



Dietas compuestas para el periodo inicial de cría de juveniles de astácidos (*Pacifastacus leniusculus*, Dana): proteína, necesidades y alternativas para una acuicultura sostenible.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Juan Bautista Fuertes Callejo dirigida por Jesús Domingo Celada Valladares y María Sáez-Royuela Gonzalo para acceder al grado de doctor

León, julio de 2013



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS¹

Los Drs. Jesús Domingo Celada Valladares y María Sáez-Royuela Gonzalo como Directores² de la Tesis Doctoral titulada “Dietas compuestas para el periodo inicial de cría de juveniles de astácidos (*Pacifastacus leniusculus* Dana): proteína, necesidades y alternativas para una acuicultura sostenible” realizada por D. Juan Bautista Fuertes Callejo en el programa de doctorado Ecología y Tecnología Ambiental, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a ____ de _____ de 2013.

Fdo.: Jesús D. Celada

Fdo.: María Sáez-Royuela

¹ Solamente para las tesis depositadas en papel.

² Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL¹

El órgano responsable del programa de doctorado Ecología y Tecnología Ambiental en su reunión celebrada el día ____ de _____ de 2013 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Dietas compuestas para el periodo inicial de cría de juveniles de astácidos (*Pacifastacus leniusculus* Dana): proteína, necesidades y alternativas para una acuicultura sostenible” dirigida por el Dr. D. Jesús Domingo Celada Valladares y la Dra. Dña. María Sáez-Royuela Gonzalo, elaborada por D. Juan Bautista Fuertes Callejo, y cuyo título en inglés es el siguiente “Composed diets for the initial period of juvenile astacid rearing (*Pacifastacus leniusculus* Dana): protein, needs and alternatives for a sustainable aquaculture”.

Lo que firmo, en León a ____ de _____ de 2013.

El Secretario,

Fdo.: _____

Vº Bº

El Director del Departamento/
Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.: _____

¹ Solamente para las tesis depositadas en papel.

Agradecimientos

La presente Tesis es el resultado del trabajo y esfuerzo de todos estos años en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, corrigiendo, aconsejando, dando ánimo... y sobre todo acompañando en los momentos de mayores dificultades. Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas ellas:

Al Dr. **Jesús Domingo Celada Valladares**, director de esta Tesis Doctoral, por haber confiado en mí. Su rigor científico y su capacidad para resolver dudas y problemas han sido clave. Le agradezco su franqueza y su dedicación hacia este trabajo.

A la Dra. **María Sáez-Royuela Gonzalo**, codirectora de esta Tesis Doctoral, y al Dr. **José Manuel Carral Llamazares**, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo, y sobretodo por su apoyo y cercanía.

Al **Ministerio de Ciencia e Innovación** (actual Ministerio de Educación, Cultura y Deporte), por el soporte económico prestado a lo largo de los últimos cuatro años a través de una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (referencia AP2008-01009).

A la astacifactoría **Quiñon S.A.** (San Esteban de Gormaz, Soria), por su ayuda y colaboración, especialmente en el abastecimiento de los animales necesarios para la realización de los diferentes estudios.

Al Dr. **Álvaro González Martín**, por su acogida y predisposición a ayudar en todo momento, compartiendo sus conocimientos y experiencia.

Al futuro doctor **Álvaro González Rodríguez**, por su directa colaboración en el desarrollo de los procesos experimentales que componen esta Tesis, y por su compañerismo y buen ambiente de trabajo creado.

A los Técnicos y Oficiales de laboratorio **Pedro de Vega Álvarez, María Mediavilla Merino y Faustino García Olmos**, por su ayuda en el mantenimiento de las instalaciones y su grata compañía a lo largo de estos años.

Al Dr. **Japo Jussila**, investigador principal en el Crayfish Innovation Center (University of Eastern Finland) en Kuopio (Finlandia), por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación durante unos meses.

A **Lidia Rodríguez Reguera, Javier Cardo Lazo, Pablo Crespo Fernández y José María Jañez Franco**, por haber estado ahí todo el tiempo. Su comprensión, paciencia y largas conversaciones sobre diferentes temas y aspectos de la vida han resultado fundamentales para mí. Gracias por los buenos momentos vividos.

A mi hermana, **Almudena Fuertes Callejo**, por su apoyo incondicional y su capacidad para escuchar y aconsejar. Gracias por ser la mejor hermana que podría tener.

A mis padres, **Bautista Fuertes Moran** y **Matilde Callejo Rodríguez**, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por confiar siempre en mí, y transmitirme vuestros valores.

A todos,

Gracias.

***“La ciencia se compone de errores, que
a su vez son los pasos hacia la verdad”***

Julio Verne

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA DE LAS PUBLICACIONES	3
2. LISTA DE PUBLICACIONES	9
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. PRINCIPALES ESPECIES DE CANGREJOS DE RÍO DE INTERÉS EN ACUICULTURA	15
3.1.1. <i>Astacidae</i>	15
3.1.2. <i>Cambaridae</i>	16
3.1.3. <i>Parastacidae</i>	16
3.2. CICLO VITAL Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS PRODUCTIVO	17
3.3. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE ASTÁCIDOS	18
3.4. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN EN CULTIVO DE ASTÁCIDOS	20
3.4.1. <i>Fase reproductiva</i>	20
3.4.2. <i>Cría de juveniles</i>	22
3.4.2.1. <i>Temperatura</i>	22
3.4.2.2. <i>Abastecimiento de agua</i>	22
3.4.2.3. <i>Densidad de juveniles</i>	22
3.4.2.4. <i>Alimentación</i>	23
3.4.2.5. <i>Perspectivas de futuro</i>	24
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES	29
5.1. CANGREJOS, INSTALACIONES Y PROCEDIMIENTO BÁSICO DE EXPERIMENTACIÓN	31
5.2. DIETAS Y ALIMENTACIÓN	33
5.2.1. <i>Análisis químico de dietas y animales</i>	35
5.3. RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
6. SECUENCIA DE EXPERIMENTACIÓN	37
6.1. ESTUDIO I: EFECTOS DE DIFERENTES CONTENIDOS PROTEICOS Y DISTINTOS NIVELES DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR HARINA DE SOJA	39
6.1.1. <i>Planteamiento experimental</i>	39
6.1.2. <i>Resultados</i>	43
6.1.3. <i>Discusión</i>	48
6.2. ESTUDIO II: EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR CONCENTRADO PROTEICO DE GUISANTE	50
6.2.1. <i>Planteamiento experimental</i>	50
6.2.2. <i>Resultados</i>	52
6.2.3. <i>Discusión</i>	57
6.3. ESTUDIO III: EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR HARINA DE SUBPRODUCTOS DE POLLO	58
6.3.1. <i>Planteamiento experimental</i>	58
6.3.2. <i>Resultados</i>	61
6.3.3. <i>Discusión</i>	65

6.3. ESTUDIO IV: EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR HARINA DE PLUMA.....	66
6.3.1. Planteamiento experimental.....	66
6.3.2. Resultados.....	68
6.3.3. Discusión.....	72
7. DISCUSIÓN GENERAL.....	75
8. CONCLUSIONES.....	83
9. RESUMEN.....	87
10. SUMMARY.....	95
11. BIBLIOGRAFÍA.....	101
12. ANEXO.....	117

A close-up photograph of several crayfish on a dark, textured surface. The crayfish are light brown and orange in color. One crayfish is in the foreground, facing right, with its large claws and antennae clearly visible. Another crayfish is partially visible behind it, and a third is in the background, slightly out of focus. The lighting is warm, highlighting the texture of the crayfish's shells.

**1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN
DE LA UNIDAD TEMÁTICA DE LAS
PUBLICACIONES**



La acuicultura es una actividad con 4000 años de historia (FAO 1988) que se encuentra en continuo desarrollo. En las últimas décadas, el sector ha evolucionado de forma notable, experimentando un fuerte crecimiento y adquiriendo gran relevancia económica. De acuerdo con los datos facilitados por la FAO, se ha pasado de una producción inferior al millón de toneladas en los años 50 a más de 60 millones de toneladas en 2011, manteniendo un índice de crecimiento anual medio del 8,8% en los últimos treinta años (FAO 2012). Los crustáceos representan aproximadamente un 10% de dicha producción, lo que en términos económicos se traduce en un 23% del total generado.

Actualmente, la mayor parte de los crustáceos cultivados son decápodos macruros, destacando por su valor en el mercado varias especies de langostinos (*Penaeus* spp y *Metapenaeus* spp), el camarón de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*) y diversas especies de cangrejos de río de las familias Astacidae, Parastacidae y Cambaridae.

Los astácidos destacan por su atractivo gastronómico, fuertemente enraizado en la cultura popular. La drástica reducción de las poblaciones desde finales de los años 60 debida principalmente a las devastadoras epizootias de afanomicosis, sumadas a la pérdida de hábitats y a la contaminación, ha originado un creciente interés por el desarrollo del cultivo de astácidos en Europa. Las principales especies objeto de cultivo son el cangrejo noble (*Astacus astacus* L.), el cangrejo de patas largas (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz), el cangrejo de patas blancas (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) y el cangrejo señal (*Pacifastacus leniusculus* Dana). A finales de los años 90, se contabilizaron más de 760 astacifactorías en la UE (15 países), en su mayoría dedicadas a ésta última especie (Pérez

et al. 1997a). Los sistemas son, generalmente, de tipo extensivo y, en el mejor de los casos, semiextensivo (Pérez et al. 1997b). En tales circunstancias, las diferentes etapas del proceso productivo están sujetas a factores ambientales de difícil control, con rendimientos bajos e impredecibles. Esto ha conducido en numerosos países al desarrollo de líneas de investigación para la intensificación y mejora de las distintas fases del cultivo.

En anteriores investigaciones con *A. pallipes* y *P. leniusculus*, este grupo ha llegado a la puesta a punto de técnicas de gran valor aplicativo en la fase reproductiva y que abarcan maduración, apareamiento, oviposición, embriogénesis en incubación maternal (Celada et al. 1985, 1987, 1988, 2001, 2005, 2006, Carral et al. 2000) y sistemas de incubación artificial (Carral et al. 1992, 2004, 2009, Pérez et al. 1998, 1999, Celada et al. 2004, Melendre et al. 2006, 2007, Sáez-Royuela et al. 2009, González Á. et al. 2010, 2011a), así como almacenamiento y transporte de huevos (Celada et al. 2000, 2001, Pérez et al. 2003), todo ello orientado a la mejora de cada una de las etapas del largo proceso que culmina con la obtención de los juveniles estado 2. Además, se ha comprobado repetidamente que los resultados obtenidos y las técnicas desarrolladas en una especie son, en gran medida, aplicables a la otra y, por extensión, a otros astácidos, con las modificaciones oportunas en cada caso.

Una vez que se ha logrado una aceptable eficiencia en la producción de juveniles, el siguiente paso ha de abordar la mejora de las tasas de supervivencia y de crecimiento de dichos animales. Dentro de ello, la alimentación constituye un factor que influye decisivamente sobre los resultados desde el inicio de la ingestión de alimento. La información disponible sobre nutrición en astácidos

es muy escasa, y la extrapolación de los conocimientos obtenidos en otros crustáceos puede ser incorrecta, debido principalmente a diferencias biológicas entre especies, condiciones de mantenimiento de los animales, edad y estado fisiológico de los mismos, así como la variabilidad de ingredientes y métodos usados en la elaboración de las dietas. En condiciones controladas, se han utilizado alimentos de muy diversa naturaleza, solos o combinados (D'Abramo et al. 1985, Ackefors et al. 1989, 1995, Gydemo y Westin 1989, Celada et al. 1989, 1993, Taugbøl y Skurdal 1992, Henttonen et al. 1993, Blake et al. 1994, Nyström 1994, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001, Savolainen et al. 2003, 2004). Considerando en conjunto todos estos estudios, tras rebasar el período crítico de los 2-3 primeros meses de cría, los resultados no han sido satisfactorios. Recientemente, los trabajos de Sáez-Royuela et al. (2007) y González Á. et al. (2008) han evidenciado que la suplementación con nauplios de *Artemia* de una dieta seca formulada para salmónidos mejora en gran medida la supervivencia y el crecimiento. Posteriormente, González R. et al. (2009) han puesto de manifiesto que la suplementación con nauplios vivos puede ser sustituida por quistes decapsulados de *Artemia* en la misma cantidad, reduciéndose los costes y mejorando el crecimiento.

Teniendo en cuenta dichos avances, en el marco del proyecto del Plan Nacional de I+D+i "Técnicas de cría de juveniles de astácidos (*P. leniusculus*) en condiciones controladas" ref. AGL2005-01127, se ha llegado a la formulación y elaboración de una dieta práctica específica para juveniles de astácidos, que ha permitido resultados aceptables (Carral et al. 2011). Partiendo de esta base, y teniendo en cuenta que no se dispone de información de niveles adecuados de macronutrientes en la dieta de estos animales en los primeros meses de

alimentación exógena, la prioridad debe ser la determinación de un nivel proteico adecuado, ya que su contenido es el factor clave que determina el coste de una dieta. En consecuencia, el primer propósito de esta Tesis Doctoral consiste en determinar niveles óptimos de proteína en la dieta durante los primeros 100 días de alimentación externa, usando harina de pescado como fuente de proteína. La harina de pescado es el principal ingrediente proteico usado en acuicultura (Tacon y Metian 2008); sin embargo, la insostenible presión de la pesca sobre las poblaciones salvajes, así como los elevados precios derivados de la creciente demanda de este ingrediente, hacen inviable mantener sus actuales niveles de inclusión en las dietas (Hannesson 2003, Tacon y Metian 2008, Naylor et al. 2009, FAO 2009). Derivado de esta problemática, el segundo propósito de esta Tesis consiste en la evaluación de diversas fuentes alternativas de proteína durante los tres primeros meses de alimentación externa.

Para alcanzar los objetivos de la Tesis, el Ministerio de Ciencia e Innovación concedió una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (referencia AP2008-01009). En este contexto, la Tesis Doctoral se presenta en la modalidad de Compendio de Publicaciones y su contenido es el siguiente:

- Publicación I: Determinación de niveles óptimos de proteína de origen animal (harina de pescado) en la dieta durante los primeros 100 días de alimentación exógena y evaluación de posibilidades de sustitución de la proteína de pescado por otra vegetal (harina de soja).
- Publicación II: Estudio de posibles sustituciones de proteína de harina de pescado por proteína

de concentrado proteico de guisante durante los primeros 100 días de alimentación exógena.

- Publicación III: Evaluación de posibilidades de sustitución de proteína de harina de pescado por proteína de harina de subproductos de pollo durante los primeros 80 días de alimentación externa.

- Publicación IV: Valoración de posibilidades de sustitución de proteína de harina de pescado por proteína de harina de pluma durante los primeros 80 días de alimentación externa.

Las cuatro publicaciones que sustentan esta Tesis se relacionan en el apartado 2.

The background of the page is a close-up photograph of several crayfish. They are light brown and orange in color, with their characteristic pincers and antennae visible. The crayfish are positioned on a dark, textured surface, possibly a table or a tray. The lighting is soft, highlighting the texture of their shells and the details of their anatomy.

2. LISTA DE PUBLICACIONES



I. Autores: Fuertes JB, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González-Rodríguez Á (2012).

Título: Effects of dietary protein and different levels of replacement of fish meal by soybean meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding.

Revista: Aquaculture 364-365, 338-344.

Factor de impacto (JCR 2012): 2,009.

Categoría: Fisheries. Posición 11 de 49 (11/49).

II. Autores: Fuertes JB, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González-Rodríguez Á (2013).

Título: Replacement of fish meal by pea protein concentrate in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding.

Revista: Aquaculture 388-391, 159-164.

Factor de impacto (JCR 2012, último disponible): 2,009.

Categoría: Fisheries. Posición 11 de 49 (11/49).

III. Autores: Fuertes JB, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González-Rodríguez Á (2013).

Título: Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding.

Revista: Aquaculture 404-405, 22-27.

Factor de impacto (JCR 2012, último disponible): 2,009.

Categoría: Fisheries. Posición 11 de 49 (11/49).

IV. Autores: Fuertes JB, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González-Rodríguez Á (2013).

Título: Effects of different levels of replacement of fish meal by feather meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding.

Revista: Aquaculture Nutrition, doi: 10.1111/anu.12044

Factor de impacto (JCR 2012, último disponible): 1,688.

Categoría: Fisheries. Posición 18 de 49 (18/49).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA





3.1. PRINCIPALES ESPECIES DE CANGREJOS DE RÍO DE INTERÉS EN ACUICULTURA

Los cangrejos de río son los invertebrados más grandes de agua dulce, muy adaptables fisiológicamente y ampliamente distribuidos en aguas lénticas, lólicas y subterráneas (Holdich 2002). En la actualidad, han sido descritas más de 550 especies encuadradas en el Infraorden Astacidea (Crandal y Buhay 2008). Taxonómicamente, este Infraorden comprende la Superfamilia Astacoidea, propia del Hemisferio Norte y compuesta por las Familias Cambaridae y Astacidae, y la Superfamilia Parastacoidea, propia del Hemisferio Sur y que incluye únicamente la Familia Parastacidae. La distribución natural de las especies ha sido ampliada en muchos casos debido a traslocaciones realizadas por el hombre, a menudo con la finalidad de llevar a cabo su cría y cultivo o realizar repoblaciones (Gherardi y Holdich 1999).

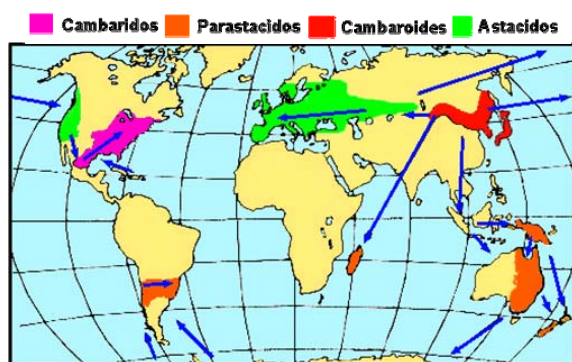


Foto1. Distribución general de las diferentes familias (según Ortmann, en André, 1960).

3.1.1. Astacidae

Este grupo lo integran dos géneros originarios de Europa (*Astacus* y *Austropotamobius*) y uno natural de Norteamérica (*Pacifastacus*), que se encuentran ampliamente distribuidos por el oeste de Eurasia y la costa oeste norteamericana. Las especies presen-

tes en Europa de mayor importancia económica y gastronómica son el cangrejo noble (*Astacus astacus* L.), el cangrejo de patas largas (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz), el cangrejo de patas blancas (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) y el cangrejo señal (*Pacifastacus leniusculus* Dana):

- El cangrejo noble (*A. astacus*) se encuentra ampliamente extendido por el norte y centro de Europa, desde Rusia hasta Francia, pasando por los países escandinavos, Polonia, República Checa, Hungría, Alemania y Países Bajos.



Foto 2. Cangrejo noble.

- El cangrejo de patas largas (*A. leptodactylus*) se distribuye principalmente por Europa oriental.

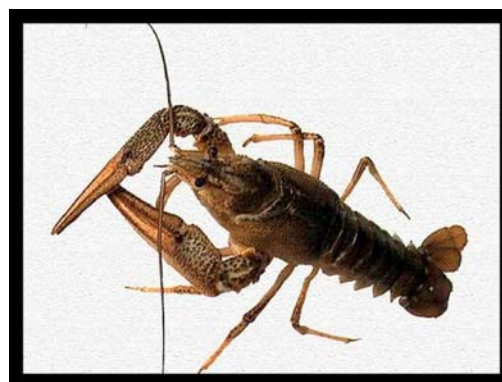


Foto 3. Cangrejo de patas largas.

- El cangrejo de patas blancas (*A. pallipes*) se encuentra asentado en Europa meridional y occidental, princi-

palmente en España, Francia, Grecia, Islas Británicas, Italia y Suiza.



Foto 4. Cangrejo de patas blancas.

- El cangrejo señal (*P. leniusculus*) es originario del noroeste de Estados Unidos y el suroeste de Canadá, y fue introducido por primera vez en Europa en la década de los años sesenta del siglo pasado en Suecia. Dado su éxito adaptativo, posteriormente se distribuyó en otros países europeos. En el año 2009, el cangrejo señal se encontraba presente en 27 países de Europa, considerándose como una de las especies de cangrejo de río introducidas con una mayor distribución en el continente (Johnsen y Taugbøl 2010).



Foto 5. Cangrejo señal.

3.1.2. Cambaridae

La Familia de los cambáridos está compuesta por doce géneros y más de

400 especies, de las cuales el 99% son oriundas de Norteamérica. Destaca por su importancia comercial el cangrejo rojo de las marismas (*Procambarus clarkii*), natural del sureste de Estados Unidos (zonas pantanosas del estado de Louisiana) y noreste de México. Su rápido crecimiento y gran capacidad de adaptación y propagación han favorecido su distribución en otras zonas del planeta, estando presente en todos los continentes a excepción de la Antártida y Oceanía (Hobbs et al. 1989).



Foto 6. Cangrejo rojo de las marismas.

3.1.3. Parastacidae

Esta Familia incluye los cangrejos de río del Hemisferio Sur presentes en zonas de Australasia, Madagascar y Sudamérica (Holdich 2002). Dentro de los catorce géneros que forman parte de este grupo, destacan por sus posibilidades de cultivo tres especies: el "yabbie" (*Cherax destructor* Clark), originario del sudeste de Australia, el "marron" (*Cherax tenuimanus* Smith), natural del suroeste de Australia y el cangrejo de pinza roja (*Cherax quadricarinatus* Clark), procedente del norte de Australia. Estos dos últimos parecen ser los de mayor proyección con vistas a su explotación, aunque la producción actual todavía es insuficiente para satisfacer la demanda del mercado (Lawrence y Jones 2002).

3.2. CICLO VITAL Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS PRODUCTIVO

El ciclo biológico de los cangrejos de río presenta importantes diferencias en el desarrollo cronológico de sus fases según las distintas familias. En el caso concreto de los astácidos, el proceso reproductivo tiene lugar solamente una vez al año y se inicia con el desarrollo y maduración gonadal de los machos y las hembras en verano. Posteriormente, coincidiendo con el descenso de la temperatura y la reducción del fotoperíodo durante los meses de otoño, se desencadena un incremento de la actividad sexual de los reproductores que desemboca en el apareamiento. En el transcurso del mismo, el macho deposita los espermátóforos sobre la parte medio-ventral del cefalotórax de la hembra, donde permanecerán adheridos unos días hasta que tenga lugar la ovoposición y posterior fecundación. Los huevos fecundados se mantienen unidos a los pleópodos maternos hasta finalizar su desarrollo embrionario.



Foto 7. Hembra ovígera.

Comparados con otros crustáceos cultivados, los cangrejos de río presentan valores de fecundidad realmente bajos. Así, mientras en langostinos peneidos la puesta oscila entre cincuenta mil y un millón de

huevos por hembra, en *A. pallipes* la puesta se limita a sólo 50-75 huevos/hembra (Woodlock y Reynolds 1988, Carral et al. 1994). A su vez, el número de huevos en el cangrejo de patas largas (*A. leptodactylus*) oscila entre 100 y 300 (Skurdal y Taugbøl 2002), y los valores medios de puesta en *P. leniusculus* varían entre 110 y 180 huevos por hembra (Momot 1991), pudiendo alcanzar valores de hasta 270 (Reynolds 2002). Los cambáridos y los parastácidos poseen mayor fecundidad que los astácidos, sin llegar a los valores registrados en peneidos. En este sentido, se han registrado valores medios de 1000 huevos por hembra en parastácidos (Jones 1995, Lawrence y Jones 2002) y de 400-450 en hembras del cangrejo rojo de las marismas, *P. clarkii* (Oluoch 1990, Huner 2002).

En lo que concierne a la duración de la embriogénesis, existen importantes diferencias según la familia. Así, los astácidos en Europa presentan el período más largo con 6-8 meses en condiciones naturales (Hogger 1986a, 1986b, Cukerzis 1988, Matthews 1992, Skurdal y Taugbøl 1994, 2002), frente a las 2-3 semanas registradas en el cangrejo rojo (Huner 2002). En las especies del Hemisferio Sur, la embriogénesis abarca entre 1 y 3 meses (Lawrence y Jones 2002).

El largo desarrollo embrionario de los astácidos no termina con la eclosión, cuando aparecen los denominados juveniles estado 1, sino que se prolonga 8-10 días más hasta que, tras la primera muda, los juveniles alcanzan el estado 2.

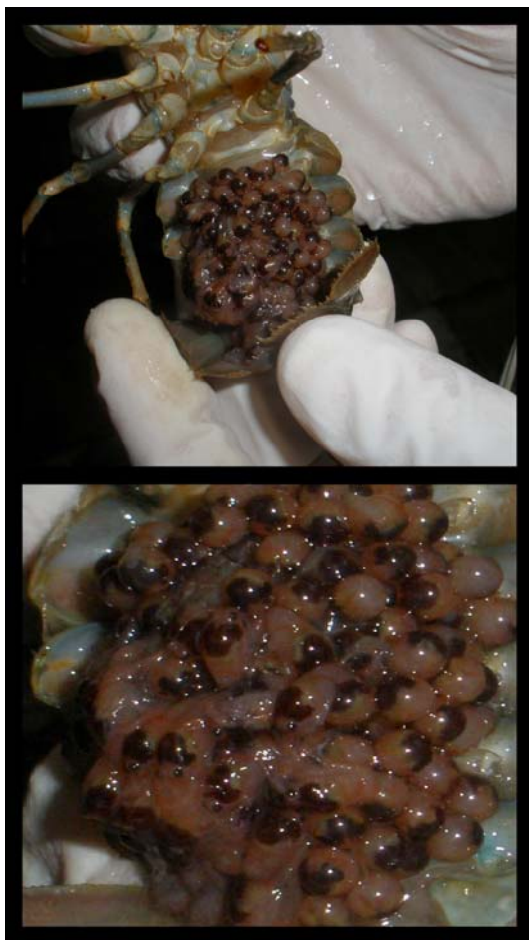


Foto 8. Juveniles estado 1 adheridos a los pleópodos maternos.

Los juveniles estado 2 se liberan de la madre con un aspecto semejante al adulto y, coincidiendo con el agotamiento progresivo de las reservas del vitelo, comienzan a ingerir alimento. Durante los primeros meses de vida, las mudas son numerosas, espaciándose en el tiempo a medida que se aproxima la madurez sexual. La edad y la talla a las que alcanzan dicha madurez sexual son variables dependiendo de la especie, siendo factores ambientales como la temperatura y el oxígeno los que más influyen en el proceso (Reynolds 2002). En astácidos, *A. astacus* madura en torno a los 3-5 años de edad cuando alcanza entre 31 y 43 mm de longitud de cefalotórax (LC) (Skurdal y Taugbøl 2002). En el caso del cangrejo de patas

blancas (*A. pallipes*), la madurez aparece a los 3-4 años con 22-26 mm LC, mientras que *P. leniusculus* normalmente madura a los 2-3 años con 30-45 mm LC (Abrahamsson y Goldman 1970, Abrahamsson 1971). Una vez adquirida la capacidad reproductiva, los procesos de desarrollo gonadal, apareamiento, oviposición, desarrollo de los huevos y producción de juveniles tendrán lugar una vez al año durante aproximadamente una década (Skurdal y Taugbøl 2002).

3.3. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE ASTÁCIDOS

Las primeras prácticas de cría de cangrejos de río a pequeña escala tuvieron lugar en la Edad Media en Europa, y se llevaron a cabo en estanques y pequeños cuerpos de agua situados dentro de propiedades pertenecientes a diversas órdenes religiosas. Dichas actividades consistían, básicamente, en el mantenimiento de animales y la producción de pequeñas cantidades de cangrejos con vistas al consumo directo en los propios monasterios y núcleos de población circundantes. Con el paso del tiempo, la demanda de cangrejos de río fue creciendo paulatinamente, así como el comercio de los mismos, hasta que la llegada y propagación de la afanomicosis provocó, desde finales del siglo XIX hasta la segunda mitad del XX, una drástica reducción de las poblaciones naturales. Así, el interés por el cultivo de astácidos en Europa se incrementa, conduciendo en numerosos países al desarrollo de técnicas para la mejora de las distintas fases del cultivo. Laurent (1988) y Arrignon (1989) hacen alusión al funcionamiento, durante el último tercio del siglo XIX, de la primera astacifactoría dedicada a la cría de cangrejo de río en Francia, y Hofmann (1978) destaca el funcionamiento de

una explotación de cangrejo noble durante la década de los 40 del siglo XX en Alemania. En la década de los 90, se contabilizaban más de 760 astacifactorías en los 15 países de la UE (Pérez et al. 1997a).

De acuerdo con Pérez et al. (1997a), los sistemas de cultivo pueden ser de tres tipos: extensivo, semiextensivo e intensivo.

- **Extensivo.** El abastecimiento de agua y condiciones de mantenimiento de los animales son naturales. La productividad espontánea sirve de base para la alimentación, aunque en algunos casos puede añadirse algún otro tipo de materias comestibles con el fin de facilitar un incremento de la densidad de población. En ocasiones, puede existir un cierto control por parte del hombre: mayor o menor aporte de alimento, regulación de la densidad de animales, fertilización del agua y limitación de la presencia de depredadores que, con frecuencia, constituyen un problema. Todas las fases del cultivo tienen lugar en el mismo estanque, estableciéndose una verdadera estructura de población.



Foto 9. Estanque en un sistema de producción extensivo.

- **Semiextensivo.** Se lleva a cabo en estanques diseñados específicamente para cangrejos. Normalmente, pueden vaciarse con el

fin de facilitar el manejo y la recolección de animales. Además del alimento natural generado en el estanque, los cangrejos pueden ver su dieta incrementada por aportes adicionales. Este sistema se diferencia del anterior por presentar un cierto grado de intensificación, definido fundamentalmente por la realización de prácticas de manejo que se efectúan en determinados momentos de la fase reproductiva. Así, al final del verano, los reproductores se encuentran en estanques, donde se completa el desarrollo gonadal y tienen lugar el apareamiento y la oviposición. En todos los casos, las madres se mantienen, durante la casi totalidad del desarrollo embrionario, bajo condiciones naturales y a bajas densidades para limitar las pérdidas de huevos. Cuando la embriogénesis llega a fases terminales, las hembras con huevos se recogen de los estanques y se trasladan a otros tanques donde la eclosión tiene lugar bajo condiciones controladas, permitiendo así la recolección de juveniles. Los animales obtenidos en los estados 2 ó 3 pueden ser destinados directamente a repoblación o ser transferidos a estanques al aire libre donde crecerán en condiciones seminaturales hasta la adquisición de la talla comercial.



Foto 10. Estanques de reproductores en un sistema semiextensivo.

- **Intensivo.** Este sistema aún no ha sido aplicado en condiciones industriales, encontrándose en la actualidad en fases experimentales. Todo el ciclo se llevaría a cabo ejerciendo un riguroso control de los factores ambientales, la reproducción y la alimentación.

En Europa, los sistemas de cultivo que se practican son, generalmente, de tipo extensivo y, en el mejor de los casos, semiextensivo (Pérez et al. 1997b), si bien se contemplan diversas modificaciones encaminadas a la mejora de los procesos productivos. Frecuentemente, las actividades se orientan a la obtención de juveniles (en los estados 2 ó 3, ó de un verano de vida) con destino a repoblación. Las características biológicas de estos animales y el escaso desarrollo de las técnicas productivas no han permitido, hasta el presente, un mayor grado de intensificación que permita cubrir totalmente la demanda europea de cangrejos de río para alimentación humana. En este sentido, destaca el hecho de que anualmente se importan en Europa varios cientos de toneladas de cangrejos de río, principalmente *P. clarkii* procedente de China (Gherardi 2011). Esto ha conducido en numerosos países al desarrollo de líneas de investigación encaminadas a intensificar y mejorar las distintas fases del cultivo, y de esta forma intentar optimizar el rendimiento y cubrir una creciente demanda.

3.4. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN EN CULTIVO DE ASTÁCIDOS

3.4.1. Fase reproductiva

Su objetivo radica en la obtención de juveniles estado 2, de vida independiente, que pueden ser destinados a repoblación o a cría en cultivo. La baja fecundidad y las altas tasas de pérdidas durante el largo período de

desarrollo embrionario son los principales inconvenientes de esta fase. Existen pocos trabajos en los que se hayan mantenido reproductores bajo condiciones controladas durante todo este período (desarrollo gonadal, maduración, apareamiento y desarrollo embrionario hasta la obtención de juveniles estado 2) registrándose las pérdidas en cada una de sus etapas, y realizándose evaluaciones globales de la eficiencia reproductiva. Esto es necesario para determinar la producción final de un stock de reproductores y, en consecuencia, para conocer el número de reproductores necesario para conseguir una producción concreta de juveniles estado 2.

El proceso de desarrollo de los huevos, eclosión de los juveniles estado 1 y muda al estado 2, que tiene lugar de forma natural en los pleópodos maternos se conoce como incubación maternal.



Foto 11. Juveniles estado 2 adheridos a los pleópodos maternos.

Actualmente, se dispone de estudios sobre eficiencia reproductiva en *A. astacus* (Cukerzis et al. 1979, Pursiainen et al. 1983, 1989, Taugbøl y Skurdal 1989, 1990a, 1990b, Mackeviciénė et al. 1997, 1999), en *A. leptodactylus* (Köksal 1988), en *A. pallipes* (De Luise y Sabbadini 1988, Celada et al. 1991, 2001, Carral et al. 1994, 2000, Saéz-Royuela et al. 2005) y en *P. leniusculus* (Mason 1974, 1997a, 1997b, Celada et al. 1988). Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido iniciados después de la puesta y pocos cubren todo el proceso reproductivo, desde la maduración hasta la obtención de juveniles estado 2. En estudios más recientes con *P. leniusculus* (Celada et al. 2005, 2006), se ha llevado a cabo todo el ciclo reproductivo bajo condiciones controladas y se han alcanzado valores de eficiencia del 45-51% (135-165 juveniles/hembra), que son los más altos registrados hasta ahora en astácidos.

En cuanto a la incubación artificial, el desarrollo de estas técnicas en el cangrejo de río surge como intento de mejora de los procesos productivos y sanitarios, de forma que permita la obtención en condiciones controladas de grandes cantidades de juveniles, libres de posibles procesos patológicos y dispuestos para ser utilizados en programas de repoblación o bien criados en condiciones de cultivo. La puesta en práctica de técnicas de incubación artificial permite evitar pérdidas de huevos al desprenderse de las hembras (Rhodes 1981, Celada et al. 1994, Matthews y Reynolds 1995, Pérez et al. 1998b, 1999) o tras la muerte de algunas de ellas (Cukerzis 1969, Arrignon 1981, Celada et al. 1994). Por otro lado, con su utilización se consigue un importante ahorro de espacio, agua, energía y mano de obra (Carral et al. 1992, Celada et al. 1994, González et al. 1993, Järvenpää 1995). Finalmente, la incubación artificial ofrece la posibilidad de identificar el

origen de los juveniles con mayor precisión, lo cual podría ser útil en programas de selección genética (Carral et al. 2003).

El uso de productos antifúngicos en incubación artificial ha permitido obtener tasas de eficiencia aceptables (Celada et al. 2004, Melendre et al. 2006, Carral et al. 2010, González Á. et al. 2011a), haciendo posible la incubación de altas densidades de huevos (Saéz-Royuela et al. 2009, González Á. et al. 2011a).

En lo referente al transporte de huevos, se ha venido efectuando en las propias madres. No obstante, este método presenta múltiples desventajas, ya que requiere contenedores de gran tamaño y una elevada densidad de hembras para el envío de cantidades importantes de huevos, lo que conlleva elevados costes de facturación (Celada et al. 1994). Dado que la eficacia de este sistema es incierta, el traslado y almacenamiento de huevos separados de las madres ofrecería indudables ventajas y contribuiría a un incremento de los rendimientos productivos de las factorías. Este pensamiento condujo a este equipo a la realización de diversos estudios destinados a posibilitar el transporte de huevos y prolongar el tiempo de almacenamiento de los mismos, llegando a alcanzar 120 días (Celada et al. 2000, Pérez et al. 2003).

La integración de las prácticas de transporte y almacenamiento de huevos embrionados vivos, combinadas necesariamente con la incubación artificial, permitiría la producción escalonada de juveniles durante largos períodos, así como la especialización de las factorías en determinadas fases del ciclo productivo, haciendo posible la distribución y el comercio de huevos. Además, mientras los huevos permanecen almacenados, el desarrollo embrionario continúa, sin gastos de agua ni de mano de obra.

3.4.2. Cría de juveniles

Durante varias décadas, la cría de juveniles ha constituido un tema de difícil enfoque. De hecho, los elevados niveles de mortalidad de estos animales durante los 2-3 primeros meses de vida han representado un fuerte inconveniente para la intensificación de la cría de astácidos (Gydemo y Westin 1989, Ackefors et al. 1995, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001). Durante los últimos 30 años, se han llevado a cabo numerosas investigaciones encaminadas a superar esta limitación, con resultados en general poco satisfactorios, hasta que los trabajos de Sáez-Royuela et al. (2007) y González Á. et al. (2008) evidenciaron que la suplementación con nauplios de *Artemia* de una dieta seca formulada para salmónidos mejora en gran medida la supervivencia y el crecimiento. Posteriormente, González R. et al. (2009) y González Á. et al. (2011b) han puesto de manifiesto que la suplementación con nauplios vivos puede ser sustituida por quistes decapsulados de *Artemia* en la misma cantidad, reduciéndose los costes y mejorando el crecimiento.

A continuación, se expone un breve resumen de los niveles actuales de conocimiento en los diferentes aspectos estudiados.

3.4.2.1. Temperatura

Al igual que en condiciones naturales, el margen adecuado de temperatura se encuentra entre 15 °C y 25 °C. La mayoría de las pruebas realizadas con juveniles a partir del estado 2 han sido llevadas a cabo a temperaturas entre 20 °C y 24 °C.

3.4.2.2. Abastecimiento de agua

Como una de las medidas para uniformar la investigación en crustáceos a nivel mundial, D'Abramo y Castell (1997) recomiendan utilizar

agua de óptima calidad y composición constante en circuito abierto con suficiente flujo. En las pruebas de Sáez-Royuela et al. (1995), el circuito abierto permitió mayor supervivencia y crecimiento que el parcialmente recirculado, a la vez que se demostró la conveniencia de mantener flujos moderados.

3.4.2.3. Densidad de juveniles

Se trata de un factor decisivo en los procesos de intensificación de la cría de juveniles de astácidos. Para el mantenimiento en grupos bajo condiciones controladas, se ha recomendado una densidad inicial de juveniles estado 2 de 50/m² (Ackefors et al. 1989), que ha sido la utilizada por Celada et al. (1989, 1993) y por Sáez-Royuela et al. (1995, 1996, 2001). De acuerdo con D'Abramo et al. (1985), dicha densidad podría ser hasta 150 juveniles/m² durante los primeros 30 días, mientras que si la cría bajo condiciones controladas se quiere prolongar hasta los seis meses la máxima concentración inicial sería 100/m², disponiendo de suficientes refugios (Gydemo y Westin 1989). En este sentido, Nyström (1994) indica que la densidad inicial no ha de ser superior a 100 juveniles/m² durante los primeros tres meses de cría intensiva. González R. et al. (2010), aplicando recientes avances en alimentación, evaluaron cuatro densidades (100, 300, 600 y 1000 juveniles/m²) y concluyeron que las mayores tasas de supervivencia y crecimiento se alcanzaron con 100 juveniles/m², mientras que con densidades mayores los valores finales, salvo la biomasa (debido al mayor número de juveniles por unidad de superficie), fueron menores. Posteriormente, González Á. et al. (2011b) comprobaron que es posible doblar dicha densidad (de 100 a 200 juveniles/m²) sin afectar negativamente a la supervivencia ni al crecimiento.

3.4.2.4. Alimentación

En hábitats naturales, estos animales consumen una amplia gama de alimentos, que incluye vegetales y animales vivos, microorganismos y detritus (D'Abramo y Robinson 1989), en cantidades que oscilan entre el 2% y el 16% del peso vivo por día y preferentemente en horas nocturnas. Mason (1975) estudió el contenido del tracto digestivo de cangrejos del género *Pacifastacus* y estimó una ración diaria equivalente al 2,8% del peso vivo en juveniles.

En condiciones controladas, la mayoría de los estudios se han hecho aportando alimento una vez al día. Algunos investigadores han realizado esta práctica dos veces al día (D'Abramo et al. 1985, Henttonen et al. 1993, Sáez-Royuela et al. 2001) mientras que otros lo han hecho cada dos días (Nyström 1994, Blake et al. 1994) o tres veces por semana (Taugbøl y Skurdal 1992).

Se han utilizado alimentos de muy diversa naturaleza, sólo o combinados. En unos casos, se han administrado en fresco tanto pescado como vegetales (D'Abramo et al. 1985, Ackefors et al. 1989, Gydemo y Westin 1989, Celada et al. 1989, 1993, Taugbøl y Skurdal 1992, Henttonen et al. 1993, Sáez-Royuela et al. 1995). En otras ocasiones, la materia fresca ha sido *Daphnia*, larvas de quironómidos, el crustáceo *Mysis sp*, lombrices de tierra, el alga *Chara fragilis* (Gydemo y Westin 1989, Celada et al. 1993, Nyström 1994, Blake et al. 1994, Sáez-Royuela et al. 1996, 2001) o productos como huevo líquido, guisantes verdes, copos de avena, hojas secas o suspensiones del alga *Chlorella* (Henttonen et al. 1993, Blake et al. 1994, Nyström 1994, Sáez-Royuela et al. 1995). Otras veces se ha recurrido a alimentos congelados (sólos o combinados con dietas secas) como larvas de insectos, pescado, el crustáceo

Neomysis integer ó el alga *Chara fragilis* (Henttonen et al. 1993, Blake et al. 1994, Ackefors et al. 1995, Savolainen et al. 2003, 2004). También se han utilizado piensos compuestos secos fabricados para otras especies de crustáceos y de peces (Ackefors et al. 1989, Taugbøl y Skurdal 1992, Celada et al. 1993, Henttonen et al. 1993, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001) y, a pesar de la escasez de conocimientos sobre las necesidades nutritivas de estos animales, se han formulado dietas constituidas por ingredientes normalmente usados en la fabricación de piensos compuestos (D'Abramo et al. 1985, Celada et al. 1989), e incluso una dieta purificada (Celada et al. 1989). Además, se ha ensayado una dieta de referencia probada anteriormente en otras especies de crustáceos (Celada et al. 1989, Ackefors et al. 1992). Considerando en conjunto todos estos estudios, transcurrido el período crítico de los 2-3 primeros meses de cría, los resultados no han sido satisfactorios.

Recientemente, se ha evidenciado que la suplementación con alimento vivo de una dieta seca para salmónidos mejora en gran medida la supervivencia y el crecimiento de los juveniles durante los tres primeros meses de cría (Sáez-Royuela et al. 2007). Las cantidades óptimas de suplementación con nauplios vivos de *Artemia* han sido cuantificadas (González Á. et al. 2008, 2012a, 2012b, González R. et al. 2010). También se ha evidenciado que la suplementación con nauplios vivos puede ser sustituida por quistes decapsulados de *Artemia* en la misma cantidad, obteniéndose mayores valores de crecimiento, y resultando además una alternativa menos costosa y laboriosa (González R. et al. 2009, 2011a, 2011b, González Á. et al. 2011b).

Partiendo de estos avances, se ha llegado a la formulación y elaboración de una dieta práctica específica para

juveniles de astácidos (Carral et al. 2011), que ha permitido resultados aceptables y puede servir de base para estudios posteriores. En este sentido, todas las dietas empleadas en la experimentación de esta Tesis toman como base dicha dieta práctica.

3.4.2.5. Perspectivas de futuro

Hoy sabemos que los pobres resultados obtenidos a lo largo de varias décadas de investigación para la intensificación de la cría de juveniles de astácidos, así como las dificultades para su interpretación, se han debido principalmente a la interferencia de factores relacionados con deficiencias nutricionales, capaces de enmascarar los tratamientos experimentales. Hasta el presente, no se dispone de información acerca de niveles adecuados de macronutrientes en la dieta de estos animales, especialmente en la etapa más crítica de la cría: los primeros meses de alimentación externa.

La disponibilidad de una dieta base específicamente formulada para juveniles de astácidos marca un antes y un después en un proceso de 30 años de investigación, ya que sirve como base para abordar el estudio de los requerimientos nutritivos de estos animales. Así, la presente Tesis Doctoral aborda el estudio del contenido proteico de la dieta y la evaluación de diferentes fuentes alternativas de proteína.

The background of the slide features a close-up photograph of several crayfish. One crayfish is prominently shown in the center, facing right, with its large pincers and antennae clearly visible. Other crayfish are partially visible in the foreground and background, creating a sense of a group. The lighting is warm, highlighting the texture of the crayfish shells.

4. OBJETIVOS



La finalidad de esta Tesis Doctoral es el estudio del contenido proteico de la dieta y la evaluación de posibilidades de sustitución de la harina de pescado por fuentes alternativas de proteína durante los primeros 3 meses de alimentación externa. Los objetivos concretos son:

- Determinar niveles óptimos de proteína de harina de pescado en la dieta (publicación I).
- Evaluar posibilidades de sustitución de la proteína de pescado por proteína de soja (publicación I).
- Estudiar posibles sustituciones de la proteína de pescado por proteína de concentrado proteico de guisante (publicación II).
- Evaluar posibilidades de sustitución de la proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo (publicación III).
- Valorar posibilidades de sustitución de la proteína de pescado por proteína de pluma (publicación IV).

Estos objetivos se encuentran en la línea del proyecto del Plan Nacional de I+D+i ref. AGL2005-01127/ACU (Técnicas de cría de juveniles de astácidos) y constituyen una continuación del mismo. También, dichos objetivos se encuentran perfectamente adecuados a las prioridades del VI Plan Nacional de I+D+i, Área de Ciencias y Tecnologías Agroalimentarias y Medioambientales. Para la consecución de los mismos, el Ministerio de Ciencia e Innovación concedió una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (referencia AP2008-01009).

The background of the slide features a close-up photograph of several crayfish. One crayfish is prominently shown in the center, facing right, with its large pincers and antennae clearly visible. Other crayfish are partially visible in the foreground and background, creating a sense of a group. The lighting is warm, highlighting the texture of the crayfish shells.

5. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES



5.1. CANGREJOS, INSTALACIONES Y PROCEDIMIENTO BÁSICO DE EXPERIMENTACIÓN

Los estudios que componen esta Tesis se llevaron a cabo en las instalaciones y laboratorios de acuicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León, ubicado en la Facultad de Veterinaria. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de León.

La especie de astácido utilizada fue *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). La obtención de juveniles estado 2 se realizó a partir de hembras portadoras de huevos procedentes de una astacifactoría. A finales del mes de noviembre o inicios de diciembre de cada año (aproximadamente 30 días después de la ovoposición), las hembras ovígeras eran trasladadas al laboratorio, donde el desarrollo embrionario hasta la obtención de juveniles estado 2 tenía lugar en los pleópodos maternos (incubación maternal).



Foto 12. Juvenil estado 2 recién independizado de la madre.

Los ensayos se realizaron durante 4 años consecutivos. En total, se llevaron a cabo 5 experimentos: 3 de 100 días y 2 de 80 días, iniciados con juveniles estado 2, desde el comienzo de la alimentación externa. En todos los casos, los animales procedían de al

menos ocho hembras y fueron distribuidos al azar entre los diferentes tratamientos. Al comienzo de las pruebas, se tomaban muestras de los juveniles estado 2, que eran medidos y pesados con calibre y balanza de precisión, respectivamente.

Un pozo artesiano proporcionaba toda el agua utilizada en los estudios. Sus parámetros de calidad fueron analizados periódicamente en el laboratorio de la Oficina Municipal del Consumidor del Ayuntamiento de León, y dichos análisis eran complementados con mediciones efectuadas en nuestro laboratorio. Los valores medios de las características físico-químicas más relevantes del agua a la entrada de las instalaciones de experimentación fueron:

- pH = 8,1
- Dureza total = 5,3°dH (calcio 32,6 mg/l)
- Sólidos totales en suspensión = 36,7 mg/l
- Sólidos disueltos totales = 111,8 mg/l

Cada dos días, se efectuaban mediciones de oxígeno disuelto, de amonio y de nitritos del agua donde se encontraban los animales. Las medidas de oxígeno en los tanques se realizaron con un oxímetro HACH HQ30d, (valores en torno a 7 mg/l, mínimo 6 mg/l, máximo 8,5 mg/l). El amonio y los nitritos fueron medidos con un espectrofotómetro HACH DR 2800 a partir de muestras de agua tomadas del interior de los tanques (los valores siempre fueron: amonio < 0,02 mg/l y nitritos < 0,05 mg/l).

