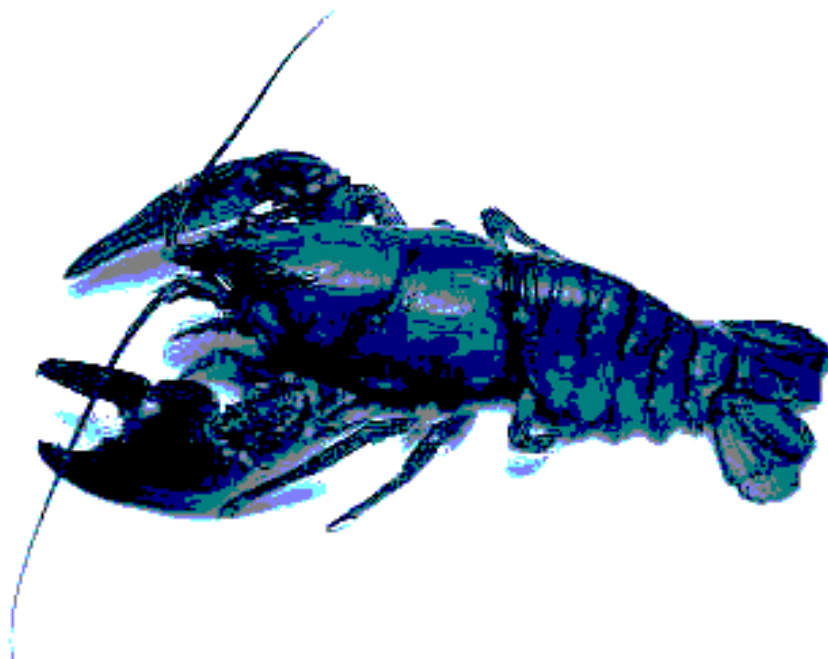


**TÉCNICAS DE INTENSIFICACIÓN DE LA
CRÍA DE JUVENILES DE ASTÁCIDOS
(*Pacifastacus leniusculus*) DURANTE
LOS SEIS PRIMEROS MESES**



ROCÍO GONZÁLEZ LÓPEZ

**Departamento de Producción Animal
Universidad de León, España
León, 2010**



UNIVERSIDAD DE LEÓN



TÉCNICAS DE INTENSIFICACIÓN DE LA CRÍA DE JUVENILES DE ASTÁCIDOS (*Pacifastacus leniusculus*) DURANTE LOS SEIS PRIMEROS MESES

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por Rocío González López
dirigida por Jesús Domingo Celada Valladares y
José Manuel Carral Llamazares para acceder al
grado de doctor con mención europea**

León, mayo de 2010



Universidad de León

**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Drs. D. Jesús Domingo Celada Valladares y José Manuel Carral Llamazares como Directores¹ de la Tesis Doctoral titulada “Técnicas de intensificación de la cría de juveniles de astácidos (*Pacifastacus leniusculus*) durante los seis primeros meses” realizada por Dña. Rocío González López en el Departamento de Producción Animal, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a _____
de _____ de 2010.

Fdo.: Jesús D. Celada

Fdo.: José M. Carral

¹ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



Universidad de León

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de _____ en su reunión celebrada el día ____ de _____ de _____ ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Técnicas de intensificación de la cría de juveniles de astádos (*Pacifastacus leniusculus*) durante los seis primeros meses”, dirigida por el Dr. D. Jesús Domingo Celada Valladares y el Dr. D. José Manuel Carral Llamazares, elaborada por Dña. Rocío González López, y cuyo título en inglés es el siguiente “Intensification techniques of astacid juvenile (*Pacifastacus leniusculus*) rearing for the first six months”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a _____ de _____ de _____.

El Secretario,

Fdo.: _____

Vº Bº
El Director del Departamento,

Fdo.: _____

“La felicidad no es hacer lo que uno quiere sino querer lo que uno hace”

