences in the behavior of the paralarvae in the samplings conducted during the morning or early afternoon (9:00, 11:00, 13:00 and 15:00). However, at mid-afternoon (17:00), the largest vertical migrations are observed in 30-day larvae, although they only occur under natural light (4th experiment) or red artificial light (3rd experiment), while no changes are observed under white artificial light.

The present study suggests that the type of lighting may affect the survival, stress and vertical migration of common octopus paralarvae. Red light and natural light seem to favor vertical migrations, which is supposed to be more closely related to the behavior of these animals in their natural environment. However the red light seems to reduce survival. Taken together, these data suggest that natural light is the most adequate for the cultivation of paralarvae under the conditions tested in the present study.

Bibliografía

- Villanueva, R., and Norman, M. D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *An Annual Review*, 46, 105–202.
<https://doi.org/doi:10.1201/9781420065756.ch4\r10.1201/9781420065756.ch4>
- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J.L., Okamura, S., Roo, J., van der Meeren, T., Vidal, E.A.G., Villanueva, R. (2007). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.019>
- Roura, A., González, A. F., Redd, K., and Guerra, A. (2012). Molecular prey identification in wild *Octopus vulgaris* paralarvae. *Marine Biology*, 159(6), 1335–1345.
<https://doi.org/10.1007/s00227-012-1914-9>
- Garrido, D., Martín, V. M., Rodríguez, C., Iglesias, J., Navarro, J. C., Estévez, A., & Almansa, E. (2016). Meta-analysis approach to the effects of live prey on the growth of *Octopus vulgaris* paralarvae under culture conditions. *Reviews in Aquaculture*. <http://doi.org/10.1111/raq.12142>
- Iglesias, J., Fuentes, L. and Villanueva, R. (2016). *CEPHALOPOD CULTURE*. 1st ed. SPRINGER, cap 5 & cap 23.
- Roura, Á., Antón Álvarez-Salgado, X., González, Á., Gregori, M., Rosón, G., Otero, J. and Guerra, Á. (2016). Life strategies of cephalopod paralarvae in a coastal upwelling system (NW Iberian Peninsula): insights from zooplankton community and spatio-temporal analyses. *Fisheries Oceanography*, 25(3), pp.241-258. DOI: 10.1111/fog.12151
- Garrido, D., Varó, I., Morales, A. E., Hidalgo, M. C., Navarro, J. C., Hontoria, F., ... Cardenete, G. (2017). Assessment of stress and nutritional biomarkers in cultured *Octopus vulgaris* paralarvae: Effects of geographical origin and dietary regime. *Aquaculture*, 468, 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.023>
- Juliette Delabbio (2015). Advantages of LED lighting Systems in larval fish culture. *World Aquaculture*. Pag. 25 – 28.
- Alexander L. Stubbs and Christopher W. Stubbs (2016). Spectral discrimination in color blind animals via chromatic aberration and pupil shape. *PNAS Early Edition*.
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1524578113>
- Antonio V. Sykes, Daniel Quintana and José P. Andrade (2010). The effects of light intensity on growth and survival of cuttlefish (*Sepia officinalis*) hatchlings and juveniles.
- Villamizar et al. (2010). Effects of light during early larval development of some aquacultures teleosts. Pag. 86 – 94. Journal homepage:
www.elsevier.com/locate/aqua-online

- Estefanell, J. (2013). El pulpo común: candidato para la acuicultura. *Vector Plus*, 26.
- Boletzky, S. von, and Villanueva, R. (2014). Cephalopod Biology. In *Cephalopod Culture* (pp. 3–16). http://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_1.
- Villanueva, R., and Norman, M. D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *An Annual Review*, 46, 105–202. <https://doi.org/doi:10.1201/9781420065756.ch4\r10.1201/9781420065756.ch4>.
- Okamoto, M., Anraku, K., Kawamura, G., & Tanaka, Y. (2001). Selectivity of color of shelter by *Octopus vulgaris* and *O-aegina* under different background colors. *Nippon Suisan Gakkaishi-Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 67(4), 672–677.
- Iglesias, J., Otero, J., Moxica, C., Fuentes, L. and Sánchez, F. (2004). The Completed Life Cycle of the Octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under Culture Conditions: Paralarval Rearing using *Artemia* and Zoeae, and First Data on Juvenile Growth up to 8 Months of Age. *Aquaculture International*, 12(4/5), pp.481-487. doi: 10.1023/b:aqui.0000042142.88449.bc
- Monroig, Ó., Tocher, D., and Navarro, J. (2013). Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in Marine Invertebrates: Recent Advances in Molecular Mechanisms. *Marine Drugs*, 11(10), 3998–4018. <https://doi.org/10.3390/md11103998>