Las instalaciones de experimentación se encuentran localizadas en tres recintos de la Facultad de Veterinaria. La recepción y tratamiento del agua se realizaba en depósitos de fibrocemento. Para el mantenimiento de los

animales, se utilizaron tanques de fibra de vidrio aglomerada con resina poliéster de diferentes dimensiones: 28 tanques de 100 x 100 x 30 cm para animales agrupados y, 60 tanques de 35 x 35 x 30 cm para animales aislados individualmente. Cada tanque estaba provisto de un filtro de malla plancónica de 250 μm para impedir la salida de animales y de alimento, así como refugios de forma que los juveniles dispusieran de los mismos siempre en exceso. Como refugios se usaron placas onduladas de fibrocemento minionda de 54 x 20,5 cm y secciones unidas de tubería de PVC de 4 cm de longitud y 2 cm de diámetro. En los tanques con animales agrupados la densidad inicial fue 100 juveniles/ m^2 y se colocaron 3 placas onduladas de fibrocemento minionda y 4 conjuntos de cuatro secciones de tubo de PVC. En el caso de los animales individualmente aislados, en cada tanque se colocó un conjunto de cuatro secciones de tubo de PVC.

La limpieza del fondo de los tanques (mediante sifonado), y la de

los filtros de salida (con agua a presión) se realizaba cada segundo día. Tras la finalización de cada prueba, los tanques se limpiaban y se dejaban en seco. Previamente a la entrada de un nuevo grupo de juveniles, los depósitos se desinfectaban con lejía.

El régimen de circulación del agua en todos los casos fue en sistema abierto y cada tanque recibía un aporte independiente. La temperatura se mantuvo en el rango de 21-23°C a lo largo de todos los estudios utilizando resistencias blindadas de 3200 W (conectadas a sus correspondientes termostatos) en los tanques de abastecimiento de agua. Dicha temperatura fue registrada diariamente con termómetros de máxima-mínima en los tanques que contenían los animales. Además, en todos los casos, el fotoperíodo fue natural (aproximadamente 12 h luz: 12 h oscuridad).



Foto 13. Tanques con animales agrupados.



Foto 14. Tanque con animales individualmente aislados.

5.2. DIETAS Y ALIMENTACIÓN

Todas las dietas prácticas secas empleadas en los diferentes estudios fueron formuladas tomando como referencia la composición propuesta por Carral et al. (2011) para juveniles de astácidos, modificando su contenido en vitamina C de acuerdo con los resultados de Celada et al. (2013). Las dietas eran isoproteicas e isoenergéticas en cada uno de los ensayos.



Foto 15. Dietas prácticas.

Para la elaboración de las dietas, se utilizó un molino rotatorio BRABENDER para la molienda y una mezcladora STEPHAN UMC5 para mezclar los ingredientes. La mezcla resultante, con aproximadamente un 15-20% de humedad, era sometida a un proceso de extrusión en una extrusora BRABENDER KE19/25D. Los pellets obtenidos, con un diámetro de 2 mm, eran secados en una campana durante 24 h a una temperatura aproximada de 30 °C y después recubiertos con aceite de hígado de bacalao. Una vez finalizado el proceso, las dietas eran almacenadas a 3-4 °C hasta su aporte a los animales.

El alimento era aportado manualmente una vez al día, en cantidad suficiente para que resultara ligeramente en exceso (3% del peso vivo, valor ajustado durante las pruebas tomando como base los datos de biomasa registrados cada 20 días).



Foto 16. Molino BRABENDER

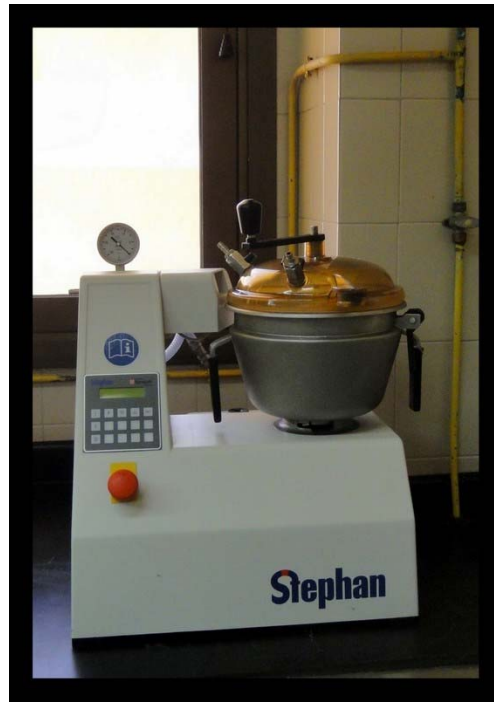


Foto 17. Mezcladora STEPHAN UMC5.



Foto 18. Extrusora BRABENDER KE19/25D.

5.2.1. ANÁLISIS QUÍMICO DE DIETAS Y ANIMALES

Una vez fabricado cada pienso, se tomaba una muestra para analizar su composición. Al final del estudio III, todos los juveniles que habían recibido el mismo tratamiento fueron agrupados para ser posteriormente analizados. Las muestras eran almacenadas a -30°C hasta que tenía lugar el análisis. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

El contenido de macronutrientes de dietas y animales fue analizado según las normas de la Organización Internacional de Normalización:

- Humedad: ISO R-1442 (ISSO 1979).
- Proteína: ISO R-937 (ISO 1978).
- Lípidos: ISO R-1443 (ISO 1973).
- Cenizas: ISO R-936 (ISO 1998a).
- Energía: ISO 9831 (ISO 1998b).
- El contenido de hidratos de carbono se obtuvo por diferencia, restando el contenido de humedad, proteínas, lípidos y cenizas del peso total.

Los crustáceos, al igual que los peces, requieren diez aminoácidos esenciales (Takeuchi y Murakami 2007). Para analizar los aminoácidos esenciales y los aminoácidos no esenciales, se realizó una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) usando el método de AccQTag de Waters. Los aminoácidos fueron derivatizados con el reactivo 6-aminoquinolil-N-hydrosysuccinimidyl carbamato (AQC) por el método de Cohen y Michaud (1993) y Cohen y De Antonis (1994), y fueron detectados por el detector de absorbancia Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector a

254 nm. La cuantificación se llevó a cabo con el software Empower Pro 2.0.

5.3. RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada 20 días, se realizaban muestreos intermedios que incluían:

- Recuento de supervivientes.
- Recuento del número de animales con una pinza o sin pinzas.
- Registro del peso vivo del conjunto de cangrejos de cada réplica (biomasa)
- En animales agrupados, toma de una muestra representativa de animales de cada réplica (15 juveniles/réplica, 45/tratamiento) para registrar longitud de cefalotórax (LC) y peso de cada individuo. En animales individualmente aislados, medición de la longitud de cefalotórax (LC) y peso de todos los individuos.

Al final de cada experimento, se cuantificaron los resultados mediante el registro de los siguientes parámetros:

- Número de supervivientes.
- Número de animales con una pinza o sin pinzas.
- Longitud de cefalotórax y peso de todos los individuos supervivientes.

Con los datos obtenidos se calcularon los índices siguientes:

- Porcentaje de supervivencia.
- Porcentaje de supervivientes con una sola pinza y sin pinzas.
- Tasa de crecimiento específico (TCE): expresa el incremento de peso diario en forma de porcentaje según la fórmula: $(\ln \text{Peso final en g} - \ln \text{Peso inicial en g}) / 100 / \text{días}$.

- Índice de conversión del alimento (IC) = Alimento suministrado en g/ (Peso final en g - Peso inicial en g).
- Índice de eficiencia proteica (IEP) = (Peso final en g - Peso inicial en g)/ Cantidad total de proteína suministrada en g.

La longitud de cefalotórax de cada individuo se midió con un calibre digital Sylvac ($\pm 0,01$ mm) y el registro del peso se realizó con una balanza de precisión COBOS M-150-SX ($\pm 0,001$ g), previa eliminación del agua retenida con papel secante.

Diariamente, se inspeccionaban cuidadosamente los tanques para verificar el correcto mantenimiento de las condiciones de experimentación, así como para retirar y anotar los animales muertos.

Todas las dietas fueron probadas en juveniles agrupados (tres tanques

para cada tratamiento con 100 cangrejos por tanque, $n = 300$) y aislados individualmente (10 tanques para cada tratamiento con 1 cangrejo por tanque, $n = 10$), a excepción de las dietas con soja del estudio I, que sólo se probaron en animales agrupados. Para la realización de los estudios estadísticos, se utilizó el programa SPSS (SPSS Inc. Chicago, Ill., USA). Las comparaciones entre los tratamientos de los diferentes experimentos fueron realizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de los datos. En su caso, la comparación de medias se llevó a cabo por el método Duncan o por el método Newman-Keuls, y el nivel de significación establecido fue siempre $P < 0,05$. Los porcentajes fueron transformados al arcoseno previamente a los análisis estadísticos. El valor de las medias en cada tratamiento se acompaña de \pm E.E.M. (error estándar de la media).



Foto 19. Medición de longitud de cefalotórax y registro del peso.

A close-up photograph of several crayfish on a dark, reflective surface. The crayfish are light brown and orange in color. One crayfish is in the foreground, facing right, with its large claws and antennae clearly visible. Another crayfish is partially visible behind it, and a third is in the background, slightly out of focus. The lighting is warm, highlighting the texture of the crayfish's shells.

**6. SECUENCIA DE
EXPERIMENTACIÓN**



6.1. ESTUDIO I: EFECTOS DE DIFERENTES CONTENIDOS PROTEICOS Y DISTINTOS NIVELES DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR HARINA DE SOJA

Effects of dietary protein and different levels of replacement of fish meal by soybean meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding

Fuertes JB, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González-Rodríguez Á 2012

Aquaculture 364-365, 338-344

6.1.1. Planteamiento experimental

El coste de una dieta seca generalmente aumenta a medida que lo hace su contenido proteico. Los requisitos de proteína de estadios juveniles de varias especies de crustáceos cultivados tales como *Metapenaeus macleayi* (Maguire y Hume 1982), *Marsupenaeus japonicus* (Teshima y Kanazawa 1984), *Macrobrachium rosenbergii* (Ashmore et al. 1985), *Penaeus monodon* (Shiau y Chou 1991), *Penaeus vannamei* (Pedrazzoli et al. 1998) o *Cherax quadricarinatus* (Keefe y Rouse 1999) han sido estudiados, y los contenidos de proteína bruta (PB) descritos como óptimos varían entre 23% y 57%. Existe una marcada variabilidad interespecifica que sugiere que las necesidades de proteína deben ser estudiadas para cada especie (Takeuchi y Murakami 2007).

La acuicultura es altamente dependiente de las capturas para suministrar harina de pescado (FM), el ingrediente proteico más importante utilizado en alimentos para animales acuáticos (Tacon y Metian 2008). Este hecho ha dado lugar a una doble problemática. Por un lado, es insostenible la presión de la pesca sobre las poblaciones salvajes para cubrir la creciente demanda de harina de pescado (Hanneson 2003, Naylor et al. 2009). Por otro lado, los elevados precios de la harina de pescado deriva-

dos de su creciente demanda (Tacon y Metian 2008, FAO 2009). Como consecuencia de ello, se plantea la necesidad de buscar fuentes alternativas de proteína (Naylor et al. 2009, Hardy 2010). En los últimos años, se ha extendido el uso de proteínas de origen vegetal para reemplazar a la proteína de la harina de pescado. Entre las fuentes proteicas de origen vegetal, destaca la soja (Brown et al. 2008), debido principalmente a su alto contenido de proteína, su disponibilidad a nivel global y su precio relativamente bajo en comparación con el harina de pescado.

Experimento I.1. El objetivo fue la cría intensiva de juveniles de cangrejo de río durante los primeros 100 días de alimentación externa, evaluando los efectos de cuatro dietas prácticas con diferente contenido proteico (35%, 40%, 45% y 50%). Los distintos niveles de proteína se obtuvieron mediante aumento de la cantidad de harina de pescado y reducción de la cantidad de harina de maíz. La formulación y la composición de macronutrientes de las dietas se muestran en la tabla 1 y el perfil de aminoácidos en la tabla 2.

Se utilizaron 1240 juveniles estado 2 ($5,54 \pm 0,04$ mm LC y $30,1 \pm 0,3$ mg). De ellos, 1200 fueron distribuidos en 12 tanques de 1 m² de superficie y 200 l de agua, y 40 fueron alojados en 40 tanques de 0,15 m² de superficie y 20 l de agua, a razón de 1 cangrejo/tanque.

El flujo de agua fue 1,5 l/min en tanques con animales agrupados y 0,25 l/min en los que alojaban solo un animal. Cada dieta fue probada en tres tanques con animales agrupados y diez tanques con animales individualmente aislados. Para los controles periódicos, se tomaban 15 juveniles por tanque (45 por tratamiento) de los animales agru-

pados para medirlos y pesarlos individualmente. En el caso de los cangrejos individualizados, todos eran pesados y medidos. Al final del experimento (100 días), se midieron y pesaron todos los cangrejos supervivientes.

Tabla 1. (Experimento I.1) Formulación y composición de macronutrientes de las dietas prácticas con diferente contenido proteico.

	Contenido proteico (%)			
	35	40	45	50
Ingredientes (g kg⁻¹)				
Harina de pescado ¹	390	465	540	614,8
Harina de maíz ²	355	280	205	130,2
Aceite de hígado de bacalao ³	30	30	30	30
Lecitina de soja ⁴	1	1	1	1
Colesterol ⁵	5	5	5	5
Monofosfato ascórbico ⁶	0,2	0,2	0,2	0,2
Cloruro de colina ⁷	5	5	5	5
Fosfato dicálcico ⁷	10	10	10	10
Quistes de <i>Artemia</i> decapsulados y desecados ⁸	150	150	150	150
Carboximetilcelulosa ⁹	30	30	30	30
Astaxantina ¹	1	1	1	1
Mezcla minerales ¹⁰	20	20	20	20
Mezcla vitaminas ¹¹	2,8	2,8	2,8	2,8
Composición (g kg⁻¹)				
Humedad	91,0	90,0	88,0	87,0
Proteína bruta	350,9	400,3	451,1	502,2
Lípidos	110,1	113,1	115,4	119,2
Hidratos de carbono	341,0	287,0	229,2	170,8
Cenizas	107,0	109,6	116,3	120,8
Energía bruta (MJ kg ⁻¹)	19,01	19,13	19,31	19,58

¹Biomar Iberia / Proaqua Nutrición, Dueñas (Palencia), España.

²ADPAN, Siero-Asturias, España.

³ACOFARMA, Terrassa (Barcelona), España.

⁴Biover NV/SA Brujas, Bélgica.

⁵Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim, Alemania.

⁶Orffa Ingredients B.V., Burgstraat 12, 4283 GG Giessen, Holanda.

⁷Nutral S.A, Madrid, España.

⁸Quistes de *Artemia*: Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Bélgica.

⁹Helm Iberica SA., Madrid, España.

¹⁰(g kg⁻¹ mezcla): CoCl₂, 0,04; CuSO₄·5H₂O, 2,50; FeSO₄, 40; MgSO₄·7H₂O, 283,98; MnSO₄·H₂O, 6,50; KI, 0,67; Na₂SeO₃, 0,10; ZnSO₄·7H₂O, 131,93.

¹¹(g kg⁻¹ mezcla): Tiamina, 21,43; riboflavina, 18,93; niacina, 71,43; piridoxina, 17,86; ácido pantoténico, 37,86; biotina, 0,36; ácido fólico, 5,71; cianocobalamina, 0,07; mioinositol, 142,86; retinol, 0,54; α-tocoferol, 23,82; colecalciferol, 3,93; naftoquinonas, 3,12; etoiquina, 35,71

Tabla 2. (Experimento I.1) Perfil de aminoácidos de las dietas prácticas con diferente contenido proteico.

g AA kg ⁻¹ dieta	Contenido proteico (%)			
	50	45	40	35
Esenciales				
Arg	58,4 ^a	50,1 ^b	41,5 ^c	33,1 ^d
Hist	9,1 ^a	7,6 ^a	5,9 ^b	4,5 ^b
Ile	24,1 ^a	21,9 ^b	20,0 ^c	18,0 ^d
Leu	38,3 ^a	35,1 ^b	31,2 ^c	28,0 ^d
Lys	33,4 ^a	30,2 ^b	26,3 ^c	22,8 ^d
Met	11,8 ^a	10,6 ^a	8,7 ^b	7,6 ^b
Phe	19,1 ^a	17,7 ^a	16,0 ^b	14,5 ^b
Thr	24,1 ^a	21,6 ^b	18,9 ^c	16,1 ^d
Val	23,6 ^a	21,7 ^b	19,6 ^c	17,0 ^d
Trp	4,7	4,4	3,9	3,5
No esenciales				
Ala	30,2 ^a	24,6 ^b	22,4 ^c	21,3 ^d
Asp	41,8 ^a	36,9 ^b	34,1 ^c	30,3 ^d
Glu	84,3 ^a	75,9 ^b	72,6 ^c	66,7 ^d
Gly	17,8 ^a	15,1 ^b	13,1 ^c	11,0 ^d
Pro	19,6 ^a	17,8 ^a	15,7 ^b	14,2 ^b
Ser	29,5 ^a	24,8 ^b	22,7 ^c	21,3 ^d
Tyr	14,0 ^a	12,0 ^b	11,9 ^b	10,4 ^b
Cys	1,8	1,7	1,6	1,5

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

Experimento I.2. Cuatro dietas prácticas fueron formuladas y fabricadas para probar diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de soja: 0% (control), 25%, 35% y 45% de sustitución, correspondientes a 0%, 22,7%, 31,8% y 40,7% de harina de soja en dieta, respectivamente. La formulación y la composición de macronutrientes de las dietas se muestran en la tabla 3 y su perfil de aminoácidos en la tabla 4.

Se utilizaron 1200 juveniles estado 2 ($5,54 \pm 0,04$ mm LC y $30,1 \pm 0,3$ mg), que fueron distribuidos en 12 tanques de 1 m² de superficie y 200 l de agua, con un flujo de 1,5 l/min. Cada dieta fue probada en 3 tanques con animales agrupados (3 réplicas).

En los controles periódicos, se tomaban 15 cangrejos por réplica (45 por tratamiento) para pesarlos y medirlos individualmente. Al final del experimento (100 días), todos los cangrejos supervivientes fueron medidos y pesados individualmente.

Tabla 3. (Experimento I.2) Formulación y composición de macronutrientes de las dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de soja.

	Nivel de sustitución (%)			
	0	25	35	45
Ingredientes (g kg⁻¹)				
Harina de pescado ¹	614,8	461,1	399,7	338,4
Harina de maíz ²	130,2	56,7	26,9	0
Harina de soja ¹	0	227,2	318	406,6
Aceite de hígado de bacalao ³	30	30	30	30
Lecitina de soja ⁴	1	1	1	1
Colesterol ⁵	5	5	5	5
Monofosfato ascórbico ⁶	0,2	0,2	0,2	0,2
Cloruro de colina ⁷	5	5	5	5
Fosfato dicálcico ⁷	10	10	10	10
Quistes de <i>Artemia</i> decapsulados ⁸	150	150	150	150
Carboximetilcelulosa ⁹	30	30	30	30
Astaxantina ¹	1	1	1	1
Mezcla minerales ¹⁰	20	20	20	20
Mezcla vitaminas ¹¹	2,8	2,8	2,8	2,8
Composición (g kg⁻¹)				
Humedad	87,0	89,5	91,0	91,5
Proteína bruta	502,2	501,7	501,1	499,8
Lípidos	119,2	110,8	107,8	105,6
Hidratos de carbono	170,8	188,4	195,3	202,6
Cenizas	120,8	109,6	104,8	100,5
Energía bruta (MJ kg ⁻¹)	19,58	19,46	19,38	19,27

^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11} Como se indica en la tabla 1.

Tabla 4. (Experimento I.2) Perfil de aminoácidos de las dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de soja.

g AA kg ⁻¹ dieta	Nivel de sustitución (%)			
	0	25	35	45
Esenciales				
Arg	58,4 ^a	54,1 ^b	50,2 ^c	47,3 ^d
Hist	9,1	8,5	8,2	7,7
Ile	24,1	23,5	23,2	23,1
Leu	38,3	37,7	37,5	37,1
Lys	33,4 ^a	30,5 ^b	25,3 ^c	23,0 ^d
Met	11,8 ^a	9,6 ^b	6,8 ^c	4,6 ^d
Phe	19,1	19,2	19,3	19,5
Thr	24,1 ^a	22,7 ^a	20,5 ^b	18,1 ^c
Val	23,6	24,0	24,1	24,3
Trp	4,7	4,5	4,1	3,8
No esenciales				
Ala	30,2 ^a	27,9 ^b	27,3 ^b	26,8 ^b
Asp	41,8 ^a	50,5 ^b	53,6 ^c	57,6 ^d
Glu	84,3 ^a	95,6 ^b	99,1 ^c	103,3 ^d
Gly	17,8 ^a	13,2 ^b	12,2 ^b	11,8 ^b
Pro	19,6	20,1	20,5	20,7
Ser	29,5	29,1	29,7	29,7
Tyr	14,0	13,9	13,1	12,8
Cys	1,8	2,0	2,0	2,1

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

6.1.2. Resultados

Experimento I.1. Los valores de supervivencia, crecimiento y conversión del alimento tras los 100 días de prueba se recogen en la tabla 5. En los animales mantenidos en grupos, las tasas finales de supervivencia se encontraron entre 72% y 78%, sin diferencias significativas. En los animales aislados individualmente, la supervivencia se redujo significativamente desde el 100% con los niveles de 45% y 50% de proteína hasta el 70% con el nivel de 35% de proteína. Dentro de un mismo tratamiento, la

supervivencia de los cangrejos aislados individualmente fue significativamente superior a la de los animales agrupados, con la excepción del nivel más bajo de proteína (35%).

En cuanto al crecimiento, no hubo diferencias significativas entre los cangrejos alimentados con 45% y 50% de proteína (14,59 mm LC, 693 mg P y 2503,4% PG). Con niveles de proteína inferiores (35% y 40%), todos los valores de crecimiento se redujeron significativamente. El gráfico 1 muestra los cambios en el peso (juveniles agrupados y aislados) a lo largo de los 100 días. Los juveniles alimentados

con las dietas con 45% y 50% de proteína crecieron más rápido que el resto. La dieta con 35% de proteína dio lugar a los valores más bajos de peso a lo largo del ensayo. Estas diferencias fueron significativas a partir del día 40. Independientemente del nivel de proteína de la dieta, los valores de crecimiento de los animales aislados individualmente (media: 16,27 mm LC y 1198,05 mg P) fueron significativamente más altos que los registrados en los animales mantenidos en grupos (media: 13,74 mm LC y 551,50 mg P). El gráfico 2 muestra los cambios en el peso de los juveniles mantenidos en grupos o aislados individualmente a lo largo de los 100 días. Los cangrejos

aislados crecieron más rápido que los cangrejos agrupados, siendo las diferencias significativas a partir del día 40.

El índice de conversión (promedio de cangrejos agrupados y aislados) varió desde 1,01 hasta 1,34. El valor más bajo se obtuvo con el 50% de proteína, sin diferencias significativas con el 45%. El índice de conversión aumentó progresivamente a medida que se redujo el contenido proteico (40% y 35%). Con todas las dietas, el índice de conversión de los cangrejos aislados (media: 0,94) fue significativamente más bajo que el de los cangrejos agrupados (media: 1,33).

Tabla 5. (Experimento I.1) Valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento de juveniles alimentados con dietas prácticas con diferentes contenidos proteicos durante los primeros 100 días de cría.

		Contenido proteico (%)			
		35	40	45	50
Supervivencia (%)	Grupos	72,0 ± 3,6	73,7 ± 3,2	76,7 ± 0,9	78,0 ± 1,6
	Aislados	70 ^a	90 ^b	100 ^c	100 ^c
LC (mm)	Grupos	12,53 ± 0,25 ^a	13,45 ± 0,23 ^b	14,46 ± 0,23 ^c	14,52 ± 0,27 ^c
	Aislados	14,61 ± 0,07 ^a	15,58 ± 0,46 ^b	17,43 ± 0,30 ^c	17,58 ± 0,62 ^c
Peso (mg)	Grupos	373 ± 35,4 ^a	497 ± 46,7 ^b	666 ± 31,9 ^c	671 ± 43,9 ^c
	Aislados	687 ± 11,4 ^a	966 ± 76,3 ^b	1541 ± 113,8 ^c	1598 ± 189,5 ^c
PG (%)	Grupos	1317,4 ± 133,0 ^a	1767,9 ± 175,4 ^b	2402,8 ± 119,9 ^c	2431,6 ± 165,2 ^c
	Aislados	2481,4 ± 42,8 ^a	3532,5 ± 286,9 ^b	5793,0 ± 427,7 ^c	5908,9 ± 412,3 ^c
IC	Grupos	1,56 ± 0,17 ^a	1,34 ± 0,12 ^b	1,21 ± 0,14 ^c	1,19 ± 0,09 ^c
	Aislados	1,12 ± 0,10 ^a	0,96 ± 0,07 ^b	0,86 ± 0,08 ^c	0,82 ± 0,06 ^c

Los valores son media ± error estándar.

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

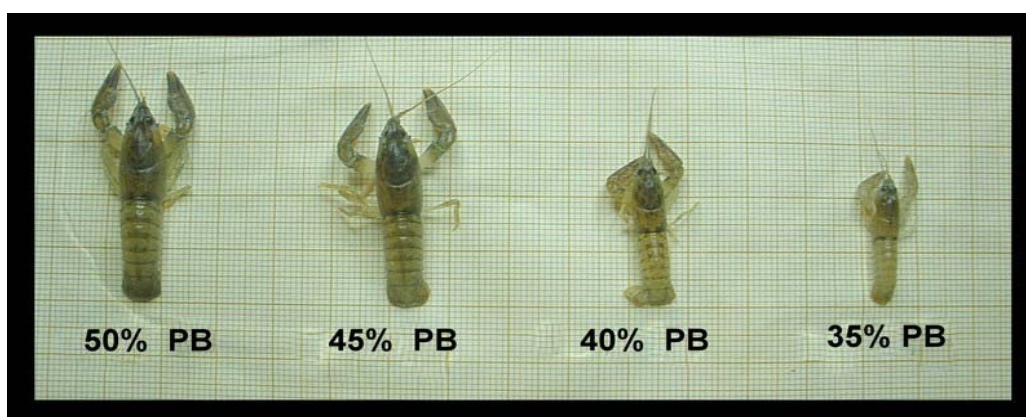


Foto 20. Juveniles agrupados alimentados con dietas con diferente contenido proteico al final del experimento I.1.

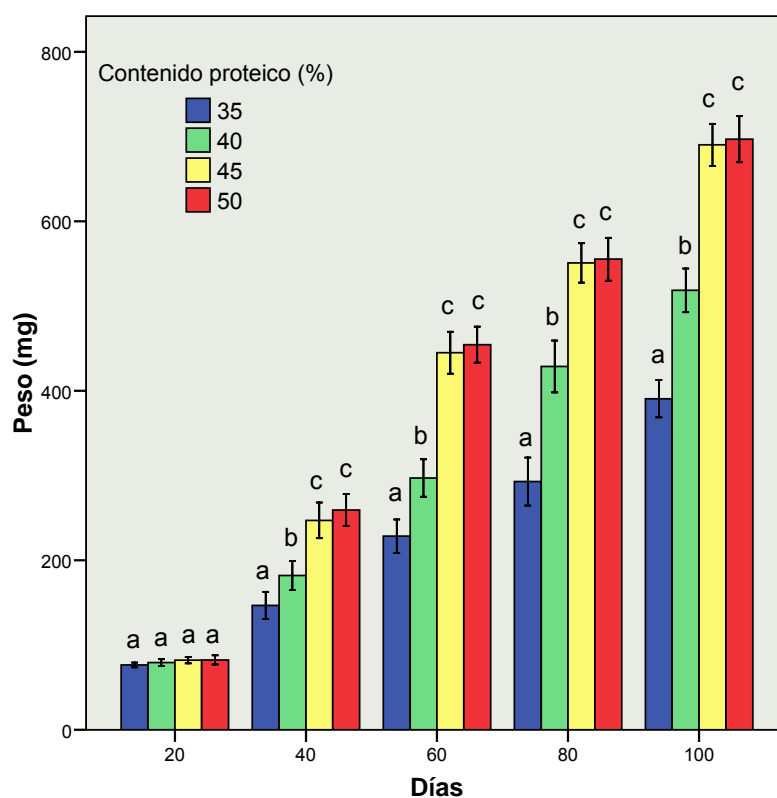


Gráfico 1. (Experimento I.1) Peso de juveniles (animales agrupados e individualmente aislados) alimentados con dietas prácticas con diferente contenido proteico durante los primeros 100 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

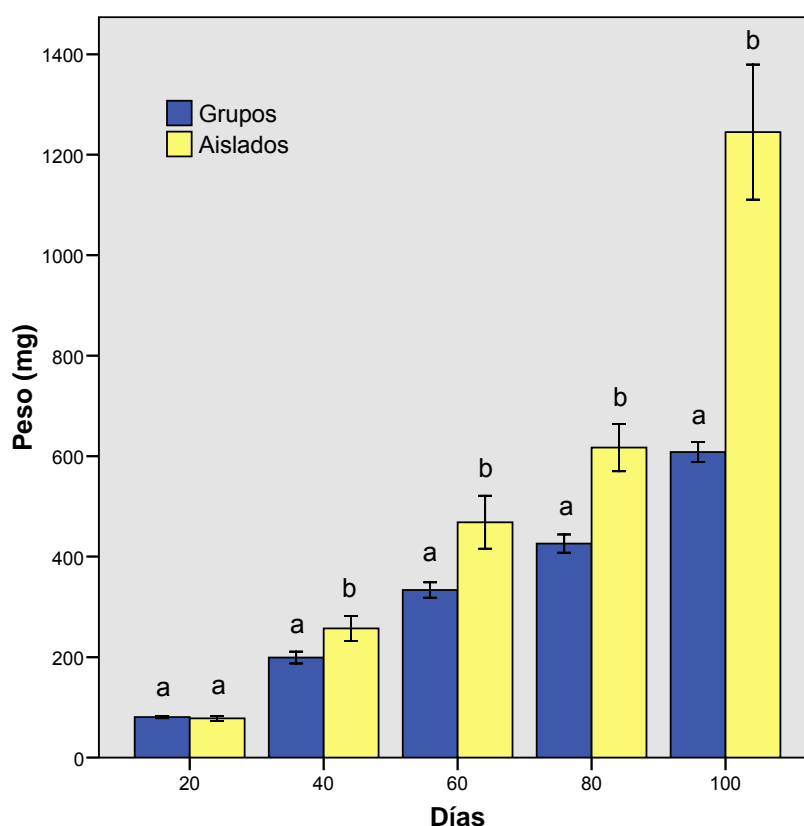


Gráfico 2. (Experimento I.1) Peso de juveniles mantenidos en grupos o individualmente aislados alimentados con dietas prácticas con diferente contenido proteico durante los primeros 100 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

La pérdida de pinzas se registró sólo en los cangrejos agrupados. El porcentaje final de juveniles con pérdida de quelípedos aumentó con la disminución del contenido de proteína, de modo que las dietas con 45% o 50% dieron lugar a valores significativamente más bajos (media: 5,4%) que las dietas con 35% y 40% de proteína (media: 9,9%).

El perfil de aminoácidos de las dietas prácticas se presenta en la tabla 2. A medida que la proteína de la dieta se redujo, el contenido de todos los aminoácidos disminuyó significativamente (excepto los de triptófano y cisteína); sin embargo, el crecimiento no se redujo hasta el 40% de proteína. Comparando este nivel con el 50%, hubo reducciones en el contenido de

aminoácidos esenciales que variaban desde el 16% (fenilalanina) hasta el 35% (histidina).

Experimento I.2. Los valores de supervivencia, crecimiento y conversión del alimento tras los 100 días de prueba se recogen en la tabla 6. Las tasas de supervivencia de los cangrejos alimentados con 0% y 25% de sustitución de proteína de pescado por proteína de soja (media: 74,0%) no mostraron diferencias significativas. La supervivencia de los juveniles alimentados con niveles de sustitución más altos (35% y 45%) fue significativamente menor (promedio: 63,7%).

En términos de crecimiento, los valores más altos (14,52 mm LC,

654,45 mg P y 2357,24% PG) se obtuvieron con el 0% de sustitución sin diferencias significativas respecto a la sustitución del 25%. Con niveles de sustitución mayores (35% y 45%), todos los valores de crecimiento fueron significativamente menores.

El gráfico 3 muestra los cambios en el peso a lo largo de los 100 días. Los cangrejos alimentados con dietas con 0% y 25% de sustitución de proteína de pescado por proteína de

soja crecieron más rápido que los alimentados con dietas con niveles de sustitución mayores, siendo las diferencias significativas a partir del día 40.

Los índices de conversión de los cangrejos alimentados con el 0% y el 25% de sustitución fueron significativamente más bajos (promedio: 1,23) que los de los cangrejos que recibieron las otras dos dietas (media: 1,35).

Tabla 6. (Experimento I.2) Valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento de juveniles alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de soja durante los primeros 100 días de cría.

	Nivel de sustitución (%)			
	0	25	35	45
Supervivencia (%)	76,0 ± 1,5 ^a	72,0 ± 1,1 ^a	64,0 ± 3,4 ^b	63,3 ± 2,89 ^b
LC (mm)	14,52 ± 0,36 ^a	14,46 ± 0,31 ^a	13,49 ± 0,29 ^b	13,48 ± 0,35 ^b
Peso (mg)	655 ± 53,0 ^a	649 ± 39,9 ^a	508 ± 49,7 ^b	502 ± 45,4 ^b
PG (%)	2357,2 ± 168,2 ^a	2309,9 ± 129,6 ^a	1771,2 ± 165,3 ^b	1750,2 ± 131,7 ^b
IC	1,22 ± 0,08 ^a	1,23 ± 0,12 ^a	1,33 ± 0,11 ^b	1,36 ± 0,20 ^b

Los valores son media ± error estándar

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$)

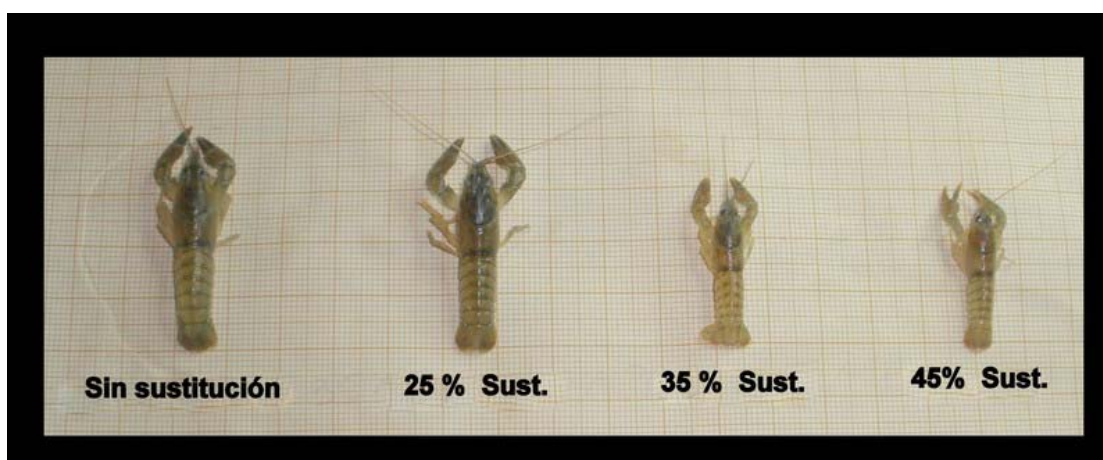


Foto 21. Juveniles alimentados con dietas con diferente nivel de sustitución de la proteína de pescado por proteína de soja al final del experimento I.2.

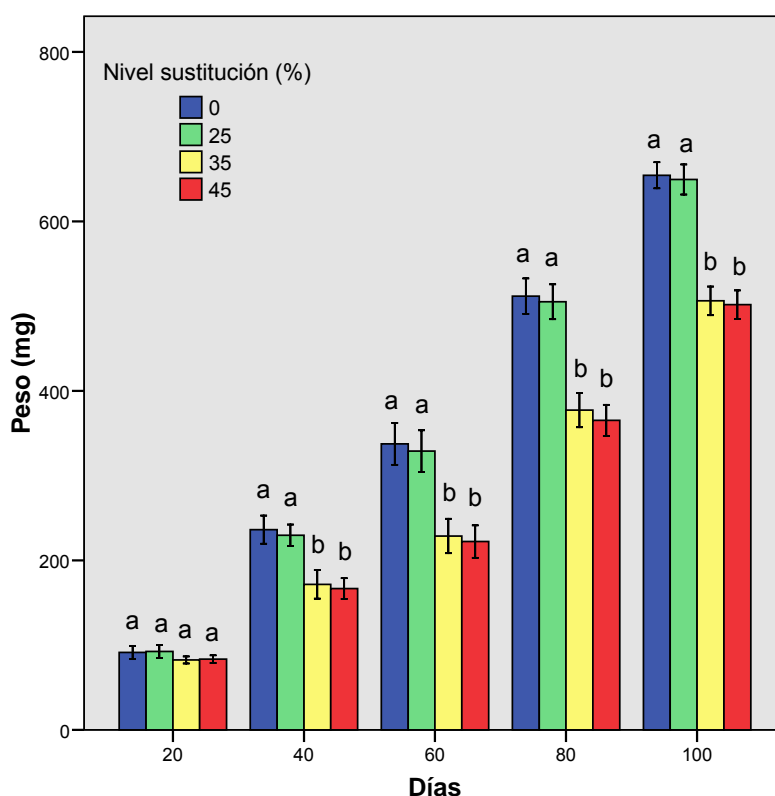


Gráfico 3. (Experimento I.2) Peso de juveniles alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína pescado por proteína de soja durante los primeros 100 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

El porcentaje final de juveniles que perdieron quelípedos aumentó a medida que se incrementó el nivel de sustitución de proteína de pescado por proteína de soja, de modo que las dietas con 0% y 25% de sustitución permitieron valores significativamente más bajos (media: 5,43%) que las dietas con 35% y 45% de sustitución (media: 9,74%).

El perfil de aminoácidos de las dietas prácticas se presenta en la tabla 4. Los contenidos de arginina, lisina, metionina y treonina se redujeron significativamente cuando el contenido de harina de soja se incrementó, sin embargo el crecimiento no se redujo hasta alcanzar el 35% de sustitución de proteína de pescado por proteína de soja (31,8% de harina de soja en dieta). Comparando dicho nivel de sustitución

con la dieta control, se registraron reducciones del contenido de los mencionados aminoácidos desde el 14% (arginina) hasta el 42% (metionina).

6.1.3. Discusión

En astácidos se recomienda un contenido de proteína de al menos 35%; sin embargo, los datos no se refieren al primer período de cría, que es el más crítico, sino a juveniles de varios meses (Ackefors et al. 1992) o animales con una edad comprendida entre 1 y 1,5 años (Wolf 2004). Es conocido que los niveles de proteína requeridos en las etapas iniciales son más altos. Recientemente, González et al. (2012b) indicaron que el contenido proteico de la dieta debe ser al menos

40%. Los resultados del presente estudio mostraron que 45-50% es un contenido de proteína adecuado, encontrándose en el rango de los niveles recomendados para otros crustáceos decápodos durante las primeras etapas de cría (23-57%).

El análisis de la dieta con 45% de proteína evidenció que los contenidos de todos los aminoácidos esenciales eran más altos que los requerimientos determinados para *P. vannamei* (Fox et al. 1995), *P. monodon* (Millamena et al. 1997, 1998, 1999), *Marsupeneus japonicus* (Alam et al. 2004, Teshima et al. 2002) y *Palaemonetes varians* (Palma et al. 2009). Por el contrario, la dieta con 40% de proteína presentó un contenido de aminoácidos esenciales (excepto triptófano) significativamente menor, encontrándose la histidina (5,9 g kg⁻¹ de dieta) por debajo de los requerimientos determinados para las especies mencionadas.

En cuanto a las posibilidades de sustitución de proteína de pescado por proteína de soja en *P. leniusculus*, los resultados del presente estudio demostraron que en una dieta con 50% de proteína, el 25% de la proteína de pescado puede ser sustituida. Niveles más altos de sustitución afectaron negativamente a la supervivencia y al crecimiento.

La dieta con 35% de sustitución de proteína de pescado por proteína de

soja presentó contenidos de arginina, lisina, metionina y treonina significativamente más bajos que los de las dietas con 0% y 25% de sustitución, estando el contenido de metionina (6,8 g kg⁻¹ de dieta) por debajo de los requerimientos determinados para *P. monodon* (Millamena et al. 1996), *M. japonicus* (Teshima et al. 2002) y *P. varians* (Palma et al. 2009). Por otra parte, hay que destacar la presencia en la soja de factores antinutricionales tales como inhibidores de la tripsina, lectinas, saponinas y proteínas antigénicas (Brown et al. 2008). Estos compuestos, junto a la deficiencia en algunos aminoácidos esenciales, tienden a limitar la cantidad de harina de soja en alimentos para animales acuáticos (Brown et al. 2008).

El presente estudio aporta información sobre el nivel óptimo de proteína de una dieta para astácidos juveniles, así como posibilidades de sustitución de proteína de harina de pescado por proteína de harina de soja en dicha dieta. A partir de estos resultados, un nivel de 45-50% de proteína con un 25% de sustitución de proteína de pescado por proteína de soja puede ser recomendado para juveniles *P. leniusculus* durante los primeros 100 días de cría intensiva desde el inicio de la alimentación externa.

6.2. ESTUDIO II: EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR CONCENTRADO PROTEICO DE GUISANTE

Replacement of fish meal by pea protein concentrate in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding

Fuertes JB, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González-Rodríguez Á 2013

Aquaculture 388-391, 159-164

6.2.1. Planteamiento experimental

Las fuentes proteicas de origen vegetal son ampliamente utilizadas debido a su bajo precio y su constante calidad (Garza de Yta et al. 2012). Dentro de ellas, se encuentran los guisantes, que son producidos en grandes cantidades en todo el mundo y ya están siendo utilizados o considerados para su uso en alimentos para animales acuáticos (Gatlin et al. 2007). La harina de guisantes ha sido evaluada como una fuente de proteína alternativa en varias especies de peces como *Dicentrarchus labrax* (Gouveia y Davies 2000), *Chanos chanos* (Borlongan et al. 2003) y *Oncorhynchus mykiss* (Thiessen et al. 2003), y en algunas especies de crustáceos tales como *Litopenaeus vannamei* (Davies et al. 2002), *Penaeus monodon* (Bautista-Teruel et al. 2003) o *Cherax quadricarinatus* (Garza de Yta et al. 2012). Recientes avances en la tecnología de procesamiento de guisantes han proporcionado varios productos, como el concentrado de proteína de guisante (PPC), que podría ser utilizado en acuicultura. El concentrado proteico de guisante ha sido probado en varias especies de peces como *D. labrax* (Tibaldi et al. 2005.), *Salmo salar* (Carter y Hauler 2000; Øverland et al. 2009) u *O.mykiss* (Zhang et al. 2012), pero no se ha probado en crustáceos. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de

dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de concentrado proteico de guisante en astácidos juveniles durante el primer período de cría.

Experimento II.1. Se prepararon cuatro dietas prácticas para evaluar diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante: 0% (control), 25%, 35% y 45% de sustitución, que correspondían a 0%, 20,2%, 28,2% y 35,5% de concentrado proteico de guisante en dieta, respectivamente. La formulación y la composición de macronutrientes de las dietas se muestran en la tabla 7 y su perfil de aminoácidos en la tabla 8.

Se utilizaron 1240 juveniles estado 2 ($5,17 \pm 0,04$ mm LC y $27,6 \pm 0,4$ mg). De ellos, 1200 fueron distribuidos en 12 tanques de 1 m² de superficie y 200 l de agua, y 40 fueron alojados en 40 tanques de 0,15 m² de superficie y 20 l de agua, a razón de 1 cangrejo/tanque. El flujo de agua fue 1,5 l/min en tanques con animales agrupados y 0,25 l/min en los que alojaban solo un animal. Cada dieta fue probada en tres tanques con animales agrupados y diez tanques con animales individualmente aislados. La prueba duró 100 días.

En los muestreos periódicos, se tomaban 15 cangrejos por réplica (45 por tratamiento) de los animales agrupados para pesarlos y medirlos individualmente. En el caso de los

aislados individualmente, todos eran pesados y medidos. Al final del experimento, todos los cangrejos supervivientes fueron medidos y pesados individualmente. Tanto en los

controles intermedios como al final del experimento, se registró el número de cangrejos con una sola pinza y sin pinzas.

Tabla 7. (Experimento II.1) Formulación y composición de macronutrientes de las dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de guisante.

	Nivel de sustitución (%)			
	0	25	35	45
Ingredientes (g kg⁻¹)				
Harina de pescado ¹	614,8	461,1	399,7	338,3
Harina de maíz ²	130,2	82,3	63,3	51,2
Concentrado proteico de guisante ³	0	201,5	282,0	355,3
Aceite de hígado de bacalao ⁴	30	30	30	30
Lecitina de soja ⁵	1	1	1	1
Colesterol ⁶	5	5	5	5
Monofosfato ascórbico ⁷	0,2	0,2	0,2	0,2
Cloruro de colina ⁸	5	5	5	5
Fosfato dicálcico ⁸	10	10	10	10
Quistes de <i>Artemia</i> decapsulados ⁹	150	150	150	150
Carboximetilcelulosa ¹⁰	30	30	30	30
Astaxantina ¹	1	1	1	1
Mezcla minerales ¹¹	20	20	20	20
Mezcla vitaminas ¹²	2,8	2,8	2,8	2,8
Composición (g kg⁻¹)				
Humedad	87,0	85,0	83,1	82,1
Proteína bruta	502,2	501,8	501,6	501,3
Lípidos	119,2	109,3	104,2	98,9
Hidratos de carbono	170,8	187,4	195,4	203,6
Cenizas	120,8	116,5	115,7	114,1
Energía bruta (MJ kg ⁻¹)	19,56	19,42	19,37	19,30

¹ Biomar Iberia / Proaqua Nutrición, Dueñas (Palencia), España.

² ADPAN, Siero-Asturias, España.

³ Yantai Oriental Protein Co., Ltd., Yantai, China.

⁴ ACOFARMA, Terrassa (Barcelona), España.

⁵ Biover NV/SA, Brujas, Bélgica.

⁶ Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim, Alemania.

⁷ Orffa Ingredients B.V., Burgstraat 12, 4283 GG Giessen, Holanda.

⁸ Nutral S.A., Madrid, España.

⁹ *Artemia* cysts: Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Bélgica.

¹⁰ Helm Iberica S.A., Madrid, España.

¹¹ (g kg⁻¹ mezcla): CoCl₂, 0,04; CuSO₄·5H₂O, 2,50; FeSO₄, 40; MgSO₄·7H₂O, 283,98; MnSO₄·H₂O, 6,50; KI, 0,67; Na₂SeO₃, 0,10; ZnSO₄·7H₂O, 131,93.

¹² (g kg⁻¹ mezcla): Tiamina, 21,43; riboflavina, 18,93; niacina, 71,43; piridoxina, 17,86; ácido pantoténico, 37,86; biotina, 0,36; ácido fólico, 5,71; cianocobalamina, 0,07; mioinositol, 142,86; retinol, 0,54; α-tocoferol, 23,82; colecalciferol, 3,93; naftoquinonas, 3,12; etoquinona, 35,71.