Jean Paul Sartre

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA DE LAS PUBLICACIONES	13
2. INTRODUCTION AND JUSTIFICATION OF THE THEMATIC UNIT OF THE PUBLICATIONS	15
3. LISTA DE PUBLICACIONES	17
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
4.1. ESPECIES DE CANGREJOS DE RÍO DE INTERÉS EN ACUICULTURA	18
4.2. CICLO VITAL Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS PRODUCTIVO ..	19
4.3. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE ASTÁCIDOS	21
4.4. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN EN CULTIVO DE ASTÁCIDOS	22
4.4.1. Fase reproductiva	22
4.4.1.1. Incubación maternal	22
4.4.1.2. Incubación artificial	24
4.4.1.3. Almacenamiento y transporte de huevos	26
4.4.2. Cría de juveniles	27
4.4.2.1. Temperatura	27
4.4.2.2. Abastecimiento de agua	27
4.4.2.3. Alimentos	27
4.4.2.4. Origen de los juveniles	28
4.4.2.5. Densidad	28
4.4.2.6. Frecuencia de aporte de alimento.....	28
4.4.2.7. Sustrato y refugios.....	29
4.4.2.8. Iluminación	29
4.4.2.9. Perspectivas de futuro.....	29
5. OBJETIVOS	30
6. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES	31
6.1. CANGREJOS, INSTALACIONES Y PROCEDIMIENTO BÁSICO DE EXPERIMENTACIÓN	31
6.2. ALIMENTACIÓN	32
6.3. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS	33
7. SECUENCIA DE EXPERIMENTACIÓN	35
7.1. ESTUDIO I: INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE HUEVOS DE CANGREJO DE RÍO: REVISIÓN Y ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LOS EFECTOS DEL ORIGEN DE LOS JUVENILES (INCUBACIÓN MATERNAL O ARTIFICIAL) SOBRE SU POSTERIOR SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO	35
7.1.1. Planteamiento experimental	35
7.1.2. Resultados	36
7.1.3. Discusión	40

7.2. ESTUDIO II: DENSIDAD PARA LA CRÍA INTENSIVA DE JUVENILES, UTILIZANDO NAUPLIOS DE ARTEMIA COMO SUPLEMENTO DE UNA DIETA SECA DESDE EL INICIO DE LA ALIMENTACIÓN EXTERNA	42
7.2.1. Planteamiento experimental	42
7.2.2. Resultados	43
7.2.3. Discusión.	47
7.3. ESTUDIO III: QUISTES DECAPSULADOS DE ARTEMIA COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO PARA JUVENILES A DIFERENTES FRECUENCIAS DE ALIMENTACIÓN	49
7.3.1. Planteamiento experimental	49
7.3.2. Resultados	50
7.3.3. Discusión.	53
7.4. ESTUDIO IV: REFUGIOS Y CONDICIONES DE ILUMINACIÓN PARA LA CRÍA INTENSIVA DE JUVENILES DESDE EL COMIENZO DE LA ALIMENTACIÓN EXTERNA.	55
7.4.1. Planteamiento experimental	55
7.4.2. Resultados	56
7.4.3. Discusión.	63
7.5. ESTUDIO V: CRÍA INTENSIVA DE JUVENILES DURANTE LOS SEIS PRIMEROS MESES: EFECTOS DE LA CLASIFICACIÓN POR PESO	65
7.5.1. Planteamiento experimental	65
7.5.2. Resultados	66
7.5.3. Discusión.	71
8. DISCUSIÓN GENERAL	73
9. CONCLUSIONES	79
10. CONCLUSIONS	80
11. RESUMEN	81
12. SUMMARY	86
13. BIBLIOGRAFÍA	90
14. AGRADECIMIENTOS	102
15. ANEXO	105

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

Durante las últimas décadas, el consumo mundial de productos acuáticos de origen animal se ha incrementado en gran medida. La imposibilidad de cubrir esta creciente demanda mediante una actividad pesquera racional hace que la acuicultura adquiera cada vez más importancia, constituyendo una alternativa real para disminuir la diferencia que existe entre la demanda y la oferta de estos productos, así como para resolver problemas de conservación de especies mediante repoblación. Según las últimas estimaciones de la FAO, publicadas en 2008, se ha pasado de una producción inferior al millón de toneladas en los años 50 a 51,7 millones de toneladas en 2006. Dentro de ello, los crustáceos cultivados representaban el 9% en 2006, si bien el alto valor que alcanzan estas especies en el mercado determina que, en términos económicos, aportaran un 23% del total. La mayor parte de la producción acuícola procede de aguas continentales. La acuicultura continental aporta un 58% en cantidad, lo que representa un 48% del valor total de los animales cultivados (FAO, 2008).

Todos los crustáceos objeto de cría en la actualidad son decápodos macruros, principalmente varias especies de langostinos de los géneros *Penaeus* y *Metapenaeus*, el camarón de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*) y diversas especies de cangrejos de río, la mayoría pertenecientes a la familia astácidos, y además algunos cambáridos y parastácidos.

A partir de los años 60, se ha venido desarrollando un creciente interés por el cultivo de astácidos en Europa, donde son considerados un alimento de lujo y alcanzan elevados precios en el mercado. Las especies de mayor importancia ecológica, productiva y gastronómica son el cangrejo noble (*Astacus astacus* L.), el cangrejo de

patas blancas (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet), el cangrejo de patas largas (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz) y el cangrejo señal (*Pacifastacus leniusculus* Dana). Se han contabilizado más de 760 astacifactorías en la UE (entonces con solo 15 países), en su mayoría dedicadas al cultivo del cangrejo señal (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.