Tabla 8. (Experimento II.1) Perfil de aminoácidos de las dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de guisante.

g AA kg ⁻¹ dieta	Nivel de sustitución (%)			
	0	25	35	45
Esenciales				
Arg	55,4 ^a	52,4 ^a	47,1 ^b	41,6 ^c
Hist	12,1 ^a	10,4 ^b	8,3 ^c	6,0 ^d
Ile	24,1	23,6	23,2	22,9
Leu	38,3	37,6	37,4	37,1
Lys	33,4	33,5	33,7	33,9
Met	12,5 ^a	11,0 ^b	9,0 ^c	7,1 ^d
Phe	19,1	18,7	18,6	18,3
Thr	24,1	23,3	23,0	22,6
Val	22,6	21,9	21,6	20,9
Trp	4,7	4,8	4,9	5,0
No esenciales				
Ala	30,2	28,8	28,5	28,3
Asp	41,8 ^a	59,8 ^b	66,3 ^c	71,2 ^d
Glu	84,3 ^a	88,3 ^b	92,2 ^c	94,9 ^d
Gly	17,8 ^a	14,8 ^b	12,2 ^c	9,7 ^d
Pro	19,6	18,5	18,0	17,6
Ser	29,5	28,3	28,0	27,6
Tyr	14,0	14,0	14,0	14,1
Cys	1,8	1,7	1,6	1,5

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

6.2.2. Resultados

Experimento II.1. Los valores de supervivencia, crecimiento y conversión del alimento tras los 100 días de prueba se recogen en la tabla 9. Las tasas de supervivencia de los juveniles alimentados con la dieta control (0% de sustitución), 25% y 35% de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante (media agrupados: 77,2%, media aislados: 90%) no mostraron diferencias significativas. La supervivencia de los juveniles alimentados con la dieta de mayor nivel de sustitución (45%) fue significativamente menor (agrupados: 67%, aislados: 80%). Dentro de una misma dieta, la supervivencia de los juveniles aislados

fue significativamente mayor que la de los agrupados.

En términos de crecimiento (tabla 9), no hubo diferencias significativas entre los juveniles alimentados con las dietas con 25% y 35% de sustitución (20,2% y 28,2% de concentrado proteico de guisante en la dieta, respectivamente) y los alimentados con la dieta control (promedio de los cangrejos agrupados y aislados: 14.67 mm LC, 706 mg P, 3,67% TCE y 2765,9% PG). Los gráficos 4 y 5 muestran los cambios en la longitud de cefalotórax y el peso (juveniles agrupados y aislados), respectivamente, a lo largo de los 100 días. Los juveniles alimentados con la dieta

control (0% de sustitución), 25% y 35% de sustitución crecieron más rápido que los alimentados con la dieta con 45% de sustitución, siendo estas diferencias significativas a partir del día 40.

Independientemente del nivel de sustitución, el crecimiento final de los cangrejos aislados (media: 16,97 mm LC, 1357 mg P) fue significativamente mayor que el de los agrupados (media: 13,88 mm LC, 601 mg P). Los gráficos 6 y 7 muestran los cambios en la longitud del cefalotórax y el peso, respectivamente, de los juveniles mantenidos en grupos o aislados individualmente durante toda la prueba. Los cangrejos aislados crecieron más

rápido que los agrupados. Estas diferencias fueron significativas a partir del día 40.

El índice de conversión (promedio de agrupados y aislados) varió desde 1,06 hasta 1,39. El valor más bajo se obtuvo con la dieta control sin diferencias significativas con las sustituciones del 25% y 35% (20,15% y 28,2% de concentrado proteico de guisante en dieta, respectivamente). Con todas las dietas, el índice de conversión de los cangrejos aislados (media: 0,97) fue significativamente más bajo que el de los cangrejos agrupados (media: 1,35).

Tabla 9. (Experimento II.1) Valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento de juveniles alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de guisante durante los primeros 100 días de cría.

		Nivel de sustitución (%)			
		0	25	35	45
Supervivencia (%)	Grupos	78,0 ± 1,0 ^a	77,5 ± 1,5 ^a	76,0 ± 2,0 ^a	67,0 ± 3,0 ^b
	Aislados	90 ^a	90 ^a	90 ^a	80 ^b
LC (mm)	Grupos	14,4 ± 0,39 ^a	14,3 ± 0,36 ^a	14,2 ± 0,32 ^a	12,3 ± 0,37 ^b
	Aislados	17,7 ± 0,53 ^a	17,6 ± 0,42 ^a	17,4 ± 0,38 ^a	15,2 ± 0,41 ^b
Peso (mg)	Grupos	665 ± 38,7 ^a	658 ± 34,5 ^a	650 ± 38,9 ^a	430 ± 35,4 ^b
	Aislados	1585 ± 121,7 ^a	1567 ± 104,8 ^a	1529 ± 78,2 ^a	748 ± 61,4 ^b
TCE (% día ⁻¹)	Grupos	3,19 ± 0,07 ^a	3,17 ± 0,04 ^a	3,13 ± 0,05 ^a	2,46 ± 0,08 ^b
	Aislados	4,07 ± 0,10 ^a	4,04 ± 0,09 ^a	4,02 ± 0,11 ^a	3,21 ± 0,08 ^b
PG (%)	Grupos	2389,6 ± 106,2 ^a	2367,1 ± 139,9 ^a	2356,3 ± 125,4 ^a	1322,3 ± 113,0 ^b
	Aislados	5794,7 ± 312,3 ^a	5598,6 ± 227,7 ^a	5398,4 ± 186,9 ^a	2498,6 ± 92,8 ^b
IC	Grupos	1,24 ± 0,15 ^a	1,26 ± 0,16 ^a	1,29 ± 0,10 ^a	1,60 ± 0,17 ^b
	Aislados	0,88 ± 0,06 ^a	0,90 ± 0,07 ^a	0,93 ± 0,09 ^a	1,18 ± 0,11 ^b

Los valores son media ± error estándar

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

No hubo diferencias significativas de pérdida de pinzas entre tratamientos a lo largo del ensayo. Al final del experimento, los valores variaron de 4,8% a 6,4%, mientras que en los controles anteriores el rango fue 3,4-5,2%.

El perfil de aminoácidos de las dietas prácticas se presenta en la tabla 8. Teniendo en cuenta los aminoácidos esenciales, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, valina y triptófano. Los niveles más altos de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante (35% y 45%) presentaron contenidos de arginina, histidina y metionina significativamente menores que los de la dieta control.

Con el 35% de sustitución, las reducciones de los contenidos de los mencionados aminoácidos fueron 16% (arginina), 28% (metionina) y 32% (histidina). Sin embargo, el crecimiento no fue afectado significativamente. Con el 45% de sustitución, estas reducciones fueron: 25% (arginina), 43% (metionina) y 51% (histidina), y el crecimiento fue significativamente menor que el de los juveniles alimentados con la dieta control.

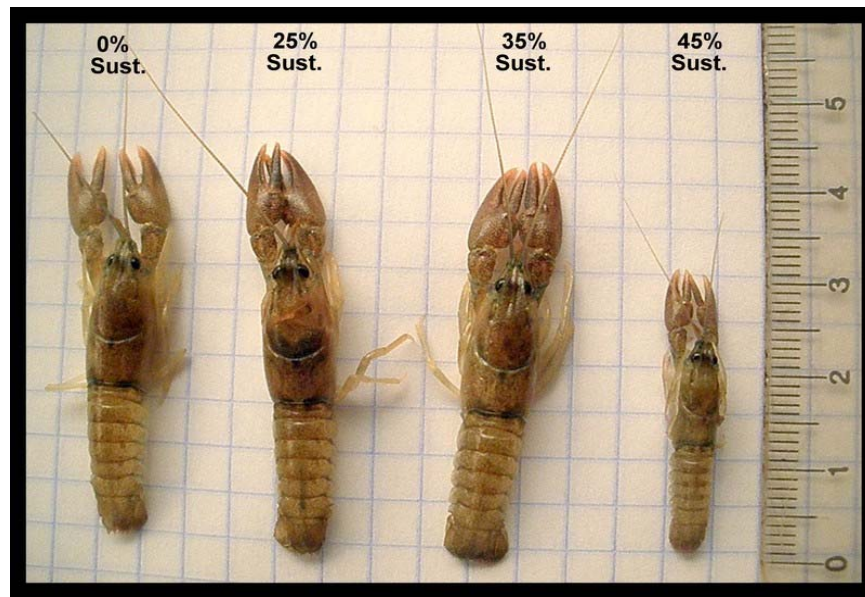


Foto 22. Juveniles agrupados alimentados con dietas con diferente nivel de sustitución de la proteína de pescado por proteína de concentrado proteico de guisante al final del experimento II.1.

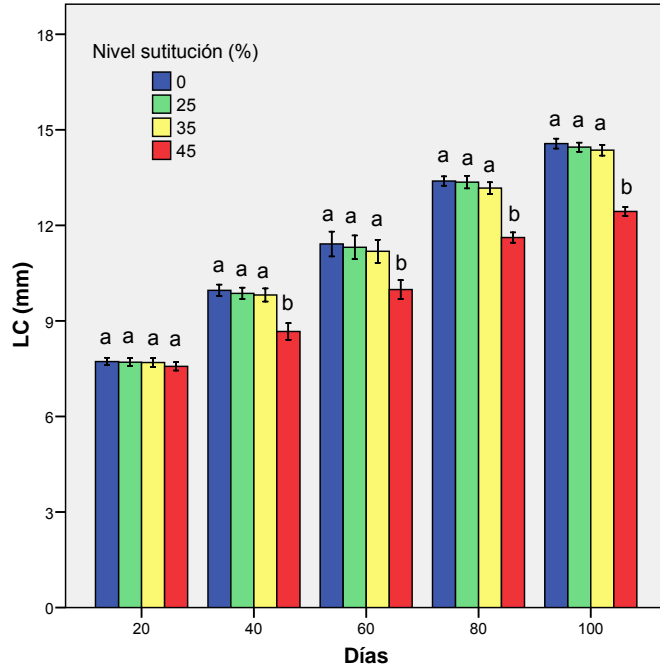


Gráfico 4. (Experimento II.1.) Longitud de cefalotórax de juveniles (animales agrupados y aislados individualmente) alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante durante los primeros 100 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

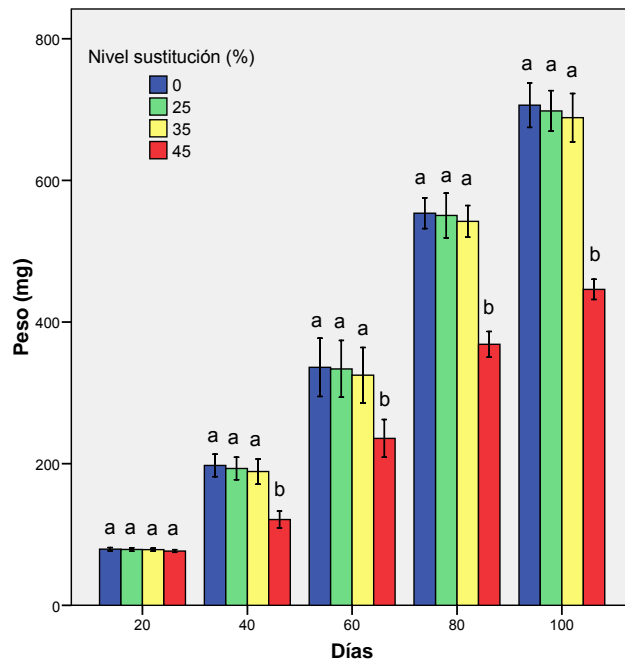


Gráfico 5. (Experimento II.1.) Peso de juveniles (agrupados y aislados individualmente) alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante durante los primeros 100 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

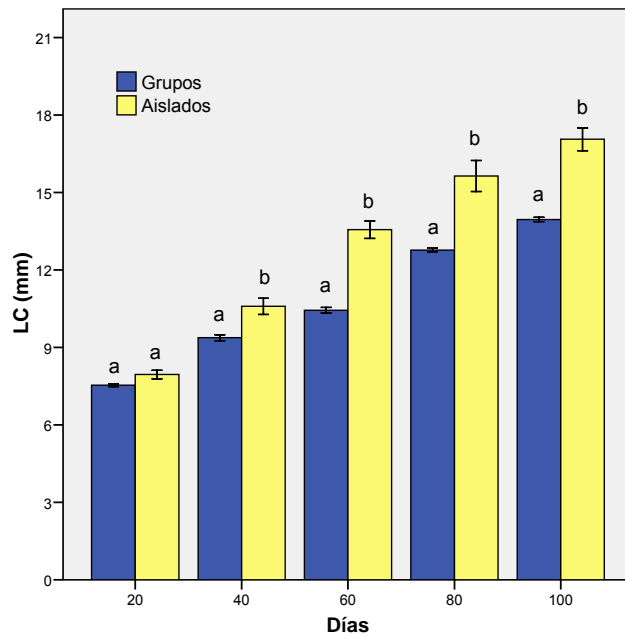


Gráfico 6. (Experimento II.1) Longitud de cefalotórax de juveniles mantenidos en grupos o aislados individualmente alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante durante los primeros 100 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

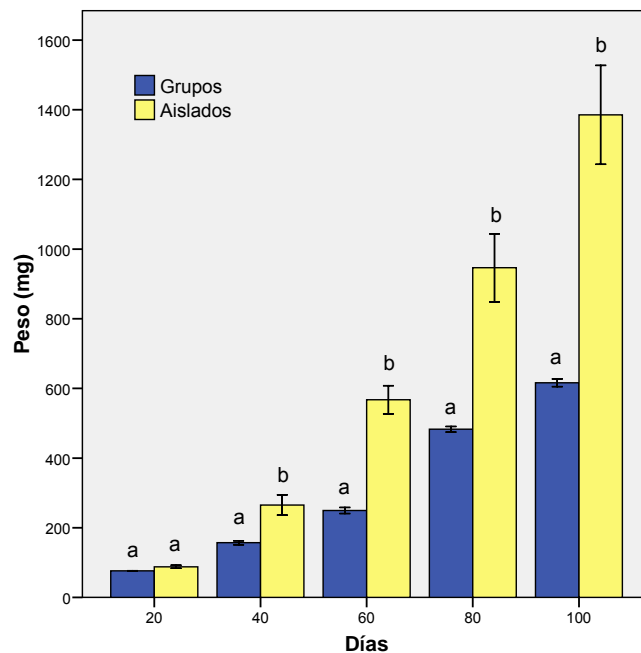


Gráfico 7. (Experimento II.1) Peso de juveniles mantenidos en grupos o aislados individualmente alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante durante los primeros 100 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

6.2.3. Discusión

El presente estudio aporta los primeros datos sobre las posibilidades de inclusión de concentrado proteico de guisante en dietas para crustáceos. Los resultados indican que es posible sustituir hasta un 35% de la proteína de pescado incluyendo un 28,2% de concentrado proteico de guisante. Con esta dieta todos los contenidos de aminoácidos esenciales fueron superiores a las necesidades determinadas para otras especies de crustáceos como *P. monodon* (Millamena et al. 1996, 1997, 1998, 1999), *Marsupeneus japonicus* (Teshima et al. 2002) y *Palaemonetes varians* (Palma et al, 2009), y la supervivencia y el crecimiento no se vieron afectados negativamente. Cuando el nivel de sustitución se aumentó hasta el 45% (35,5% de concentrado proteico de guisante), los contenidos de histidina (6,0 g kg⁻¹ de dieta) y metionina (7,1 g kg⁻¹ de dieta) estuvieron por debajo de los requerimientos determinados para las mencionadas especies y el crecimiento se redujo significativamente (tabla 9).

Además de su deficiencia en aminoácidos esenciales, otras limitaciones nutritivas para el uso de concentrado proteico de guisante son su contenido de hidratos de carbono no digestibles, factores antinutricionales y altos niveles de fibra (Venero et al. 2008).

En definitiva, se puede incluir hasta un 28,2% de concentrado proteico de guisante (35% de sustitución de la proteína de pescado) en dietas extrusionadas (50% de proteína bruta) para juveniles *P. leniusculus* durante los primeros 100 días de alimentación externa sin afectar al crecimiento ni a la conversión del alimento.

6.3. ESTUDIO III: EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR HARINA DE SUBPRODUCTOS DE POLLO

Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding

Fuertes JB, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González-Rodríguez Á 2013

Aquaculture 404-405, 22-27

6.3.1. Planteamiento experimental

Dentro de las fuentes proteicas de origen de animal permitidas por la legislación se encuentra el harina de subproductos de pollo (PBM). El precio de este ingrediente es inferior al de la harina de pescado (FM) y, desde el punto de vista medioambiental, supone una fuente sostenible de proteína (Cruz-Suárez et al. 2007). El harina de subproductos de pollo ha sido probada en dietas para diferentes crustáceos, como *Penaeus monodon* (Phuong y Yu 2003), *Macrobrachium nipponense* (Yang et al. 2004), *Litopenaeus vannamei* (Cruz-Suárez et al. 2007) y *Cherax quadricarinatus* (Saoud et al. 2008), con niveles de inclusión recomendados que varían del 21,2% al 31,4%. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo en astácidos juveniles (*P. leniusculus*) durante el primer periodo de cría intensiva.

Experimento III.1. Se prepararon seis dietas prácticas para evaluar diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo: 0% (control), 15%, 25%, 35%, 45% y 55% de sustitución, correspondientes a 0%, 10,5%, 17,7%, 24,4%, 31,3% y 38,2% de harina de subproductos de pollo en dieta, respectivamente. La composición de macronutrientes y el perfil de aminoácidos de las harinas se muestran en

la tabla 10.

Tabla 10. (Experimento III.1) Composición de macronutrientes y perfil de aminoácidos de la harina de pescado y de la harina de subproductos de pollo.

g kg ⁻¹	FM	PBM
Humedad	74,3	50,6
Proteína bruta	679,0	601,0
Lípidos	88,7	190,5
Hidratos de carbono	0	34,5
Cenizas	158	123,4
Aminoácidos esenciales		
Arg	97,8	92,4
His	12,9	10,0
Ile	35,1	29,3
Leu	45,4	44,7
Lys	61,1	39,4
Met	42,4	20,4
Phe	29,1	21,1
Thr	37,3	29,0
Val	24,7	34,2
Trp	1,7	1,1
Aminoácidos no esenciales		
Ala	43,2	37,9
Asp	61,1	49,6
Glu	85,4	55,1
Gly	8,2	6,6
Pro	25,3	48,1
Ser	38,3	44,8
Tyr	20,1	15,4
Cys	3,8	6,3

La formulación y la composición de macronutrientes de las dietas se presentan en la tabla 11 y su perfil de aminoácidos en la tabla 12.

Tabla 11. (Experimento III.1) Formulación y composición de macronutrientes de las dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo.

	Nivel de sustitución (%)					
	0	15	25	35	45	55
Ingredientes (g kg⁻¹)						
Harina de pescado ^a	615,0	522,8	461,2	399,8	338,0	276,8
Harina de maíz ^b	110,3	109,0	108,5	107,0	102,3	96,5
Harina de subproductos de pollo ^a	0	104,5	176,6	244,0	313,0	382,0
Aceite de hígado de bacalao ^c	30	30	30	30	30	30
Lecitina de soja ^d	31	20	10	5,5	3,0	1,0
Colesterol ^e	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Monofosfato ascórbico ^f	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cloruro de colina ^g	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Fosfato dicálcico ^g	10	10	10	10	10	10
Quistes de <i>Artemia</i> decapsulados y desecados ^h	150	150	150	150	150	150
Carboximetilcelulosa ⁱ	30	30	30	30	30	30
Astaxantina ^j	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Mezcla vitamínico-mineral ^k	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Composición (g kg⁻¹)						
Humedad	87,5	84,5	84,1	85,0	87,0	86,3
Proteína bruta	502,8	502,0	501,7	501,6	501,4	501,1
Lípidos	109,5	114,3	116,1	117,4	118,2	119,8
Hidratos de carbono	151,8	152,2	152,8	153,4	153,7	153,9
Cenizas	148,4	147,0	145,3	142,6	139,7	138,9
Energía bruta (MJ kg ⁻¹)	20,26	20,71	20,88	21,01	21,28	21,32

^a SKRETTING, Cojóbar (Burgos), Spain.

^b ADPAN, Siero-Asturias, Spain.

^c ACOFARMA, Terrassa (Barcelona), Spain.

^d Biover NV/SA, Brujas, Belgium.

^e Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim, Germany.

^f Orffa Ingredients B.V., Burgstraat 12, 4283 GG Giessen, The Netherlands.

^g Nutral S.A., Madrid, Spain.

^h *Artemia* cysts: Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium.

ⁱ Helm Iberica S.A., Madrid, Spain.

^j Biomar Iberia / Proaqua Nutrición, Dueñas (Palencia), Spain.

^k (g kg⁻¹ premix): CoCl₂, 0,064; CuSO₄·5H₂O, 4; FeSO₄, 64; MgSO₄·7H₂O, 454,37; MnSO₄·H₂O, 10,4; KI, 1,07; Na₂SeO₃, 0,16; ZnSO₄·7H₂O, 211,09; thiamin, 4,8; riboflavin, 4,24; niacin, 16; pyridoxine, 4; pantothenic acid, 8,48; biotin, 0,08; folic acid, 1,28; cyanocobalamin, 0,02; myoinositol, 32; retinol, 0,40; α-tocopherol, 5,34; cholecalciferol, 0,88; naphthoquinone, 0,72; ethoxyquin, 8.

Tabla 12. (Experimento III.1) Perfil de aminoácidos de las dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo.

g AA kg ⁻¹ dieta	Nivel de sustitución (%)					
	0	15	25	35	45	55
Esenciales						
Arg	67,5	67,7	67,9	68,0	68,1	68,6
His	12,1	11,7	11,5	11,0	10,9	10,8
Ile	23,6	23,4	23,1	23,0	23,0	22,5
Leu	36,5	36,8	37,5	37,5	37,8	37,9
Lys	38,5	38,0	36,8	36,0	35,7	35,6
Met	12,2 ^a	11,7 ^a	11,7 ^a	11,1 ^a	10,0 ^{a,b}	8,0 ^b
Phe	24,2	23,7	23,4	23,2	22,7	22,4
Thr	21,0	20,7	20,5	20,5	20,2	19,7
Val	24,6	25,0	25,2	25,8	25,9	26,1
Trp	1,4	1,4	1,3	1,3	1,1	1,1
No esenciales						
Ala	29,5	29,4	29,4	29,2	29,0	29,0
Asp	42,7	42,0	41,7	41,4	41,0	40,8
Glu	84,2 ^a	82,1 ^a	81,0 ^a	79,2 ^a	78,2 ^{a,b}	76,7 ^b
Gly	7,8	7,4	7,3	7,0	6,7	6,7
Pro	22,5 ^a	23,9 ^a	25,0 ^a	27,2 ^{a,b}	29,4 ^b	32,9 ^b
Ser	29,2	30,3	32,4	33,4	33,9	35,8
Tyr	14,3	14,0	13,9	13,7	13,6	13,6
Cys	2,8 ^a	3,0 ^a	3,4 ^{a,b}	3,5 ^{a,b}	3,9 ^{a,b}	4,1 ^b

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

Se utilizaron 1860 juveniles estado 2 ($5,08 \pm 0,01$ mm LC y $26,9 \pm 0,3$ mg). De ellos, 1800 fueron distribuidos en 18 tanques de 1 m² de superficie y 200 l de agua, y 60 fueron alojados en 60 tanques de 0,15 m² de superficie y 20 l de agua, a razón de 1 cangrejo/tanque. El flujo de agua fue 1,5 l/min en tanques con animales agrupados y 0,25 l/min en los que alojaban solo un animal. Cada dieta fue probada en tres tanques con animales agrupados y diez tanques con animales individualmente aislados. La prueba duró 80 días.

En los muestreos periódicos, se tomaban 15 cangrejos por réplica (45 por tratamiento) de los animales agrupados para pesarlos y medirlos in-

dividualmente. En el caso de los aislados individualmente, todos eran pesados y medidos. Al final del experimento, todos los cangrejos supervivientes fueron medidos y pesados. Tanto en los controles intermedios como al final del experimento, se registró el número de cangrejos con una sola pinza y sin pinzas.

Al final del estudio, todos los juveniles que habían recibido el mismo tratamiento fueron agrupados, almacenados a -30 °C y posteriormente sometidos a un análisis de cuerpo completo. La composición de macronutrientes y el perfil de aminoácidos del cuerpo completo se presentan en la tabla 14.

6.3.2. Resultados

Experimento III.1. Los valores de supervivencia, crecimiento y conversión del alimento al final del experimento se recogen en la tabla 13. En términos de supervivencia, no hubo diferencias significativas entre los juveniles agrupados alimentados con la dieta control (0% de sustitución) y los alimentados con dietas que contenían hasta un 45% de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo (media: 74,9%). La supervivencia de los juveniles agrupados alimentados con la dieta con el mayor nivel de sustitución (55%) fue significativamente menor (63,0%). En el caso de los cangrejos individualmente aislados, las dietas probadas no tuvieron efectos significativos sobre la supervivencia (media: 98,3%). Con todas las dietas probadas, la supervivencia de los juveniles aislados fue significativamente mayor que la de los agrupados.

En cuanto al crecimiento, no hubo diferencias significativas entre los juveniles alimentados con las dietas con 15%, 25%, 35% y 45% de sustitución de la proteína de pescado (10,5%, 17,7%, 24,4% y 31,3% de harina de subproductos de pollo en dieta, respectivamente) y los alimentados con la dieta control (promedio de los cangrejos agrupados y aislados de los cinco tratamientos: 13,2 mm LC, 555 mg P y 2160,9% PG). El gráfico 8 muestra los cambios en el peso (juveniles agrupados y aislados) a lo largo de los 80 días de prueba. Los juveniles alimentados con la dieta con 55% de sustitución presentaron un

menor ritmo de crecimiento que los alimentados con las otras dietas, siendo las diferencias significativas a partir del día 40. Independientemente del nivel de sustitución, los valores finales de crecimiento de los juveniles individualmente aislados (media: 15,9 mm LC, 983 mg P) fueron significativamente más altos que los de los agrupados (media: 12,3 mm CL, 453 mg P). El gráfico 9 muestra los cambios en el peso de los juveniles mantenidos en grupo o aislados individualmente durante todo el estudio. Los juveniles aislados crecieron más rápido que los agrupados, siendo las diferencias significativas del día 40 en adelante.

El índice de conversión (media de juveniles agrupados y aislados) varió desde 0,98 hasta 1,32. El valor más bajo se obtuvo con la dieta control, sin diferencias significativas con el 15%, 25%, 35% y 45% de sustitución (10,4%, 17,7%, 24,4% y 31,3% de harina de subproductos de pollo en dieta, respectivamente). Con todos los tratamientos, el índice de conversión de los cangrejos aislados (media: 0,95) fue significativamente más bajo que el de los agrupados (media: 1,20).

A medida que el nivel de sustitución se incrementó, el índice de eficiencia proteica se redujo, aunque las diferencias entre los tratamientos de alimentación no fueron significativas (media de juveniles agrupados y aislados: 1,93). El índice de eficiencia proteica de los animales individualmente aislados (media: 2,09) fue significativamente más alto que el de los agrupados (media: 1,79).

Tabla 13. (Experimento III.1) Valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento de juveniles alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo durante los primeros 80 días de cría.

		Nivel de sustitución (%)					
		0	15	25	35	45	55
Supervivencia (%)	Grupos	78,0 ± 2,0 ^a	76,5 ± 1,5 ^a	74,6 ± 1,4 ^a	73,0 ± 1,0 ^a	72,7 ± 1,3 ^a	63,0 ± 1,8 ^b
	Aislados	100	100	100	100	100	90
LC (mm)	Grupos	12,8 ± 0,28 ^a	12,6 ± 0,23 ^a	12,5 ± 0,30 ^a	12,4 ± 0,21 ^a	12,2 ± 0,33 ^a	11,0 ± 0,20 ^b
	Aislados	16,8 ± 0,39 ^a	16,5 ± 0,32 ^a	16,1 ± 0,36 ^a	16,1 ± 0,33 ^a	16,0 ± 0,31 ^a	14,0 ± 0,29 ^b
Peso (mg)	Grupos	495 ± 44,4 ^a	489 ± 40,5 ^a	481 ± 38,9 ^a	476 ± 37,3 ^a	470 ± 41,2 ^a	308 ± 29,1 ^b
	Aislados	1092 ± 101,1 ^a	1064 ± 98,6 ^a	1025 ± 88,3 ^a	1000 ± 87,4 ^a	990 ± 86,4 ^a	668 ± 51,2 ^b
PG (%)	Grupos	1664,3 ± 138,1 ^a	1642,2 ± 154,9 ^a	1613,7 ± 145,8 ^a	1595,3 ± 123,0 ^a	1574,8 ± 165,4 ^a	999,6 ± 93,0 ^b
	Aislados	3794,9 ± 221,5 ^a	3694,8 ± 207,1 ^a	3559,1 ± 205,9 ^a	3466,3 ± 190,8 ^a	3395,2 ± 206,9 ^a	2221,1 ± 88,8 ^b
IC	Grupos	1,12 ± 0,10 ^a	1,14 ± 0,13 ^a	1,17 ± 0,15 ^a	1,19 ± 0,14 ^a	1,22 ± 0,12 ^a	1,38 ± 0,15 ^b
	Aislados	0,84 ± 0,05 ^a	0,86 ± 0,04 ^a	0,89 ± 0,07 ^a	0,92 ± 0,05 ^a	0,93 ± 0,08 ^a	1,26 ± 0,10 ^b
IEP	Grupos	1,82 ± 0,04	1,81 ± 0,06	1,79 ± 0,02	1,78 ± 0,07	1,78 ± 0,06	1,76 ± 0,05
	Aislados	2,14 ± 0,06	2,11 ± 0,08	2,09 ± 0,03	2,08 ± 0,07	2,07 ± 0,09	2,06 ± 0,08

Los valores son media ± error estándar

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

No hubo diferencias significativas de pérdida de pinzas entre tratamientos a lo largo del ensayo. Al final del experimento, los valores variaron de 3,9% a 5,7%, mientras que en los controles anteriores el rango fue 3,0-4,8%.

Los perfiles de aminoácidos de las dietas prácticas se presentan en la tabla 12. Teniendo en cuenta los aminoácidos esenciales, sólo se detectaron diferencias significativas en el contenido de metionina. La dieta con un mayor nivel de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo (55%, 38,2% de harina de subproductos de pollo en dieta) presentó un contenido de metionina significativamente menor que

la dieta control. La reducción en el contenido de este aminoácido fue un 36%.

La composición corporal de los juveniles al final del experimento se presenta en la tabla 14. No hubo diferencias significativas en la composición de macronutrientes. En cuanto al perfil de aminoácidos, sólo se encontraron diferencias significativas en el contenido de metionina, al igual que en las dietas. Así, el contenido de metionina de los juveniles alimentados con la dieta del 55% de sustitución de proteína de pescado (38,2% de harina de pollo en dieta) fue un 43% más bajo que el de los juveniles alimentados con la dieta control.

Tabla 14. (Experimento III.1) Composición corporal de macronutrientes y perfil de aminoácidos de los juveniles alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo durante los primeros 80 días de cría.

g kg ⁻¹	Nivel de sustitución (%)					
	0	15	25	35	45	55
Humedad	735,0	744,0	747,0	746,0	746,0	747,0
Proteína Bruta	116,0	114,0	113,0	112,0	111,0	111,0
Lípidos	16,0	16,0	17,0	17,0	17,0	18,0
Hidratos de carbono	25,0	23,0	24,0	26,0	28,0	27,0
Cenizas	109,0	103,0	99,0	99,0	98,0	97,0
Aminoácidos esenciales						
Arg	9,1	9,3	9,4	9,6	9,8	9,9
His	4,0	3,7	3,5	3,4	3,2	3,1
Ile	6,8	6,7	6,7	6,4	6,1	5,9
Leu	8,8	9,2	9,3	9,5	9,6	9,9
Lys	9,0	8,9	8,5	8,3	8,0	7,9
Met	5,2 ^a	5,0 ^a	4,7 ^{a,b}	4,1 ^b	4,1 ^b	3,0 ^c
Phe	6,9	6,5	6,3	6,3	6,1	6,0
Thr	5,8	5,3	5,1	5,0	4,8	4,5
Val	6,2	6,5	6,5	6,6	6,7	6,9
Trp	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4
Aminoácidos no esenciales						
Ala	7,0	6,9	6,9	6,7	6,7	6,4
Asp	7,4	7,1	6,9	6,7	6,5	6,5
Glu	7,6	7,2	7,1	7,1	6,9	6,7
Gly	1,0 ^a	0,9 ^a	0,9 ^a	0,8 ^a	0,7 ^{a,b}	0,6 ^b
Pro	8,5 ^a	9,2 ^a	9,6 ^{a,b}	9,8 ^b	10,1 ^b	11,8 ^c
Ser	6,3	6,6	6,8	7,1	7,2	7,4
Tyr	3,5	3,2	3,2	3,0	2,9	2,7
Cys	2,5 ^a	2,6 ^a	3,0 ^{a,b}	3,1 ^{a,b}	3,5 ^b	3,9 ^b

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).



Foto 23. Juveniles agrupados alimentados con la dieta control (sin sustitución) y con la dieta con 55% de sustitución de la proteína de pescado al final del experimento III.1.

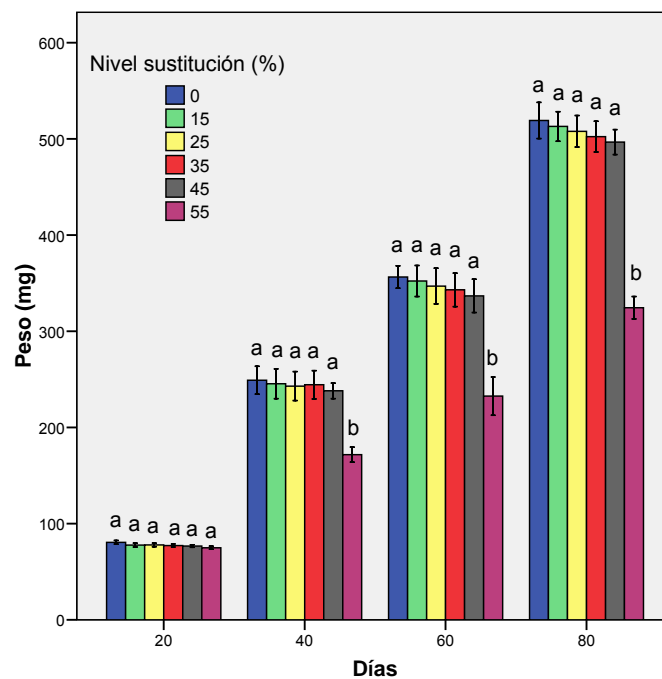


Gráfico 8. (Experimento III.1) Peso de juveniles (animales agrupados y aislados individualmente) alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo durante los primeros 80 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

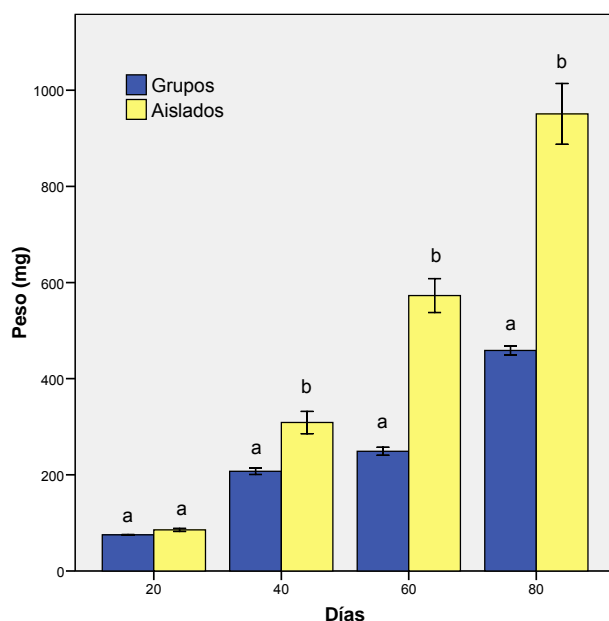


Gráfico 9. (Experimento III.1) Peso de juveniles mantenidos en grupos o aislados individualmente alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo durante los primeros 80 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

6.3.3. Discusión

Los resultados del presente estudio están en la línea del nivel de inclusión más alto incorporado con éxito en dietas para crustáceos (Cruz-Suárez et al. 2007). De esta manera, hasta un 31,3% de harina de subproductos de pollo puede ser incluido en dietas formuladas para juveniles *P. leniusculus* desde el inicio de la alimentación exógena para reemplazar un 45% de proteína de pescado. Con este nivel de sustitución, todos los contenidos de aminoácidos esenciales de la dieta fueron más altos que los requerimientos determinados para otras especies de crustáceos como *P. monodon* (Millamena et al. 1996, 1997, 1998, 1999), *Marsupeneus japonicus* (Teshima et al. 2002) y *Palaemonetes varians* (Palma et al. 2009), y el crecimiento de juveniles *P. leniusculus* no se redujo. Por el contrario cuándo el nivel de sustitución

se aumentó hasta el 55% (38,2% de harina de pollo), el contenido de metionina de la dieta ($8,0 \text{ g kg}^{-1}$) se encontró por debajo de los requerimientos de las especies mencionadas anteriormente, y es probable que también fuera menor que las necesidades de los juveniles de cangrejo señal, ya que su crecimiento se redujo. Además, el contenido de metionina en el cuerpo de los juveniles alimentados con dicha dieta fue significativamente menor que el de aquellos alimentados con la dieta control.

Resumiendo, hasta un 31,3% de harina de subproductos de pollo (45% de sustitución de proteína de pescado) puede ser incluido en dietas extrusionadas para juveniles *P. leniusculus* durante los primeros 80 días de cría intensiva sin afectar al crecimiento ni a la conversión del alimento.

6.4. ESTUDIO IV: EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR HARINA DE PLUMA

Effects of fish meal replacement by feather meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae)

Fuertes JB, Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, González-Rodríguez Á 2013

Aquaculture Nutrition DOI: 10.1111/anu.12044

6.4.1. Planteamiento experimental

La harina de pluma (FEM) es un ingrediente económico con un creciente uso en alimentos para animales acuáticos (Poppi et al. 2011). Se dispone de escasa información sobre el uso de harina de pluma en dietas para crustáceos, que se reduce a *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Lawrence y Castilla 1991, Mendoza et al. 2001). El objetivo de nuestro estudio fue evaluar los efectos de dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma en juveniles *P. leniusculus* durante el primer período de cría intensiva. Para ello se diseñó la siguiente prueba:

Experimento IV.1. Se formularon y elaboraron cuatro dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma: 0% (control), 15%, 25% y 35% de sustitución, que correspondían a 0%, 8,2%, 13,7% y 19,2% de harina de pluma en dieta, respectivamente. La composición de macronutrientes y el perfil de aminoácidos de las harinas se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. (Experimento IV.1.) Composición de macronutrientes y perfil de aminoácidos de la harina de pescado (FM) y la harina de pluma (FEM).

g kg ⁻¹	FM	FEM
Humedad	79,9	53,3
Proteína bruta	680	761
Lípidos	90,1	158,7
Hidratos de carbono	0	23,6
Cenizas	150	3,4
Aminoácidos esenciales		
Arg	125,7	66,4
His	12,7	42,1
Ile	27,5	28,6
Leu	48,2	50,2
Lys	47,0	11,8
Met	20,9	7,5
Phe	21,2	26,4
Thr	39,0	31,5
Val	32,9	58,0
Trp	0,1	0,1
Aminoácidos no esenciales		
Ala	40,5	36,0
Asp	55,7	96,9
Glu	88,8	99,7
Gly	24,0	20,3
Pro	26,2	68,6
Ser	40,2	93,3
Tyr	15,5	9,2
Cys	1,2	6,8

La formulación y la composición de macronutrientes de las dietas se presentan en la tabla 16 y su perfil de aminoácidos en la tabla 17.

Tabla 16. (Experimento IV.1) Formulación y composición de macronutrientes de las dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma.

	Nivel de sustitución (%)			
	0	15	25	35
Ingredientes (g kg⁻¹)				
Harina de pescado ¹	614,8	522,6	461,1	399,7
Harina de maíz ²	130,2	140	146,6	152,9
Harina de pluma ³	0	82,4	137,3	192,2
Aceite de hígado de bacalao ⁴	30	30	30	30
Lecitina de soja ⁵	1	1	1	1
Colesterol ⁶	5	5	5	5
Monofosfato ascórbico ⁷	0,2	0,2	0,2	0,2
Cloruro de colina ⁸	5	5	5	5
Fosfato dicálcico ⁸	10	10	10	10
Quistes de <i>Artemia</i> decapsulados ⁹	150	150	150	150
Carboximetilcelulosa ¹⁰	30	30	30	30
Astaxantina ¹	1	1	1	1
Mezcla minerales ¹¹	20	20	20	20
Mezcla vitaminas ¹²	2,8	2,8	2,8	2,8
Composición (g kg⁻¹)				
Humedad	87,0	86,0	84,0	83,0
Proteína bruta	502,2	502,3	502,4	502,5
Lípidos	119,2	125,4	129,4	131,7
Hidratos de carbono	170,8	174,8	175,0	185,8
Cenizas	120,8	111,5	109,2	97,0
Energía bruta (MJ kg ⁻¹)	19,58	19,86	20,03	20,31

¹ Biomar Iberia / Proaqua Nutrición, Dueñas (Palencia), España.

² ADPAN, Siero-Asturias, España.

³ COREN, Santa Cruz de Arrabaldo (Ourense), España.

⁴ ACOFARMA, Terrassa (Barcelona), España.

⁵ Biover NV/SA, Brujas, Bélgica.

⁶ Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim, Alemania.

⁷ Orffa Ingredients B.V., Burgstraat 12, 4283 GG Giessen, Holanda.

⁸ Nutral S.A., Madrid, España.

⁹ *Artemia* cysts: Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Bélgica.

¹⁰ Helm Iberica S.A., Madrid, España.

¹¹(g kg⁻¹ mezcla): CoCl₂, 0,04; CuSO₄·5H₂O, 2,50; FeSO₄, 40; MgSO₄·7H₂O, 283,98; MnSO₄·H₂O, 6,50; KI, 0,67; Na₂SeO₃, 0,10; ZnSO₄·7H₂O, 131,93.

¹² (g kg⁻¹ mezcla): Tiamina, 21,43; riboflavina, 18,93; niacina, 71,43; piridoxina, 17,86; ácido pantoténico, 37,86; biotina, 0,36; ácido fólico, 5,71; cianocobalamina, 0,07; mioinositol, 142,86; retinol, 0,54; α-tocoferol, 23,82; colecalciferol, 3,93; naftoquinonas, 3,12; etoquinina, 35,71.

Tabla 17. (Experimento IV.1) Perfil de aminoácidos de las dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de la proteína de pescado por proteína de pluma.

g AA kg ⁻¹ dieta	Nivel de sustitución (%)			
	0	15	25	35
Esenciales				
Arg	62,5 ^a	53,5 ^b	46,5 ^c	39,2 ^d
Hist	8,9	9,3	9,7	9,9
Ile	24,1	23,9	23,8	23,7
Leu	38,3	38,0	37,8	37,6
Lys	33,4 ^a	30,3 ^b	25,0 ^c	22,2 ^c
Met	13,2 ^a	10,1 ^b	8,4 ^c	7,2 ^c
Phe	19,1	19,3	19,5	19,6
Thr	24,1	23,1	22,6	22,2
Val	24,6	25,2	26,3	27,3
Trp	0,6	0,6	0,6	0,6
No esenciales				
Ala	30,2	29,5	29,0	28,5
Asp	41,8 ^a	44,4 ^{a,b}	46,1 ^{a,b}	47,8 ^b
Glu	84,9	85,0	85,0	85,0
Gly	17,8	16,4	15,4	14,7
Pro	19,6 ^a	23,5 ^{a,b}	25,5 ^b	27,4 ^b
Ser	29,5 ^a	33,2 ^{a,b}	35,6 ^b	38,0 ^b
Tyr	14,0	13,4	13,0	12,6
Cys	1,8 ^a	3,8 ^b	5,0 ^{b,c}	6,1 ^c

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

Se utilizaron 1240 juveniles estado 2 ($5,13 \pm 0,02$ mm LC y $27,2 \pm 0,2$ mg). De ellos, 1200 fueron distribuidos en 12 tanques de 1 m² de superficie y 200 l de agua, y 40 fueron alojados en 40 tanques de 0,15 m² de superficie y 20 l de agua, a razón de 1 cangrejo/tanque. El flujo de agua fue 1,5 l/min en tanques con animales agrupados y 0,25 l/min en los que alojaban solo un animal. Cada dieta fue probada en tres tanques con animales agrupados y diez tanques con animales individualmente aislados. La prueba duró 80 días.

En los muestreos periódicos, se tomaban 15 cangrejos por réplica (45 por tratamiento) de los animales agrupados para pesarlos y medirlos individualmente. En el caso de los aislados individualmente, todos eran

pesados y medidos. Al final del experimento, todos los cangrejos supervivientes fueron medidos y pesados individualmente. Tanto en los controles intermedios como al final del experimento, se registró el número de cangrejos con una sola pinza y sin pinzas.

6.4.2. Resultados

Experimento IV.1. Los valores de supervivencia, crecimiento y conversión del alimento tras los 80 días de prueba se recogen en la tabla 18. Las tasas de supervivencia de los juveniles alimentados con la dieta control (0% de sustitución) y el 15% de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma no mostraron diferencias signifi-

cativas (media de agrupados: 76,3%; media de aislados: 100%). La supervivencia de los juveniles alimentados con dietas con niveles de sustitución más altos (25% y 35%) fue significativamente menor (media de agrupados: 63,9%, media de aislados: 80%). En todos los casos, la supervivencia de los cangrejos aislados fue significativamente mayor (media: 90%) que la de los agrupados (media: 70,1%).

En términos de crecimiento, no se encontraron diferencias significativas entre juveniles alimentados con la dieta del 15% de sustitución (8,2% de harina de pluma) y los alimentados con la dieta control (cangrejos agrupados y aislados: 13,60 mm LC, 527,1 mg P y 3,67% TCE). Con las sustituciones de 25% y 35% (13,7% y 19,2% de harina de pluma en dieta, respectivamente), todos los valores de crecimiento fueron significativamente menores. Los gráficos 10 y 11 muestran los cambios en la longitud de cefalotórax y el peso (juveniles agrupados y aislados) a lo largo de los 80 días. Los juveniles alimentados con la dieta control (0% de sustitución) y el 15% de sustitución crecieron más rápido que los alimentados con las otras dos dietas.

La sustitución del 35% dió lugar a los valores más bajos de crecimiento a lo largo del ensayo, siendo estas diferencias significativas a partir del día 40. Independientemente de la dieta, los valores finales de crecimiento de los cangrejos aislados (media: 14,60 mm CL, 763,0 mg P) fueron significativamente más altos que los de los cangrejos agrupados (media: 12,58 mm CL, 427,0 mg P). Los gráficos 12 y 13 muestran los cambios en la longitud de cefalotórax y el peso de los juveniles mantenidos en grupos o aislados a lo largo de los 80 días de prueba. Los juveniles aislados individualmente crecieron más rápido que los agrupados, siendo las diferencias significativas desde el día 40 en adelante.

Los índices de conversión (media de cangrejos agrupados y aislados) oscilaron entre 1,02 y 1,32. El valor más bajo se obtuvo con la dieta control, sin diferencias significativas con la sustitución del 15% (8,2% de harina de pluma). Con todas las dietas, los índices de conversión de los cangrejos aislados (media: 1,03) fueron significativamente más bajos que los de los cangrejos agrupados (media: 1,25).

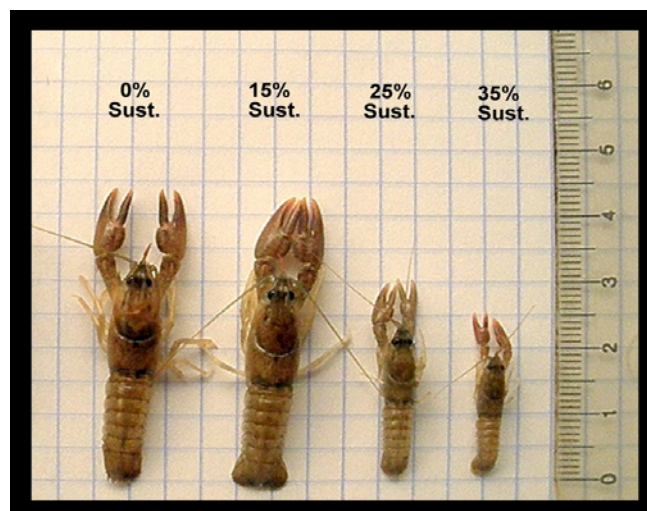


Foto 24. Juveniles agrupados alimentados con dietas con diferente nivel de sustitución de la proteína de pescado por proteína de pluma al final del experimento IV.1.

Tabla 18. (Experimento IV.1) Valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento de juveniles alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma durante los primeros 80 días de cría.

		Nivel de sustitución (%)			
		0	15	25	35
Supervivencia (%)	Grupos	77,0 ± 1,7 ^a	75,6 ± 1,2 ^a	64,7 ± 1,6 ^b	63,0 ± 1,8 ^b
	Aislados	100 ^a	100 ^a	80 ^b	80 ^b
LC (mm)	Grupos	13,5 ± 0,32 ^a	13,4 ± 0,28 ^a	12,4 ± 0,31 ^b	10,9 ± 0,25 ^c
	Aislados	16,1 ± 0,42 ^a	15,9 ± 0,38 ^a	14,1 ± 0,36 ^b	12,4 ± 0,33 ^c
Peso (mg)	Grupos	509 ± 36,8 ^a	502 ± 34,5 ^a	400 ± 28,9 ^b	297 ± 25,4 ^c
	Aislados	1039 ± 109,5 ^a	991 ± 93,8 ^a	614 ± 56,3 ^b	409 ± 31,4 ^c
TCE (% día ⁻¹)	Grupos	2,93 ± 0,07 ^a	3,48 ± 0,06 ^a	3,02 ± 0,05 ^b	2,66 ± 0,08 ^c
	Aislados	3,61 ± 0,10 ^a	4,35 ± 0,09 ^a	3,81 ± 0,11 ^b	3,03 ± 0,08 ^c
IC	Grupos	1,15 ± 0,15 ^a	1,17 ± 0,16 ^a	1,27 ± 0,10 ^b	1,39 ± 0,17 ^c
	Aislados	0,89 ± 0,06 ^a	0,92 ± 0,07 ^a	1,06 ± 0,09 ^b	1,24 ± 0,11 ^c

Los valores son media ± error estándar

Valores en la misma fila con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

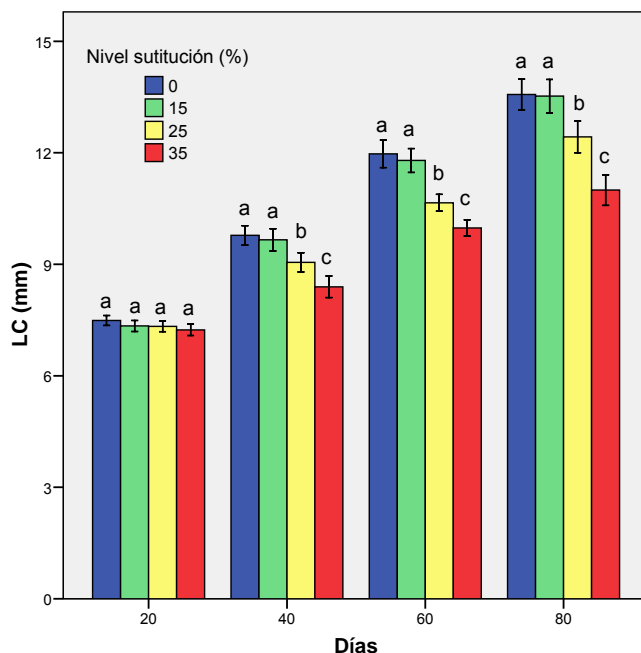


Gráfico 10. (Experimento IV.1) Longitud de cefalotórax de juveniles (animales agrupados y aislados individualmente) alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma durante los primeros 80 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

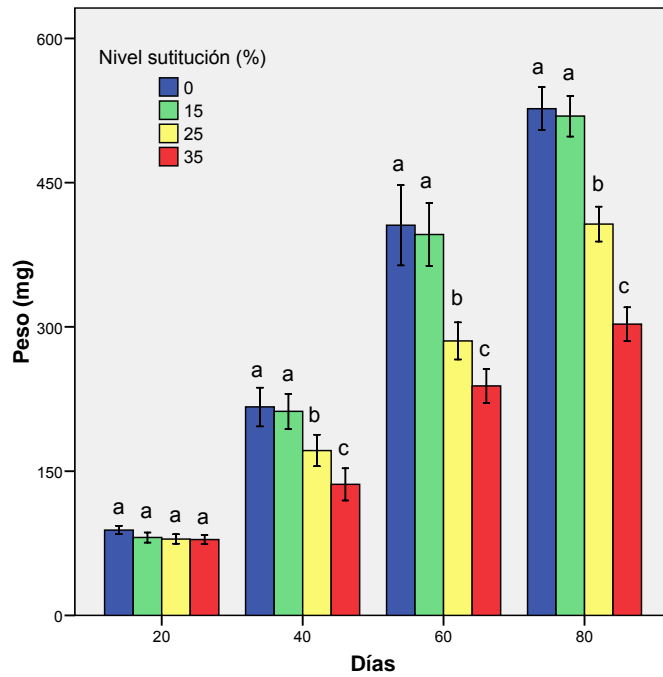


Gráfico 11. (Experimento IV.1) Peso de juveniles (animales agrupados y aislados individualmente) alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma durante los primeros 80 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

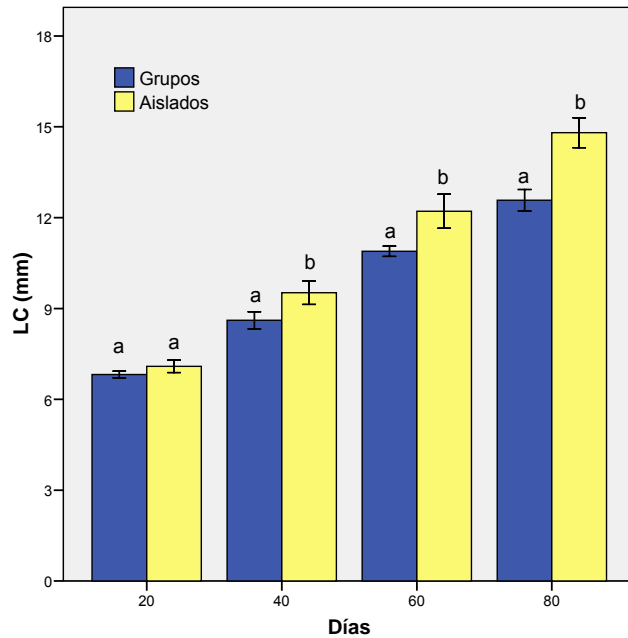


Gráfico 12. (Experimento IV.1) Longitud de cefalotórax de juveniles mantenidos en grupos o aislados individualmente alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma durante los primeros 80 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

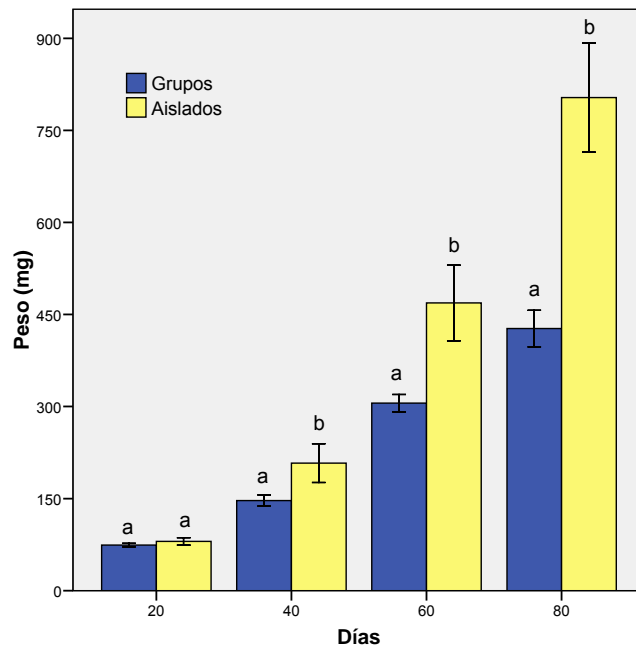


Gráfico 13. (Experimento IV.1) Peso de juveniles mantenidos en grupos o aislados individualmente alimentados con dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma durante los primeros 80 días de cría. Las barras de error representan el error estándar de la media. Letras diferentes en el mismo día denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Sólo se produjo pérdida de pinzas en juveniles agrupados. El porcentaje final de cangrejos que carecían de alguna pinza aumentó a medida que se incrementó el nivel de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma, de modo que las dietas con 0% y 15% de sustitución permitieron valores significativamente más bajos (media: 4,9%) que las dietas con 25% y 35% de sustitución (media: 13,0%). En los controles anteriores, el rango fue 3,9-12,6%.

El perfil de aminoácidos de las dietas prácticas se presenta en la tabla 17. Los contenidos de arginina, lisina y metionina se redujeron significativamente cuando el contenido de harina de pluma se incrementó; sin embargo el crecimiento no se redujo hasta alcanzar el 25% de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma (13,7% de harina de pluma en dieta). Comparando dicho nivel de sustitución con la dieta control, las

reducciones del contenido de los mencionados aminoácidos fueron: 25% (arginina), 26% (lisina) y 36% (metionina).

6.4.3. Discusión

En el presente estudio con juveniles *P. leniusculus*, fue posible incluir hasta un 8,2% de harina de pluma para sustituir el 15% de la proteína de la harina de pescado. Con mayores niveles de sustitución (25% y 35%), la supervivencia y el crecimiento se redujeron significativamente. Los contenidos dietéticos de arginina, lisina y metionina se vieron reducidos significativamente cuando la harina de pluma fue incluido en la dieta (tabla 17). Con el 25% de sustitución (13,7% de harina de pluma), los contenidos de arginina y lisina fueron 46,5 y 25,2 g kg⁻¹ de dieta, respectivamente, y tanto la supervivencia como el crecimiento se vieron negativamente afectados. Sin embargo, estos contenidos fueron superiores a

los requerimientos determinados para *P. vannamei* y *P. monodon* (Fox et al. 1995, Millamena et al. 1998). Dentro de los aminoácidos esenciales, sólo la metionina (8,4 g kg⁻¹ de dieta) estuvo por debajo de los requerimientos de *P. monodon* (Millamena et al. 1996). Además de la deficiencia en algunos aminoácidos esenciales, otra limitación para el uso de harina de pluma en dietas para animales acuáticos es su baja digestibilidad, que ha sido atribuida a los enlaces disulfuro (NRC 2011). A pesar de que el proceso de hidrolización usado para obtener la harina de pluma da lugar a una mejora

significativa de la digestibilidad (Bureau et al. 2000), aún es menor que la de la harina de pescado (NRC 2011).

El presente estudio aporta los primeros datos sobre posibilidades de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma en dietas para cangrejos de río juveniles. Se puede incluir hasta un 8,2% de harina de pluma (15% de sustitución de proteína de pescado) en dietas extrusionadas para juveniles *P. leniusculus* durante los primeros 80 días de alimentación externa sin afectar al crecimiento ni a la conversión del alimento.

7. DISCUSIÓN GENERAL





Debido a que los astácidos presentan una baja fecundidad, muy inferior a la de otros crustáceos de interés en acuicultura, la obtención de elevadas tasas de supervivencia durante las primeras etapas de la cría de juveniles resulta clave para alcanzar un nivel de producción viable. Esto ha dado lugar al desarrollo de numerosas líneas de investigación orientadas a mejorar el rendimiento en las primeras fases del cultivo de estos animales. Dentro de ello, la alimentación constituye un factor que influye decisivamente sobre los resultados de la cría desde el inicio de la alimentación externa.

Una de las principales limitaciones para interpretar y comparar los resultados de las investigaciones en las diferentes especies de crustáceos es la falta de estandarización de la metodología experimental (D'Abramo y Castell 1997). Dentro de las recomendaciones propuestas por New (1976) para mejorar los estudios nutricionales en crustáceos, destaca la necesidad de desarrollar un procedimiento estándar de experimentación que facilite la comparación de datos. Partiendo de esta premisa, se propuso una dieta formulada para bogavantes (*Homarus* spp.) como dieta de referencia (Castell 1989), siendo evaluada en varias especies de crustáceos, incluyendo cangrejos de río (Celada et al. 1989, Ackefors et al. 1992). Los pobres resultados conseguidos con esta dieta no aportaron solución alguna en el caso de los astácidos. No fue hasta 20 años después cuando los trabajos de este grupo de investigación llegaron a la formulación y elaboración de una dieta práctica seca específica para juveniles de astácidos (Carral et al. 2011), que ha permitido buenos resultados como único alimento desde el comienzo de la alimentación externa. Cabe destacar que, con el fin de facilitar su utilización y siguiendo las sugerencias de D'Abramo y Castell (1997), esta dieta se formuló con

ingredientes habitualmente disponibles en el mercado y ha sido propuesta como base para futuros estudios nutricionales en cangrejos de río juveniles bajo condiciones controladas. El uso de la misma en otros estudios dará lugar a una mejora progresiva de la actual formulación y proceso de fabricación mediante la inclusión de futuros descubrimientos en nutrición de astácidos.

Actualmente no se dispone de información sobre los requerimientos de macronutrientes de juveniles de astácidos durante el primer período de cría intensiva. Teniendo en cuenta que el contenido proteico es el factor clave que determina el coste de una dieta, la prioridad debe ser el estudio de las necesidades de proteína desde el comienzo de la alimentación externa. Por ello, el primer paso en nuestros estudios (Experimento I.1) ha consistido en determinar un contenido proteico apropiado para los primeros meses de cría intensiva. Los resultados indican que un nivel de 50% de proteína es adecuado para juveniles *P. leniusculus* durante los primeros 100 días de alimentación externa. Este nivel de proteína es mayor que la recomendación del 30-35% (Ackefors et al. 1992, Wolf 2004). Sin embargo, hay que considerar que esta recomendación no se refiere al primer período de cría sino a juveniles de varios meses o animales con una edad comprendida entre 1 y 1,5 años. Es sabido que los requerimientos de proteína son mayores en las etapas iniciales, cuando el ritmo de crecimiento es más rápido.

Una vez establecido el contenido proteico de la dieta, con el fin de utilizar los ingredientes más adecuados, debe tenerse en cuenta la disponibilidad y el precio de las diferentes materias primas. La soja es una de las fuentes proteicas de origen vegetal más usadas en alimentación animal, debido a su alto contenido proteico y disponibilidad

en el mercado. Los crustáceos estudiados parecen tener diferente tolerancia a la harina de soja. Por ejemplo, hasta el 40% de la proteína de pescado puede ser sustituida por proteína de soja en una dieta para *P. vannamei* sin comprometer el crecimiento ni la eficiencia de utilización del alimento (Lim y Dominy 1990). Sin embargo, García-Ulloa et al. (2003) han indicado que una sustitución del 25% puede reducir el crecimiento de *C. quadricarinatus*, y Du y Niu (2003) señalaron que juveniles *M. rosenbergii* mostraron un menor crecimiento y una reducción de la eficiencia de utilización del alimento cuando el nivel de sustitución fue sólo un 20%. Los resultados del Experimento I.2 indican que, en una dieta con un 50% de proteína, es posible sustituir el 25% de la proteína de pescado por proteína de soja (22,7% de harina de soja en dieta). La presencia de factores antinutricionales en la soja junto a su deficiencia en algunos aminoácidos esenciales actúan como factores limitantes a la hora de incluir una mayor cantidad de harina de soja en la dieta (Brown et al. 2008).

Otra fuente proteica de origen vegetal ampliamente utilizada en alimentación animal es el harina de guisantes. Es conocido que existen limitaciones nutritivas para su uso en alimentos para animales acuáticos, principalmente su contenido de hidratos de carbono no digestibles, factores antinutricionales y altos niveles de fibra (Venero et al. 2008). Sin embargo, la harina de guisantes (23% de proteína bruta, aproximadamente) ha sido evaluada como una fuente alternativa de proteína en varias especies de peces, que parecen tener diferente tolerancia. Por ejemplo, se puede incluir hasta un 30% en dietas para lubina, *D. labrax* (Gouveia y Davies 2000), sin afectar al crecimiento, mientras que los niveles óptimos de inclusión en dietas para *C. chanos* (Borlongan et al. 2003) y la trucha arco iris, *O. mykiss* (Thiessen et al. 2003),

fueron solo un 13,1% y un 20%, respectivamente. Hay poca información disponible sobre el uso de harina de guisantes en dietas para crustáceos. Davies et al. (2002) han señalado que un 20% de harina de guisante puede ser incluido en dietas para juveniles *L. vannamei* sin reducir el crecimiento, y Bautista-Teruel et al. (2003) incluyeron hasta un 42% en dietas para *P. monodon* sin comprometer el crecimiento ni la eficiencia de utilización del alimento. En juveniles *C. quadricarinatus*, Garza de Yta et al. (2012) probaron sólo un 10% de harina de guisantes en la dieta y no observaron efectos sobre el crecimiento. El procesamiento de los guisantes por la tecnología del aislamiento físico permite la obtención de un concentrado proteico de guisante (PPC, 55% de proteína bruta, aproximadamente). El concentrado proteico de guisante ha sido probado en varias especies de peces como *D. labrax* (Tibaldi et al. 2005.), *S. salar* (Carter y Hauler 2000, Øverland et al. 2009, Penn et al. 2011) y *O. mykiss* (Zhang et al. 2012), con niveles de inclusión óptimos que van desde el 20% hasta el 36%. El Experimento II.1 aporta los primeros datos sobre las posibilidades de inclusión de concentrado de proteína de guisante en dietas para crustáceos. De acuerdo con los resultados obtenidos, la inclusión de un 28,2% de concentrado proteico de guisante permitió sustituir el 35% de la proteína de harina de pescado sin afectar negativamente al rendimiento. A pesar de que el descascarillado de los guisantes, utilizado para obtener el concentrado proteico, disminuye la concentración de factores antinutricionales (Eusebio 1991) y la extrusión de las dietas mejora el índice de conversión (Cruz-Suárez et al. 2001), estos compuestos junto a su deficiencia en histidina y metionina tienden a limitar la cantidad de concentrado proteico de guisante recomendable para animales acuáticos.

En cuanto a las fuentes proteicas de origen animal, la harina de subproductos de pollo es considerada como una fuente de proteína interesante para crustáceos, debido a su bajo precio, alta calidad nutritiva y digestibilidad cercana a la de la harina de pescado (Cruz-Suárez et al. 2007). El factor más limitante para su uso en acuicultura es su bajo contenido de metionina (Dong et al. 1993, Zhou et al. 2011). Se han incluido en dietas para crustáceos diferentes niveles de harina de subproductos de pollo sin afectar al crecimiento: 27,7% en *P. monodon* (Phuong y Yu 2003), 29,8% en *M. nipponense* (Yang et al. 2004), 31,4% en *L. vannamei* (Cruz-Suárez et al. 2007) y 21,2% en *C. quadricarinatus* (Saoud et al. 2008). En el Experimento III.1, se pudo comprobar que, en comparación con la harina de pescado, la harina de subproductos de pollo solamente es deficiente en metionina, siendo posible incluir en la dieta hasta un 31,3% para sustituir un 45% de la proteína de pescado. Además de la deficiencia de metionina, otra posible razón del menor crecimiento de los juveniles *P. leniusculus* alimentados con dietas con mayores niveles de inclusión de harina de pollo podría ser una reducción de la palatabilidad del alimento. En algunas especies de peces como *Oncorhynchus tshawytscha* (Fowler 1991), *Morone chrysops* X *M. saxatilis* (Webster et al. 2000) o *Psetta maeotica* (Yigit et al. 2006), se ha sugerido que altos niveles de inclusión de harina de subproductos de pollo (mayores del 30%) pueden dar lugar a una reducción de la palatabilidad de la dieta y, en consecuencia, a un menor consumo de alimento y a una peor eficiencia de utilización del mismo (aumento del índice de conversión).

La harina de pluma es otra fuente económica de proteína de origen animal que ha sido probada en las etapas juveniles de varias especies de peces, con diferentes resultados según

la especie (Yu 2008). Por ejemplo, hasta un 15% de harina de pluma se puede incluir en dietas para el salmón Chinook, *Oncorhynchus tshawytscha* (Fowler 1990), y la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Bureau et al. 2000), sin afectar al crecimiento, mientras que sólo un 3,5% de harina de pluma en dietas para *Nibea miichthioides* puede ocasionar una reducción significativa del crecimiento (Wang et al. 2006). En crustáceos, un 10% (Lawrence y Castilla 1991) y un 13,33% de harina de pluma (Mendoza et al. 2001) han sido incluidos en dietas prácticas para juveniles *L. vannamei* sin comprometer el crecimiento. En el Experimento IV.1, se comprobó que es posible incluir un 8,2% de harina de pluma en la dieta para sustituir el 15% de la proteína aportada por la harina de pescado sin efectos adversos sobre el rendimiento. La baja digestibilidad de la harina de pluma (NRC 2011) y su marcada deficiencia en arginina, lisina y metionina dificultan seriamente la posibilidad de alcanzar con éxito mayores niveles de sustitución.

Tomando como referencia los análisis químicos efectuados en cada estudio y comparando con la harina de pescado, las cuatro fuentes de proteína evaluadas fueron deficientes en metionina, el aminoácido más limitante. Además, el concentrado proteico de guisante también fue deficiente en histidina. La suplementación con cantidades adecuadas de los aminoácidos deficientes en cada caso podría permitir mayores niveles de inclusión de todas estas materias primas. De esta forma, se abriría la posibilidad de alcanzar mayores niveles de sustitución de la proteína de pescado.

Además de la deficiencia de aminoácidos, existen otras variables que podrían contribuir a limitar las posibilidades de sustitución de la proteína de pescado. Dentro de dichas variables se incluyen factores antinutricionales tales como inhibidores

de la tripsina, lectinas, saponinas o proteínas antigénicas (harina de soja y concentrado proteico de guisante), altos contenidos de hidratos de carbono no digestibles y de fibra (concentrado proteico de guisante) y una menor digestibilidad (harina de pluma). Además, la inclusión de cualquier fuente alternativa podría estar también limitada por una reducción de la palatabilidad.

En términos de supervivencia, los valores fueron elevados (en torno al 74% en juveniles agrupados y al 90% en aislados individualmente), encontrándose en el rango de los más altos conseguidos. El nivel de proteína de la dieta y los contenidos de harina de soja, concentrado proteico de guisante, harina de subproductos de pollo y harina de pluma afectaron a las tasas de supervivencia, que se redujeron significativamente con niveles de proteína inferiores al 45% y con niveles de inclusión de las fuentes alternativas utilizadas iguales o superiores a 31,8% de harina de soja, 35,5% de concentrado proteico de guisante, 38,2% de harina de subproductos de pollo y 13,7% de harina de pluma.

El crecimiento estuvo afectado por el contenido proteico de la dieta y por los niveles de inclusión de harina de soja, concentrado proteico de guisantes, harina de subproductos de pollo y harina de pluma. Además, cabe destacar el hecho de que en todos los estudios, independientemente de la dieta probada, los valores de crecimiento de los juveniles aislados individualmente fueron significativamente más altos que los de los mantenidos en grupos. Esto pudo ser debido a que, ante la ausencia de luchas, los cangrejos aislados pudieron expresar mejor su potencial de crecimiento, ya que no perdieron energía en las mismas y pudieron utilizar una mayor proporción del alimento para el proceso de crecimiento (Celada et al. 2013). Esto se

evidencia por el hecho de que los índices de conversión de los juveniles individualizados fueron significativamente menores que los de los agrupados.

Por otra parte, los porcentajes de animales con una sola pinza o sin pinzas estuvieron afectados por el nivel de proteína de la dieta y por los niveles de inclusión de harina de soja y de harina de pluma. En el cultivo de astácidos, la pérdida de pinzas es frecuente y se encuentra estrechamente relacionada con el comportamiento agonístico (Nyström 1994). La deficiencia de nutrientes en la dieta provoca un incremento de las interacciones agresivas (Ackefors y Lindqvist 1994), probablemente debido a que conduce a un aumento de la tendencia al canibalismo y esto puede dar lugar a un incremento de la pérdida de pinzas.

Teniendo en cuenta las posibilidades de aplicación en los procesos productivos, nuestras investigaciones aportan resultados de gran utilidad para la mejora del cultivo de astácidos durante el primer periodo de alimentación externa, que podrían resumirse en los siguientes aspectos:

- a) Se define la formulación y composición analítica de diversas dietas prácticas, que pueden ser manejadas como un pienso comercial y utilizadas como único alimento durante el periodo inicial de cría de juveniles de astácidos.
- b) Usando harina de pescado como principal fuente proteica, un contenido de proteína bruta del 50% puede ser recomendado durante los primeros 100 días de cría.
- c) En una dieta con un contenido proteico del 50%, se puede sustituir hasta el 25% de la proteína de harina de pescado por proteína de

harina de soja sin afectar negativamente a la supervivencia ni al crecimiento de los juveniles.

d) Hasta el 35% de la proteína de harina de pescado puede ser sustituida por proteína de concentrado proteico de guisante.

e) Hasta el 45% de la proteína de pescado puede ser sustituida por proteína de harina de subproductos de pollo.

f) Hasta el 15% de la proteína de pescado puede ser reemplazada por proteína de harina de pluma.

Los conocimientos adquiridos durante el desarrollo de esta Tesis constituyen una sólida base para la continuidad en aquellas vías específicas encaminadas a la mejora de los procesos productivos que, a nuestro juicio, deberían orientarse en el futuro hacia los siguientes aspectos:

- Evaluar durante los primeros 80-100 días de alimentación externa posibilidades de sustitución de la proteína de pescado por otras

vegetales ó animales disponibles en el mercado.

- Determinar niveles óptimos de proteína de pescado a partir de los 100 días de cría.

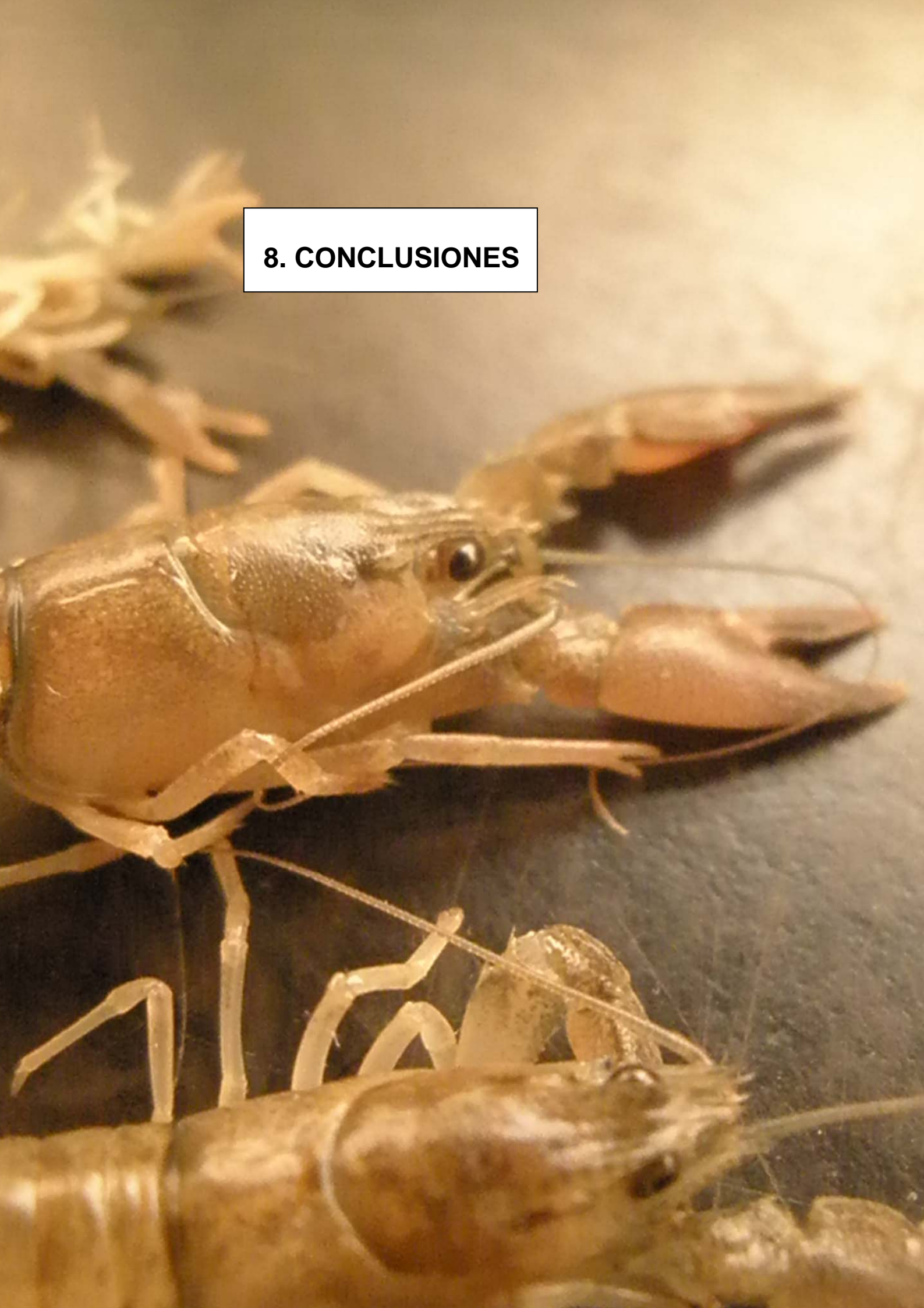
- Estudiar posibilidades de sustitución de la proteína de pescado a partir de los 100 días de cría.

- Considerar posibilidades de suplementar las dietas con los aminoácidos esenciales deficientes en las fuentes proteicas alternativas y de esta forma aumentar los niveles de sustitución de la proteína de pescado.

- Usando aceite de pescado como principal fuente lipídica, determinar niveles óptimos de lípidos en la dieta durante los primeros 80-100 días de alimentación externa.

- Valorar fuentes de lípidos alternativas al aceite de pescado durante el primer período de cría intensiva.

8. CONCLUSIONES





1.- La dieta práctica base aportada como único alimento durante los primeros 100 días de cría ha permitido alcanzar repetidamente tasas de supervivencia del 78% en los cangrejos agrupados y del 100% en los aislados individualmente, con un peso de 660 mg en el primer caso y de 1500 mg en el segundo. En todos los estudios, el peso final de los juveniles individualmente aislados fue aproximadamente el doble que el de los mantenidos en grupos.

2.- El porcentaje medio de cangrejos con pérdida de pinzas al final de los estudios (80 ó 100 días) fue aproximadamente un 7%, siendo afectado por el nivel de proteína de la dieta y los niveles de inclusión de harina de soja y de harina de pluma.

3.- Utilizando harina de pescado como fuente proteica, los juveniles alimentados con un 45% ó un 50% de proteína alcanzaron mayor crecimiento que los alimentados con menores niveles proteicos.

4.- La inclusión en la dieta de un 22,7% de harina de soja ha permiti-

do sustituir el 25% de la proteína de pescado sin afectar negativamente a la supervivencia ni al crecimiento. El aminoácido más limitante ha sido la metionina.

5.- Un 28,2% de concentrado proteico de guisante en la dieta ha permitido sustituir el 35% de la proteína de pescado. Los aminoácidos más limitantes han sido la metionina y la histidina.

6.- La incorporación de un 31,3% de harina de subproductos de pollo ha permitido sustituir el 45% de la proteína de pescado. El aminoácido más limitante ha sido la metionina.

7.- Los incrementos del nivel de inclusión de harina de subproductos de pollo en la dieta dieron lugar en los cangrejos a menores contenidos corporales de metionina, que se redujeron progresivamente desde 5,2% hasta 3%.

8.- La inclusión de un 8,2% de harina de pluma ha permitido reemplazar el 15% de la proteína de pescado. El aminoácido más limitante ha sido la metionina.

9. RESUMEN





La drástica reducción de las poblaciones sufrida durante las últimas cinco décadas debida a las devastadoras epizootias de afanomicosis, a la pérdida de hábitats y a la contaminación, ha originado un creciente interés por el desarrollo del cultivo de astácidos en Europa. Los sistemas son, generalmente, de tipo extensivo y, en el mejor de los casos, semiextensivo. En tales circunstancias, las diferentes etapas del proceso productivo están sujetas a factores ambientales de difícil control, con rendimientos bajos e impredecibles. Esto ha conducido en numerosos países al desarrollo de líneas de investigación para la intensificación y mejora de las distintas fases del cultivo.

En anteriores investigaciones llevadas a cabo por este grupo, se ha llegado a la puesta a punto de técnicas de gran valor aplicativo en la fase reproductiva y que abarcan maduración, apareamiento, oviposición, embriogénesis en incubación maternal y sistemas de incubación artificial, así como almacenamiento y transporte de huevos, todo ello orientado a la mejora de cada una de las etapas del largo proceso que culmina con la obtención de los juveniles estado 2.

Una vez que se ha logrado una aceptable eficiencia en la producción de juveniles, el siguiente paso ha de abordar la mejora de las tasas de supervivencia y de crecimiento de dichos animales. Dentro de ello, la alimentación constituye un factor que influye decisivamente sobre los resultados desde el inicio de la ingestión de alimento. La información disponible sobre nutrición en ástacidos es muy escasa. En condiciones controladas, se han utilizado alimentos de muy diversa naturaleza, solos o combinados y, considerando en conjunto todos los estudios, tras rebasar el período crítico de los 2-3 primeros meses de cría, los resultados no han sido satisfactorios. Recientemente, se

ha evidenciado que la suplementación con nauplios vivos de *Artemia* de una dieta seca para salmónidos mejora en gran medida la supervivencia y el crecimiento de los juveniles los tres primeros meses de cría. También se ha evidenciado que la suplementación con nauplios vivos puede ser sustituida por quistes decapsulados de *Artemia* en la misma cantidad, obteniéndose mayores valores de crecimiento y resultando además una alternativa menos costosa y laboriosa. Partiendo de estos avances, este grupo ha llegado a la formulación y elaboración de una dieta práctica específica para juveniles de astácidos, que ha permitido resultados aceptables y puede servir de base para estudios posteriores.

Tomando como referencia dicha dieta, y teniendo en cuenta que no se dispone de información acerca de niveles adecuados de macronutrientes para juveniles de astácidos, la finalidad de esta Tesis Doctoral es el estudio del contenido proteico de la dieta y la evaluación de posibilidades de sustitución del harina de pescado por fuentes alternativas de proteína durante los primeros 3 meses de alimentación externa. Los objetivos concretos son:

- Determinar niveles óptimos de proteína de harina de pescado en la dieta (publicación I).
- Evaluar posibilidades de sustitución de la proteína de pescado por proteína de soja (publicación I).
- Estudiar posibles sustituciones de la proteína de pescado por proteína de concentrado proteico de guisante (publicación II).
- Evaluar posibilidades de sustitución de la proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo (publicación III).
- Valorar posibilidades de sustitución de la proteína de pescado

por proteína de pluma (publicación IV).

Estos estudios se llevaron a cabo en las instalaciones y laboratorios de acuicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León a lo largo de cuatro años consecutivos. Para alcanzar los objetivos, el Ministerio de Ciencia e Innovación concedió una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (referencia AP2008-01009).

Se llevaron a cabo 5 experimentos: 3 de 100 días y 2 de 80 días, iniciados con juveniles estado 2 del astácido *Pacifastacus leniusculus*. Se utilizaron en total 6780 juveniles, obtenidos a partir de hembras portadoras de huevos procedentes de una astacifactoría. A finales del mes de noviembre o inicios de diciembre de cada año (aproximadamente 1 mes después de la ovoposición), las hembras ovígeras eran trasladadas al laboratorio, donde el desarrollo embrionario hasta la obtención de juveniles estado 2 tenía lugar en los pleópodos maternos (incubación maternal).

Para la elaboración de las dietas prácticas, se utilizó un molino rotatorio BRABENDER para la molienda, una mezcladora STEPHAN UMC5 para mezclar los ingredientes molidos y una extrusora BRABENDER KE19/25D para someter la mezcla a un proceso de extrusión. El alimento era aportado manualmente una vez al día, en cantidad suficiente para que resultara ligeramente en exceso (3% del peso vivo).

Estudio I (Publicación I: *Aquaculture* 364-365, 2012). El primer objetivo de este estudio fue determinar un contenido proteico apropiado para los primeros meses de cría utilizando harina de pescado como fuente de proteína. Este es el principal ingredien-

te proteico en acuicultura. Sin embargo, la insostenible presión de pesca sobre las poblaciones salvajes, así como los elevados precios derivados de la creciente demanda de harina de pescado, hacen inviable mantener sus actuales niveles de inclusión en las dietas. Derivado de esta problemática, el segundo propósito de este estudio consistió en evaluar la soja como fuente alternativa de proteína.

En el Experimento I.1, se evaluaron los efectos sobre la supervivencia y el crecimiento de cuatro dietas prácticas con diferente contenido proteico (35%, 40%, 45% y 50%). Cada dieta fue probada durante 100 días en tres tanques con animales agrupados y diez tanques con animales individualmente aislados. En los animales mantenidos en grupos, las tasas finales de supervivencia no mostraron diferencias significativas, con valores en torno al 76%. En los animales aislados individualmente, la supervivencia se redujo significativamente desde el 100% con los niveles de 45% y 50% de proteína hasta el 70% con el nivel de 35% de proteína. En cuanto al crecimiento, no hubo diferencias significativas entre los cangrejos alimentados con 45% y 50% de proteína (media de agrupados y aislados: 14,59 mm LC y 693 mg P). Con niveles de proteína inferiores (35% y 40%), todos los valores de crecimiento se redujeron significativamente. En consecuencia, un contenido de proteína bruta del 50% puede ser recomendado durante los primeros 100 días de cría.

En el Experimento I.2, se formularon y prepararon cuatro dietas prácticas para probar diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de soja: 0% (control), 25%, 35% y 45% de sustitución, correspondientes a 0%, 22,7%, 31,8% y 40,7% de harina de soja en dieta, respectivamente. Cada dieta fue probada en tres tanques con juveniles agrupados durante los primeros 100

días de alimentación externa. Las mayores tasas de supervivencia (media: 74%) y de crecimiento (media: 14,49 mm LC y 651,9 mg P) se alcanzaron con el 0% de sustitución sin diferencias significativas respecto a la sustitución del 25%. Con niveles de sustitución mayores (35% y 45%), todos los valores de supervivencia y de crecimiento fueron significativamente menores. El aminoácido más limitante fue la metionina. Los resultados muestran que, en una dieta con un contenido proteico del 50%, es posible sustituir hasta el 25% de la proteína de harina de pescado por proteína de harina de soja sin afectar negativamente a la supervivencia ni al crecimiento de los juveniles.

Estudio II (Publicación II: Aquaculture 388-391, 2013). Dentro de las fuentes proteicas de origen vegetal, se encuentran los guisantes, que son producidos en grandes cantidades en todo el mundo. Recientes avances en la tecnología de procesamiento han proporcionado varios productos, como el concentrado de proteína de guisante, que ya está siendo utilizado o considerado para su uso en alimentos para diferentes peces pero no ha sido probado en crustáceos. En el Experimento II.1, se evaluaron los efectos de cuatro dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante: 0% (control), 25%, 35% y 45% de sustitución, que correspondían a 0%, 20,2%, 28,2% y 35,5% de concentrado proteico de guisante en dieta, respectivamente. Cada dieta fue probada durante 100 días en tres tanques con animales agrupados y diez tanques con animales individualmente aislados. Las tasas de supervivencia (media agrupados: 77,2%, media aislados: 90%) y de crecimiento (media de agrupados y aislados: 14,44 mm LC, 674,9 mg P) de los juveniles alimentados con la dieta control (0% de sustitución), 25% y 35% de sustitución no mostraron diferencias significativas.

Con el 45% de sustitución de proteína de pescado por proteína de guisante, tanto la supervivencia como el crecimiento se vieron afectados negativamente. Los aminoácidos más limitantes fueron la metionina y la histidina. Este estudio demuestra que hasta el 35% de la proteína de harina de pescado puede ser sustituida por proteína de concentrado proteico de guisante en dietas para juveniles de astácidos durante el primer periodo de cría.

Estudio III (Publicación III: Aquaculture 404-405, 2013). La harina de subproductos de pollo es considerada como una fuente de proteína interesante para crustáceos, debido a su bajo precio, alta calidad nutritiva y digestibilidad cercana a la de la harina de pescado. En el Experimento III.1, se evaluaron seis dietas prácticas con diferentes niveles de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo: 0% (control), 15%, 25%, 35%, 45% y 55% de sustitución, correspondientes a 0%, 10,5%, 17,7%, 24,4%, 31,3% y 38,2% de harina de subproductos de pollo en dieta, respectivamente. Cada dieta fue probada durante 80 días en tres tanques con animales agrupados y diez tanques con animales individualmente aislados. No hubo diferencias significativas entre las tasas de supervivencia de los juveniles agrupados alimentados con la dieta control (0% de sustitución) y los alimentados con las dietas que contenían hasta un 45% de sustitución (media: 74,9%). La supervivencia de los juveniles agrupados alimentados con la dieta con el mayor nivel de sustitución de proteína de pescado por proteína de subproductos de pollo (55%) fue significativamente menor (63,0%). En el caso de los cangrejos individualmente aislados, las dietas probadas no tuvieron efectos significativos sobre la supervivencia (media: 98,3%). En cuanto al crecimiento, no hubo diferencias signi-

ficativas entre los juveniles alimentados con las dietas con 15%, 25%, 35% y 45% de sustitución de la proteína de pescado y los alimentados con la dieta control (promedio de los cangrejos agrupados y aislados: 13,2 mm LC y 555 mg P). Los juveniles alimentados con la dieta con 55% de sustitución presentaron un menor ritmo de crecimiento y un contenido corporal de metionina significativamente inferior al de los juveniles alimentados con la dieta control. El aminoácido más limitante fue la metionina. Puede concluirse que hasta un 45% de la proteína de pescado puede ser sustituida por proteína de harina de subproductos de pollo sin afectar al rendimiento.

Estudio IV (Publicación IV: Aquaculture Nutrition doi: 10.1111/anu.12044, 2013). La harina de pluma es un ingrediente económico con un creciente uso en alimentos para animales acuáticos. Con la finalidad de evaluar la capacidad de esta harina para reemplazar la proteína de pescado en juveniles de astácidos, se prepararon cuatro dietas prácticas con diferente nivel de sustitución de la proteína de pescado por proteína de pluma: 0% (control), 15%, 25% y 35% de sustitución, que correspondían a 0%, 8,2%, 13,7% y 19,2% de harina de pluma en dieta, respectivamente. Cada dieta fue probada durante 80 días en tres tanques con animales agrupados y 10 tanques con animales aislados individualmente. Las tasas de supervivencia (media agrupados: 76,3%; media aislados: 100%) y de crecimiento (media agrupados y aislados: 13,58 mm LC, 523,2 mg P) de los juveniles alimentados con la dieta control (0% de sustitución) y el 15% de sustitución de proteína de pescado por proteína de pluma no mostraron diferencias significativas. La supervivencia y el crecimiento de los juveniles alimentados con dietas con niveles de sustitución más altos (25% y 35%) fueron significativamente menores. El

aminoácido más limitante fue la metionina. Así, este estudio muestra que es posible sustituir hasta un 15% de la proteína de pescado por proteína de harina de pluma.

Considerando en conjunto los porcentajes de supervivencia en nuestros experimentos, los valores fueron elevados (en torno al 74% en juveniles agrupados y al 90% en aislados individualmente), encontrándose en el rango de los más altos conseguidos. El nivel de proteína de la dieta y los contenidos de harina de soja, concentrado proteico de guisante, harina de subproductos de pollo y harina de pluma afectaron a las tasas de supervivencia, que se redujeron significativamente con niveles de proteína inferiores al 45% y con niveles de inclusión iguales o superiores a 31,8% de harina de soja, 35,5% de concentrado proteico de guisante, 38,2% de harina de subproductos de pollo y 13,7% de harina de pluma.

En lo referente al crecimiento, estuvo afectado por el contenido proteico de la dieta y por los niveles de inclusión de harina de soja, concentrado proteico de guisantes, harina de subproductos de pollo y harina de pluma. Además, cabe destacar el hecho de que en todos los estudios, independientemente de la dieta probada, el peso de los juveniles aislados individualmente fue aproximadamente el doble que el de los mantenidos en grupos.

Los porcentajes de animales con una sola pinza o sin pinzas fueron bajos, en torno al 7%, y estuvieron afectados significativamente por el nivel de proteína de la dieta y por los niveles de inclusión de harina de soja y de harina de pluma.

Cara a las posibilidades de aplicación en los procesos productivos, nuestras investigaciones aportan resultados de gran utilidad para la mejora del cultivo de astácidos durante el primer periodo de alimentación externa, que es el más crítico. En primer lugar, se define la formulación y composición analítica de diversas dietas prácticas, que pueden ser manejadas como un pienso comercial y utilizadas como único alimento durante el periodo inicial de cría. Con harina de pescado como principal fuente proteica de la dieta, un contenido de proteína bruta del 50% puede ser recomendado para los primeros meses de alimentación externa. Referente a las posibilidades de utilización de fuentes alternativas de proteína, la inclusión en dieta de un 22,7% de harina de soja permite

sustituir hasta el 25% de la proteína de harina de pescado, la inclusión de un 28,2% de concentrado proteico de guisante permite reemplazar hasta el 35% de la proteína de pescado, la inclusión de un 31,3% de harina de subproductos de pollo permite sustituir hasta el 45% de la proteína de harina de pescado y la inclusión de un 8,2% de harina de pluma permite reemplazar hasta el 15% de la proteína de harina de pescado.

Cabe concluir que los conocimientos adquiridos a lo largo del período experimental contribuyen en gran medida a mejorar el cultivo de juveniles de astácidos durante el primer periodo de cría y constituyen una sólida base para el desarrollo de futuras líneas de investigación en estos animales.



10. SUMMARY



The drastic reduction of wild populations during the last five decades due to crayfish plague, loss of habitat and pollution, has led to a growing interest on development of astacid crayfish culture in Europe. Culture systems are generally extensive or in the best case semiextensive. In such circumstances, the different phases of the productive process are subjected to uncontrolled factors, resulting in a low and unpredictable yield. This has led to the development of research lines in several countries to intensify and improve the culture.

In previous research, this team has developed applied techniques in the reproductive phase, covering maturation, mating, spawning, embryogenesis in maternal incubation, artificial incubation systems, as well as egg transport and storage, with the aim to improve each phase of this long process which ends with the production of stage 2 juvenile.

Once obtained acceptable efficiency in juvenile production, the next step is focused on the increase of juvenile survival and growth. Feeding is an essential factor which influences the results from the onset of exogenous feeding. Currently, there is scarce knowledge on astacid crayfish nutrition. In previous studies carried out under controlled conditions, a wide variety of foods, either alone or combined, has been used, and after the first 2-3 months of rearing the results have not been satisfactory. Recently, it has been shown that the supplementation a dry diet for salmonids with live *Artemia* nauplii greatly improves the survival and growth of juvenile after the first three months of rearing. It also has been demonstrated that supplementation with live nauplii can be replaced by decapsulated *Artemia* cysts in the same amount, being less expensive and laborious, and leading to greater values of growth. Based on these findings, our research group has

formulated and developed a specific practical diet for juvenile astacid, which allows for acceptable results and can be a basis for further studies. Drawing on this diet, and taking into account that there is not information about appropriate levels of macronutrients for juvenile astacids, the purpose of this thesis is to determine the optimal protein content of the diet and to evaluate the possibilities of replacement of fishmeal by alternative protein sources during the first 3 months of exogenous feeding. The specific objectives are:

- Determining optimal levels of fish meal protein in the diet (publication I).
- Evaluating substitution possibilities of fish protein by soy protein (publication I).
- Studying substitution possibilities of fish protein by pea protein concentrate (publication II).
- Evaluating potential substitution of fish protein by poultry by-product protein (publication III).
- Assessing substitution possibilities of fish protein by feather protein (publication IV).

These studies were carried out in the aquaculture facilities and laboratories of the Animal Production Department at the University of León, over four consecutive years. To achieve the objectives, the Ministerio de Ciencia e Innovación awarded a grant of the Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (reference AP2008-01009).

Five experiments, starting with stage 2 juveniles of the astacid *Pacifastacus leniusculus*, were carried out: 3 of 100 days and 2 of 80 days. A total of 8,760 juveniles, obtained from ovigerous females from a crayfish farm, were used. Every year, in late

November or early December (about 1 month after oviposition), ovigerous females were brought to our facilities, where the embryonic development took place in the maternal pleopods until obtaining stage 2 juveniles (maternal incubation).

For the elaboration of the practical diets, the grinding was performed in a BRABENDER rotary mill. Ingredients were mixed in a STEPHAN UMC5 mixer and extruded using a BRABENDER KE19/25D stand-alone extruder. The ration was manually supplied once a day in slight excess (3% of body weight).