Respecto a la reproducción, en anteriores investigaciones con *P. leniusculus* y *A. pallipes*, este grupo ha llegado a la puesta a punto de técnicas de gran valor aplicativo en la fase reproductiva, que abarcan desarrollo gonadal, maduración, apareamiento, oviposición, embriogénesis en incubación maternal (Celada et al. 1985, 1987, 1988, 2001a, 2005, 2006, Carral et al. 2000), sistemas de incubación artificial (Carral et al. 1992, 2004, 2009, Pérez et al. 1998a, 1998b, 1999, Celada et al. 2004, Melendre et al. 2006, 2007, Sáez-Royuela et al. 2009, González et al. 2010a, 2010b), así como almacenamiento y transporte de huevos (Celada et al. 2000, 2001b, Pérez et al. 2003), todo ello orientado a la mejora de cada una de las etapas del largo proceso que finalmente culmina con la obtención del juvenil 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 europeos, con las modificaciones adaptativas 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 los animales obtenidos en la fase reproductiva. Para ello, el primer factor a considerar es la alimentación. En trabajos llevados a cabo con juveniles de astácidos desde el comienzo de la alimentación externa (Mason 1979, D'Abramo et al. 1985, Gydemo y Westin 1989, Celada et al. 1989, 1993, Ackefors et al. 1989, 1992, 1995, Taugbøl y Skurdal 1992, Henttonen et al. 1993, Blake et al. 1994, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001, Savolainen et al. 2003, 2004), se ha probado una amplia gama de alimentos, tanto frescos como elaborados artificialmente. Sin embargo, dentro de una desconcertante variabilidad de resultados, ninguno de ellos permitió alcanzar aceptables tasas de supervivencia y de crecimiento. Recientemente, Sáez-Royuela et al. (2007) han señalado que las causas se encuentran vinculadas a deficiencias nutritivas, relacionadas con factores esenciales desconocidos, que pueden ser aportados por alimento vivo (*Artemia* o *Daphnia*). Posteriormente, González et al. (2008) han cuantificado las cantidades óptimas de nauplios vivos de *Artemia* como suplemento de una dieta compuesta seca para salmónidos, alcanzando altas tasas de supervivencia y un crecimiento mucho mayor que el obtenido hasta entonces durante el mismo período (100 días). Estos estudios establecen las bases para una alimentación adecuada, que ha permitido superar el bloqueo sufrido por los procesos de investigación durante 30 años, provocado por resultados que probablemente han respondido más a una deficiente alimentación que a efectos de los tratamientos experimentales. A partir de aquí, otros factores importantes en la cría de juveniles pueden ser estudiados sin el riesgo de que los resultados se distorsionen, enmascarados por una alimentación inadecuada.

Sobre esta base, las investigaciones para la mejora de las técnicas de cría de juveniles de astácidos han de orientarse al estudio de aspectos relacionados con prácticas de manejo y condiciones ambientales, centrado no solo en el incremento de las tasas de supervivencia y de crecimiento sino también en las posibilidades de reducir trabajo y costes, así como en obtener información sobre la respuesta de los juveniles a períodos de cría desde el inicio de la alimentación externa más largos que los alcanzados hasta el presente. Así, los factores de mayor importancia tanto para la mejora de los procesos productivos como de sus resultados constituyen el objeto de esta Tesis, y son los siguientes:

- Efectos del origen de los juveniles: incubación maternal o incubación artificial. Publicación I.
- Densidades adecuadas para la cría intensiva. Publicación II.
- Simplificación de las prácticas vinculadas a la alimentación. Publicación III.
- Condiciones adecuadas de disponibilidad de refugios y de iluminación. Publicación IV.
- Cría intensiva durante los seis primeros meses, evaluando efectos de la clasificación por peso. Publicación V.

Estas investigaciones se han llevado a cabo dentro del proyecto del Plan Nacional de I+D+i "Técnicas de cría de juveniles de astácidos (*P. leniusculus* Dana) en condiciones controladas", referencia AGL2005-01127. Las cinco publicaciones que sustentan esta Tesis se relacionan en el apartado 3.

2. INTRODUCTION AND JUSTIFICATION OF THE THEMATIC UNIT OF THE PUBLICATIONS

Over the last decades, worldwide consumption of aquatic products of animal origin has grown dramatically. The impossibility of meeting this increasing demand by means of a reasonable fishing activity leads aquaculture to gain more and more importance, reducing the difference between demand and supply of these products, as well as solving problems of species conservation through restocking. According to the FAO's latest estimates published in 2008, production has increased from less than one million tonnes in the 1950s to 51.7 million tonnes in 2006. Cultured crustaceans accounted for 9% of the total production in 2006 and, in economic terms, those amounts (4.5 million tonnes) were worth US\$ 17.95 billion (23% of the total value). Most aquaculture production comes from inland waters. Freshwater environment contributes 58% by quantity and 48% by value (FAO, 2008).