Study I (Publication I: Aquaculture 364-365, 2012). The first objective of this study was to determine appropriate protein content for the early months of rearing using fish meal as a protein source. This is the main protein ingredient used in aquaculture. However, the non-sustainability of the fisheries pressure on wild stocks to cover the increasing demand of fish meal and the rising prices of fish meal derived from its growing demand make fish meal less feasible to use at current inclusion recommended levels. Derived from this problem, the second purpose of this study was to evaluate soybean as an alternative protein source.

In the Experiment I.1, the effects on survival and growth of four practical diets with different protein content (35%, 40%, 45% and 50%) were evaluated. Each diet was tested for 100 days in three tanks with grouped crayfish and ten tanks with individually isolated crayfish. Diets tested had no significant effects on survival of grouped crayfish (average: 76%). Isolated crayfish fed 50% or 45% dietary protein achieved the highest survival (100%), and survival rates were reduced significantly with decreased protein contents (until 70% survival with 35% dietary protein). Regarding growth, there were no

significant differences between crayfish fed the diets with 45% or 50% protein (average grouped and isolated crayfish: 14.59 mm CL and 693 mg W). Lower protein contents (40% or 35%) enabled significantly lower growth. Consequently, a level of 50% dietary protein can be recommended during the first 100 days of intensive rearing.

In the Experiment I.2, four diets were formulated and prepared to test different replacement levels of fish protein by soybean protein: 0% (control), 25%, 35% or 45%, corresponding to 0%, 22.7%, 31.8% or 40.7% dietary soybean meal, respectively. Each diet was tested during the first 100 days of exogenous feeding in three tanks with grouped crayfish. The highest rates of survival (average: 74%) and growth (average: 14.49 mm CL and 651.9 mg W) were obtained with 0% replacement of fish meal protein by soybean meal protein without significant differences from the 25% replacement. With higher replacement levels (35% or 45%), all survival and growth values were significantly lower. The most limiting amino acid was the methionine. The results show that in a diet with a protein content of 50%, it is possible to replace up to 25% of fish meal protein by soybean meal protein without adverse effects on the survival or growth of juveniles.

Study II (Publication II: Aquaculture 388-391, 2013). Among the vegetable protein sources are peas, which are produced in significant quantities throughout the world. Recent advances in processing technology have provided several products, as pea protein concentrate, which is already being used or considered for use in feedstuffs for different fish but it has not been tested in crustaceans. In the Experiment II.1, four practical diets were prepared to evaluate the effects of different replacement levels of fish

protein by pea protein: 0% (control), 25%, 35% or 45%, corresponding to 0%, 20.2%, 28.2% or 35.5% dietary pea protein concentrate, respectively. Each diet was tested for 100 days in three tanks with grouped crayfish and ten tanks with individually isolated crayfish. The final survival rates (average grouped: 77.2%, average isolated: 90%) and growth (average grouped and isolated: 14.44 mm CL, 674.9 mg W) of juvenile crayfish fed the control diet (0% substitution), 25% or 35% replacement did not show significant differences. With the highest replacement level of fish protein by pea protein (45%) both survival and growth were negatively affected. The most limiting amino acids were methionine and histidine. This study shows that up to 35% of fish meal protein can be replaced by pea protein concentrate in diets for juvenile astacid during the first period of rearing.

Study III (Publication III: Aquaculture 404-405, 2013). Poultry by-product meal is considered as an interesting alternative protein source for crustaceans because of its price, nutritive quality and a digestibility close to that of fish meal. In the Experiment III.1, six diets were prepared to test different levels of replacement of fish protein by poultry by-product protein: 0% (control), 15%, 25%, 35%, 45% or 55%, corresponding to 0%, 10.5%, 17.7%, 24.4%, 31.3% or 38.2% dietary poultry by-product meal, respectively. Each diet was tested during 80 days on three tanks with grouped crayfish and ten tanks with individually isolated crayfish. There were no significant differences in survival among grouped crayfish fed the control diet (0% replacement) and those fed replacement levels up to 45% (average: 74.9%). Survival of grouped crayfish fed the highest replacement level (55%) was significantly lower (63.0%). In the case of isolated crayfish, diets tested had no significant effects on survival (average: 98.3%). In terms of growth,

there were no significant differences among crayfish fed the diets with 15%, 25%, 35% or 45% replacement of fish protein and those fed the control diet (average of grouped and isolated crayfish: 13.2 mm CL and 555 mg W). Juveniles fed 55% replacement grew slower and had a methionine content significantly lower than those fed the control diet. The most limiting amino acid was the methionine. It can be concluded that up to 45% of the fish protein can be replaced by poultry by-product meal without affecting performance.

Study IV (Publication IV- Aquaculture Nutrition doi: 10.1111/anu.12044, 2013). Feather meal is an economical protein ingredient with increasing use in aquafeeds. In order to assess the ability of this meal to replace the fish protein in astacid juveniles, four practical diets with different replacement level of fish protein by feather protein were prepared: 0% (control), 15%, 25% or 35%, corresponding to 0%, 8.2%, 13.7% or 19.2% dietary feather meal, respectively. Each diet was tested during 80 days on three tanks with grouped crayfish and ten tanks with individually isolated crayfish. The final survival rates (average grouped: 76.3%, average isolated: 100%) and growth (average grouped and isolated: 13.58 mm CL, 523.2 mg W) of juvenile crayfish fed the control diet (0% replacement) or 15% replacement of fish protein by feather protein did not show significant differences. With higher replacement levels (25% or 35%) both survival and growth were significantly lower. The most limiting amino acid was the methionine. Thus, this study shows that it is possible to replace up to 15% of fish protein by feather meal protein.

Considering all survival rates of our studies, values were high (around 74% in grouped crayfish and 90% in individually isolated), being in the range of the highest achieved. The dietary protein and the content of soybean meal, pea protein concentrate, poultry by-product meal and feather meal have affected survival rates, which were significantly reduced with protein levels below 45% and inclusion levels equal or above to 31.8% soybean meal, 35.5% pea protein concentrate, 38.2% chicken by-product meal and 13.7% feather meal.

Regarding growth, it was affected by the protein content of the diet and the inclusion levels of soybean meal, pea protein concentrate, poultry by-product meal and feather meal. Furthermore, it is remarkable that in all studies, regardless the diet provided, the weight of individually isolated crayfish was approximately twice than that of grouped crayfish.

Percentages of crayfish lacking chelipeds were low, around 7%, and they were significantly affected by the protein level and the inclusion level of soybean meal and feather meal.

Taking in mind the application possibilities in culture, our research provide valuable results for the improvement of astacid culture during the first period of exogenous feeding, which is the most critical. Firstly, it was defined the formulation and analytical composition of different practical diets that can be managed as a commercial feedstuff and used as the only food during the initial period of rearing. With fish meal as the main protein source of the diet, a dietary protein content of 50% can be recommended for the first months of exogenous feeding. Regarding the potential use of alternative protein sources, the inclusion in diet of 22.7% of soybean meal makes it possible replace up to 25% of fish meal protein, including

28.2% of pea protein concentrate it can replace up to 35% of fish protein, the inclusion of 31.3% of poultry by-product meal can replace up to 45% of the protein flour fish and the inclusion of 8.2% of feather meal can replace up to 15% of fish meal protein.

It can be concluded that the knowledge acquired throughout the experimental period greatly contribute to improving juvenile astacid culture during the first period of rearing and it provides a solid basis for the development of future research in these animals.

11. BIBLIOGRAFÍA





- Abrahamsson, S.A., Goldman, C.R., 1970. Distribution, density and production of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in Lake Tahoe, California-Nevada. **Oikos** **21**, 83-91.
- Abrahamsson, S.A., 1971. Density, growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. **Oikos** **22**, 363-380.
- Ackefors, H., Gydemo, R., Westin, L., 1989. Growth and survival of juvenile crayfish, *Astacus astacus*, in relation to food and density. En: Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (Eds.), **Aquaculture: A Biotechnology in Progress**. European Aquaculture Society, Bredene, pp. 365-373.
- Ackefors, H., Castell, J.D., Boston, L.D., Rätty, P., Svensson, M., 1992. Standard experimental diets for crustacean nutrition research. II.- Growth and survival of juvenile crayfish *Astacus astacus* (Linné) fed diets containing various amounts of protein, carbohydrate and lipid. **Aquaculture** **104**, 341-356.
- Ackefors, H., Lindqvist, O.V., 1994. Cultivation of freshwater crayfishes in Europe. En: Huner, J.V. (Ed.), **Freshwater Crayfish Aquaculture**. The Haworth Press, Binghamton, New York, pp. 157-216.
- Ackefors, H., Gydemo, R., Keyser, P., 1995. Growth and moulting in confined juvenile noble crayfish *Astacus astacus* (L.) (Decapoda: Astacidae). **Freshwater Crayfish** **10**, 396-409.
- Ackefors, H., 1996. The development of crayfish culture in Sweden during the last decade. **Freshwater Crayfish** **11**, 627-654.
- Alam, M.S., Teshima, S., Ishikawa, M., Hasegawa, D., Koshio, S., 2004. Dietary arginine requirement of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate). **Aquac. Res.** **35**, 99-105.
- Arrignon, J., 1981. **L'écrevisse et son élevage**. Gauthier-Villars, Paris, 178 p.
- Arrignon, J., 1989. *Pacifastacus leniusculus*, étude des bases techniques de production en picardie. **L'Astaciculteur de France** **21**, 28-29.
- Ashmore, S.B., Stanley R.W., Moore, L.B., Malecha, S.R., 1985. Effect on growth and apparent digestibility of diets varying in grain source and protein level in *Macrobrachium rosenbergii*. **J. World Aquacult. Soc.** **16**, 205-216.
- Bautista-Teruel, M.N., Eusebio, P.S., Welsh, T.P., 2003. Utilization of feed pea *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture** **225**, 121-131.
- Blake, M., Nyström, P., Hart, P., 1994. The effect of weed cover on juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) exposed to adult crayfish and non-predatory fish. **Annales Zoologici Fennici** **31**, 297-306.
- Borlongan, I.G., Eusebio, P.S., Welsh, T., 2003. Potential of feed pea (*Pisum sativum*) meal as a protein source in practical diets for milkfish (*Chanos chanos*). **Aquaculture** **225**, 89-98.
- Brown P.B., Kaushik S.J., Peres H., 2008. Protein feedstuffs originating from soybeans. En: Lim, C., Webster, C.D., Lee, C. (Eds.), **Alternative**

- protein sources in aquaculture diets.** The Haworth Press, New York, pp. 205-223.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Bedan, D.J., Simmons, L.A., Azevedo, P.A., Cho, C.Y., 2000. Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. **Aquaculture** **181**, 281–291.
- Carral, J.M., Celada, J.D., Gonzalez, J., Gaudioso, V.R., Fernandez, R., Lopez-Baisson, C., 1992. Artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) from early stages of embryonic development. **Aquaculture** **104**, 261-269.
- Carral, J.M., Celada, J.D., González, J., Sáez-Royuela, M., Gaudioso, V.R., 1994. Mating and spawning of freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) under laboratory conditions. **Aquacult. Fish. Manage.** **25**, 721-727.
- Carral, J.M., Celada, J.D., Muñoz, R., Sáez-Royuela, M., Pérez, J.R., 2000. Effects of the presence or absence of males throughout spawning and maternal incubation on the reproductive efficiency of astacid crayfish (*Austropotamobius pallipes*) under controlled conditions. **Invertebr. Reprod. Dev.** **38**, 1-5.
- Carral, J.M., Pérez, J.R., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., Melendre, P.M., Aguilera, A., 2004. Effects of dead egg removal frequency on stage 2 juvenile production in artificial incubation of *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. **Bull. Fr. Pêche Piscic.** **372-373**, 425-430.
- Carral, J.M., González, A., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., Melendre, P.M., González, R., García, V., 2009. Antifungal treatments in artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae): Searching for alternatives to formaldehyde. **Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems** **394-395**, 16.
- Carral, J.M., González, Á, Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., García, V., González, R., 2011. Proposal of a practical diet for juvenile astacid crayfish studies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. **Knowl. Manag. Aquat. Ec.** **401**, 20.
- Carter, C.G., Hauler, R.C., 2000. Fish meal replacement by plants meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Aquaculture** **185**, 299-311.
- Celada, J.D., Gaudioso, V.R., Paz, P., Fernandez, R., 1985. Identification et chronologie des phases de développement des oeufs de l'écrevisse (*Pacifastacus leniusculus* Dana) par observation directe. **La Pisciculture Française** **82**, 5-8.
- Celada, J.D., Paz, P., Gaudioso, V.R., Fernandez, R. 1987. Embryonic development of the freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana): a scanning electron microscopic study. **The Anat. Rec.** **219**, 304-310.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudioso, V.R., Temiño, C., Fernández, R., 1988. Effects of thermic manipulation throughout egg development on the reproductive efficiency of the freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana). **Aquaculture** **72**, 341-348.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudioso, V.R., Temiño, C., Fernández R., 1989. Response of juvenile

- freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) to several fresh and artificially compounded diets. **Aquaculture** **76**, 67-78.
- Celada, J.D., Carral, J.M., González, J., 1991. A study on the identification and chronology of the embryonic stages of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858). **Crustaceana** **61(3)**, 225-232.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudioso, V., Gonzalez, J., López-Baisson, C., Fernández, R., 1993. Survival and growth of juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) fed two raw diets and two commercial formulated feeds. **Journal of the World Aquaculture Society** **24(1)**, 108-111.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Gaudioso, V.R., Muñoz, M.C., Pérez, J.R., 1994. Investigación sobre cangrejos de río en la Universidad de León. **Anales de la Facultad de Veterinaria** **38**, 55-70.
- Celada, J.D., González, J., Carral, J.M., Fernández, R., Pérez, J.R., Sáez-Royuela, M., 2000. Storage and transport of embryonated eggs of the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. **N. Am. J. Aquac.** **62**, 308-310.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Saez-Royuela, M., Muñoz, C., Perez, J.R., 2001. Effects of different thermal treatments on the maternal incubation efficiency of the astacid crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) under controlled conditions. **Aquaculture** **74**, 801-808.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Melendre, P.M., Aguilera, A., 2004. Effects of different antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs. **Aquaculture** **239**, 249-259.
- Celada, J.D., Antolín, J.I., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Rodríguez, R., 2005. Successful sex ratio 1M:4F in the astacid crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana under captive breeding conditions. **Aquaculture** **244**, 89-95.
- Celada, J.D., Antolín, J.I., Carral, J.M., Pérez, J.R., Sáez-Royuela, M., 2006. Reproductive efficiency of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) at different densities under both culture and laboratory conditions. **Aquaculture** **252**, 298-304.
- Celada, J.D., Fuertes, J.B., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González, Á., González-Rodríguez, Á., 2013. Effects of vitamin C inclusion in practical diets on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. **Aquacult. Nutr.** **19**, 110-116.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P., 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. **Anal Biochem.** **211(2)**, 279-87.
- Cohen, S.A., De Antonis, K.M., 1994. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. **Journal of Chromatography A** **661 (1-2)**, 25-34.

- Crandal, K., Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae - Decapoda) in freshwater. **Hydrobiologia** **595**, 295-301.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., McCallum, I.M., Hickling, D., 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). **Aquaculture** **196**, 87-104.
- Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., Scholz, U., Ricque-Marie, D., 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. **Aquaculture** **272**, 466-476.
- Cukerzis, J.M., Sheshtokas, J., Terentyev, A.L., 1979. Method for accelerated artificial breeding of crayfish juveniles. **Freshwater Crayfish** **4**, 451-458.
- Cukerzis, J.M., 1988. *Astacus astacus* in Europe. En: Holdich, D.M., Lowery, R.S. (Eds.) **Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation**. Croom Helm, London, pp. 309-340.
- D'Abramo, L.R., Wright, J.S., Wright, K.H., Bordner, C.E., Conklin, D.E., 1985. Sterol requirements of cultured juvenile crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Aquaculture** **49**, 245-255.
- D'Abramo, L.R., Robinson, E.H., 1989. Nutrition of crayfish. **Critical Reviews in Aquatic Sciences** **1(4)**, 711-728.
- D'Abramo, L.R., Castell, J.D., 1997. Research methodology. En: D'Abramo L.D., Conklin D.E., Akiyama D. (Eds.), **Crustacean nutrition**. Advances in World Aquaculture 6, World Aquaculture Society. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA., pp 3-25.
- Davies, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I.M., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. **Aquac. Nutr.** **8**, 87-94.
- Davis, K.B., 2006. Management of physiological stress in fin-fish aquaculture. *N. Am. J. Aquacult.* **68**, 116-121.
- De Luise, G., Sabbadini, A., 1988. Freshwater crayfish culture: rearing and production of *Austropotamobius pallipes italicus* (Faxon) for stocking purposes. **Freshwater Crayfish** **7**, 267-270.
- Dong, F.M., Hardy, R.W., Haard, N.F., Barrows, F.T., Rasco, B.A., Fairgrieve, W.T., Foster, I.O., 1993. Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. **Aquaculture** **116**, 149-158.
- Du, L., Niu, C.J., 2003. Effects of dietary substitution of soya bean meal for fish meal on consumption, growth, and metabolism of juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquacult.Nutr.** **9**, 139-143.
- Eusebio, P.S., 1991. Effect of dehulling on the nutritive value of some leguminous seeds as protein sources for tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Aquaculture** **99**, 297-308.

- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), 1988. **History of aquaculture.** En: [http://www.fao.org/docrep/field/009/ag158e/AG158E00.htm#TOC.ASEAN/UNDP/FAO Regional Small-Scale Coastal Fisheries Development Project](http://www.fao.org/docrep/field/009/ag158e/AG158E00.htm#TOC.ASEAN/UNDP/FAO%20Regional%20Small-Scale%20Coastal%20Fisheries%20Development%20Project). Manila, Filipinas.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), 2009. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2008 (SOFIA).** FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), 2012. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura.** FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Fornshell, G., Hinshaw, J. M., 2009. Better Management Practices for Flow-Through Aquaculture Systems. En: Tucker, C. S., Hargreaves, J. A. (Eds), **Environmental Best Management Practices for Aquaculture.** Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 231-288.
- Fowler, L.G., 1990. Feather meal as a dietary protein source during parr-smolt transformation in fall chinook salmon. **Aquaculture** **89**, 301-314.
- Fowler, L.G., 1991. Poultry by-product meal as a dietary protein source in fall Chinook salmon diets. **Aquaculture** **99**, 309-321.
- Fox, J.M., Lawrence, A.L., Li-Chan, E., 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. **Aquaculture** **131**, 179-190.
- García-Ulloa, G.M., López-Chavarín, H.M., Rodríguez-González, H., Villarreal-Colmenares, H., 2003. Growth of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens 1868) (Decapoda: Parastacidae) juveniles fed isoproteric diets with partial or total substitution of fish meal by soy bean meal: preliminary study. **Aquac. Res.** **9**, 25-29.
- Garza de Yta, A., Davis, D.A., Rouse, D.B., Ghanawi, J., Salud, I.P., 2012. Evaluation of practical diets containing various terrestrial protein sources on survival and growth parameters of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Aquac. Res.** **43**, 84-90.
- Gatlin, D.M., Barrows, F., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquac. Res.** **38**, 551-579.
- Gherardi, F., Holdich, D.M., 1999. Crayfish in Europe as alien species. **Crustacean Issues** **11**. AA. Balkema, Rotterdam, pp 299.
- Gherardi, F., 2011. Towards a sustainable human use of freshwater crayfish (Crustacea, Decapoda, Astacidea). **Knowl. Managt. Aquatic. Ecosyst.** **401**, 2.
- González, J., Carral, J.M., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., Gaudioso, V.R., Fernández, R., López-Baissón, C., 1993. Management of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) for intensification of juvenile production. **Freshwater Crayfish** **9**, 144-146.
- González A., Celada J.D., González R., García V., Carral J.M., Sáez-Royuela M., 2008. *Artemia* nauplii and two commercial replacements

- as dietary supplement for juvenile signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), from the onset of exogenous feeding. **Aquaculture** **281**, 83-86.
- González Á., Celada J.D., González R., García V., Carral J.M., Sáez-Royuela M., 2010. Increasing density in artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). **Freshwater Crayfish** **17**, 19-21.
- González Á., Celada J.D., Melendre P.M., Carral J.M., Sáez-Royuela M., González R., García V., 2011a. Effects of different bronopol treatments on final survival rates in the artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). **Aquac. Res.** **44**, 354-358.
- González, Á., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., García, V., González, R., 2011b. Additional supply of decapsulated *Artemia* cysts for various periods in intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). **Knowl. Manag. Aquat. Ec.** **401**, 15.
- González, Á., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., García, V., González, R., 2012a. Effects of live *Artemia* nauplii supplementation for different periods on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) in the first six months of intensive culture. **N. Am. J. Aquacult.** **74**, 34-38.
- González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., González, R., Carral, J.M., García, V., 2012b. Response of juvenile astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) to three commercial dry diets with different protein levels during the first 6 months of intensive rearing. **Aquac. Res.** **43**, 99-105.
- González, R., Celada, J.D., Carral, J.M., González, Á., Sáez-Royuela, M., García, V., 2009. Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different feed supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. **Aquaculture** **295**, 200-204.
- González, R., Celada, J.D., González, A., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2010. Stocking density for the intensive rearing of juvenile crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), using *Artemia* nauplii to supplement a dry diet from the onset of exogenous feeding. **Aquacult. Int.** **18**, 371-378.
- González, R., Celada, J. D., García, V., Carral, J. M., González, Á., Sáez-Royuela, M., 2011a. Shelter and lighting in the intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. **Aquac. Res.** **42**, 450-456.
- González, R., Celada, J. D., Carral, J. M., García, V., Sáez-Royuela, M., González, Á., 2011b. Intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) during the first 6 months: effects of size grading. **Aquac. Res.** **42**, 1385-1392.
- Gouveia, A., Davies, S.J., 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture** **182**, 183-193.
- Gydemo, R., Westin, L., 1989. Growth and survival of juvenile *Astacus*

- astacus* L. in optimized water temperature. En: Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (Eds.), **Aquaculture: A Biotechnology in Progress**. European Aquaculture Society, Bredene, pp 383-391.
- Hannesson, R., 2003. Aquaculture and fisheries. **Marine Policy** **27**, 169-178
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquac. Res.** **41**, 770-776.
- Henttonen, P., Huner, J.V., Lindqvist, O.V., Henttonen, L., Pitkäniemi, J., 1993. Moulting, growth, survival and colour of *Astacus astacus* (L.) juveniles fed diets with and without green plant material and maintained in individual cages and communal tanks. **Freshwater Crayfish** **9**, 426-441.
- Hobbs, H.H. Jr., Jass, J.P., Huner, J.V., 1989. A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American Species (Decapoda, Cambaridae). **Crustaceana**, **56** (3), 299-316.
- Hofmann, J., 1978. **Cangrejos de río**. Compañía Editorial Continental, Barcelona.
- Hogger, J.B., 1986a. A report of some of the first introductions of *Pacifastacus leniusculus* into the UK. **Freshwater Crayfish** **6**, 134-145.
- Hogger, J.B., 1986b. Aspects of the introduction of "signal crayfish" *Pacifastacus leniusculus* (Dana), into the southern United Kingdom.1. Growth and survival. **Aquaculture** **58**, 27-44.
- Holdich, D.M., 2002. Background and functional morphology. En: Holdich, D.M. (Ed.), **Biology of freshwater crayfish**. Blackwell Sciences Ltd, Oxford, pp. 3-29.
- Huner, J.V., 2002. *Procambarus*. En: Holdich, D.M. (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Blackwell Sciences Ltd, Oxford, pp. 541-584.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1973. Determination of lipids content (R-1443). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1978. Determination of nitrogen content (R-937). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1979. Determination of moisture content (R-1442). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998a. Determination of ash content (R-936). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998b. Determination of gross caloric value: bomb calorimeter method (9831). Geneva, Switzerland.
- Järvenpää, T., 1995. Artificial incubation of crayfish eggs on moving tray (abstract). **Freshwater Crayfish** **8**, 716.
- Johansen, S.I., Taugbøl, T., 2010. *Pacifastacus leniusculus*, **NOBANIS Invasive Alien Species Fact Sheet**. En: online database of the North European and Baltic Network on invasive alien species- NOBANI <http://www.nobanis.org/default.asp>
- Jones, C.M., 1995. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax*

- quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae).I. Development of hatchery and nursery procedures. **Aquaculture** **38**, 221-238.
- Keefe, A., Rouse, D.,1999. Protein requirements for juvenile Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Freshwater Crayfish** **12**, 471-477.
- Köksal, G., 1988. *Astacus leptodactylus* in Europe. En: Holdich, D.M., Lowery, R.S. (Eds.) **Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation**. Croom Helm, London, pp. 365-400.
- Laurent, P.J., 1988. *Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium* with observations on their interactions with other species in Europe. En: Holdich, D.M., Lowery, R.S. (Eds.) **Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation**. Croom Helm, London, pp. 341-364.
- Lawrence, A.K., Castille, F., 1991. Nutritive response of a western hemisphere shrimp *Penaeus vannamei*, to meat and bone, feather and poultry by-product meal. **Director's Digest** **215**. Fat and Protein Research Foundation, Bloomington, IL.
- Lawrence, C., Jones, C., 2002. *Cherax*. En: Holdich, D.M. (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Blackwell Sciences Ltd, Oxford, pp. 635-669.
- Lim, C., Dominy, W.,1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** **87**, 53-63.
- Mackevicienė, G., Mickėnienė, L., Burba, A., Korieva, G., 1997. Aquaculture of the noble crayfish *Astacus astacus* L. in Lithuania. **Freshwater Crayfish** **11**, 599-607.
- Mackevicienė, G., Mickėnienė, L., Burba, A., Mazeika, V., 1999. Reproduction of the noble crayfish *Astacus astacus* L. in semi-intensive culture. **Freshwater Crayfish** **12**, 462-470.
- Maguire, G.B., Hume, I.D., 1982. A study of the nutritional requirements of school shrimp *Metapenaeus macleayi* (haswell) in some Australian brackish water farming ponds. **Aquaculture** **29**, 261-278.
- Manomaitis, L., 2001. Assessment of the crude protein requirements for juvenile red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). Tesis doctoral. Universidad de Auburn.
- Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L.R., Ramos-Enríquez, R., 2009. Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. **Rev. Electrón. Vet.** **10**, 1-16.
- Mason, J.C., 1974. Aquaculture potential of the freshwater crayfish (*Pacifastacus*). I: studies during 1970. **Technical Report-Fisheries and Marine Service, vol. 440**. Fisheries Research Board of Canada, Pacific Biological Station, Nanaimo, British Columbia, 43 p.
- Mason, J.C., 1975. Crayfish production in a small woodland stream. **Freshwater Crayfish** **2**, 449-479
- Mason, J.C., 1977a. Reproductive efficiency of *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in culture. **Freshwater Crayfish** **3**, 101-117.
- Mason, J.C., 1977b. Artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus*

- leniusculus* Dana). **Freshwater Crayfish 3**, 119-132.
- Matthews, M., 1992. Reproduction, growth and aquaculture potential of the freshwater crayfish *Autropotamobius pallipes* (Lereboullet). Tesis Doctoral, Universidad de Dublín, Irlanda, 222 p.
- Matthews, M., Reynolds, J.D., 1995. The *in vitro* culture of crayfish eggs using a recirculating airlift incubator. **Freshwater Crayfish 8**, 300-306.
- Melendre, P.M., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Aguilera, A., 2006. Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae). **Aquaculture 257**, 257-265.
- Melendre, P.M., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Aguilera, A., 2007. Effects of stage 2 juvenile removal frequency on survival rates in artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae). **J. Shellfish Res. 26(1)**, 201-203.
- Mendoza, R., De Dios, A., Vazquez, C., Cruz, E., Ricque, D., Aguilera, C., Montemayor, J., 2001. Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition 7**, 143-151.
- Millamena, O.M., Bautista-Teruel, M.N., Kanazawa, A., 1996. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture 143**, 403-410.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture 151**, 9-14.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1998. Requirements of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius for lysine and arginine. **Aquaculture 164**, 95-104.
- Millamena, O.M., Teruel, M.B., Kanazawa, A., Teshima, S., 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. **Aquaculture 179**, 169-179.
- Momot, W.T., 1991. Potential for exploitation of freshwater crayfish in coolwater systems: management guidelines and issues. **Fisheries 16(5)**, 14-21.
- National Research Council, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press, Washington DC, USA.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliot, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldburg, R.J., Hua, K. & Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106**, 15103-15110.
- Nyström, P., 1994. Survival of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in relation to light intensity and density. **Nordic Journal of Freshwater Research 69**, 162-166.
- Oluoch, A.O., 1990. Breeding biology of the Louisiana Red Swamp Crayfish

- Procambarus clarkii* Girard in Lake Naivasha, Kenya. **Hydrobiologia** **208**, 85-92.
- Øverland, M., Sørensen, M., Storebakken, T., Krogdahl, A., Skrede, A., 2009. Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)- Effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. **Aquaculture** **288**, 305-311.
- Palma, J., Bureau, D.P., Lemme, A., Correia, M., Andrade, J.P., 2009. Quantitative dietary requirement of juvenile Atlantic ditch shrimp *Palaemonetes varians* (Leach) for lysine, methionine and arginine. **Unpublished**. (Abstract ISFNF 2006).
- Pedrazzoli, A., Molina, C., Montoya, N., Townsend, S., León-Hing, A., Paredes Y., Calderón, J., 1998. Recent advances on nutrition research of *Penaeus vannamei* in Ecuador. **Reviews in Fisheries Science** **6**, 143-151.
- Penn, M.H., Bendiksen, E.A., Campbell, P., Krogdahl, A., 2011. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture** **310**, 267-273.
- Pérez, J.R., Carral, J.M., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., Muñoz, C., Sierra, A., 1997a. Current status of astaciculture production and commercial situation of crayfish in Europe. **Aquaculture Europe** **22(1)**, 6-13.
- Pérez, J.R., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Muñoz, C., Sierra, A., 1997b. Métodos básicos de cría de astácidos en Europa. **Investigación Agraria, Producción y Sanidad Animales** **12 (1,2,3)**, 87-96.
- Pérez, J.R., Carral, J.M., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., Romero, M.P., 1998a. Effects of different thermal treatments during embryonic development on the artificial incubation efficiency of crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) eggs. Control of the embryogenetic duration and implications for commercial production. **Invertebr. Reprod. Dev.** **34 (2-3)**, 253-258.
- Pérez, J.R., Carral, J.M., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., Muñoz, C., Antolín, J.I., 1998b. Effects of stripping time on the success of the artificial incubation of freshwater crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet), eggs. **Aquac. Res.** **29**, 389-395.
- Pérez, J.R., Carral, J.M., Celada, J.D., Muñoz, C., Sáez-Royuela, M., Antolín, J.I., 1999. The possibilities for artificial incubation of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) eggs: comparison between maternal and artificial incubation. **Aquaculture** **170**, 29-35.
- Pérez, J.R., Celada, J.D., González, J., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Fernández, R., 2003. Duration of egg storage at different temperatures in the astacid crayfish *Pacifastacus leniusculus*: critical embryonic phase. **Aquaculture** **219**, 347-354.
- Phuong, N.T., Yu, Y., 2003. Replacement of fish meal with MBM and PBM on growth performance of juvenile black tiger shrimp (*P.monodon*). **National Renderers**

Association. Research Report Vietnam-2.

- Poppi, D.A., Quinton, V.M., Hua, K., Bureau, D.P., 2011. Development of a test diet for assessing the bioavailability of arginine in feather meal fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** **314**, 100-109.
- Pursiainen, M., Järvenpää, T., Westman, K., 1983). A comparative study on the production of crayfish (*Astacus astacus* L.) juveniles in natural food ponds and by feeding in plastic basins. En: Goldman, Ch.R. (Ed.) **Freshwater Crayfish** **5**. Davis, California, USA, pp. 391-402.
- Pursiainen, M., Järvenpää, T., Tulonen, J., Westman, K., 1989. Crayfish culture in Finland. En: Skurdal, J., Westman, K., Bergan, P.I. (Eds.) **Crayfish Culture in Europe**. Report from the Workshop on Crayfish Culture, 16-19 Nov. 1987, Trondheim, Noruega, pp. 69-78.
- Reynolds, J.D., Celada, J.D., Carral, J.M., Matthews, M.A., 1992. Reproduction of astacid crayfish in captivity – current developments and implications for culture, with special reference to Ireland and Spain. **Invertebr. Reprod. Dev.** **22(1-3)**, 253-266.
- Reynolds, J.D., 2002. Growth and Reproduction. En: Holdich, D.M. (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Blackwell Sciences Ltd, Oxford, pp. 152-191.
- Rhodes, C.P., 1981. Artificial incubation of the eggs of the crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. **Aquaculture** **25**, 129-140.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Muñoz, C., 1995. Effects of management on survival and growth of Stage 2 juvenile freshwater signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under laboratory conditions. **Aquaculture** **133**, 123-133.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Muñoz, C., 1996. Modified photoperiod and light intensity influence on survival and growth of stage 2 juveniles *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Applied Aquaculture** **6(3)**, 33-37.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Pérez, J.R., 2001. Effects of shelter type and food supply frequency on survival and growth of stage-2 juvenile white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) under laboratory conditions. **Aquaculture International** **9**, 489-497.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Melendre, P.M., Aguilera, A., 2005. Comparison between individual and group mating of *Austropotamobius pallipes* under controlled conditions. **Bull. Fr. Pêche Piscic.** **376-377**, 699-704.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Pérez, J.R., González, Á., 2007. Live feed as supplement from the onset of external feeding of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae) under controlled conditions. **Aquaculture** **269**, 321-327.
- Sáez-Royuela, M., Melendre, P.M., Celada, J.D., Carral, J.M., González, Á., González, R., García, V., 2009. Possibilities of artificial incubation of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs at high densities and reduced flow rate

- using formaldehyde as antifungal treatment. **Aquaculture** **288**, 65-68.
- Saoud, I.P., Rodgers, L.J., Davis, D.A., Rouse, D.B., 2008. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). **Aquacult. Nutr.** **14**, 139-142.
- Savolainen, R., Ruohonen, K., Tulonen, J., 2003. Effects of bottom substrate and presence of shelter in experimental tanks on growth and survival of signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana) juveniles. **Aquaculture Research** **34(4)**, 289-297.
- Savolainen, R., Ruohonen, K., Railo, E., 2004. Effect of stocking density on growth, survival and cheliped injuries of stage 2 juvenile signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana. **Aquaculture** **231**, 237-248.
- Shiau, S.Y., Chou, B.S., 1991. Effects of dietary protein and energy on growth performance of tiger shrimp *Penaeus monodon* reared in seawater. *Nippon Suisan gakkaiishi* **57**, 2271-2276.
- Skurdal, J., Taugbøl, T., 1994. Biology, culture and management of the noble crayfish *Astacus astacus* L. **Tesis Doctoral, Universidad de Oslo, Noruega**, 300 pp.
- Skurdal J, Taugbøl T (2002) *Astacus*. En: Holdich, D.M. (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Blackwell Sciences Ltd, Oxford, pp. 467-510.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture** **285**, 145-158.
- Takeuchi, T., Murakami, K., 2007. Crustacean nutrition and larval feed, with emphasis on Japanese spiny lobster, *Panilurus japonicus*. **Bull. Fish. Res. Agen.** **20**, 15-23.
- Taugbøl, T., Skurdal, J., 1989. Effect of indoor, culture conditions on maturation and fecundity of wildcaught female noble crayfish, *Astacus astacus* L. **Aquaculture** **81**, 1-12.
- Taugbøl, T., Skurdal, J., 1990a. Effect of density on brood size in noble crayfish *Astacus astacus* L., subjected to indoor rearing conditions. **Aquac. Fish. Manage.** **21**, 17-23.
- Taugbøl, T., Skurdal, J., 1990b. Reproduction, molting and mortality of female noble crayfish, *Astacus astacus* (L., 1978), from five Norwegian populations subjected to indoor conditions. (Decapoda, Astacoidea). **Crustaceana** **58**, 113-123.
- Taugbøl, T., Skurdal, J., 1992. Growth, mortality and molting rate of noble crayfish *Astacus astacus* L. juveniles in aquaculture experiments. **Aquaculture and Fisheries Management** **23**, 411-420.
- Teshima, S., Kanazawa, A., 1984. Effects of the protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates of the prawn larvae. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** **50**, 1709-1715.
- Teshima, S., Alam, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A., 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). **Aquac. Res.** **33**, 395-402.
- Thiessen, D.L., Campbell, G.L., Adelizi, P.D., 2003. Digestibility and growth

- performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. **Aquac. Nutr.** **9**, 67-75.
- Tibaldi, E., Tulli, F., Messina, M., Franchin, C., Badini, E., 2005. Pea protein concentrate as a substitute for fish meal protein in sea bass diet. **Italian J. Anim. Sci.** **4**, 597–599.
- Ulikowski, D., Krzywosz, T., Smietana, P., 2006. A comparison of survival and growth in juvenile *Astacus leptodactylus* (Esch.) and *Pacifastacus leniusculus* (Dana) under controlled conditions. **Bull. Fr. Peche. Piscic.** **380-381**, 1245-1253.
- Venero, J.A., Davis, D.A., Lim, C., 2008. Use of plant protein sources in crustaceans diets. En: Lim, C., Webster, C.D., Lee, C. (Eds.), **Alternative protein sources in aquaculture diets**. The Haworth Press, New York, pp. 163-203.
- Wang, Y., Guo, J., Bureau, D.P., Cui, Z., 2006. Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients in feeds for cuneate drum (*Nibea miichthioides*). **Aquaculture** **252**, 476-483.
- Webster, C.D., Goodgame-Tiu, L.S., Tidwell, J.H., Rouse, D.B., 1994. Evaluation of practical feed formulations with different protein levels for juvenile red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). **Transactions of the Kentucky Academy of Science** **55 (3/4)**, 108-112.
- Webster, C.D., Thompson, K.R., Morgan, A.M., Grisby, E.J., Gannam, A.L., 2000. Use of hempseed meal, poultry by-product meal, and canola meal in practical diets without fish meal for sunshine bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*). **Aquaculture** **188**, 299-309.
- Wolf, Y.S., 2004. Growth and macronutritional requirements of signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in aquaculture. Tesis doctoral, Universidad de Kiel.
- Woodlock, B., Reynolds, J.D., 1988. Laboratory breeding studies of freshwater crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). **Freshwater Biology** **19**, 71-78.
- Yang, Y., Xie, S., Lei, W., Zhu, X., Yang, Y., 2004. Effect of replacement of fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal in diets on the growth and immune response of *Macrobrachium nipponense*. **Fish Shellfish Immun.** **17**, 105-114.
- Yigit, M., Erdem, M., Koshio, S., Ergun, S., Turker, A., Karaali, B., 2006. Substituting fish meal with poultry by-product meal in diets for black Sea turbot *Psetta maeotica*. **Aquacult. Nutr.** **12**, 340-347.
- Yu, Y., 2008. Replacement of fish meal with poultry by-product meal and hydrolyzed feather meal in feeds for finfish. En: Lim, C., Webster, C.D., Lee, C. (Eds.), **Alternative protein sources in aquaculture diets**. The Haworth Press, New York, pp. 51-95.
- Zhang, Y., Øverland, M., Sørensen, M., Penn, M., Mydland, L.T., Shearer, K.D., Storebakken, T., 2012. Optimal inclusion of lupin and pea protein concentrates in extruded diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** **344-349**, 100-113.

Zhou, Q.C., Zhao, J., Li, P., Wang, H.L., Wang, L.G., 2011. Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture** **322-323**, 122-127.

ANEXO



Publicaciones

- I. Fuertes, J.B., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González-Rodríguez, Á., 2012. Effects of dietary protein and different levels of replacement of fish meal by soybean meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. **Aquaculture** **364-365**, 338-344.
- II. Fuertes, J.B., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González-Rodríguez, Á., 2013. Replacement of fish meal by pea protein concentrate in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. **Aquaculture** **388-391**, 159-164.
- III. Fuertes, J.B., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González-Rodríguez, Á., 2013. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. **Aquaculture** **404-405**, 22-27.
- IV. Fuertes, J.B., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González-Rodríguez, Á., 2013. Effects of different levels of replacement of fish meal by feather meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. **Aquaculture Nutrition** doi: **10.1111/anu.12044**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online

Effects of dietary protein and different levels of replacement of fish meal by soybean meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding

J.B. Fuertes*, J.D. Celada, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, Á. González-Rodríguez

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2012

Received in revised form 28 August 2012

Accepted 29 August 2012

Available online 7 September 2012

Keywords:

Astacid crayfish

Pacifastacus leniusculus

Juvenile rearing

Practical diet

Dietary protein

Soybean meal

ABSTRACT

Two 100-day experiments were conducted to evaluate effects of practical diets with different protein content and substitution possibilities of fish meal (FM) protein with soybean meal (SBM) protein on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) from the onset of exogenous feeding. In experiment 1, four practical diets were prepared to contain 35, 40, 45 or 50% crude protein. Each diet was fed to crayfish housed individually or as a group. Survival rates of isolated crayfish fed 45 or 50% dietary protein were the highest (100%). There were no significant effects on survival of grouped crayfish (average: 75.09%). Weight gain plateaued at 45% crude protein (grouped and isolated crayfish: 14.56 mm CL, 691 mg W). Final growth values of isolated crayfish were significantly higher than those of grouped crayfish for all protein levels tested. In experiment 2, four practical diets (50% crude protein content) were prepared to test replacement levels of FM protein by SBM protein of 0% (control group), 25%, 35% or 45%, in crayfish housed in groups. Replacement levels of 0% and 25% SBM enabled the highest survival (average: 74%) and growth (average: 14.49 mm CL, 651.9 mg W). The amino acids profile of all diets is presented and compared with the requirements determined for other crustacean species. In conclusion, a 45–50% dietary protein with 25% replacement of FM protein by SBM protein can be recommended for juvenile *P. leniusculus* during the first period of intensive rearing.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There are about 550 recognised species of freshwater crayfish in the world (Crandal and Buhay, 2008). Several of them, mostly belonging to the family Astacidae, have attracted a strong interest for aquaculture purposes. In the last three decades, the main constraints to intensify astacid culture include poor survival and growth rates of juveniles during the first months of independent life, when feeding is a critical factor. Currently, there is little knowledge on astacid crayfish nutrition, and specifically formulated diets are not available. In previous studies carried out from the onset of exogenous feeding under controlled conditions, a wide variety of natural foods (mainly fresh or frozen animals and vegetables) and dry diets formulated for other aquatic species either alone or supplemented with natural feeds have been used (González et al., 2010). Recent advances (González et al., 2008, 2009, 2012) have provided knowledge enough to enable an initial approach to a specific practical diet, which was proposed as a basis for further nutritional studies on juvenile crayfish (Carral et al., 2011).

The cost of a dry diet generally increases as the protein content does. Protein requirements of juvenile stages of several species of

cultured crustaceans such as *Metapenaeus macleayi* (Maguire and Hume, 1982), *Marsupenaeus japonicus* (Teshima and Kanazawa, 1984), *Macrobrachium rosenbergii* (Ashmore et al., 1985), *Penaeus monodon* (Shiau and Chou, 1991), *Penaeus vannamei* (Pedrazzoli et al., 1998) or *Cherax quadricarinatus* (Keefe and Rouse, 1999) have been studied, and optimal dietary protein ranges from 23% to 57%. There is an inter-specific variability that suggests that protein requirements need to be studied for each species (Takeuchi and Murakami, 2007). In juvenile astacid crayfish commercial dry diets prepared for other aquatic species have been used so far. Crude protein content of commercial diets used is very variably and ranged from 33% to 56% (González et al., 2012).

With a view to use adequate ingredients, it should be taken into account the current availability and price of different feedstuffs. Finfish and crustacean aquaculture is highly dependent upon marine capture fisheries to supply fishmeal (FM), the most important protein ingredient used in aquafeeds (Tacon and Metian, 2008). This fact has led to a double concern, on the one hand the non-sustainability of the fisheries pressure on wild stocks to cover the increasing demand of FM (Hannesson, 2003; Naylor et al., 2009). On the other hand, the rising prices of FM derived from the growing demand of FM make FM less feasible to use at current inclusion recommended levels (FAO, 2009; Tacon and Metian, 2008). Thus, the aquafeed industry had to search for

* Corresponding author. Fax: +34 987 291187.

E-mail address: jbfuecl@unileon.es (J.B. Fuertes).

alternative protein sources less expensive to reduce their dependence on FM (Hardy, 2010; Naylor et al., 2009). Despite the possibility of including terrestrial animal by-products in aquaculture diets, there is much public concern in many countries due to BSE (bovine spongiform encephalopathy) and prion risks associated to such ingredients arising within the animal and consumer food chain, so legislation severely restricts the use of these protein sources. Consequently, the use of plant proteins to replace FM has become more acceptable in recent years. Considering the different possibilities, soybeans are a logical protein source for use in aquaculture diets (Brown et al., 2008), mainly due to their high protein content, global availability and relatively low price compared to FM.

The aims of this study were to evaluate effects of practical diets with different protein content and substitution possibilities of FM protein by soybean meal (SBM) protein during the first period of rearing.

2. Materials and methods

2.1. Crayfish, facilities and experimental procedure

In late November, egg-bearing females (*Pacifastacus leniusculus* Dana) from a crayfish farm were transferred to the laboratory located in the Department of Animal Production of the University of León (Spain), where egg development, hatching and first moult of juveniles (stage 2) took place under controlled conditions.

Two 100-day experiments were conducted with stage 2 juveniles (average 5.54 ± 0.04 mm carapace length and 30.1 ± 0.3 mg weight) from the onset of exogenous feeding. Juveniles were housed in fibreglass tanks in groups at a stocking density of 100 m^{-2} and, in order to avoid the influence of intraspecific behavioural interactions such as fighting and cannibalism, individual isolation of crayfish was also carried out. Grouped crayfish were kept in tanks with 1 m^2 bottom and 200 l water. Each tank was provided with shelters: 4 groups of four jointed sections of PVC pipe (4 cm long \times 2 cm diameter) and 3 pieces of undulating fibre cement (54×20.5 cm). Isolated crayfish were kept individually in tanks (0.15 m^2 , 25 l water) with 1 group of four jointed sections of PVC pipe (4 cm long \times 2 cm diameter) as shelter.

Aerated artesian well water was supplied in open system (flow throughout), and each tank had its own water inlet (flow rate: 1.5 l min^{-1} for the tanks of 200 l and 0.25 l min^{-1} for the tanks of 25 l) and outlet, provided with a $250 \mu\text{m}$ mesh filter to avoid the escape of crayfish and feed. The parameters of incoming water quality were pH 8.1, hardness $5.2 \text{ }^\circ\text{dH}$ (German degrees, calcium 32.1 mg l^{-1}), total dissolved solids 112.5 mg l^{-1} and total suspended solids 36.9 mg l^{-1} . Throughout the trials, dissolved oxygen content was measured in the tanks every other day with a portable meter (HATCH HQ30d, Hatch Lange GmbH; <http://www.hach-lange.es>) and values ranged between 6.2 mg l^{-1} and 8.3 mg l^{-1} . Ammonia and nitrites were measured with a portable spectrophotometer (HATCH DR 2800, Hatch Lange GmbH; <http://www.hach-lange.es>) from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia $< 0.02 \text{ mg l}^{-1}$ and nitrites $< 0.05 \text{ mg l}^{-1}$). Water temperature was daily registered using maximum–minimum thermometers and maintained at $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Photoperiod was natural (around 12 h light:12 h dark). Tanks, filters and shelters were cleaned every second day.

2.2. Diets and feeding

The practical diet proposed by Carral et al. (2011) was modified in vitamin C content according to the results of Celada et al. (2012). On this basis, different dry diets were prepared to test several protein contents and substitution possibilities of fish meal (FM) protein by defatted soybean meal (SBM) protein. The FM and SBM used had 68% and 46% crude protein, respectively. The grinding was performed in a rotary mill (BRABENDER, Brabender® GmbH & Co. KG; [\[www.brabender.com\]\(http://www.brabender.com\)\). Ingredients were mixed in a mixer \(STEPHAN UMC5, Stephan Food Service Equipment; <http://www.stephan-belgium.be/>\) and extruded using a stand-alone extruder \(BRABENDER KE19/25D, Brabender® GmbH & Co. KG; <http://www.brabender.com>\) at a temperature range between \$75 \text{ }^\circ\text{C}\$ and \$90 \text{ }^\circ\text{C}\$. Pellets with 2 mm diameter were obtained and then dried during 24 h at \$30 \text{ }^\circ\text{C}\$. Later, pellets received a coating of cod liver oil. Diets were stored at \$3\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}\$ until used.](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

A ration level of 3% live body weight per day was adjusted based on a weekly estimation of biomass from each tank and the biomass calculated every 20 days from the samples. The ration was manually supplied once a day, and the feed pellets remained intact in the water around 8 h.

2.2.1. Experiment 1

A total of 1240 stage 2 juveniles were used: 1200 were grouped in 12 tanks and 40 were housed individually isolated. Four practical diets (nearly isoenergetic) were prepared to test 35%, 40%, 45% or 50% dietary protein. Formulation and proximate composition of the diets are presented in Table 1. The different protein levels were obtained by increasing the amount of FM and reducing the amount of corn meal. Each diet was tested on 3 tanks with grouped crayfish ($n = 300$) and 10 tanks with individually isolated crayfish ($n = 10$).

2.2.2. Experiment 2

A total of 1200 stage 2 juveniles were housed in 12 tanks (100 crayfish/tank). Four isonitrogenous and isoenergetic diets were prepared to test replacement levels of FM protein by SBM protein of

Table 1

Formulation and proximate composition of the practical diets with different protein content (experiment 1).

Ingredients (g kg ⁻¹)	Protein content (%)			
	35	40	45	50
Fish meal ^a	390	465	540	614.8
Corn meal ^b	355	280	205	130.2
Cod liver oil ^c	30	30	30	30
Soy lecithin ^d	1	1	1	1
Cholesterol ^e	5	5	5	5
L-ascorbyl-2-monophosphate-Na ^f	0.2	0.2	0.2	0.2
Choline chloride ^g	5	5	5	5
Dicalcium phosphate ^g	10	10	10	10
Decapsulated <i>Artemia</i> cysts ^h	150	150	150	150
Carboxymethyl cellulose ⁱ	30	30	30	30
Astaxanthin ^a	1	1	1	1
Mineral premix ^j	20	20	20	20
Vitamin premix ^k	2.8	2.8	2.8	2.8
Proximate composition (g kg ⁻¹ fresh-weight basis)				
Moisture	91.0	90.0	88.0	87.0
Crude protein	350.9	400.3	451.1	502.2
Crude fat	110.1	113.1	115.4	119.2
Nitrogen-free extract	341.0	287.0	229.2	170.8
Ash	107.0	109.6	116.3	120.8
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	19.01	19.13	19.31	19.58

^a Biomar Iberia/Proaqua Nutrición, Dueñas (Palencia), Spain.

^b ADPAN, Siero-Asturias, Spain.

^c ACOFARMA, Terrassa (Barcelona), Spain.

^d Biover NV/SA Brujas, Belgium.

^e Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim, Germany.

^f Orffa Ingredients B.V., Burgstraat 12, 4283 GG Giessen, The Netherlands.

^g Nutral S.A., Madrid, Spain.

^h *Artemia* cysts: Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 μm , Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium.

ⁱ Helm Iberica SA, Madrid, Spain.

^j (g kg⁻¹ premix): CoCl₂, 0.04; CuSO₄·5H₂O, 2.50; FeSO₄, 40; MgSO₄·7H₂O, 283.98; MnSO₄·H₂O, 6.50; KI, 0.67; Na₂SeO₃, 0.10; ZnSO₄·7H₂O, 131.93.

^k (g kg⁻¹ premix): thiamin, 21.43; riboflavin, 18.93; niacin, 71.43; pyridoxine, 17.86; pantothenic acid, 37.86; biotin, 0.36; folic acid, 5.71; cyanocobalamin, 0.07; myoinositol, 142.86; retinol, 0.54; α -tocopherol, 23.82; cholecalciferol, 3.93; naphthoquinones, 3.12; ethoxyquin, 35.71.

0% (control group), 25%, 35% or 45%. Formulation and proximate composition of the diets are presented in Table 3. Each diet was tested on 3 tanks with grouped crayfish (n = 300).

2.3. Chemical analysis of practical diets

Proximate composition of practical diets (Table 1) was analysed according to the Norms of the International Standards Organization: moisture to ISO R-1442 (ISO, 1979), protein to ISO R-937 (ISO, 1978), lipid to ISO R-1443 (ISO, 1973), ash to ISO R-936 (ISO, 1998a) and gross energy to ISO 9831 (ISO, 1998b). Samples were stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. All analyses were performed in duplicate. The content of nitrogen-free extract was calculated by subtracting the content of moisture, protein, lipid and ash from the wet weight.

Crustaceans require ten kinds of essential amino acids (EAA) that are the same as that of fish (Takeuchi and Murakami, 2007). EAA and nonessential amino acid (NEAA) were analysed by HPLC using AccQTag method from Waters (Milford, MA, USA). Amino acids were derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydrosysuccinimidyl carbamate reagent (AQC) by the method of Cohen and Michaud (1993) and Cohen and De Antonis (1994), and were detected by Dual λ Absorbance Detector Waters 2487 from Waters (Milford, MA, USA) at 254 nm. Quantification was carried out with Empower Pro 2.0 software from Waters (Milford, MA, USA).

2.4. Data collection and statistical analysis

Every 20 days, survivors were counted, number of crayfish lacking one or two chelae was registered, and 15 randomly sampled juveniles per replicate of grouped animals (45 per treatment, 15% of the initial number) and all isolated crayfish were collected for recording carapace length (CL) and body weight (W).

At the end of the experiments (100 days), all crayfish were individually measured and weighed. Carapace length was measured with digital calliper (to the nearest 0.01 mm). To obtain individual wet weight, excess water was removed with tissue paper and a precision balance (COBOS CB COMPLETE, Balanzas Cobos; <http://www.balanzascobos.com>), to the nearest 0.001 g, was used. Weight gain (WG) were expressed as $WG = (W_t - W_i) 100 / W_i$, where W_t is the mean final weight (g) and W_i is the mean initial weight at the beginning of the experiment. According to

Table 2
Amino acid profile of the practical diets with different protein content (experiment 1).

g AA/100 g diet (dry matter)	Protein content (%)			
	35	40	45	50
<i>EAA</i>				
Arg	3.31	4.15	5.01	5.84
Hist	0.45	0.59	0.76	0.91
Ile	1.80	2.00	2.19	2.41
Leu	2.80	3.12	3.51	3.83
Lys	2.28	2.63	3.02	3.34
Met	0.76	0.87	1.06	1.18
Phe	1.45	1.60	1.77	1.91
Thr	1.61	1.89	2.16	2.41
Val	1.70	1.96	2.17	2.36
Trp	0.35	0.39	0.44	0.47
<i>NEAA</i>				
Ala	2.13	2.24	2.46	3.02
Asp	3.03	3.41	3.69	4.18
Glu	6.67	7.26	7.59	8.43
Gly	1.10	1.31	1.51	1.78
Pro	1.42	1.57	1.78	1.96
Ser	2.13	2.27	2.48	2.95
Tyr	1.04	1.19	1.20	1.40
Cys	0.15	0.16	0.17	0.18

Table 3
Formulation and proximate composition of the practical diets with different levels of replacement of FM protein by SBM protein (experiment 2).

Ingredients (g kg ⁻¹)	Replacement (%)			
	0	25	35	45
Fish meal ^a	614.8	461.1	399.7	338.4
Corn meal ^b	130.2	56.7	26.9	0
Soybean meal ^a	0	227.2	318	406.6
Cod liver oil ^c	30	30	30	30
Soy lecithin ^d	1	1	1	1
Cholesterol ^e	5	5	5	5
L-ascorbyl-2-monophosphate-Na ^f	0.2	0.2	0.2	0.2
Choline chloride ^g	5	5	5	5
Dicalcium phosphate ^g	10	10	10	10
Decapsulated <i>Artemia</i> cysts ^h	150	150	150	150
Carboxymethyl cellulose ⁱ	30	30	30	30
Astaxanthin ^a	1	1	1	1
Mineral premix ^j	20	20	20	20
Vitamin premix ^k	2.8	2.8	2.8	2.8
Proximate composition (g kg ⁻¹ fresh-weight basis)				
Moisture	87.0	89.5	91.0	91.5
Crude protein	502.2	501.7	501.1	499.8
Crude fat	119.2	110.8	107.8	105.6
Nitrogen-free extract	170.8	188.4	195.3	202.6
Ash	120.8	109.6	104.8	100.5
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	19.58	19.46	19.38	19.27

a,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l As indicated in Table 1.

Fornshell and Hinshaw (2009), feed conversion ratio (FCR) was calculated as $FCR = D_t / (W_t - W_i)$, where D_t is the total amount of feed fed and $W_t - W_i$ is the increase of weight over 100 days.

All results were examined by analysis of variance (two-way ANOVA) using the computer program SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) to determine whether data were significantly different among groups. Duncan's multiple range test was applied to compare means at the $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

3. Results

All practical diets were consumed from the first day as indicated by the externally observable presence of each in the translucent digestive tract of juvenile crayfish.

3.1. Experiment 1

Final mean survival, growth and feed conversion values (100 days) are presented in Table 5. Diets tested had no significant effects on survival of grouped crayfish (average: 75.09%). Isolated crayfish fed 50% or 45% dietary protein achieved the highest survival (100%), and survival rates were reduced significantly with decreased protein contents. Within the same diet, survival of isolated crayfish was significantly higher than that of grouped crayfish, with the exception of the diet with 35% protein.

Regarding growth, there were no significant differences between crayfish fed the diets with 45% or 50% protein (average grouped and isolated crayfish: 14.59 mm CL, 693 mg W and 2503.4% WG). Lower protein contents (40% or 35%) enabled significantly lower growth. Fig. 1 shows the changes in weight (grouped and isolated crayfish) throughout the 100 days. Juveniles fed the diets with 50% or 45% protein grew faster than the rest. The diet with 35% protein resulted in the lowest weight values along the trial. These differences were significant from day 40 onwards.

Regardless the dietary protein, final growth values of isolated crayfish (average: 16.27 mm CL, 1198.1 mg W) were significantly higher

Table 4
Amino acid profile of the practical diets with different levels of replacement of FM protein by SBM protein (experiment 2).

g AA/100 g diet (dry matter)	Replacement (%)			
	0	25	35	45
EAA				
Arg	5.84	5.41	5.02	4.73
Hist	0.91	0.85	0.82	0.77
Ile	2.41	2.35	2.32	2.31
Leu	3.83	3.77	3.75	3.71
Lys	3.34	3.05	2.53	2.30
Met	1.18	0.96	0.68	0.46
Phe	1.91	1.92	1.93	1.95
Thr	2.41	2.27	2.05	1.81
Val	2.36	2.40	2.41	2.43
Trp	0.47	0.45	0.41	0.38
NEAA				
Ala	3.02	2.79	2.73	2.68
Asp	4.18	5.05	5.36	5.76
Glu	8.43	9.56	9.91	10.33
Gly	1.78	1.32	1.22	1.18
Pro	1.96	2.01	2.05	2.07
Ser	2.95	2.91	2.97	2.97
Tyr	1.40	1.39	1.31	1.28
Cys	0.18	0.20	0.20	0.21

than those of grouped crayfish (average: 13.74 mm CL, 551.5 mg W). Fig. 2 shows the changes in weight of juvenile crayfish held in groups or individually isolated throughout the 100 days. Isolated crayfish grew faster than grouped crayfish, differences being significant from day 40 onwards.

FCRs (average of grouped and isolated crayfish) ranged from 1.01 to 1.34. The lowest value was obtained with 50% dietary protein, without significant differences from 45% protein. FCRs increased progressively with decreased protein contents (40% or 35%). With all diets, FCRs of isolated crayfish (average: 0.94) were significantly lower than those of grouped crayfish (average: 1.33).

Cheliped losses were only recorded in the grouped crayfish. The final percentages of juveniles lacking chelipeds increased with decreased protein content, so that the diets with 45% or 50% protein resulted in values significantly lower (average: 5.35%) than the diets with 35% or 40% protein (average: 9.89%).

The amino acid profile of the practical diets is presented in Table 2. As the dietary protein was reduced, the content of all amino acids significantly decreased, except tryptophan and cystine. Comparing 40% dietary protein (level with which growth was significantly lower

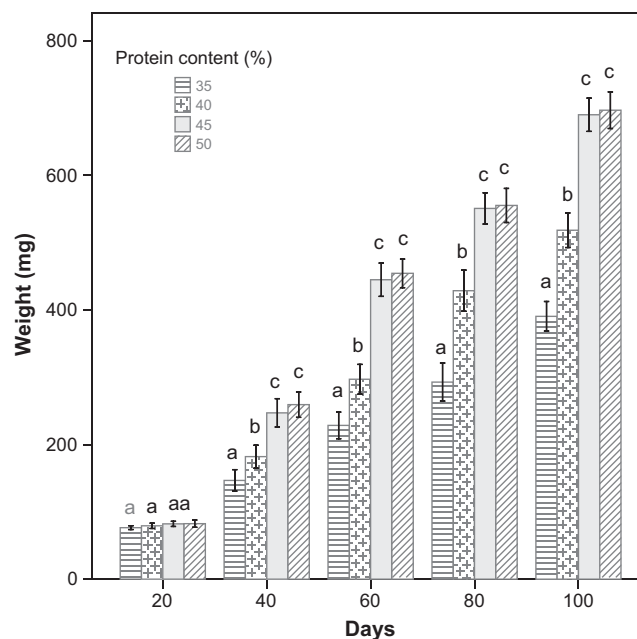


Fig. 1. Mean weight (grouped and isolated animals) at various periods of juvenile crayfish fed practical diets with different protein content over 100 days from the onset of exogenous feeding (experiment 1). Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

than that of 50% dietary protein) with 50% dietary protein, there were reductions in the EAA contents that ranged from 16% (phenylalanine) to 35% (histidine).

3.2. Experiment 2

Final survival, growth and feed conversion values (100 days) are presented in Table 6. There were no significant differences in survival between crayfish fed diets with replacement levels of FM protein by SBM protein of 0% or 25% (average: 74.0%). Survival of crayfish fed higher replacement levels (35% or 45%) was significantly lower (average: 63.7%).

In terms of growth, the highest values (14.52 mm CL, 654.45 mg W and 2357.24% WG) were obtained with 0% replacement of FM protein by SBM protein without significant differences from the 25% replacement (Table 4). With higher replacement levels (35% or 45%), all growth values were significantly lower. Fig. 3 shows the changes in

Table 5
Final survival, growth and feed conversion values of juvenile crayfish fed practical diets with different protein contents over 100 days from the onset of exogenous feeding (experiment 1).

		Protein (%)			
		35	40	45	50
Survival (%)	Groups	72.0 ± 3.6 ^a	73.7 ± 3.2 ^a	76.7 ± 0.9 ^a	78.0 ± 1.6 ^a
	Isolated	70 ^a	90 ^b	100 ^c	100 ^c
Carapace length (mm)	Groups	12.53 ± 0.25 ^a	13.45 ± 0.23 ^b	14.46 ± 0.23 ^c	14.52 ± 0.27 ^c
	Isolated	14.61 ± 0.07 ^a	15.58 ± 0.46 ^b	17.43 ± 0.30 ^c	17.58 ± 0.62 ^c
Weight (mg)	Groups	373 ± 35.4 ^a	497 ± 46.7 ^b	666 ± 31.9 ^c	671 ± 43.9 ^c
	Isolated	687 ± 11.4 ^a	966 ± 76.3 ^b	1541 ± 113.8 ^c	1598 ± 189.5 ^c
WG (%)	Groups	1317.4 ± 133.0 ^a	1767.9 ± 175.4 ^b	2402.8 ± 119.9 ^c	2431.6 ± 165.2 ^c
	Isolated	2481.4 ± 42.8 ^a	3532.5 ± 286.9 ^b	5793.0 ± 427.7 ^c	5908.9 ± 412.3 ^c
FCR	Groups	1.56 ± 0.17 ^a	1.34 ± 0.12 ^b	1.21 ± 0.14 ^c	1.19 ± 0.09 ^c
	Isolated	1.12 ± 0.10 ^a	0.96 ± 0.07 ^b	0.86 ± 0.08 ^c	0.82 ± 0.06 ^c

Values are mean ± standard error.

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

WG, weight gain = $100 \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight}) \div \text{initial body weight}^{-1}$.

FCR, feed conversion ratio = total amount of feed fed $\div (\text{final body weight} - \text{initial body weight})^{-1}$.

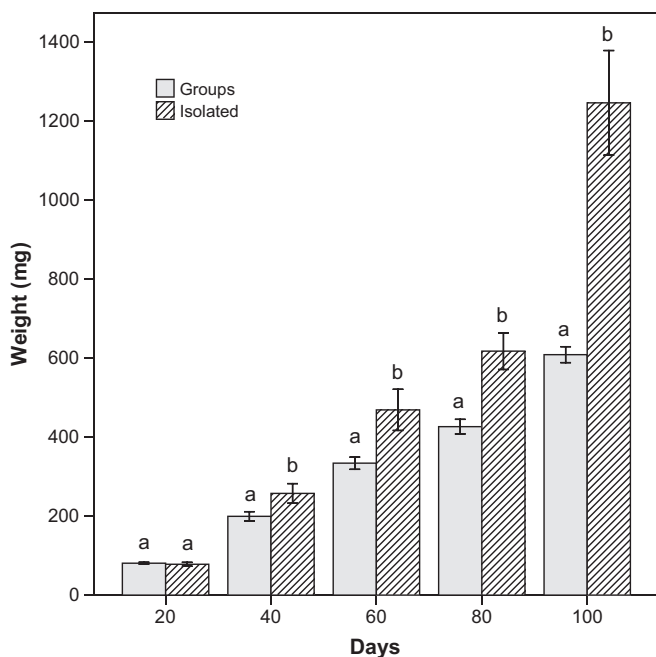


Fig. 2. Mean weight at various periods of juvenile crayfish held in groups or individually isolated over 100 days from the onset of exogenous feeding (experiment 1). Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

weight throughout the 100 days. Crayfish fed diets with 0% or 25% replacement of FM protein by SBM protein grew faster than crayfish fed diets with higher replacement levels, differences being significant from day 40 onwards.

FCRs of crayfish fed diets with replacement levels of 0% or 25% were significantly lower (average: 1.23) than those of crayfish that received the other two diets (average: 1.35).

The final percentages of animals lacking chelipeds increased with increasing the level of substitution of FM protein by SBM protein, so that the diets with 0% or 25% replacement resulted in values significantly lower (average: 5.43%) than the diets with 35% or 45% replacement (average: 9.74%).

The amino acid profile of the practical diets is presented in Table 4. The dietary contents of arginine, lysine, methionine and threonine were significantly reduced when the level of SBM was increased. Comparing 35% replacement of FM protein by SBM protein (substitution level with which growth was significantly lower than that of the

Table 6

Final survival, growth and feed conversion values of juvenile crayfish fed practical diets with different levels of substitution of FM protein by SBM protein over 100 days from the onset of exogenous feeding (experiment 2).

	Replacement (%)			
	0	25	35	45
Survival (%)	76.0 ± 1.5 ^a	72.0 ± 1.1 ^a	64.0 ± 3.4 ^b	63.3 ± 2.89 ^b
Carapace length (mm)	14.52 ± 0.36 ^a	14.46 ± 0.31 ^a	13.49 ± 0.29 ^b	13.48 ± 0.35 ^b
Weight (mg)	655 ± 53.0 ^a	649 ± 39.9 ^a	508 ± 49.7 ^b	502 ± 45.4 ^b
WG (%)	2357.2 ± 168.2 ^a	2309.9 ± 129.6 ^a	1771.2 ± 165.3 ^b	1750.2 ± 131.7 ^b
FCR	1.22 ± 0.08 ^a	1.23 ± 0.12 ^a	1.33 ± 0.11 ^b	1.36 ± 0.20 ^b

Values are mean ± standard error.

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). WG, weight gain = $100 \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight}) \times \text{initial body weight}^{-1}$. FCR, feed conversion ratio = $\text{total amount of feed fed} \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight})^{-1}$.

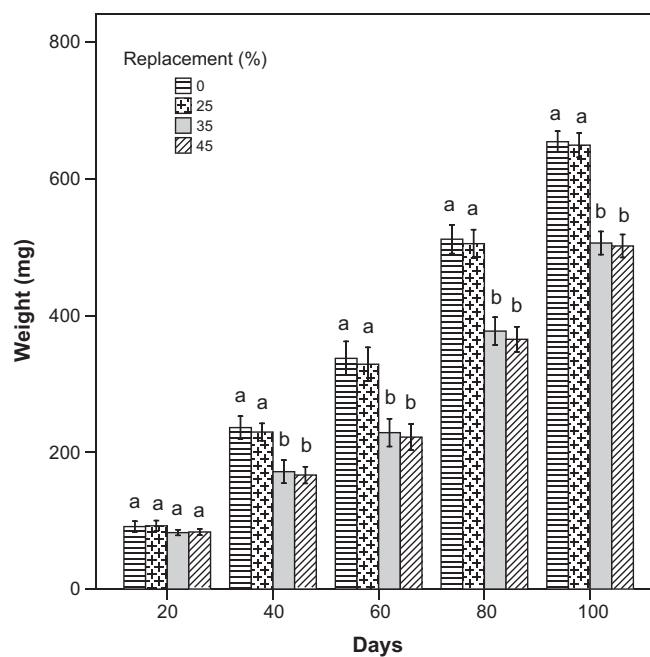


Fig. 3. Mean weight at various periods of juvenile crayfish held in groups and fed practical diets with different replacement levels of FM protein by SBM protein over 100 days from the onset of exogenous feeding (experiment 2). Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

control group) with the control diet, there were reductions in the contents of the mentioned amino acids that ranged from 14% (arginine) to 42% (methionine).

4. Discussion

In astacid crayfish rearing from the onset of exogenous feeding under controlled conditions, improvements have been obtained when dry diets (formulated for other aquatic species) were combined with live *Artemia* nauplii (González et al., 2008, 2010, 2012) or decapsulated *Artemia* cysts (González et al., 2009). In the present study, crayfish were fed extruded practical diets as the sole feed and results are in the range of those reported by the mentioned authors (grouped crayfish: around 76% survival and 660 mg W after 100 days). This may support the feasibility of the practical diet proposed by Carral et al. (2011) for juvenile astacid crayfish from the onset of exogenous feeding. The use of this basal diet in further studies will lead to a progressive improvement of the current formulation and elaboration process by including future findings on crayfish nutrition. In this way, the present study demonstrated the potential for replacing 25% of FM protein with SBM in diets formulated to contain 50% crude protein without negative effects on survival and growth of juvenile crayfish.

Survival rates of isolated crayfish were significantly reduced when protein content of the diet was lower than 45% (experiment 1). However, diets tested had no significant effects on survival of grouped crayfish. This was likely because cannibalism spared nutritional deficiencies of the diets in grouped crayfish, so that survival rates were not affected by dietary protein.

With all diets tested, growth values of isolated crayfish were significantly higher than those of crayfish kept in groups, in contrast to previous studies (Celada et al., 1989, 1993; Sáez-Royuela et al., 1995) where it was the opposite, probably due to the poor quality of the feed. The use of an improved diet allowed that isolated crayfish could better express their growth potential since they do not waste energy for fighting and can utilise a higher proportion of consumed energy towards the growth process (Celada et al., 2012). This fact

is evidenced by significant differences in feed conversion values: FCR of the isolated crayfish (average: 0.94) was significantly lower than that of the grouped crayfish (average: 1.33).

Due to the absence of aggressive interactions, cheliped losses were not recorded in the individually isolated crayfish. In groups, diets with 35% or 40% protein resulted in values of cheliped losses significantly higher than diets with 45% or 50% protein. In juvenile crayfish rearing, cheliped losses are common and closely related to agonistic behaviour (Nyström, 1994), and deficiency of necessary nutrients in the diet causes an increment in aggressive interactions (Ackefors and Lindqvist, 1994), probably because leading to increased cannibalism. The results of the present study suggest that low protein content (35% or 40%) leads to a rise in aggressive behaviour.

Protein requirements of juvenile stages of several species of cultured crustaceans have been studied. There is an inter-specific variability that suggests that protein requirements need to be studied for each species (Takeuchi and Murakami, 2007). Most studies have been performed on penaeid shrimp, where optimal dietary protein ranges from 23% to 57% (Takeuchi and Murakami, 2007). In juvenile *M. rosenbergii*, Ashmore et al. (1985) reported that 40% was an adequate protein level. Keefe and Rouse (1999) tested three diets with different protein contents in the parastacid *C. quadricarinatus* during the first 6 weeks of intensive rearing, and reported that the greatest growth was obtained with the highest protein level (43%). For astacid crayfish, a protein content of at least 30–35% has been recommended, although data are not referred to the first and most critical period of independent life but to juveniles several months old (Ackefors et al., 1992) or to animals with an age between 1 and 1.5 years (Wolf, 2004). It is known that protein levels required in the initial stages are higher. Thus, in experiments with astacid crayfish from stage 2, dry diets containing 45–49% protein have been used (Ackefors et al., 1989; Sáez-Royuela et al., 2007; Taugbøl and Skurdal, 1992; Ulikowski et al., 2006). Recently, commercial aquafeeds with different protein levels were tested by González et al. (2012) during the first 6 months of intensive rearing, and they reported that the protein content of the diets should be at least 40%. In the present study, four practical diets with different protein content were compared during the first 100 days of exogenous feeding, and the results showed that an adequate protein level may be 45%, which are in the range of the levels recommended for other decapods crustaceans at the earlier stages of rearing. With 45% dietary protein, all EAA contents were higher than the requirements determined for *P. vannamei* (Fox et al., 1995), *P. monodon* (Millamena et al., 1997, 1998, 1999), *Marsupeneus japonicus* (Alam et al., 2004; Teshima et al., 2002) and *Palaemonetes varians* (Palma et al., 2009). By the contrast, with 40% dietary protein EAA contents (except tryptophan) significantly decreased, being the content of histidine (0.59 g AA/100 g dry diet) below the requirements determined for the mentioned species.

Regarding substitution possibilities of FM by SBM, crustacean species studied appear to have different tolerance for dietary defatted soybean meal. For instance, up to 40% of marine animal protein can be replaced by SBM protein in diets for *P. vannamei* without compromising growth and feed efficiency (Lim and Dominy, 1990). However, García-Ulloa et al. (2003) noticed that a replacement of 25% may reduce growth in redclaw crayfish (*C. quadricarinatus*), and giant freshwater prawn (*M. rosenbergii*) showed reduced growth and feed efficiency when the level of replacement was only 20% (Du and Niu, 2003). Results of the present study demonstrate that in diets with 50% crude protein, 25% of FM protein could be replaced by SBM protein in the development of diets for juvenile astacid crayfish. Higher replacement levels negatively affected both survival and growth. It is known that there are nutrient limitations for the use of SBM in aquaculture diets. Compared with FM, SBM is deficient in EAA, especially lysine, methionine and threonine (Brown et al., 2008). In this study, with 35% replacement of FM by SBM, the contents of arginine, lysine, methionine and threonine were significantly lower than those of 0% or 25% replacement of FM by SBM, being the content of methionine (0.68 g AA/100 g dry diet) below the requirements determined for *P. monodon* (Millamena et al.,

1996), *M. japonicus* (Teshima et al., 2002) and *P. varians* (Palma et al., 2009). On the other hand, it should be noted that antinutritional factors (ANF) as trypsin inhibitors, lectin, saponins and antigenic proteins are present in soybeans (Brown et al., 2008). Although processing of soybeans to SBM and extrusion of feeds decrease concentrations of ANF, these compounds together with the deficiency in essential amino acids tend to limit the amount of SBM recommended for aquafeeds (Brown et al., 2008).

The present study provides information on optimum protein level and amino acid content of diets for juvenile astacid crayfish, as well as substitution possibilities of fish meal (FM) protein by soybean meal (SBM) protein in these diets. From these results, levels of 45–50% dietary protein with 25% replacement of FM protein by SBM protein can be recommended for juvenile *P. leniusculus* from the onset of exogenous feeding up to 100 days of intensive rearing.

Acknowledgements

We thank the financing of a grant for Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, reference AP2008-01009. We thank Nutral S.A. for providing the vitamin and mineral compounds. We also thank the Quiñón S.A. crayfish farm for their collaboration.

References

- Ackefors, H., Lindqvist, O.V., 1994. Cultivation of freshwater crayfishes in Europe. In: Huner, J.V. (Ed.), *Freshwater Crayfish Aquaculture*. The Haworth Press, Binghamton, New York, pp. 157–216.
- Ackefors, H., Gydemo, R., Westin, L., 1989. Growth and survival of juvenile crayfish, *Astacus astacus*, in relation to food and density. In: Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (Eds.), *Aquaculture: A Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society, Bredene, pp. 365–373.
- Ackefors, H., Castell, J.D., Boston, L.D., Råty, P., Svensson, M., 1992. Standard experimental diets for crustacean nutrition research. II. Growth and survival of juvenile crayfish *Astacus astacus* (Linné) fed diets containing various amounts of protein, carbohydrate and lipid. *Aquaculture* 104, 341–356.
- Alam, M.S., Teshima, S., Ishikawa, M., Hasegawa, D., Koshio, S., 2004. Dietary arginine requirement of juvenile kuruma shrimp *Marsupeneus japonicus* (Bate). *Aquaculture Research* 35, 99–105.
- Ashmore, S.B., Stanley, R.W., Moore, L.B., Malecha, S.R., 1985. Effect on growth and apparent digestibility of diets varying in grain source and protein level in *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of the World Aquaculture Society* 16, 205–216.
- Brown, P.B., Kaushik, S.J., Peres, H., 2008. Protein feedstuffs originating from soybeans. In: Lim, C., Webster, C.D., Lee, C. (Eds.), *Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets*. The Haworth Press, New York, pp. 205–223.
- Carral, J.M., González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., García, V., González, R., 2011. Proposal of a practical diet for juvenile astacid crayfish studies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401, 20.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudio, V.R., Temiño, C., Fernández, R., 1989. Response of juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) to several fresh and artificially compounded diets. *Aquaculture* 76, 67–78.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudio, V.R., González, J., Lopez-Baissions, C., Fernández, R., 1993. Survival and growth of juvenile freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana fed two raw diets and two commercial formulated feeds. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 108–111.
- Celada, J.D., Fuertes, J.B., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González, Á., González-Rodríguez, Á., 2012. Effects of vitamin C inclusion in practical diets on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture Nutrition*. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00949.x>.
- Cohen, S.A., De Antonis, K.M., 1994. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography*. A 661 (1–2), 25–34.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P., 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 211 (2), 279–287.
- Crandall, K., Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae – Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 295–301.
- Du, L., Niu, C.J., 2003. Effects of dietary substitution of soya bean meal for fish meal on consumption, growth, and metabolism of juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Nutrition* 9, 139–143.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), 2009. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2008 (SOFIA)*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.

- Fornshell, G., Hinshaw, J.M., 2009. Better management practices for flow-through aquaculture systems. In: Tucker, C.S., Hargreaves, J.A. (Eds.), *Environmental Best Management Practices for Aquaculture*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 231–288.
- Fox, J.M., Lawrence, A.L., Li-Chan, E., 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture* 131, 179–190.
- García-Ulloa, G.M., López-Chavarrín, H.M., Rodríguez-González, H., Villarreal-Colmenares, H., 2003. Growth of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens 1868) (Decapoda: Parastacidae) juveniles fed isoproteric diets with partial or total substitution of fish meal by soy bean meal: preliminary study. *Aquaculture Research* 9, 25–29.
- González, Á., Celada, J.D., González, R., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2008. *Artemia* nauplii and two commercial replacements as dietary supplement for juvenile signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture* 281, 83–86.
- González, R., Celada, J.D., Carral, J.M., González, Á., Sáez-Royuela, M., García, V., 2009. Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different feed supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture* 295, 200–204.
- González, R., Celada, J.D., González, A., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2010. Stocking density for the intensive rearing of juvenile crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), using *Artemia* nauplii to supplement a dry diet from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture International* 18, 371–378.
- González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., González, R., Carral, J.M., García, V., 2012. Response of juvenile astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) to three commercial dry diets with different protein levels during the first 6 months of intensive rearing. *Aquaculture Research* 43, 99–105.
- Hannesson, R., 2003. *Aquaculture and fisheries*. *Marine Policy* 27, 169–178.
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41, 770–776.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1973. Determination of Lipids Content (R-1443). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1978. Determination of Nitrogen Content (R-937). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1979. Determination of Moisture Content (R-1442). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998a. Determination of Ash Content (R-936). Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998b. Determination of Gross Caloric Value: Bomb Calorimeter Method (9831). Geneva, Switzerland.
- Keefe, A., Rouse, D., 1999. Protein requirements for juvenile Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Freshwater Crayfish* 12, 471–477.
- Lim, C., Dominy, W., 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 87, 53–63.
- Maguire, G.B., Hume, I.D., 1982. A study of the nutritional requirements of school shrimp *Metapenaeus macleayi* (haswell) in some Australian brackish water farming ponds. *Aquaculture* 29, 261–278.
- Millamena, O.M., Bautista-Teruel, M.N., Kanazawa, A., 1996. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 143, 403–410.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 151, 9–14.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1998. Requirements of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius for lysine and arginine. *Aquaculture* 164, 95–104.
- Millamena, O.M., Teruel, M.B., Kanazawa, A., Teshima, S., 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture* 179, 169–179.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliot, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 15103–15110.
- Nyström, P., 1994. Survival of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in relation to light intensity and density. *Nordic Journal of Freshwater Research* 69, 162–166.
- Palma, J., Bureau, D.P., Lemme, A., Correia, M., Andrade, J.P., 2009. Quantitative dietary requirement of juvenile Atlantic ditch shrimp *Palaemonetes varians* (Leach) for lysine, methionine and arginine. Unpublished. (Abstract ISFNF 2006).
- Pedrazzoli, A., Molina, C., Montoya, N., Townsend, S., León-Hing, A., Paredes, Y., Calderón, J., 1998. Recent advances on nutrition research of *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Reviews in Fisheries Science* 6, 143–151.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Muñoz, C., 1995. Effects of management on survival and growth of stage 2 juvenile freshwater signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under laboratory conditions. *Aquaculture* 133, 123–133.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Pérez, J.R., González, Á., 2007. Live feed as supplement from the onset of external feeding of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under controlled conditions. *Aquaculture* 269, 321–327.
- Shiau, S.Y., Chou, B.S., 1991. Effects of dietary protein and energy on growth performance of tiger shrimp *Penaeus monodon* reared in seawater. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 2271–2276.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 145–158.
- Takeuchi, T., Murakami, K., 2007. Crustacean nutrition and larval feed, with emphasis on Japanese spiny lobster, *Panilurus japonicus*. *Bulletin Fisheries Research Agency* 20, 15–23.
- Taugbøl, T., Skurdal, J., 1992. Growth, mortality and molting rate of noble crayfish *Astacus astacus* L. juveniles in aquaculture experiments. *Aquaculture Research* 23, 411–420.
- Teshima, S., Kanazawa, A., 1984. Effects of the protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates of the prawn larvae. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 50, 1709–1715.
- Teshima, S., Alam, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A., 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture Research* 33, 395–402.
- Ulikowski, D., Krzywosz, T., Smietana, P., 2006. A comparison of survival and growth in juvenile *Astacus leptodactylus* (Esch.) and *Pacifastacus leniusculus* (Dana) under controlled conditions. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 380–381, 1245–1253.
- Wolf, Y.S., 2004. Growth and macronutritional requirements of signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in aquaculture. Phd Thesis, Kiel, University.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online

Replacement of fish meal by pea protein concentrate in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding



J.B. Fuertes*, J.D. Celada, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, Á. González-Rodríguez

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 October 2012

Received in revised form 14 December 2012

Accepted 24 January 2013

Available online 31 January 2013

Keywords:

Astacid crayfish

Pacifastacus leniusculus

Juvenile rearing

Nutrition

Practical diets

Pea protein concentrate

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate different replacement levels of fish meal (FM) with pea protein concentrate (PPC) on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). A 100-day experiment was conducted with stage 2 juveniles from the onset of exogenous feeding. Four practical diets (50% crude protein) differing in the level of replacement of FM protein by PPC protein were prepared: 0% (control diet), 25% (20.2% dietary PPC), 35% (28.2% dietary PPC) or 45% (35.5% dietary PPC). Each diet was tested on grouped or individually isolated crayfish. The 25% or 35% replacement of FM protein by PPC protein resulted in survival (average of grouped and isolated: 83.6%) and growth (grouped and isolated: 14.44 mm carapace length, 674.9 mg weight) similar to those obtained with the control diet. Final growth of isolated crayfish was significantly higher than that of grouped crayfish with all diets. The relation among the amino acid profile of the diets, the performance of juveniles and the amino acid requirements determined for other crustacean species is discussed. The present study provides the first data on the substitution possibilities of FM by PPC in diets for freshwater crayfish. A 28.2% PPC (35% replacement of FM protein) can be included in formulated diets (50% crude protein) for juvenile *P. leniusculus* during the first 100 days of intensive rearing without impairing growth or feed conversion.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays there are about 550 recognized species of freshwater crayfish in the world (Crandal and Buhay, 2008). Some of them, mostly belonging to the family Astacidae, have attracted a strong interest for aquaculture purposes. At present, there is little knowledge on astacid crayfish nutrition and there are not available specifically formulated diets. Based on recent advances (González et al., 2008, 2009, 2012), Carral et al. (2011) prepared an extruded diet which has been proposed as a basis for further studies on juvenile crayfish, and used by Fuertes et al. (2012) to determine an adequate protein level for juvenile *Pacifastacus leniusculus* during the first 100 days of exogenous feeding.

When developing a diet, in order to choose the right ingredients, it should be taken into account the current availability and price of different feedstuffs. Crustacean aquaculture is highly dependent upon marine capture fisheries to supply fishmeal (FM), the most important and expensive protein ingredient used in aquafeeds (Tacon and Metian, 2008). This fact has led to a double concern, on the one hand the non-sustainability of the fisheries pressure on wild stocks to cover the increasing demand of FM (Hannesson, 2003; Naylor et al., 2009). On

the other hand, the rising prices of FM derived from the growing demand of FM make this ingredient less feasible to use at current inclusion recommended levels (FAO, 2009; Tacon and Metian, 2008). Thus, the aquafeed industry has to search for alternative protein sources less expensive to reduce their dependence in FM (Hardy, 2010; Naylor et al., 2009). Despite the possibility of including terrestrial animal by-products in aquaculture diets, there is much public concern in many countries due to BSE (bovine spongiform encephalopathy) and prion risks associated to such ingredients arising within the animal and consumer food chain, so legislation severely restricts the use of these feedstuffs. Other sources of protein are plants, which are often recommended because of their low price and consistent quality (Garza de Yta et al., 2012). Peas are common plants produced in significant quantities throughout the world, and they are already being used or considered for use in aquafeeds (Gatlin et al., 2007). Pea meal has been evaluated as an alternative protein source in several fish species as *Dicentrarchus labrax* (Gouveia and Davies, 2000), *Chanos chanos* (Borlongan et al., 2003) or *Oncorhynchus mykiss* (Thiessen et al., 2003), and some crustacean species such as *Litopenaeus vannamei* (Davies et al., 2002), *Penaeus monodon* (Bautista-Teruel et al., 2003) or *Cherax quadricarinatus* (Garza de Yta et al., 2012). Recent advances in pea processing technology have provided several products, as pea protein concentrate (PPC), which could be used as protein sources in aquaculture. PPC has been tested in fish species such as *D. labrax* (Tibaldi et

* Corresponding author. Tel./fax: +34 987 291187.

E-mail address: jbfuecl@unileon.es (J.B. Fuertes).

al., 2005), *Salmo salar* (Carter and Hauler, 2000; Øverland et al., 2009) or *O. mykiss* (Zhang et al., 2012), but to our knowledge, it has not been evaluated in crustaceans. Considering this, the aim of this study was to evaluate effects of practical diets with different levels of replacement of FM protein by PPC protein in juvenile astacid crayfish during the first period of rearing.

2. Materials and methods

2.1. Crayfish, facilities and experimental procedure

In late November of 2010, egg-bearing females (*P. leniusculus* Dana) from a crayfish farm were transferred to the laboratory located in the Department of Animal Production of the University of León (Spain), where egg development, hatching and first moult of juveniles (stage 2) took place under controlled conditions.

A 100-day experiment was conducted with stage 2 juveniles (average 5.21 ± 0.01 mm carapace length, 28.1 ± 0.4 mg weight) from the onset of exogenous feeding. A total of 1200 juveniles were housed in fibreglass tanks in groups at a stocking density of 100 m^{-2} and, in order to avoid the influence of intraspecific behavioural interactions such as cannibalism, 40 crayfish were kept individually. Thus, each of the four feeding treatments was tested on groups (three tanks for each treatment with 100 crayfish per tank, $n=300$) and individually isolated animals (10 tanks for each treatment with 1 crayfish per tank, $n=10$). Grouped crayfish were kept in tanks with 1 m^2 bottom and 200 l water. Each tank was provided with shelters: 4 groups of four jointed sections of PVC pipe (4 cm long \times 2 cm diameter) and 3 pieces of undulating fibre cement (54×20.5 cm). Isolated crayfish were kept individually in tanks (0.15 m^2 , 25 l water) with 1 group of four jointed sections of PVC pipe as shelter. Aerated artesian well water was supplied in open system (flow throughout), and each tank had its own water inlet (flow rate: 1.5 l min^{-1} for the tanks of 200 l and 0.25 l min^{-1} for the tanks of 25 l) and outlet, provided with a 250 μm mesh filter to avoid the escape of crayfish and feed. The parameters of incoming water quality were pH 8.3, hardness $5.4 \text{ }^\circ\text{dH}$ (German degrees, calcium 33.2 mg l^{-1}), total dissolved solids 113.2 mg l^{-1} and total suspended solids 37.1 mg l^{-1} . Throughout the trial, dissolved oxygen content was measured in the tanks every other day with a meter HATCH HQ30d (Hatch Lange GmbH; <http://www.hach-lange.es>) and values ranged between 6.1 mg l^{-1} and 8.2 mg l^{-1} . Ammonia and nitrites were measured with a spectrophotometer HATCH DR 2800 (Hatch Lange GmbH; <http://www.hach-lange.es>) from freshwater samples taken inside the tanks (values were always ammonia $<0.02 \text{ mg l}^{-1}$ and nitrites $<0.05 \text{ mg l}^{-1}$). Freshwater temperature was daily registered using maximum–minimum thermometers and maintained at 22 ± 1 °C. Photoperiod was natural (around 12 h light:12 h dark). Tanks, filters and shelters were cleaned every second day.

2.2. Diets and feeding

Based on the practical diet proposed by Carral et al. (2011), modified in the vitamin C content according to Celada et al. (2012), four diets (nearly isonitrogenous and isoenergetic) were prepared to test substitution possibilities of fish meal (FM) by pea protein concentrate (PPC) obtained by physical isolation technology. The FM and PPC used had 68.0% and 52.2% crude protein, respectively. The grinding was performed in a rotary mill BRABENDER (Brabender® GmbH & Co. KG; <http://www.brabender.com>). Ingredients were mixed in a mixer STEPHAN UMC5 (Stephan Food Service Equipment; <http://www.stephan-belgium.be/>) and extruded using a stand-alone extruder BRABENDER KE19/25D (Brabender® GmbH & Co. KG; <http://www.brabender.com>) at a temperature range between 75 °C and 100 °C. Pellets with 2 mm diameter were obtained and then dried during 24 h at 30 °C. Later, pellets received a coating of cod liver oil. Diets were stored at 3–4 °C until use.

According to Fuertes et al. (2012), 50% crude protein was established as dietary protein level. Four practical diets were prepared to test different levels of replacement of FM protein by PPC protein: 0% (control), 25% (20.2% dietary PPC), 35% (28.2% dietary PPC) or 45% (35.5% dietary PPC). Formulation and proximate composition of practical diets are presented in Table 1. Each diet was tested on three tanks with grouped crayfish ($n=300$) and 10 tanks with individually isolated crayfish ($n=10$).

A ration of 3% live body weight per day was adjusted based on a weekly estimation of biomass from each tank and the biomass calculated every 20 days from the samples. The ration was manually supplied once a day, and the feed pellets remained intact in the water around 8 h.

2.3. Chemical analysis of practical diets

All analyses were performed in duplicate. Proximate composition of practical diets (Table 1) was analyzed according to the Norms of the International Standards Organization: moisture to ISO R-1442 (ISO, 1979), protein to ISO R-937 (ISO, 1978), lipid to ISO R-1443 (ISO, 1973), ash to ISO R-936 (ISO, 1998a) and gross energy to ISO 9831 (ISO, 1998b). Samples were stored at -30 °C until analysis. Content of carbohydrates was calculated by subtracting the content of moisture, protein, lipid and ash from wet weight.

Crustaceans require ten kinds of essential amino acids (EAA) that are the same as those of fish (Takeuchi and Murakami, 2007). EAA and nonessential amino acids (NEAA) were analyzed by HPLC using

Table 1

Formulation and proximate composition of the practical diets with different levels of replacement of FM protein by PPC protein.

	Replacement (%)			
	0	25	35	45
<i>Ingredients (g kg⁻¹ diet)</i>				
Fish meal ^a	614.8	461.1	399.7	338.3
Corn meal ^b	130.2	82.3	63.3	51.2
Pea protein concentrate ^c	0	201.5	282.0	355.3
Cod liver oil ^d	30	30	30	30
Soy lecithin ^e	1	1	1	1
Cholesterol ^f	5	5	5	5
L-Ascorbyl-2-monophosphate-Na ^g	0.2	0.2	0.2	0.2
Choline chloride ^h	5	5	5	5
Dicalcium phosphate ^h	10	10	10	10
Decapsulated <i>Artemia</i> cysts ⁱ	150	150	150	150
Carboxymethylcellulose ^j	30	30	30	30
Astaxanthin ^a	1	1	1	1
Mineral premix ^k	20	20	20	20
Vitamin premix ^l	2.8	2.8	2.8	2.8
<i>Proximate composition (g kg⁻¹ diet fresh-weight basis)</i>				
Moisture	87.0	85.0	83.1	82.1
Crude protein	502.2	501.8	501.6	501.3
Crude fat	119.2	109.3	104.2	98.9
Carbohydrates	170.8	187.4	195.4	203.6
Ash	120.8	116.5	115.7	114.1
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	19.56	19.42	19.37	19.30

^a Biomar Iberia/Proaqua Nutrición, Dueñas (Palencia), Spain.

^b ADPAN, Siero-Asturias, Spain.

^c Yantai Oriental Protein Co., Ltd., Yantai, China.

^d ACOFARMA, Terrassa (Barcelona), Spain.

^e Biover NV/SA, Brujas, Belgium.

^f Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstr 2, D-89555 Steinheim, Germany.

^g Orffa Ingredients B.V., Burgstraat 12, 4283 GG Giessen, The Netherlands.

^h Nutral S.A., Madrid, Spain.

ⁱ *Artemia* cysts: Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 μm , Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium.

^j Helm Iberica S.A., Madrid, Spain.

^k (g kg⁻¹ premix): CoCl₂, 0.04; CuSO₄·5H₂O, 2.50; FeSO₄, 40; MgSO₄·7H₂O, 283.98; MnSO₄·H₂O, 6.50; KI, 0.67; Na₂SeO₃, 0.10; ZnSO₄·7H₂O, 131.93.

^l (g kg⁻¹ premix): thiamin, 21.43; riboflavin, 18.93; niacin, 71.43; pyridoxine, 17.86; pantothenic acid, 37.86; biotin, 0.36; folic acid, 5.71; cyanocobalamin, 0.07; myoinositol, 142.86; retinol, 0.54; α -tocopherol, 23.82; cholecalciferol, 3.93; naphthoquinone, 3.12; ethoxyquin, 35.71.

AccQTag method from Waters (Milford, MA, USA). Amino acids were derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydrosuccinimidyl carbamate reagent (AQC) by the method of Cohen and Michaud (1993) and Cohen and De Antonis (1994), and were detected by Dual λ Absorbance Detector Waters 2487 from waters (Milford, MA, USA) at 254 nm. Quantification was carried out with Empower Pro 2.0 software from Waters (Milford, MA, USA).

2.4. Data collection and statistical analysis Escuchar

Every 20 days, survivors were counted, and number of crayfish lacking one or two chelae was registered. Moreover, 15 randomly sampled juveniles per replicate from grouped crayfish (45 per treatment, 15% of the initial number) and all isolated crayfish were collected for recording carapace length (CL) and body weight (W).

At the end of the experiment (100 days), all crayfish were individually measured and weighed. Carapace length was measured with digital calliper (to the nearest 0.1 mm). To obtain individual wet weight, excess water was removed with tissue paper and a precision balance COBOS CB COMPLET (Balanzas Cobos; <http://www.balanzascobos.com>), to the nearest 0.001 g, was used. Specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) were expressed as $SGR = (\ln W_t - \ln W_i) \times 100/T$ and $WG = (W_t - W_i) / 100/W_i$, where W_t is the mean final weight, W_i is the mean initial weight, and T is the duration of the experiment (days). According to Fornshell and Hinshaw (2009), feed conversion ratio (FCR) was calculated as $FCR = D_t/W_t - W_i$, where D_t is the total amount of feed fed and $W_t - W_i$ is the increase in weight over 100 days.

All results were examined by analysis of variance (two-way ANOVA) using the computer program SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) to determine whether data were significantly different among groups. Duncan test was applied to compare means at the $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

3. Results

All practical diets were consumed from the first day as indicated by the externally observable presence in the translucent digestive tract of juvenile crayfish.

Final survival, growth and feed conversion values (100 days) are presented in Table 2. There were no significant differences in survival among crayfish fed the control diet (0% replacement), 25% or 35% replacement of FM protein by PPC protein (average of grouped and isolated crayfish: 83.6%). Survival of crayfish fed the diet with the highest replacement level (45%) was significantly lower (average of grouped and isolated crayfish: 73.5%). Within the same diet, survival

of isolated crayfish was significantly higher than that of grouped crayfish.

In terms of growth (Table 2), there were no significant differences among crayfish fed the diets with 25% or 35% replacement of FM protein by PPC protein (20.2% or 28.2% PPC in diet, respectively) and those fed the control diet (average of grouped and isolated crayfish of the three feeding treatments: 14.67 mm CL, 706 mg W, 3.67% SGR and 2765.9% WG). Figs. 1 and 2 show the changes in carapace length and weight (grouped and isolated crayfish), respectively, throughout the 100 days. Juveniles fed the control diet (0% replacement), 25% or 35% replacement of FM protein by PPC protein always grew faster than those fed the 45% replacement diet. These differences were significant from day 40 onwards.

Regardless the replacement level, final growth of isolated crayfish (average: 16.97 mm CL, 1357 mg W) was significantly higher than that of grouped crayfish (average: 13.88 mm CL, 601 mg W). Figs. 3 and 4 show the changes in carapace length and weight, respectively, of juvenile crayfish held in groups or individually isolated throughout the trial. Isolated crayfish grew faster than grouped crayfish, being significant differences from day 40 onwards.

FCRs (average of grouped and isolated crayfish) ranged from 1.06 to 1.39. The lowest value was obtained with the control diet without significant differences from the 25% or 35% replacement of FM protein (20.15% or 28.2% PPC in diet, respectively). With all diets, FCRs of isolated crayfish (average: 0.97) were significantly lower than those of grouped crayfish (average: 1.35).

Cheliped losses were not recorded in the individually isolated crayfish. In the grouped crayfish, percentages of juveniles lacking chelipeds did not show significant differences among feeding treatments along the trial. At the end of the experiment, values were from 4.8% to 6.4%, whereas in previous controls the range was 3.4–5.2%.

The amino acid profile of the practical diets is presented in Table 3. Considering the EAA, there were not significant differences in the content of isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, threonine, valine and tryptophan. The highest replacement levels of FM by PPC (35% or 45%) resulted in contents of arginine, histidine and methionine significantly lower than those of the control diet. With 35% replacement of FM protein by PPC protein, the reduction in the contents of the mentioned amino acids were 16% (arginine), 28% (methionine) and 32% (histidine). However, the growth was not significantly reduced. With 45% replacement of FM protein by PPC protein, these reductions were: 25% (arginine), 43% (methionine) and 51% (histidine), and the growth was significantly lower than that of the crayfish fed the control diet.

Table 2

Final survival, growth and feed conversion values of juvenile crayfish fed practical diets with different levels of substitution of FM protein by PPC protein over 100 days from the onset of exogenous feeding.

		Replacement (%)			
		0	25	35	45
Survival (%)	Groups	78.0 ± 1.0 ^a	77.5 ± 1.5 ^a	76.0 ± 2.0 ^a	67.0 ± 3.0 ^b
	Isolated	90 ^a	90 ^a	90 ^a	80 ^b
Carapace length (mm)	Groups	14.4 ± 0.39 ^a	14.3 ± 0.36 ^a	14.2 ± 0.32 ^a	12.3 ± 0.37 ^b
	Isolated	17.7 ± 0.53 ^a	17.6 ± 0.42 ^a	17.4 ± 0.38 ^a	15.2 ± 0.41 ^b
Weight (mg)	Groups	665 ± 38.7 ^a	658 ± 34.5 ^a	650 ± 38.9 ^a	430 ± 35.4 ^b
	Isolated	1585 ± 121.7 ^a	1567 ± 104.8 ^a	1529 ± 78.2 ^a	748 ± 61.4 ^b
SGR (% day ⁻¹)	Groups	3.19 ± 0.07 ^a	3.17 ± 0.04 ^a	3.13 ± 0.05 ^a	2.46 ± 0.08 ^b
	Isolated	4.07 ± 0.10 ^a	4.04 ± 0.09 ^a	4.02 ± 0.11 ^a	3.21 ± 0.08 ^b
WG (%)	Groups	2389.6 ± 106.2 ^a	2367.1 ± 139.9 ^a	2356.3 ± 125.4 ^a	1322.3 ± 113.0 ^b
	Isolated	5794.7 ± 312.3 ^a	5598.6 ± 227.7 ^a	5398.4 ± 186.9 ^a	2498.6 ± 92.8 ^b
FCR	Groups	1.24 ± 0.15 ^a	1.26 ± 0.16 ^a	1.29 ± 0.10 ^a	1.60 ± 0.17 ^b
	Isolated	0.88 ± 0.06 ^a	0.90 ± 0.07 ^a	0.93 ± 0.09 ^a	1.18 ± 0.11 ^b

Values are mean ± standard error.

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

SGR, specific growth rate (% day⁻¹) = $100 \times [(\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) \times \text{days}^{-1}]$.

WG, weight gain = $100 \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight}) \times \text{initial body weight}^{-1}$.

FCR, feed conversion ratio = $\text{feed fed} \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight})^{-1}$.

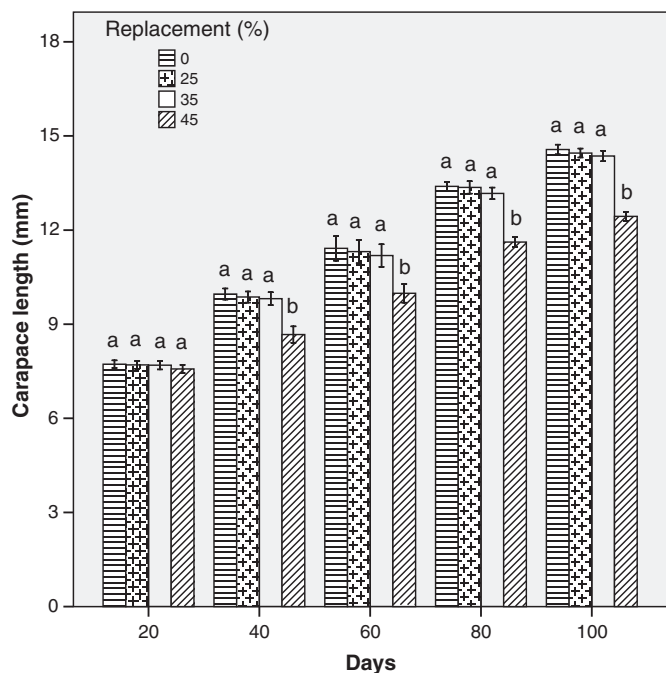


Fig. 1. Mean carapace length (grouped and isolated animals) at various periods of juvenile crayfish fed practical diets with different replacement levels of FM protein by PPC protein over 100 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

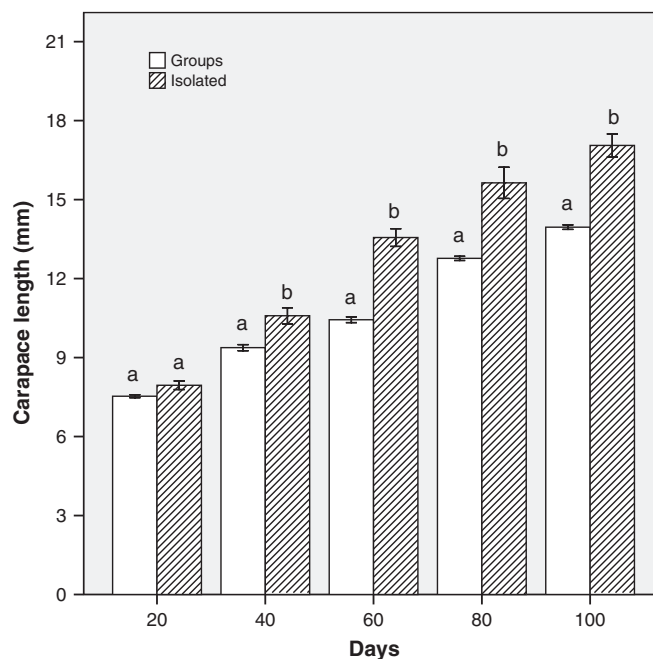


Fig. 3. Mean carapace length at various periods of juvenile crayfish held in groups or individually isolated over 100 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

4. Discussion

In the present study, crayfish were fed practical diets as the sole food, and results (grouped crayfish: around 76% survival and 660 mg W after 100 days) are in the range of the best results achieved when live *Artemia* nauplii (González et al., 2008, 2010, 2012) or decapsulated *Artemia* cysts (González et al., 2009) were combined with dry diets prepared for other

aquatic species. This may support the feasibility of the practical diet proposed by Carral et al. (2011) for juvenile astacid crayfish, in which are based the practical diets of this experiment. The use of this basal diet in further studies will lead to a progressive improvement of the current formulation and elaboration process by including future findings on crayfish nutrition. Up to now, Celada et al. (2012) have studied the vitamin C requirements, Fuertes et al. (2012) have determined an adequate

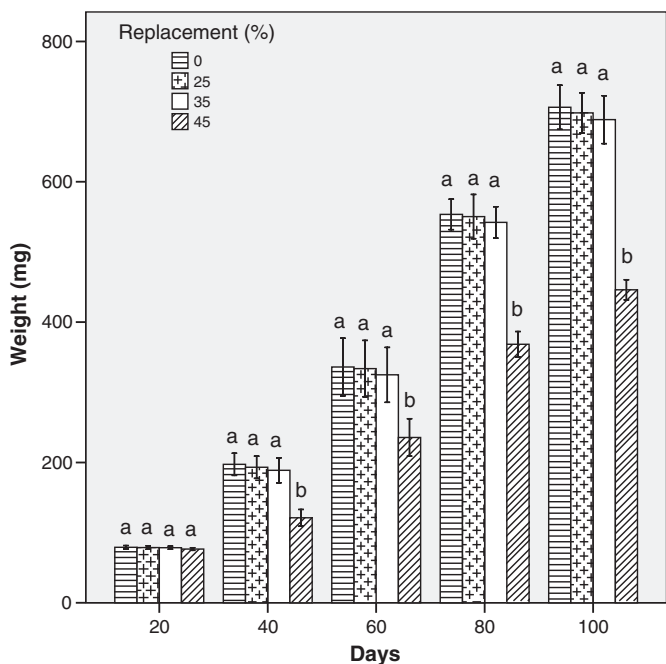


Fig. 2. Mean weight (grouped and isolated animals) at various periods of juvenile crayfish fed practical diets with different replacement levels of FM protein by PPC protein over 100 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

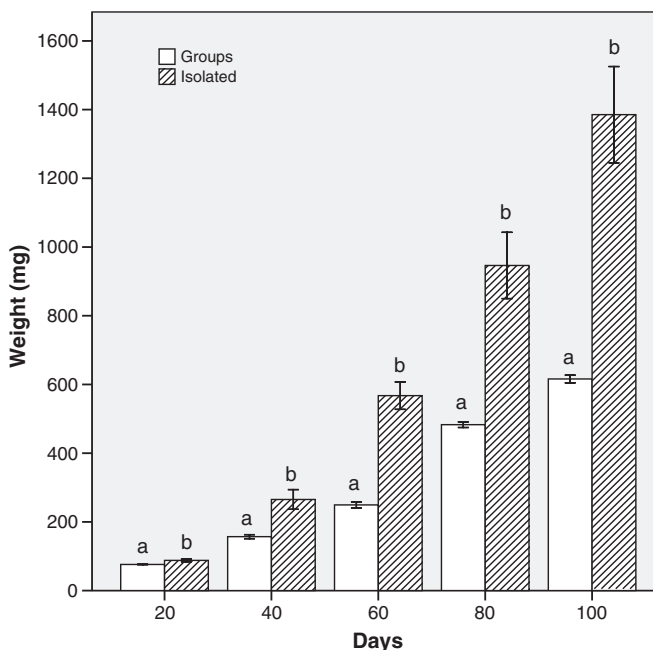


Fig. 4. Mean weight at various periods of juvenile crayfish held in groups or individually isolated over 100 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

Table 3

Amino acid profile of the practical diets with different levels of replacement of FM protein by PPC protein.

G AA kg ⁻¹ diet (fresh-weight basis)	Replacement (%)			
	0	25	35	45
EAA				
Arg	55.4	52.4	47.1	41.6
Hist	12.1	10.4	8.3	6.0
Ile	24.1	23.6	23.2	22.9
Leu	38.3	37.6	37.4	37.1
Lys	33.4	33.5	33.7	33.9
Met	12.5	11.0	9.0	7.1
Phe	19.1	18.7	18.6	18.3
Thr	24.1	23.3	23.0	22.6
Val	22.6	21.9	21.6	20.9
Trp	4.7	4.8	4.9	5.0
NEAA				
Ala	30.2	28.8	28.5	28.3
Asp	41.8	59.8	66.3	71.2
Glu	84.3	88.3	92.2	94.9
Gly	17.8	14.8	12.2	9.7
Pro	19.6	18.5	18.0	17.6
Ser	29.5	28.3	28.0	27.6
Tyr	14.0	14.0	14.0	14.1
Cys	1.8	1.7	1.6	1.5

protein level and evaluated possibilities of including soybean meal (SBM), and the present study demonstrate the potential for replacing 35% of FM protein with PPC (28.2% dietary PPC) in diets formulated to contain 50% crude protein without negative effects on the performance of juveniles.

With all diets tested, growth values of isolated crayfish were higher than those of communally reared juveniles, which contrast with previous studies (Celada et al., 1989, 1993; Sáez-Royuela et al., 1995) where it was the opposite. Just as reported by Celada et al. (2012), the use of an improved diet allowed that isolated crayfish could better express their growth potential since they do not waste energy for fighting and can utilize a higher proportion of consumed energy toward the growth process. Significant differences in FCR's values support this fact: FCR of the isolated crayfish (average: 0.97) was significantly lower than that of the grouped crayfish (average: 1.35).

It is known that there are nutrient limitations for the use of pea meal in aquaculture diets, mainly the presence of indigestible carbohydrates, antinutritional factors and high levels of fiber (Venero et al., 2008). Nevertheless, pea meal (around 23% crude protein) has been evaluated as an alternative protein source in several fish species, which appear to have different tolerance for this ingredient. For instance, up to 30% can be included in diets for European sea bass, *D. labrax* (Gouveia and Davies, 2000), without affecting growth, while the optimum inclusion levels in diets for milkfish, *C. chanos* (Borlongan et al., 2003), and rainbow trout, *O. mykiss* (Thiessen et al., 2003), were only 13.1% and 20%, respectively. Nowadays, there is little information on the use of pea meal in crustacean diets. Davies et al. (2002) noticed that a 20% of pea meal can be included in diets for juvenile *L. vannamei* without reducing growth, and Bautista-Teruel et al. (2003) included up to 42% in diets for *P. monodon* without compromising growth and feed efficiency. In juvenile *C. quadricarinatus*, Garza de Yta et al. (2012) tested only 10% of pea meal in diets and effects on growth were not observed. The processing of pea by physical isolation technology allows obtaining a pea protein concentrate (PPC, around 55% crude protein). Although dehulling of peas to obtain PPC decreases concentrations of antinutritional factors (Eusebio, 1991) and extrusion of feeds improves feed conversion ratio (Cruz-Suárez et al., 2001), these compounds together their deficiency in essential amino acids tend to limit the amount of PPC recommended for aquafeeds. The PPC has been tested in fish species as *D. labrax* (Tibaldi et al., 2005), *S. salar* (Carter and Hauler, 2000; Øverland et al., 2009; Penn et al., 2011) or *O. mykiss* (Zhang et al., 2012), with adequate

inclusion levels ranging from 20% to 36%. To our knowledge, the present study provides the first data on inclusion possibilities of PPC in crustacean diets. The arginine, histidine and methionine contents of the diet with 28.2% PPC (35% replacement of FM protein) were significantly lower than those of the control diet, however growth of *P. leniusculus* was not reduced. Considering this and that all EAA contents were higher than the requirements determined for other crustacean species as *P. monodon* (Millamena et al., 1996, 1997, 1998, 1999), *Marsupeneus japonicus* (Teshima et al., 2002) and *Palaemonetes varians* (Palma et al., 2009), it could be assumed that the control diet had an excess of these EAA. When replacement level was increased to 45% (35.5% dietary PPC), the contents of histidine (6.0 g kg⁻¹ diet) and methionine (7.1 g kg⁻¹ diet) (Table 3) were below the requirements determined for the mentioned crustacean species, and probably they were also lower than the requirements of juvenile signal crayfish, as their growth was reduced.

To summarize, the present study provides the first information on substitution possibilities of FM by PPC in diets for juvenile crayfish. A 28.2% PPC (35% replacement of FM protein) can be included in extruded diets (50% crude protein) for juvenile *P. leniusculus* from the onset of exogenous feeding up to 100 days of intensive rearing without impairing growth or feed conversion.

Acknowledgments

We thank the financing of a grant from Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, reference AP2008-01009. We thank Nutral S.A. for providing the vitamin and mineral compounds, and Yantai Oriental Protein Co. for providing the pea protein concentrate. We also thank the Quiñón S.A. crayfish farm for their collaboration.

References

- Bautista-Teruel, M.N., Eusebio, P.S., Welsh, T.P., 2003. Utilization of feed pea *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 225, 121–131.
- Borlongan, I.G., Eusebio, P.S., Welsh, T., 2003. Potential of feed pea (*Pisum sativum*) meal as a protein source in practical diets for milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture* 225, 89–98.
- Carral, J.M., González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., García, V., González, R., 2011. Proposal of a practical diet for juvenile astacid crayfish studies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401, 20.
- Carter, C.G., Hauler, R.C., 2000. Fish meal replacement by plants meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 185, 299–311.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudioso, V.R., Temiño, C., Fernández, R., 1989. Response of juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) to several fresh and artificially compounded diets. *Aquaculture* 76, 67–78.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudioso, V.R., González, J., Lopez-Baissions, C., Fernández, R., 1993. Survival and growth of juvenile freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana fed two raw diets and two commercial formulated feeds. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 108–111.
- Celada, J.D., Fuertes, J.B., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González, Á., González-Rodríguez, Á., 2012. Effects of vitamin C inclusion in practical diets on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture Nutrition*. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00949.x>.
- Cohen, S.A., De Antonis, K.M., 1994. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography. A* 661 (1–2), 25–34.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P., 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 211 (2), 279–287.
- Crandal, K., Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae – Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 295–301.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., McCallum, I.M., Hickling, D., 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 196, 87–104.
- Davies, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I.M., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 8, 87–94.
- Eusebio, P.S., 1991. Effect of dehulling on the nutritive value of some leguminous seeds as protein sources for tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 99, 297–308.

- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture 2008 (SOFIA). FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, p. 176.
- Fornshell, G., Hinshaw, J.M., 2009. Better management practices for flow-through aquaculture systems. In: Tucker, C.S., Hargreaves, J.A. (Eds.), *Environmental Best Management Practices for Aquaculture*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 331–388.
- Fuertes, J.B., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González-Rodríguez, Á., 2012. Effects of dietary protein and different levels of replacement of fish meal by soybean meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.050>.
- Garza de Yta, A., Davis, D.A., Rouse, D.B., Ghanawi, J., Salud, I.P., 2012. Evaluation of practical diets containing various terrestrial protein sources on survival and growth parameters of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research* 43, 84–90.
- Gatlin, D.M., Barrows, F., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38, 551–579.
- González, Á., Celada, J.D., González, R., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2008. *Artemia* nauplii and two commercial replacements as dietary supplement for juvenile signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture* 281, 83–86.
- González, R., Celada, J.D., Carral, J.M., González, Á., Sáez-Royuela, M., García, V., 2009. Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different feed supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture* 295, 200–204.
- González, R., Celada, J.D., González, Á., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2010. Stocking density for the intensive rearing of juvenile crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), using *Artemia* nauplii to supplement a dry diet from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture International* 18, 371–378.
- González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., González, R., Carral, J.M., García, V., 2012. Response of juvenile astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) to three commercial dry diets with different protein levels during the first 6 months of intensive rearing. *Aquaculture Research* 43, 99–105.
- Gouveia, A., Davies, S.J., 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 182, 183–193.
- Hannesson, R., 2003. *Aquaculture and fisheries*. Marine Policy 27, 169–178.
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41, 770–776.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1973. Determination of Lipids Content (R-1443). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1978. Determination of Nitrogen Content (R-937). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1979. Determination of moisture content (R-1442). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998a. Determination of ash content (R-936). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998b. Determination of Gross Caloric Value: Bomb Calorimeter Method (9831). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Millamena, O.M., Bautista-Teruel, M.N., Kanazawa, A., 1996. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 143, 403–410.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 151, 9–14.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1998. Requirements of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius for lysine and arginine. *Aquaculture* 164, 95–104.
- Millamena, O.M., Teruel, M.B., Kanazawa, A., Teshima, S., 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture* 179, 169–179.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliot, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 15103–15110.
- Øverland, M., Sørensen, M., Storebakken, T., Krogdahl, A., Skrede, A., 2009. Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) — effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. *Aquaculture* 288, 305–311.
- Palma, J., Bureau, D.P., Lemme, A., Correia, M., Andrade, J.P., 2009. Quantitative dietary requirement of juvenile Atlantic ditch shrimp *Palaemonetes varians* (Leach) for lysine, methionine and arginine. Unpublished. (Abstract ISFNF 2006).
- Penn, M.H., Bendiksen, E.A., Campbell, P., Krogdahl, A., 2011. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 310, 267–273.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Muñoz, C., 1995. Effects of management on survival and growth of stage 2 juvenile freshwater signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under laboratory conditions. *Aquaculture* 133, 123–133.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 145–158.
- Takeuchi, T., Murakami, K., 2007. Crustacean nutrition and larval feed, with emphasis on Japanese spiny lobster, *Panilurus japonicus*. *Bulletin of Fisheries Research Agency* 20, 15–23.
- Teshima, S., Alam, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A., 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture Research* 33, 395–402.
- Thiessen, D.L., Campbell, G.L., Adelizi, P.D., 2003. Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquaculture Nutrition* 9, 67–75.
- Tibaldi, E., Tulli, F., Messina, M., Franchin, C., Badini, E., 2005. Pea protein concentrate as a substitute for fish meal protein in sea bass diet. *Italian Journal of Animal Science* 4, 597–599.
- Venero, J.A., Davis, D.A., Lim, C., 2008. Use of plant protein sources in crustaceans diets. In: Lim, C., Webster, C.D., Lee, C. (Eds.), *Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets*. The Haworth Press, New York, pp. 163–203.
- Zhang, Y., Øverland, M., Sørensen, M., Penn, M., Mydland, L.T., Shearer, K.D., Storebakken, T., 2012. Optimal inclusion of lupin and pea protein concentrates in extruded diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344–349, 100–113.



Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding



J.B. Fuertes^{*}, J.D. Celada, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela, Á. González-Rodríguez

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2012
Received in revised form 10 April 2013
Accepted 11 April 2013
Available online 18 April 2013

Keywords:

Astacid crayfish
Nutrition
Alternative protein
Amino acids
Poultry by-product meal

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate different replacement levels of fish meal (FM) by poultry by-product meal (PBM) on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). An 80-day experiment was conducted with stage 2 juveniles from the onset of exogenous feeding. Six practical diets (50% crude protein) differing in the level of replacement of FM protein by PBM protein were prepared: 0% (control), 15%, 25%, 35%, 45% or 55%, corresponding to 0%, 10.5%, 17.7%, 24.4%, 31.3% or 38.2% dietary PBM, respectively. Each diet was tested on grouped or individually isolated crayfish. There were no significant differences in survival among grouped crayfish fed the control diet (0% replacement) and those fed replacement levels up to 45% (31.3% dietary PBM) (average: 74.9%). Survival of grouped crayfish fed the highest replacement level (55%) was significantly lower (63.0%). In the case of isolated crayfish, diets tested had no significant effects on survival (average: 98.3%). Diets with 15%, 25%, 35% or 45% replacement of FM protein by PBM protein resulted in growth values (grouped and isolated: 13.2 mm carapace length, 555 mg weight) similar to those obtained with the control diet. Final growth of isolated crayfish was significantly higher than that of grouped crayfish with all diets. FCRs (average of grouped and isolated crayfish) ranged from 0.98 to 1.32. The relations among the amino acid profile of the diets, the amino acid requirements of other crustacean species, the amino acid composition of whole body of crayfish and the performance of juveniles are discussed. The present study provides the first data on the substitution possibilities of FM by PBM in diets for freshwater crayfish. Up to 31.3% PBM (45% replacement of FM protein) can be included in formulated diets (50% crude protein) for juvenile *P. leniusculus* during the first 80 days of intensive rearing without impairing growth or feed conversion.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

At the present day, 550 species of freshwater crayfish are known in the world (Crandal and Buhay, 2008). Several of them, mostly belonging to the family Astacidae, have attracted a strong interest for aquaculture purposes. Currently, there is little knowledge on crayfish nutrition and specifically formulated diets are not available. Based on recent advances (González et al., 2008, 2009, 2012), Carral et al. (2011) prepared an extruded diet which has been proposed as basis for further studies on juvenile crayfish, and used by Fuertes et al. (2012) to determine an adequate protein level for juvenile *Pacifastacus leniusculus* during the first period of rearing.

When developing a diet, in order to choose the right ingredients, it should be considered the availability and price of different feedstuffs.

Finfish and crustacean aquaculture is highly dependent upon marine capture fisheries to supply fishmeal (FM), the most important protein ingredient used in aquafeeds (Tacon and Metian, 2008). Nowadays, the non-sustainable fisheries pressure on wild stocks and the rising prices derived from the growing demand of FM make this ingredient less feasible to use at current inclusion levels (FAO, 2009; Hannesson, 2003; Naylor et al., 2009; Tacon and Metian, 2008). Thus, the aquafeed industry has to search for alternative protein sources to reduce their dependence of FM (Hardy, 2010; Naylor et al., 2009). One of the most promising alternatives is poultry by-product meal (PBM). It is readily available at a lower price than FM and is a sustainable source of animal protein (Cruz-Suárez et al., 2007). In crustaceans, PBM has been tested in diets for *Penaes monodon* (Phuong and Yu, 2003), *Macrobrachium nipponense* (Yang et al., 2004), *Litopenaeus vannamei* (Cruz-Suárez et al., 2007) and *Cherax quadricarinatus* (Saoud et al., 2008). The inclusion levels without affecting growth in these species ranges from 21.2% to 31.4%. The aim of this study was to evaluate effects of practical diets with different levels of replacement of FM protein by PBM protein in juvenile astacid crayfish (*P. leniusculus*) during the first period of intensive rearing.

^{*} Corresponding author. Tel./fax: +34 987 291187.
E-mail address: jbfuecl@unileon.es (J.B. Fuertes).

2. Materials and methods

2.1. Crayfish, facilities and experimental procedure

In early December, egg-bearing females (*P. leniusculus* Dana) from a crayfish farm were transferred to the laboratory, where egg development, hatching and first molt of juveniles (stage 2) took place under controlled conditions.

An 80-day experiment was conducted with stage 2 juveniles (average 5.33 ± 0.02 mm carapace length, 30.3 ± 0.2 mg weight) from the onset of exogenous feeding. A total of 1800 juveniles were housed in fiberglass tanks in groups at a stocking density of 100 m^{-2} and, in order to avoid the influence of intraspecific behavioral interactions such as fighting and cannibalism, 60 crayfish were kept individually. Thus, six practical diets were tested on groups (three tanks for each treatment with 100 crayfish per tank) and individually isolated animals (10 tanks for each treatment with 1 crayfish per tank). Grouped crayfish were kept in tanks with 1 m^2 bottom and 200 l water. Each tank was provided with shelters: 4 groups of four jointed sections of PVC pipe (4 cm long \times 2 cm diameter) and 3 pieces of undulating fiber cement (54×20.5 cm). Isolated crayfish were kept individually in tanks (0.15 m^2 , 25 l water) with 1 group of four jointed sections of PVC pipe as shelter. Aerated artesian well water was supplied in open system (flow through), and each tank had its own water inlet (flow rate: 1.5 l min^{-1} for the tanks of 200 l and 0.25 l min^{-1} for the tanks of 25 l) and outlet, provided with a $250 \mu\text{m}$ mesh filter to avoid the escape of crayfish and feed. The parameters of incoming water quality were pH 7.7, hardness $5.3 \text{ }^\circ\text{dH}$ (German degrees, calcium 33.0 mg l^{-1}), total dissolved solids 110.1 mg l^{-1} and total suspended solids 35.7 mg l^{-1} . Throughout the trial, dissolved oxygen content was measured in the tanks every other day with a meter HACH HQ30d (Hach Lange GmbH; <http://www.hach-lange.es>) and values ranged between 6.0 mg l^{-1} and 7.9 mg l^{-1} . Ammonia and nitrites were measured with a spectrophotometer HACH DR 2800 (Hach Lange GmbH; <http://www.hach-lange.es>) from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia $<0.02 \text{ mg l}^{-1}$ and nitrites $<0.05 \text{ mg l}^{-1}$). Water temperature was daily registered using maximum–minimum thermometers and maintained at $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Photoperiod was natural (around 12 h light:12 h dark). Tanks, filters and shelters were cleaned every second day.

All procedures used in the study were approved by the León University Ethics Committee (Spain).

2.2. Diets and feeding

Based on the practical diet proposed by Carral et al. (2011), modified in the vitamin C content according to Celada et al. (2013), six diets (nearly isonitrogenous and isoenergetic) were prepared to test substitution possibilities of fish meal (FM) by poultry by-product meal (PBM). Proximate composition and amino acid profile of FM and PBM are in Table 1. The grinding was performed in a rotary mill BRABENDER (Brabender® GmbH & Co. KG; <http://www.brabender.com>). Ingredients were mixed in a mixer STEPHAN UMC5 (Stephan Food Service Equipment; <http://www.stephan-belgium.be/>) and extruded using a stand-alone extruder BRABENDER KE19/25D (Brabender® GmbH & Co. KG; <http://www.brabender.com>) at a temperature range between $95 \text{ }^\circ\text{C}$ and $115 \text{ }^\circ\text{C}$. Pellets with 2 mm diameter were obtained and then dried during 24 h at $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Later, pellets received a coating of cod liver oil. Diets were stored at $3\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$ until use.

According to Fuertes et al. (2012), 50% crude protein was established as basal dietary protein. Six diets were prepared to test different levels of replacement of FM protein by PBM protein: 0% (control), 15%, 25%, 35%, 45% or 55%, corresponding to 0%, 10.5%, 17.7%, 24.4%, 31.3% or 38.2% dietary PBM, respectively. Formulation and proximate composition of the practical diets are in Table 2. Each diet was tested on three

Table 1

Proximate composition and amino acid profile (g kg^{-1} fresh-weight basis) of the FM and PBM used in the experiment.

	FM	PBM
<i>Proximate composition</i>		
Moisture	74.3	50.6
Crude protein	679.0	601.0
Crude fat	88.7	190.5
Carbohydrates	0	34.5
Ash	158	123.4
<i>Essential amino acid</i>		
Arginine	97.8	92.4
Histidine	12.9	10.0
Isoleucine	35.1	29.3
Leucine	45.4	44.7
Lysine	61.1	39.4
Methionine	42.4	20.4
Phenylalanine	29.1	21.1
Threonine	37.3	29.0
Valine	24.7	34.2
Tryptophan	1.7	1.1
<i>Nonessential amino acid</i>		
Alanine	43.2	37.9
Aspartic acid	61.1	49.6
Glutamic acid	85.4	55.1
Glycine	8.2	6.6
Proline	25.3	48.1
Serine	38.3	44.8
Tyrosine	20.1	15.4
Cysteine	3.8	6.3

Asparagine and glutamine content were not determined.

tanks with grouped crayfish (100 crayfish per tank) and 10 tanks with individually isolated crayfish.

A ration of 3% live body weight per day was adjusted on the basis of the biomass calculated every 20 days from the samples (see Section 2.4). This ration was always slightly higher than consumption, as demonstrated by the presence of a small amount of uneaten feed in the tanks every day. The ration was manually supplied once a day, and the feed pellets remained intact in the water around 12 h.

2.3. Chemical analysis of practical diets and whole body of juvenile crayfish

At the end of the experiment, all surviving crayfish were collected. Grouped and isolated crayfish from the same feeding treatment were pooled and stored at $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. All analyses were performed in duplicate. Proximate composition of FM and PBM (Table 1), practical diets (Table 2) and whole body of juvenile crayfish (Table 5) were analyzed according to the Norms of the International Standards Organization: moisture to ISO R-1442 (ISO, 1979), protein to ISO R-937 (ISO, 1978), lipid to ISO R-1443 (ISO, 1973), ash to ISO R-936 (ISO, 1998a) and gross energy to ISO 9831 (ISO, 1998b). The content of carbohydrates was calculated by subtracting the content of moisture, protein, lipid and ash from the wet weight.

Crustaceans require ten kinds of essential amino acids (EAA) that are the same as that of fish (Takeuchi and Murakami, 2007). Amino acid profile of FM and PBM (Table 1), practical diets (Table 3) and whole body of juvenile crayfish (Table 5) were analyzed by HPLC using AccQTag method from Waters (Milford, MA, USA). Amino acids were derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydrosysuccinimidyl carbamate reagent (AQC) by the method of Cohen and Michaud (1993) and Cohen and De Antonis (1994), and were detected by Dual λ Absorbance Detector Waters 2487 from Waters (Milford, MA, USA) at 254 nm. Quantification was carried out with Empower Pro 2.0 software from Waters (Milford, MA, USA).

Table 2
Formulation and proximate composition of the practical diets with different levels of replacement of FM protein by PBM protein.

	Replacement (%)					
	0	15	25	35	45	55
<i>Ingredients (g kg⁻¹ diet)</i>						
Fish meal ^a	615.0	522.8	461.2	399.8	338.0	276.8
Corn meal ^b	110.3	109.0	108.5	107.0	102.3	96.5
Poultry by-product meal ^c	0.0	104.5	176.6	244.0	313.0	382.0
Cod liver oil ^d	30	30	30	30	30	30
Soy lecithin ^e	31	20	10	5.5	3.0	1.0
Cholesterol ^f	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
L-ascorbyl-2-monophosphate-Na ^g	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Choline chloride ^h	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Dicalcium phosphate ^h	10	10	10	10	10	10
Decapsulated <i>Artemia</i> cysts ⁱ	150	150	150	150	150	150
Carboxymethylcellulose ^j	30	30	30	30	30	30
Astaxanthin ^a	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral and vitamin premix ^k	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>Proximate composition (g kg⁻¹ diet fresh-weight basis)</i>						
Moisture	87.5	84.5	84.1	85.0	87.0	86.3
Crude protein	502.8	502.0	501.7	501.6	501.4	501.1
Crude fat	109.5	114.3	116.1	117.4	118.2	119.8
Carbohydrates	151.8	152.2	152.8	153.4	153.7	153.9
Ash	148.4	147.0	145.3	142.6	139.7	138.9
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	20.26	20.71	20.88	21.01	21.28	21.32

^a Biomar Iberia/Proaqua Nutrición, Dueñas (Palencia), Spain.^b ADPAN, Siero-Asturias, Spain.^c SKRETTING, Cojóbar (Burgos), Spain.^d ACOFARMA, Terrassa (Barcelona), Spain.^e Biover NV/SA, Brujas, Belgium.^f Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim, Germany.^g Orffa Ingredients B.V., Burgstraat 12, 4283 GG Giessen, The Netherlands.^h Nutral S.A., Madrid, Spain.ⁱ *Artemia* cysts: Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium.^j Helm Iberica S.A., Madrid, Spain.^k (g kg⁻¹ premix): CoCl₂, 0.064; CuSO₄·5H₂O, 4; FeSO₄, 64; MgSO₄·7H₂O, 454.37; MnSO₄·H₂O, 10.4; KI, 1.07; Na₂SeO₃, 0.16; ZnSO₄·7H₂O, 211.09; thiamin, 4.8; riboflavin, 4.24; niacin, 16.00; pyridoxine, 4.00; pantothenic acid, 8.48; biotin, 0.08; folic acid, 1.28; cyanocobalamin, 0.02; myoinositol, 32.00; retinol, 0.40; α-tocopherol, 5.34; cholecalciferol, 0.88; naphthoquinone, 0.72; ethoxyquin, 8.00.**Table 3**
Amino acid profiles (g kg⁻¹ diet fresh-weight basis) of the practical diets with different levels of replacement of FM protein by PBM protein.

	Replacement (%)					
	0	15	25	35	45	55
<i>Essential amino acid</i>						
Arginine	67.5	67.7	67.9	68.0	68.1	68.6
Histidine	12.1	11.7	11.5	11.0	10.9	10.9
Isoleucine	23.6	23.4	23.1	23.0	23.0	22.5
Leucine	36.5	36.8	37.5	37.5	37.8	37.9
Lysine	38.5	38.0	36.8	36.0	35.7	35.6
Methionine	12.2 ^a	11.7 ^a	11.7 ^a	11.1 ^a	10.0 ^{a,b}	8.0 ^b
Phenylalanine	24.2	23.7	23.4	23.2	22.7	22.4
Threonine	21.0	20.7	20.5	20.5	20.2	19.7
Valine	24.6	25.0	25.2	25.8	25.9	26.1
Tryptophan	1.4	1.4	1.3	1.3	1.1	1.1
∑EAA	261.6	260.1	258.9	257.4	255.4	252.7
<i>Nonessential amino acid</i>						
Alanine	29.5	29.4	29.4	29.2	29.0	29.0
Aspartic acid	42.7	42.0	41.7	41.4	41.0	40.8
Glutamic acid	84.2 ^a	82.1 ^a	81.0 ^a	79.2 ^a	78.2 ^{a,b}	76.7 ^b
Glycine	7.8	7.4	7.3	7.0	6.7	6.7
Proline	22.5 ^a	23.9 ^a	25.0 ^a	27.2 ^{a,b}	29.4 ^b	32.9 ^b
Serine	29.2	30.3	32.4	33.4	33.9	34.2
Tyrosine	14.3	14.0	13.9	13.7	13.6	13.6
Cysteine	2.8 ^a	3.0 ^a	3.4 ^{a,b}	3.5 ^{a,b}	3.9 ^{a,b}	4.1 ^b
∑NEAA	233.0	232.1	234.3	234.6	235.7	238.0

Asparagine and glutamine content were not determined.

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

∑EAA = sum of essential amino acid.

∑NEAA = sum of nonessential amino acid.

2.4. Data collection and statistical analysis

Every 20 days, survivors were counted, number of crayfish lacking one or two chelae was registered, and 15 randomly sampled juveniles per replicate of grouped animals (45 per treatment, 15% of the initial number) and all isolated crayfish were collected for recording carapace length (CL) and body weight (W). Carapace length was measured with a digital caliper (to the nearest 0.1 mm). To obtain individual wet weight, excess water was removed with tissue paper and a precision balance COBOS CB COMPLETE (Balanzas Cobos; <http://www.balanzascobos.com>), to the nearest 0.001 g, was used.

At the end of the experiment (80 days), all crayfish were individually measured and weighed. Weight gain (WG) was expressed as $WG = (W_t - W_i)100 / W_i$, where W_t is the mean final weight, W_i is the mean initial weight, and T is the duration of the experiment (days). According to Fornshell and Hinshaw (2009), feed conversion ratio (FCR) was calculated as $FCR = D_t / W_t - W_i$, where D_t is the total amount of feed fed and $W_t - W_i$ is the increase in weight over 80 days. Protein efficiency ratio (PER) was expressed as $PER = (W_t - W_i) / P_t$, where P_t is the total amount of protein fed.

All results were examined by analysis of variance (two-way ANOVA) using the computer program SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) to determine whether data were significantly different among groups. The main factors considered in the statistical analysis were: effects of diets on grouped crayfish, effects of diets on isolated crayfish, overall effects of diets and overall effects on grouped vs. isolated crayfish. Newman-Keuls test was applied to compare means at the $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

Table 4

Final survival, growth and feed conversion values of juvenile crayfish fed practical diets with different levels of substitution of FM protein by PBM protein over 80 days from the onset of exogenous feeding.

		Replacement (%)					
		0	15	25	35	45	55
Survival (%)	Groups	78.0 ± 2.0 ^a	76.5 ± 1.5 ^a	74.6 ± 1.4 ^a	73.0 ± 1.0 ^a	72.7 ± 1.3 ^a	63.0 ± 1.8 ^b
	Isolated	100	100	100	100	100	90
Carapace length (mm)	Groups	12.8 ± 0.28 ^a	12.6 ± 0.23 ^a	12.5 ± 0.30 ^a	12.4 ± 0.21 ^a	12.2 ± 0.33 ^a	11.0 ± 0.20 ^b
	Isolated	16.8 ± 0.39 ^a	16.5 ± 0.32 ^a	16.1 ± 0.36 ^a	16.1 ± 0.33 ^a	16.0 ± 0.31 ^a	14.0 ± 0.29 ^b
Weight (mg)	Groups	495 ± 44.4 ^a	489 ± 40.5 ^a	481 ± 38.9 ^a	476 ± 37.3 ^a	470 ± 41.2 ^a	308 ± 29.1 ^b
	Isolated	1092 ± 101.1 ^a	1064 ± 98.6 ^a	1025 ± 88.3 ^a	1000 ± 87.4 ^a	990 ± 86.4 ^a	668 ± 51.2 ^b
WG (%)	Groups	1664.3 ± 138.1 ^a	1642.2 ± 154.9 ^a	1613.7 ± 145.8 ^a	1595.3 ± 123.0 ^a	1574.8 ± 165.4 ^a	999.6 ± 93.0 ^b
	Isolated	3794.9 ± 221.5 ^a	3694.8 ± 207.1 ^a	3559.1 ± 205.9 ^a	3466.3 ± 190.8 ^a	3395.2 ± 206.9 ^a	2221.1 ± 88.8 ^b
FCR	Groups	1.12 ± 0.10 ^a	1.14 ± 0.13 ^a	1.17 ± 0.15 ^a	1.19 ± 0.14 ^a	1.22 ± 0.12 ^a	1.38 ± 0.15 ^b
	Isolated	0.84 ± 0.05 ^a	0.86 ± 0.04 ^a	0.89 ± 0.07 ^a	0.92 ± 0.05 ^a	0.93 ± 0.08 ^a	1.26 ± 0.10 ^b
PER	Groups	1.82 ± 0.04	1.81 ± 0.06	1.79 ± 0.02	1.78 ± 0.07	1.78 ± 0.06	1.76 ± 0.05
	Isolated	2.14 ± 0.06	2.11 ± 0.08	2.09 ± 0.03	2.08 ± 0.07	2.07 ± 0.09	2.06 ± 0.08

Values are mean ± standard error. Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

3. Results

All practical diets were consumed from the first day as indicated by the externally observable presence in the translucent digestive tract of juvenile crayfish.

Final survival, growth and feed conversion values (80 days) are presented in Table 4. There were no significant differences in survival among grouped crayfish fed the control diet (0% replacement) and those fed replacement levels up to 45% (31.3% dietary PBM) (average: 74.9%). Survival of grouped crayfish fed the highest replacement level (55%) was significantly lower (63.0%). In the case of isolated crayfish, diets tested had no significant effects on survival (average: 98.3%). Within the same diet, survival of isolated crayfish was significantly higher than that of grouped crayfish.

In terms of growth (Table 4), there were no significant differences among crayfish fed the diets with 15%, 25%, 35% or 45% replacement of FM protein (10.5%, 17.7%, 24.4% or 31.3% PBM in diet, respectively) and those fed the control diet (average of grouped and isolated

crayfish of the five treatments: 13.2 mm CL, 555 mg W and 2160.9% WG). Fig. 1 shows the changes in weight (grouped and isolated crayfish) throughout the 80 days of trial. Juveniles fed 55% replacement of FM protein grew slower than those fed lower replacement levels. Differences were significant from day 40 onwards.

Regardless of the replacement level, final growth values of isolated crayfish (average: 15.9 mm CL, 983 mg W) were significantly higher than those of grouped crayfish (average: 12.3 mm CL, 453 mg W). Fig. 2 shows the changes in weight of juvenile crayfish held in groups or individually isolated throughout the trial. Isolated crayfish grew faster than grouped crayfish, being significant differences from day 40 onwards.

FCRs (average of grouped and isolated crayfish) ranged from 0.98 to 1.32. The lowest value was obtained with the control diet without significant differences from the 15%, 25%, 35% or 45% replacement of FM protein (10.4%, 17.7%, 24.4% or 31.3% PBM in diet, respectively). For all diets, FCRs of isolated crayfish (average: 0.95) were significantly lower than those of grouped crayfish (average: 1.20).

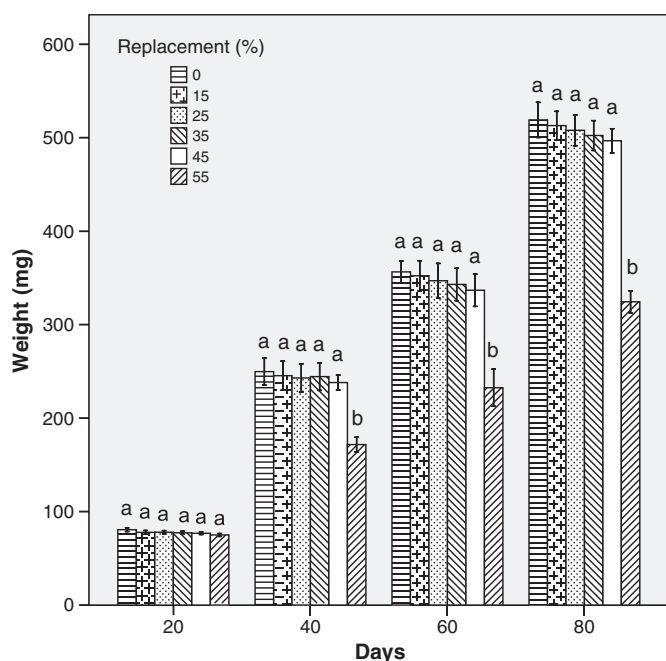


Fig. 1. Mean weight (grouped and isolated animals) at various periods of juvenile crayfish fed practical diets with different replacement levels of FM protein by PBM protein over 80 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

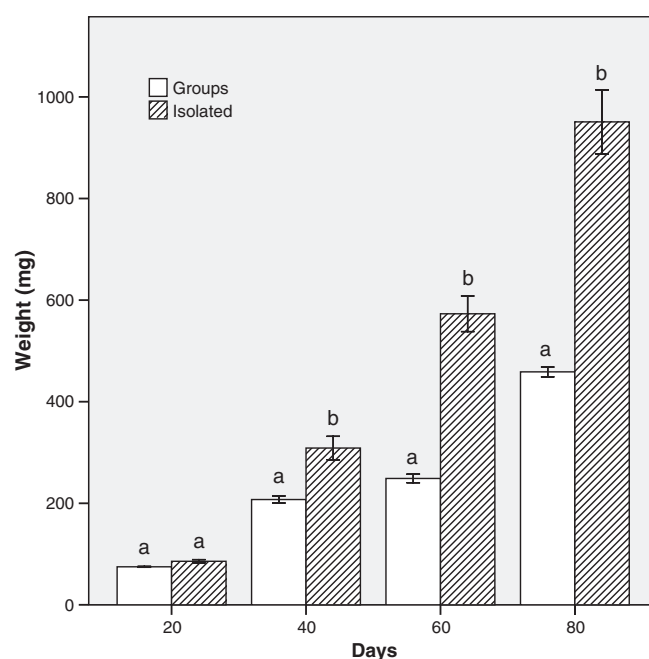


Fig. 2. Mean weight at various periods of juvenile crayfish held in groups or individually isolated over 80 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

Table 5

Proximate composition and amino acid profile of whole body (g kg^{-1} fresh-weight basis) of juvenile crayfish fed practical diets with different levels of replacement of FM protein by PBM protein over 80 days from the onset of exogenous feeding.

	Replacement (%)					
	0	15	25	35	45	55
<i>Proximate composition</i>						
Moisture	735.0	744.0	747.0	746.0	746.0	747.0
Crude protein	116.0	114.0	113.0	112.0	111.0	111.0
Crude fat	16.0	16.0	17.0	17.0	17.0	18.0
Carbohydrates	25.0	23.0	24.0	26.0	28.0	27.0
Ash	109.0	103.0	99.0	99.0	98.0	97.0
<i>Essential amino acid</i>						
Arginine	9.1	9.3	9.4	9.6	9.8	9.9
Histidine	4.0	3.7	3.5	3.4	3.2	3.1
Isoleucine	6.8	6.7	6.7	6.4	6.1	5.9
Leucine	8.8	9.2	9.3	9.5	9.6	9.9
Lysine	9.0	8.9	8.5	8.3	8.0	7.9
Methionine	5.2 ^a	5.1 ^a	4.7 ^{a, b}	4.0 ^b	4.0 ^b	2.9 ^c
Phenylalanine	6.9	6.5	6.3	6.3	6.1	6.0
Threonine	5.8	5.3	5.1	5.0	4.8	4.5
Valine	6.2	6.5	6.5	6.6	6.7	6.9
Tryptophan	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4
∑EAA	62.3	61.7	60.5	59.6	58.7	57.5
<i>Nonessential amino acid</i>						
Alanine	7.0	6.9	6.9	6.7	6.7	6.3
Aspartic acid	7.4	7.1	6.9	6.7	6.5	6.5
Glutamic acid	7.6	7.2	7.1	7.1	6.9	6.6
Glycine	1.0 ^a	0.9 ^a	0.9 ^a	0.8 ^a	0.7 ^{a, b}	0.5 ^b
Proline	8.5 ^a	9.2 ^a	9.5 ^{a, b}	9.8 ^b	10.0 ^b	11.7 ^c
Serine	6.3	6.6	6.7	7.1	7.3	7.4
Tyrosine	3.5	3.2	3.2	3.0	2.9	2.7
Cysteine	2.5 ^a	2.6 ^a	3.0 ^{a, b}	3.2 ^{a, b}	3.7 ^b	3.9 ^b
∑NEAA	43.8	43.9	44.2	44.5	44.7	46.0

Asparagine and glutamine content were not determined.

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

∑EAA = sum of essential amino acid.

∑NEAA = sum of nonessential amino acid.

As the replacement level was increased, the PER decreased, although differences among feeding treatments were not significant (average of grouped and isolated crayfish: 1.93). PERs of isolated crayfish (average: 2.09) were significantly higher than those of grouped crayfish (average: 1.79).

Cheliped losses were not recorded in the individually isolated crayfish. In the grouped crayfish, percentages of juveniles lacking chelipeds did not show significant differences among feeding treatments along the trial. At the end of the experiment, values were from 3.9% to 5.7%, whereas in previous controls the range was 3.0–4.8%.

The amino acid profiles of the practical diets are presented in Table 3. Considering the EAA, there were significant differences only in the methionine content. The highest replacement level of FM by PBM (55%, 38.2% dietary PBM) resulted in a methionine content significantly lower than that of the control diet. The reduction in the content of this amino acid was 36%.

The proximate composition and amino acid profile of crayfish whole body at the end of the experiment are presented in Table 5. Differences among feeding treatments were not significant for each macronutrient. Regarding the amino acid profile, there were significant differences only in the methionine content, as in diets. So, the juveniles fed 55% replacement of FM protein (38.3% dietary PBM) had a methionine content 43% lower than the crayfish fed the control diet.

4. Discussion

In the present study, crayfish were fed practical diets as the sole feed, and results are in the range of the best results achieved when live *Artemia* nauplii (González et al., 2008, 2010, 2012) or decapsulated

Artemia cysts (González et al., 2009) were combined with dry diets prepared for other aquatic species (grouped crayfish: around 78% survival and 500 mg W after 80 days). This may support the feasibility of the practical diet proposed by Carral et al. (2011), in which are based the practical diets of this experiment. The use of this basal diet in further studies will lead to a progressive improvement of the current formulation and elaboration process by including future findings on crayfish nutrition. Hitherto, Fuertes et al. (2012) have determined an adequate protein level and evaluated possibilities of including soybean meal (SBM), Celada et al. (2013) have studied the vitamin C requirements, and the present study provides the possibility of including up to 31.3% dietary PBM.

With all diets tested, individually isolated crayfish had higher growth than grouped crayfish, just as in previous studies (Carral et al., 2011; Celada et al., 2013; Fuertes et al., 2012). According to Celada et al. (2013), isolated crayfish could better express their growth potential since they do not waste energy for fighting and can utilize a higher proportion of consumed energy towards the growth process. This fact is evidenced by significant differences in feed conversion values: FCR of the isolated crayfish (average: 0.95) was significantly lower than that of the grouped crayfish (average: 1.20).

Nowadays, PBM is considered as an interesting alternative protein source for crustaceans because of its price, nutritive quality and a digestibility close to that of FM (Cruz-Suárez et al., 2007). The greater limiting factor for its use in aquafeeds is a low methionine content (Dong et al., 1993; Zhou et al., 2011). Different levels of PBM have been included in crustacean diets without affecting growth: 27.7% in *P. monodon* (Phuong and Yu, 2003), 29.8% in *M. nipponense* (Yang et al., 2004), 31.4% in *L. vannamei* (Cruz-Suárez et al., 2007) and 21.2% in *C. quadricarinatus* (Saoud et al., 2008). Results of the present study are in agreement with the highest inclusion level successfully incorporated in crustacean diets (31.4%). In this way, up to 31.3% of PBM can be included in formulated diets for juvenile *P. leniusculus* from the onset of exogenous feeding to replace 45% of FM protein. With this replacement level, all EAA contents of the diet were higher than the requirements determined for other crustacean species as *P. monodon* (Millamena et al., 1996, 1997, 1998, 1999), *Marsupeneus japonicus* (Teshima et al., 2002) and *Palaemonetes varians* (Palma et al., 2009), and growth of juvenile *P. leniusculus* was not reduced. By contrast, when the replacement level was increased to 55% (38.2% dietary PBM), the methionine content of diet (8.0 g kg^{-1}) was below the requirements of the above mentioned species, and probably it was also lower than the requirement of juvenile signal crayfish, as their growth was reduced. In addition, the methionine content in the whole body was lower than that of the crayfish fed the control diet.

Another possible reason of depressed growth could be a reduction of the feed palatability. In some fish species like Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Fowler, 1991), sunshine bass, *Morone chrysops* X *M. saxatilis* (Webster et al., 2000) or black sea turbot, *Psetta maotica* (Yigit et al., 2006), it has been suggested that high inclusion levels of PBM (greater than 30%) can result in a reduced palatability of the diet and consequently a lower feed consumption and a worse feed efficiency (increased FCR). PBM has not been tested in astacid crayfish. In other crustaceans in which PBM has been evaluated, effects on palatability have not been suggested, probably because the inclusion levels were not high enough. The highest level of PBM (31.4%) had been included in diets for *L. vannamei* (Cruz-Suárez et al., 2007), whereas in the present study with *P. leniusculus* it has been raised to 38.2%. This inclusion level could negatively affect the feed palatability, leading to a reduction of feed consumption and increased FCR (Table 4). From these considerations, it could be hypothesized that, in addition to the methionine deficiency, a reduced palatability of the diet could have contributed to the slower growth of the crayfish fed the diet with 38.2% PBM.

To summarize, up to 31.3% PBM (45% replacement of FM protein) can be included in extruded diets for juvenile *P. leniusculus* from the

onset of exogenous feeding up to 80 days of intensive rearing without impairing growth or feed conversion.

Acknowledgments

We thank the financing of a grant for Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, reference AP2008-01009. We thank Nutral S.A. for providing the vitamin and mineral compounds. We also thank the Quiñón S.A. crayfish farm for their collaboration.

References

- Carral, J.M., González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., García, V., González, R., 2011. Proposal of a practical diet for juvenile astacid crayfish studies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401, 20.
- Celada, J.D., Fuertes, J.B., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González, Á., González-Rodríguez, Á., 2013. Effects of vitamin C inclusion in practical diets on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture Nutrition* 19, 110–116.
- Cohen, S.A., De Antonis, K.M., 1994. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography A* 661 (1–2), 25–34.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P., 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 211 (2), 279–287.
- Crandal, K., Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae - Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 295–301.
- Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., Scholz, U., Ricque-Marie, D., 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture* 272, 466–476.
- Dong, F.M., Hardy, R.W., Haard, N.F., Barrows, F.T., Rasco, B.A., Fairgrieve, W.T., Foster, I.O., 1993. Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. *Aquaculture* 116, 149–158.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture 2008 (SOFIA). FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome 176.
- Fornshell, G., Hinshaw, J.M., 2009. Better management practices for flow-through aquaculture systems. In: Tucker, C.S., Hargreaves, J.A. (Eds.), *Environmental Best Management Practices for Aquaculture*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 331–388.
- Fowler, L.G., 1991. Poultry by-product meal as a dietary protein source in fall Chinook salmon diets. *Aquaculture* 99, 309–321.
- Fuertes, J.B., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González-Rodríguez, Á., 2012. Effects of dietary protein and different levels of replacement of fish meal by soybean meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture* 364–365, 338–344.
- González, Á., Celada, J.D., González, R., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2008. *Artemia* nauplii and two commercial replacements as dietary supplement for juvenile signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture* 281, 83–86.
- González, R., Celada, J.D., Carral, J.M., González, Á., Sáez-Royuela, M., García, V., 2009. Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different feed supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture* 295, 200–204.
- González, R., Celada, J.D., González, A., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2010. Stocking density for the intensive rearing of juvenile crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), using *Artemia* nauplii to supplement a dry diet from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture International* 18, 371–378.
- González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., González, R., Carral, J.M., García, V., 2012. Response of juvenile astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) to three commercial dry diets with different protein levels during the first 6 months of intensive rearing. *Aquaculture Research* 43, 99–105.
- Hannesson, R., 2003. Aquaculture and fisheries. *Marine Policy* 27, 169–178.
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41, 770–776.
- ISO Norms, International Standards Organization, 1973. Determination of Lipids Content (R-1443) (Geneva, Switzerland).
- ISO Norms, International Standards Organization, 1978. Determination of Nitrogen Content (R-937) (Geneva, Switzerland).
- ISO Norms, International Standards Organization, 1979. Determination of Moisture Content (R-1442) (Geneva, Switzerland).
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998a. Determination of Ash Content (R-936) (Geneva, Switzerland).
- ISO Norms, International Standards Organization, 1998b. Determination of Gross Caloric Value: Bomb Calorimeter Method (9831) (Geneva, Switzerland).
- Millamena, O.M., Bautista-Teruel, M.N., Kanazawa, A., 1996. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 143, 403–410.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 151, 9–14.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1998. Requirements of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius for lysine and arginine. *Aquaculture* 164, 95–104.
- Millamena, O.M., Teruel, M.B., Kanazawa, A., Teshima, S., 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture* 179, 169–179.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliot, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 15103–15110.
- Palma, J., Bureau, D.P., Lemme, A., Correia, M., Andrade, J.P., 2009. Quantitative dietary requirement of juvenile Atlantic ditch shrimp *Palaeomonetes varians* (Leach) for lysine, methionine and arginine. Unpublished. (Abstract ISFNF 2006).
- Phuong, N.T., Yu, Y., 2003. Replacement of fish meal with MBM and PBM on growth performance of juvenile black tiger shrimp (*P. monodon*). National Renderers Association. Research Report Vietnam-2.
- Saoud, I.P., Rodgers, L.J., Davis, D.A., Rouse, D.B., 2008. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture Nutrition* 14, 139–142.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 145–158.
- Takeuchi, T., Murakami, K., 2007. Crustacean nutrition and larval feed, with emphasis on Japanese spiny lobster, *Panilurus japonicus*. *Bulletin of Fisheries Research Agency* 20, 15–23.
- Teshima, S., Alam, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A., 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture Research* 33, 395–402.
- Webster, C.D., Thompson, K.R., Morgan, A.M., Grisby, E.J., Gannam, A.L., 2000. Use of hempseed meal, poultry by-product meal, and canola meal in practical diets without fish meal for sunshine bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*). *Aquaculture* 188, 299–309.
- Yang, Y., Xie, S., Lei, W., Zhu, X., Yang, Y., 2004. Effect of replacement of fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal in diets on the growth and immune response of *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 105–114.
- Yigit, M., Erdem, M., Koshio, S., Ergun, S., Turker, A., Karaali, B., 2006. Substituting fish meal with poultry by-product meal in diets for black Sea turbot *Psetta maotica*. *Aquaculture Nutrition* 12, 340–347.
- Zhou, Q.C., Zhao, J., Li, P., Wang, H.L., Wang, L.G., 2011. Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 322–323, 122–127.



Effects of fishmeal replacement by feather meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae)

J.B. FUERTES, J.D. CELADA, J.M. CARRAL, M. SÁEZ-ROYUELA & Á. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, León, Spain

Abstract

The aim of this study was to evaluate different replacement levels of fishmeal (FM) by feather meal (FeM) on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). An 80-day experiment was conducted with stage 2 juveniles from the onset of exogenous feeding. Four practical diets (500 g kg⁻¹ protein) differing in the level of replacement of FM protein by FeM protein were prepared: 0% (control diet), 15% (8.2% dietary FeM), 25% (13.7% dietary FeM) or 35% (19.2% dietary FeM). Each diet was tested on grouped or individually isolated crayfish. Crayfish fed the control diet or 15% replacement achieved the highest survival (average of grouped and isolated: 88.2%) and growth (grouped and isolated: 13.58 mm carapace length, 523.2 mg weight) and the lowest feed conversion ratio (average of grouped and isolated: 1.11). Final growth of isolated crayfish was significantly higher than that of grouped crayfish for all diets. This study provides the first data on the substitution possibilities of FM by FeM in diets for freshwater crayfish. An 8.2% of FeM (15% replacement of FM protein) can be included in extruded diets for juvenile *P. leniusculus* during the first 80 days of intensive rearing without impairing growth or feed conversion.

KEY WORDS: Astacid crayfish, feather meal, juvenile rearing, nutrition, *Pacifastacus leniusculus*, practical diets

Received 8 May 2012; accepted 30 December 2012

Correspondence: Juan B. Fuertes, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain. E-mail: jbfuecl@unileon.es

Introduction

There are about 550 recognized species of freshwater crayfish in the world (Crandal & Buhay 2008). Several of them, mostly belonging to the family Astacidae, have attracted a strong interest for aquaculture purposes. Currently, there is little knowledge on crayfish nutrition and specifically formulated diets are not available. In previous studies carried out from the onset of exogenous feeding under controlled conditions, a wide variety of natural foods (mainly fresh or frozen animals and vegetables) and dry diets formulated for other aquatic species either alone or supplemented with natural feeds have been used (González *et al.* 2010). Recent advances (González *et al.* 2008, 2009, 2012) have provided knowledge enough to enable an initial approach to a specific practical diet, which was proposed as a basis for further nutritional studies on juvenile crayfish (Carral *et al.* 2011).

When developing a diet, to choose the right ingredients, it should be taken into account the current availability and price of different feedstuffs. Crustacean aquaculture is highly dependent upon marine capture fisheries to supply fishmeal (FM), the most important and expensive protein ingredient used in aquafeeds (Tacon & Metian 2008). This fact has led to a double concern, on the one hand the non-sustainability of the fisheries pressure on wild stocks to cover the increasing demand of FM (Hannesson 2003; Naylor *et al.* 2009). On the other hand, the rising prices of FM derived from the growing demand of FM make this ingredient less feasible to use at current inclusion recommended levels (Tacon & Metian 2008; FAO, 2009). Thus, the aquafeed industry has to search for alternative protein sources less expensive to reduce their dependence in FM (Naylor *et al.* 2009; Hardy 2010). Despite the possibility of including terrestrial animal by-products in aquaculture diets, there is much public concern in many countries due

to bovine spongiform encephalopathy (BSE) and prion risks associated with such ingredients arising within the animal and consumer food chain, so legislation severely restricts the use of these protein sources. Feather meal (FeM) is generally allowed and is an economical protein ingredient that has found increasing use in aquafeeds (Poppi *et al.* 2011). Nowadays, there is little information on the use of FeM in crustacean diets, which is reduced to *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Lawrence & Castille 1991; Mendoza *et al.* 2001). The aim of this study was to evaluate effects of practical diets with different levels of replacement of FM protein by FeM protein in juvenile astacid crayfish during the first period of rearing.

Materials and methods

Crayfish, facilities and experimental procedure

In late November, egg-bearing females (*Pacifastacus leniusculus* Dana) from a crayfish farm were transferred to the laboratory, where egg development, hatching and first moult of juveniles (stage 2) took place under controlled conditions.

An 80-day experiment was conducted with stage 2 juveniles [average: 5.13 ± 0.02 mm carapace length (CL), 27.2 ± 0.2 mg weight] from the onset of exogenous feeding. A total of 1200 juveniles were housed in fibreglass tanks in groups at a stocking density of 100 m^{-2} and, in order to avoid the influence of intraspecific behavioural interactions such as cannibalism, 40 crayfish were also reared individually. Thus, each of the four feeding treatments was tested on communally (three tanks for each treatment with 100 crayfish per tank, $n = 300$) and individually reared crayfish (10 tanks for each treatment with 1 crayfish per tank, $n = 10$).

Grouped crayfish were kept in tanks with 1 m^2 bottom and 200 L water. Each tank was provided with shelters: four groups of four jointed sections of PVC pipe (4 cm long \times 2 cm diameter) and three pieces of undulating fibre cement (54×20.5 cm). Isolated crayfish were kept individually in tanks (0.15 m^2 , 25 L water) with one group of four jointed sections of PVC pipe (4 cm long \times 2 cm diameter) as shelter. Aerated artesian well water was supplied in open system (flow throughout), and each tank had its own water inlet (flow rate: 1.5 L min^{-1} for the tanks of 200 L and 0.25 L min^{-1} for the tanks of 25 L) and outlet, provided with a 250- μm mesh filter to avoid the escape of crayfish and feed. The parameters of incoming water quality were pH 8.2, hardness $5.1 \text{ }^\circ\text{dH}$ (German degrees, calcium 32.1 mg L^{-1}), total dissolved solids 111.4 mg L^{-1} and total

suspended solids 37.1 mg L^{-1} . Throughout the trial, dissolved oxygen content was measured in the tanks every other day with a meter HATCH HQ30d (Hatch Lange GMBH; <http://www.hach-lange.es>) and values ranged between 6.0 and 8.5 mg L^{-1} . Ammonia and nitrites were measured with a spectrophotometer HATCH DR 2800 (Hatch Lange GMBH) from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia $<0.02 \text{ mg L}^{-1}$ and nitrites $<0.05 \text{ mg L}^{-1}$). Water temperature was registered daily using maximum–minimum thermometers and maintained at $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Photoperiod was natural (around 12-h light: 12-h dark). Every other day, the bottom of the tanks was cleaned by siphoning and filters and shelters were removed and cleaned with pressurized water.

Diets and feeding

Based on the practical diet proposed by Carral *et al.* (2011), modified in the vitamin C content according to Celada *et al.* (2012), four diets (nearly isonitrogenous and isoenergetic) were prepared to test substitution possibilities of FM by hydrolysed FeM. Proximate composition and amino acid profiles of FM and FeM are presented in Table 1. The grinding was performed in a rotary mill

Table 1 Proximate composition and amino acid profiles of fish-meal (FM) and feather meal (FeM)

g kg^{-1}	FM	FeM
Proximate composition		
Moisture	79.9	53.3
Crude Protein	680	761
Crude Fat	90.1	158.7
Carbohydrates	0	23.6
Ash	150	3.4
Essential amino acid		
Arginine	125.7	66.4
Histidine	12.7	42.1
Isoleucine	27.5	28.6
Leucine	48.2	50.2
Lysine	47.0	11.8
Methionine	20.9	7.5
Phenylalanine	21.2	26.4
Threonine	39.0	31.5
Valine	32.9	58.0
Tryptophan	0.1	0.1
Nonessential amino acid		
Alanine	40.5	36.0
Aspartic acid	55.7	96.9
Glutamic acid	88.8	99.7
Glycine	24.0	20.3
Proline	26.2	68.6
Serine	40.2	93.3
Tyrosine	15.5	9.2
Cysteine	1.2	6.8

BRABENDER (Brabender® GmbH & Co. KG; <http://www.brabender.com>). Ingredients were mixed in a mixer STEPHAN UMC5 (Stephan Food Service Equipment; <http://www.stephan-belgium.be/>) and extruded using a stand-alone extruder BRABENDER KE19/25D (Brabender® GmbH & Co. KG) at a temperature range between 75 and 95 °C. Pellets with 2 mm diameter were obtained and then dried during 24 h at 30 °C. Later, pellets received a coating of cod liver oil. Diets were stored at 3–4 °C until used.

Four diets (500 g kg⁻¹ crude protein) with different levels of replacement of FM protein by FeM protein were tested: 0% (control), 15% (8.2% dietary FeM), 25% (13.7% dietary FeM) or 35% (19.2% dietary FeM). The formulation and the proximate composition of the diets are presented in Table 2. Each diet was tested on three tanks

with grouped crayfish ($n = 300$) and 10 tanks with individually isolated crayfish ($n = 10$).

A ration level of 3% live body weight per day was adjusted based on a weekly estimation of biomass from each tank and the biomass calculated every 20 days from the samples. The ration was manually supplied once a day.

Chemical analysis of practical diets

Proximate composition of FM and FeM (Table 1) and practical diets (Table 2) were analysed according to the Norms of the International Standards Organization: moisture to ISO R-1442 (ISO 1979), protein to ISO R-937 (ISO 1978), lipid to ISO R-1443 (ISO 1973), ash to ISO R-936 (ISO 1998a) and gross energy to ISO 9831 (ISO 1998b).

Table 2 Composition of the practical diets

Ingredients (g kg ⁻¹)	Replacement (%)			
	0	15	25	35
Fish meal ¹	614.8	522.6	461.1	399.7
Corn meal ²	130.2	140	146.6	152.9
Feather meal ³	0	82.4	137.3	192.2
Cod liver oil ⁴	30	30	30	30
Soy lecithin ⁵	1	1	1	1
Cholesterol ⁶	5	5	5	5
L-ascorbyl-2-monophosphate-Na ⁷	0.2	0.2	0.2	0.2
Choline chloride ⁸	5	5	5	5
Dicalcium phosphate ⁸	10	10	10	10
Decapsulated <i>Artemia</i> cysts ⁹	150	150	150	150
Carboxymethylcellulose ¹⁰	30	30	30	30
Astaxanthin ¹	1	1	1	1
Mineral premix ¹¹	20	20	20	20
Vitamin premix ¹²	2.8	2.8	2.8	2.8
Proximate composition (g kg ⁻¹)				
Moisture	87.0	86.0	84.0	83.0
Crude Protein	502.2	502.3	502.4	502.5
Crude Fat	119.2	125.4	129.4	131.7
Nitrogen-free extract	170.8	174.8	175.0	185.8
Ash	120.8	111.5	109.2	97.0
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	19.58	19.86	20.03	20.31

¹ Biomar Iberia/Proaqua Nutrición, Dueñas (Palencia), Spain.

² ADPAN, Siero-Asturias, Spain.

³ COREN, Santa Cruz de Arrabaldo (Ourense), Spain.

⁴ ACOFARMA, Terrassa (Barcelona), Spain.

⁵ Biover NV/SA, Brujas, Belgium.

⁶ Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim, Germany.

⁷ Orffa Ingredients B.V., Burgstraat 12, 4283 GG Giessen, The Netherlands.

⁸ Nutral S.A., Madrid, Spain.

⁹ *Artemia* cysts: Inve Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium.

¹⁰ Helm Iberica S.A., Madrid, Spain.

¹¹ (g kg⁻¹ premix): CoCl₂, 0.04; CuSO₄·5H₂O, 2.50; FeSO₄, 40; MgSO₄·7H₂O, 283.98; MnSO₄·H₂O, 6.50; KI, 0.67; Na₂SeO₃, 0.10; ZnSO₄·7H₂O, 131.93.

¹² (g kg⁻¹ premix): thiamin, 21.43; riboflavin, 18.93; niacin, 71.43; pyridoxine, 17.86; pantothenic acid, 37.86; biotin, 0.36; folic acid, 5.71; cyanocobalamin, 0.07; myoinositol, 142.86; retinol, 0.54; α-tocopherol, 23.82; cholecalciferol, 3.93; naphthoquinone, 3.12; ethoxyquin, 35.71.

Samples were stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. All analyses were performed in duplicate. The content of nitrogen-free extract was calculated by subtracting the content of moisture, protein, lipid and ash from the wet weight.

Essential amino acid (EAA) (Takeuchi & Murakami 2007) and non-essential amino acid (NEAA) of FM and FeM (Table 1) and practical diets (Table 3) were analysed by HPLC using AccQTag method from Waters (Milford, MA, USA). Amino acids were derivatized with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate reagent (AQC) by the method of Cohen & Michaud (1993) and Cohen & De Antonis (1994) and were detected by Dual λ Absorbance Detector Waters 2487 from Waters at 254 nm. Quantification was carried out with Empower Pro 2.0 software from Waters.

Data collection and statistical analysis

Every 20 days, survivors were counted, number of crayfish lacking one or two chelae was registered, and 15 randomly sampled juveniles per replicate of grouped crayfish (45 per treatment, 15% of the initial number) and all isolated crayfish were collected for recording CL and body weight (W).

At the end of the experiment (day 80), all crayfish were individually measured and weighed. Carapace length was measured with digital calliper (to the nearest 0.1 mm). To obtain individual wet weight, excess water was removed with tissue paper and a precision balance COBOS CB

Table 3 Amino acid profile of the practical diets

g AA kg ⁻¹ diet	Replacement (%)			
	0	15	25	35
Essential amino acid				
Arg	62.5	53.5	46.5	39.2
Hist	8.9	9.3	9.7	9.9
Ile	24.1	23.9	23.8	23.7
Leu	38.3	38.0	37.8	37.6
Lys	33.4	30.3	25.0	22.2
Met	13.2	10.1	8.4	7.2
Phe	19.1	19.3	19.5	19.6
Thr	24.1	23.1	22.6	22.2
Val	24.6	25.2	26.3	27.3
Trp	0.6	0.6	0.6	0.6
Nonessential amino acid				
Ala	30.2	29.5	29.0	28.5
Asp	41.8	44.4	46.1	47.8
Glu	84.9	85.0	85.0	85.0
Gly	17.8	16.4	15.4	14.7
Pro	19.6	23.5	25.5	27.4
Ser	29.5	33.2	35.6	38.0
Tyr	14.0	13.4	13.0	12.6
Cys	1.8	3.8	5.0	6.1

COMPLET (Balanzas Cobos; <http://www.balanzascobos.com>), to the nearest 0.001 g, was used. Specific growth rate (SGR) was expressed as $\text{SGR} = (\ln W_t - \ln W_i) \times 100/T$ where W_t is the mean final weight (g), W_i is the mean initial weight, and T is the duration of the experiment (days). According to Fornshell & Hinshaw (2009), feed conversion ratio (FCR) was calculated as $\text{FCR} = D_t/W_t - W_i$, where D_t is the total amount of feed fed and $W_t - W_i$ is the increase in weight over 80 days.

All results were examined by analysis of variance (two-way ANOVA) using the computer program SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) to determine whether data were significantly different among groups. Duncan's test was applied to compare means at the $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

Results

All practical diets were consumed from the first day as indicated by the externally observable presence of each in the translucent digestive tract of juvenile crayfish.

There were no significant differences in survival between crayfish fed the control diet (0% replacement) or 15% replacement of FM protein by FeM protein (average of grouped and isolated crayfish: 88.2%) (Table 4). Survival of crayfish fed higher replacement levels (25% or 35%) was significantly lower (average of grouped and isolated crayfish: 71.9%). Within the same diet, survival of isolated crayfish was significantly higher than that of grouped crayfish.

In terms of growth, significant differences were not found between 15% replacement of FM protein by FeM protein (8.2% FeM in diet) and the control diet (grouped and isolated crayfish: 13.60 mm CL, 527.1 mg W, 3.67% SGR) (Table 4). With 25% or 35% replacement of FM protein by FeM protein (13.7% or 19.2% FeM in diet, respectively), all growth values were significantly lower. Figures 1 and 2 show the changes in CL and weight (grouped and isolated crayfish), respectively, throughout the 80 days. Juveniles fed the control diet (0% replacement) or 15% replacement of FM protein by FeM protein grew faster than those fed the other two diets. The 35% replacement of FM protein resulted in the lowest growth values along the trial. These differences were significant from day 40 onwards.

Regardless of the diet, final growth values of isolated crayfish (average: 14.60 mm CL, 763.0 mg W) were significantly higher than those of grouped crayfish (average: 12.58 mm CL, 427.0 mg W). Figures 3 and 4 show the changes in CL and weight, respectively, of juvenile crayfish

Table 4 Final survival, growth and feed conversion values of juvenile crayfish fed practical diets with different levels of substitution of fishmeal (FM) protein by feather meal (FeM) protein over 80 days from the onset of exogenous feeding

	Replacement (%)			
	0	15	25	35
Survival (%)				
Groups	77.0 ± 1.7 ^a	75.6 ± 1.2 ^a	64.7 ± 1.6 ^b	63.0 ± 1.8 ^b
Isolated	100 ^a	100 ^a	80 ^b	80 ^b
Carapace length (mm)				
Groups	13.5 ± 0.32 ^a	13.4 ± 0.28 ^a	12.4 ± 0.31 ^b	10.9 ± 0.25 ^c
Isolated	16.1 ± 0.42 ^a	15.9 ± 0.38 ^a	14.1 ± 0.36 ^b	12.4 ± 0.33 ^c
Weight (mg)				
Groups	509 ± 36.8 ^a	502 ± 34.5 ^a	400 ± 28.9 ^b	297 ± 25.4 ^c
Isolated	1039 ± 109.5 ^a	991 ± 93.8 ^a	614 ± 56.3 ^b	409 ± 31.4 ^c
SGR (% day ⁻¹)				
Groups	2.93 ± 0.07 ^a	3.48 ± 0.06 ^a	3.02 ± 0.05 ^b	2.66 ± 0.08 ^c
Isolated	3.61 ± 0.10 ^a	4.35 ± 0.09 ^a	3.81 ± 0.11 ^b	3.03 ± 0.08 ^c
FCR				
Groups	1.15 ± 0.15 ^a	1.17 ± 0.16 ^a	1.27 ± 0.10 ^b	1.39 ± 0.17 ^c
Isolated	0.89 ± 0.06 ^a	0.92 ± 0.07 ^a	1.06 ± 0.09 ^b	1.24 ± 0.11 ^c

Values are mean ± standard error.

Values in the same row having different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Specific growth rate (SGR) (% day⁻¹) = $100 \times [(\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) \times \text{days}^{-1}]$.

Feed conversion ratio (FCR) = feed fed \times (final body weight - initial body weight)⁻¹.

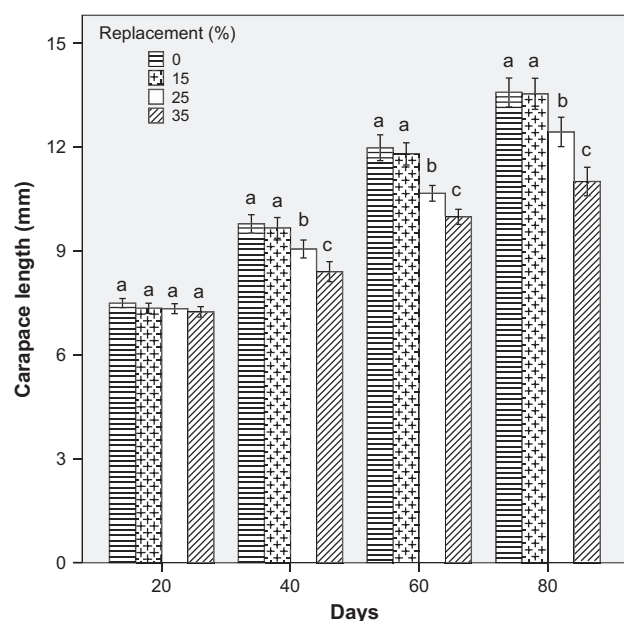


Figure 1 Mean carapace length (grouped and isolated animals) at various periods of juvenile crayfish fed practical diets with different replacement levels of fishmeal protein by feather meal protein over 80 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

held in groups or individually isolated throughout the trial. Isolated crayfish grew faster than grouped crayfish, being significant differences from day 40 onwards.

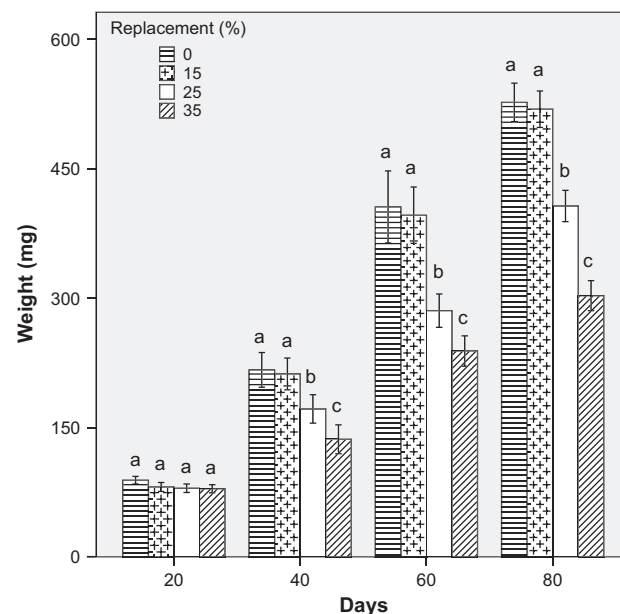


Figure 2 Mean weight (grouped and isolated animals) at various periods of juvenile crayfish fed practical diets with different replacement levels of fishmeal protein by feather meal protein over 80 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

Feed conversion ratios (average of grouped and isolated crayfish) ranged from 1.02 to 1.32. The lowest value was obtained with the control diet without significant differ-

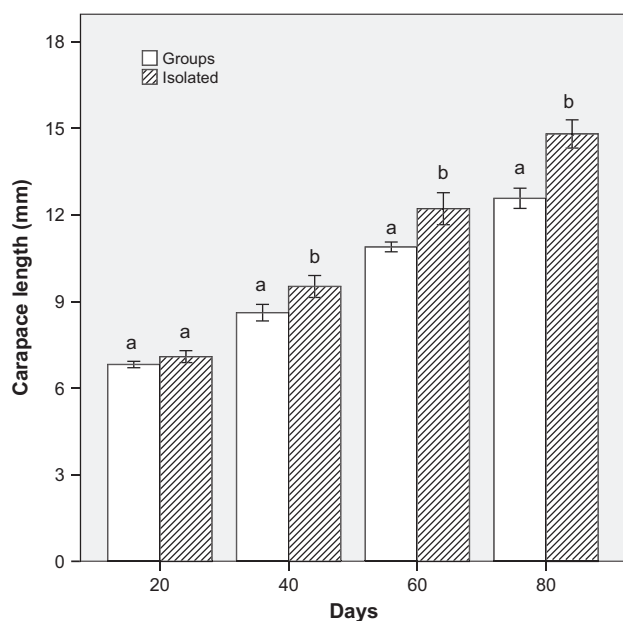


Figure 3 Mean carapace length at various periods of juvenile crayfish held in groups or individually isolated over 80 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

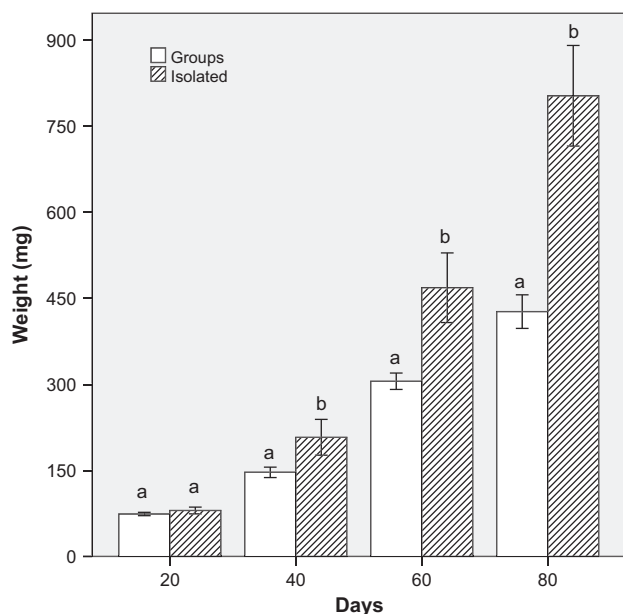


Figure 4 Mean weight at various periods of juvenile crayfish held in groups or individually isolated over 80 days from the onset of exogenous feeding. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters at the same day denote significant differences ($P < 0.05$).

ences from the 15% replacement of FM protein (8.2% FeM in diet). With all diets, FCRs of isolated crayfish (average: 1.03) were significantly lower than those of grouped crayfish (average: 1.25).

Cheliped losses were only recorded in the grouped crayfish. The final percentages of crayfish lacking chelipeds increased with increasing the level of substitution of FM protein by FeM protein, so that the diets with 0% or 15% replacement resulted in values significantly lower (average: 4.98%) than the diets with 25% or 35% replacement (average: 13.03%). In previous controls, the range was between 3.89% (average of 0% and 15% replacement) and 12.57% (average of 25% and 35% replacement). The amino acid profiles of FM and FeM are presented in Table 1 and those of practical diets in Table 3. Considering the EAA, arginine, lysine and methionine contents of FeM are significantly lower than those of FM (Table 1), and the dietary contents of these amino acids were reduced when FeM was included in the diets (Table 3). Comparing 25% replacement of FM protein by FeM protein (substitution level with which growth was significantly lower than that of the control group) with the control diet, the reductions in the contents of the mentioned amino acids were 25% (arginine), 26% (lysine) and 36% (methionine).

Discussion

In the present study, crayfish were fed practical diets as the sole food, and results are in the range of the best results achieved when live *Artemia* nauplii (González *et al.* 2008, 2010, 2012) or decapsulated *Artemia* cysts (González *et al.* 2009) were combined with dry diets prepared for other aquatic species. This may support the feasibility of the practical diet proposed by Carral *et al.* (2011) for juvenile astacid crayfish from the onset of exogenous feeding. The use of this basal diet in further studies will lead to a progressive improvement in the current formulation and elaboration process by including future findings on crayfish nutrition. In this way, the diets used in the present study were modified in the vitamin C content according to the results of Celada *et al.* (2012).

For all diets tested, individually isolated crayfish had higher growth than grouped crayfish, in contrast to previous studies (Celada *et al.* 1989, 1993; Sáez-Royuela *et al.* 1995) where it was the opposite, probably due to the poor feed quality. An improved diet allowed that isolated crayfish could better express their growth potential because they do not waste energy for fighting and can utilize a higher proportion of consumed energy towards the growth

process (Celada *et al.* 2012). This fact is evidenced by significant differences in feed conversion values: FCR of the isolated crayfish (average: 1.03) was significantly lower than that of the grouped crayfish (average: 1.25).

Due to the absence of aggressive interactions, cheliped losses were not recorded in individually isolated crayfish. The percentages of communally reared juveniles lacking chelipeds increased significantly with the two highest replacement levels of FM protein by FeM protein (25% or 35%). Deficiency of necessary nutrients in crayfish diets increases the tendency to cannibalism, which leads to a rise in aggressive interactions and consequently an increase in cheliped losses (Ackefors & Lindqvist 1994; Celada *et al.* 2012). The mentioned replacement levels also reduced survival and growth. Compared with FM, FeM is poor in arginine, lysine and methionine (Table 1), this being attributed to the natural structure of feather keratin (Mendoza *et al.* 2001). In the present study, the dietary contents of arginine, lysine and methionine were reduced when FeM was included in the diet (Table 3). With 25% replacement of FM protein (13.7% FeM), the contents of arginine and lysine were 46.5 and 25.2 g kg⁻¹ diet, respectively, and both survival and growth were negatively affected. However, these amounts are higher than the requirements determined for *P. vannamei* and *Penaeus monodon* (Fox *et al.* 1995; Millamena *et al.* 1998). Within the EAA, only methionine (8.4 g kg⁻¹ diet) was below requirements of *P. monodon* (Millamena *et al.* 1996). Besides the deficiency in some EAA, another limitation for the use of FeM in diets for aquatic animals may be their difficult digest, which has been attributed to the disulphide bonds (NRC, 2011). Despite the FeM hydrolyzation process led to a significant improvement in the digestibility (Bureau *et al.* 2000), this digestibility is still lower than that of FM (NRC, 2011). Thus, the decrease in growth of juvenile crayfish fed the diets with 25% or 35% replacement of FM protein by FeM protein could be attributable to both a deficiency of some EAAs and a lower digestibility of FeM compared with FM.

Despite their deficiencies, FeM is an economical protein source that has been tested in juvenile stages of several fish species, and results show different tolerance for dietary FeM (Yu 2008). For instance, up to 15% FeM can be included in diets for chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Fowler 1990) and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Bureau *et al.* 2000) without affecting growth, while 3.5% FeM in diets for cuneate drum, *Nibea miichthioides*, significantly reduced growth (Wang *et al.* 2006). In crustaceans, 10% (Lawrence & Castille 1991) or 13.33% FeM (Mendoza *et al.* 2001) has been included in practical diets

for juvenile *P. (Litopenaeus) vannamei*, without compromising growth. The present study provides the first data on the substitution possibilities of FM by FeM in diets for freshwater crayfish. From these results, 8.2% of FeM (15% replacement of FM protein) can be included in extruded diets for juvenile *P. leniusculus* from the onset of exogenous feeding up to 80 days of intensive rearing without impairing growth or feed conversion.

Acknowledgements

We thank the financing of a grant for Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, reference AP2008-01009. We thank Nutral S.A. for providing the vitamin and mineral compounds. We also thank the Quiñón S.A. crayfish farm for their collaboration.

References

- Ackefors, H. & Lindqvist, O.V. (1994) Cultivation of freshwater crayfishes in Europe. In: *Freshwater Crayfish Aquaculture* (Huner, J.V. ed.), pp. 157–216. The Haworth Press, Binghamton, New York.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Bedan, D.J., Simmons, L.A., Azevedo, P.A. & Cho, C.Y. (2000) Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture*, **181**, 281–291.
- Carral, J.M., González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., García, V. & González, R. (2011) Proposal of a practical diet for juvenile astacid crayfish studies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, **401**, 20.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudioso, V.R., Temiño, C. & Fernández, R. (1989) Response of juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) to several fresh and artificially compounded diets. *Aquaculture*, **76**, 67–78.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Gaudioso, V.R., González, J., Lopez-Baissón, C. & Fernández, R. (1993) Survival and growth of juvenile freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana fed two raw diets and two commercial formulated feeds. *J. World Aquac. Soc.*, **24**, 108–111.
- Celada, J.D., Fuertes, J.B., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González, Á. & González-Rodríguez, Á. (2012) Effects of vitamin C inclusion in practical diets on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquacult. Nutr.*, doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.00949.x.
- Cohen, S.A. & De Antonis, K.M. (1994) Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *J. Chromatogr.*, **661**, 25–34.
- Cohen, S.A. & Michaud, D.P. (1993) Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **211**, 279–87.

- Crandal, K. & Buhay, J.E. (2008) Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae - Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 295–301.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) (2009) The State of World Fisheries and Aquaculture 2008 (SOFIA). FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Fornshell, G. & Hinshaw, J.M. (2009) Better management practices for flow-through aquaculture systems. In: Environmental Best Management Practices for Aquaculture (Tucker, C.S. & Hargreaves, J.A. eds), pp. 331–388. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Fowler, L.G. (1990) Feather meal as a dietary protein source during parr-smolt transformation in fall chinook salmon. *Aquaculture*, **89**, 301–314.
- Fox, J.M., Lawrence, A.L. & Li-Chan, E. (1995) Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture*, **131**, 179–190.
- González, Á., Celada, J.D., González, R., García, V., Carral, J.M. & Sáez-Royuela, M. (2008) *Artemia* nauplii and two commercial replacements as dietary supplement for juvenile signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture*, **281**, 83–86.
- González, R., Celada, J.D., Carral, J.M., González, Á., Sáez-Royuela, M. & García, V. (2009) Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different feed supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture*, **295**, 200–204.
- González, R., Celada, J.D., González, A., García, V., Carral, J.M. & Sáez-Royuela, M. (2010) Stocking density for the intensive rearing of juvenile crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae), using *Artemia* nauplii to supplement a dry diet from the onset of exogenous feeding. *Aquacult. Int.*, **18**, 371–378.
- González, Á., Celada, J.D., Sáez-Royuela, M., González, R., Carral, J.M. & García, V. (2012) Response of juvenile astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) to three commercial dry diets with different protein levels during the first 6 months of intensive rearing. *Aquacult. Res.*, **43**, 99–105.
- Hannesson, R. (2003) Aquaculture and fisheries. *Marine Policy*, **27**, 169–178.
- Hardy, R.W. (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquacult. Res.*, **41**, 770–776.
- ISO Norms, International Standards Organization (1973) Determination of lipids content (R-1443). International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization (1978) Determination of nitrogen content (R-937). International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization (1979) Determination of moisture content (R-1442). International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization (1998a) Determination of ash content (R-936). International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO Norms, International Standards Organization (1998b) Determination of gross caloric value: bomb calorimeter method (9831). International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
- Lawrence, A.K. & Castille, F. (1991) Nutritive response of a western hemisphere shrimp *Penaeus vannamei*, to meat and bone, feather and poultry by-product meal. In: Director's Digest, Fats and Proteins Research Foundation, 215. Bloomington, IL.
- Mendoza, R., De Dios, A., Vazquez, C., Cruz, E., Ricque, D., Aguilera, C. & Montemayor, J. (2001) Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquac. Nutr.*, **7**, 143–151.
- Millamena, O.M., Bautista-Teruel, M.N. & Kanazawa, A. (1996) Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, **143**, 403–410.
- Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S. & Kanazawa, A. (1998) Requirements of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius for lysine and arginine. *Aquaculture*, **164**, 95–104.
- National Research Council (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press, Washington, DC.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P. *et al.* (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 15103–15110.
- Poppi, D.A., Quinton, V.M., Hua, K. & Bureau, D.P. (2011) Development of a test diet for assessing the bioavailability of arginine in feather meal fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **314**, 100–109.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D. & Muñoz, C. (1995) Effects of management on survival and growth of stage 2 juvenile freshwater signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under laboratory conditions. *Aquaculture*, **133**, 123–133.
- Tacon, G.J. & Metian, M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture*, **285**, 145–158.
- Takeuchi, T. & Murakami, K. (2007) Crustacean nutrition and larval feed, with emphasis on Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *Bull. Fish. Res. Agen.*, **20**, 15–23.
- Wang, Y., Guo, J., Bureau, D.P. & Cui, Z. (2006) Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients in feeds for cuneate drum (*Nibea mitchthioides*). *Aquaculture*, **252**, 476–483.
- Yu, Y. (2008) Replacement of fish meal with poultry by-product meal and hydrolyzed feather meal in feeds for finfish. In: Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets (Lim, C., Webster, C.D. & Lee, C. eds), pp. 51–95. The Haworth Press, Binghamton, New York.