Currently, the crustaceans which are the object of culture belong to the order Decapoda, primarily species of the genera *Penaeus* and *Metapenaeus*, the freshwater shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*) and several freshwater crayfish species, most of them belonging to family Astacidae, together with some cambarid and parastacid crayfish.

Since the sixties, an increasing interest has been shown in astacid crayfish culture in Europe, due to its gastronomic quality as well as its high market Price. From the ecologic, productive and gastronomic point of view, the most important species are the noble crayfish (*Astacus astacus* L.), the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet), the narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz) and the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana). There are around 760 crayfish farms in the EU (with only 15 countries

at that time), most of them devoted to the cultivation of signal crayfish (Pérez et al. 1997a). Culture systems are generally extensive or semi-extensive at best. In such circumstances, the different phases of the productive process are subject to uncontrolled factors, resulting in a low and unpredictable yield. This has led to the development of research lines investigating means to intensify and improve the culture phases in several countries.

As regards reproduction, in previous research with *P. leniusculus* and *A. pallipes*, this team developed techniques with a high application value in the reproductive phase, including gonadal development, maturation, mating, spawning, embryogenesis in maternal incubation (Celada et al. 1985, 1987, 1988, 2001a, 2005, 2006, Carral et al. 2000), artificial incubation systems (Carral et al. 1992, 2004, 2009, Pérez et al. 1998a, 1998b, 1999, Celada et al. 2004, Melendre et al. 2006, 2007, Sáez-Royuela et al. 2009, González et al. 2010a, 2010b), as well as egg transport and storage (Celada et al. 2000, 2001b, Pérez et al. 2003), aimed at improving each phase of the long process with ends with obtaining the stage 2 juvenile. Moreover, it has been proved that the results obtained and techniques developed in one of the species can be, in large part, applied to the other, and by extension, to other European astacid crayfish, with appropriate adaptative modifications as the case may require.

Having obtained acceptable efficiency in juvenile production, the next step is to increase animal survival and growth rates. The first factor to consider is feeding. In studies carried out under controlled conditions (Mason 1979, D'Abramo et al. 1985, Gydemo y Westin 1989, Celada et al. 1989, 1993, Ackefors et al. 1989, 1992, 1995, Taugbøl y

Skurdal 1992, Henttonen et al. 1993, Blake et al. 1994, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001, Savolainen et al. 2003, 2004), a wide variety of foods have been tested in astacid juveniles from the onset of exogenous feeding. However, results were usually unsatisfactory. Recently, Sáez-Royuela et al. (2007) reported that these poor results were mainly due to nutritional deficiencies, related to unknown essential elements that can be provided by live food (*Artemia* o *Daphnia*). Later on, González et al. (2008) determined the optimum quantities of *Artemia* nauplii to supplement a dry diet for salmonids, which allowed high survival rates and a growth greater than that obtained so far for the same period (100 days). This knowledge constitutes an important advance in the research process and lays the foundations for an adequate feeding regime. Once the effects of the experimental treatments are no longer masked by deficient feeding, other important factors in juvenile rearing can be studied.

In this context, research on intensive juvenile astacid crayfish rearing has to aim at studying aspects related to management and environmental conditions, focused not only on increasing survival and growth rates but also on the possibilities of reducing labor and costs, in addition to obtaining information about the response of juveniles to rearing periods from the onset of exogenous

feeding which were longer than those tested so far. Thus, the more important factors involved in improving the productive processes and the results constitute the aim of this thesis, whose specific objectives are as follows:

- Assessing possible influences of juvenile origin: maternal incubation or artificial incubation. Study I.
- Determining adequate densities for intensive rearing. Study II.
- Simplifying the practices linked with feeding. Study III.
- Determining adequate conditions of shelter and lighting. Study IV.
- Intensive rearing for the first six months, assessing effects of size grading. Study V.

This research was carried out in the aquaculture laboratories of the Animal Production Department at the University of León, over three consecutive years, within the framework of Research Project AGL2005-01127 "Rearing techniques of astacid juvenile (*P. leniusculus* Dana) under controlled conditions", funded through the Plan Nacional de I+D+i. The five publications which support this thesis are as follows in the section 3.

3. LISTA DE PUBLICACIONES

- I. **Autores:** González R, Celada JD, García V, Carral JM, González A, Sáez-Royuela M (2009).
Título: The artificial incubation of crayfish eggs: review and report from an experimental study concerning the effects of offspring origin (maternal or artificial incubation) on the survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae).
Revista: Reviews in Fish Biology and Fisheries 19, 167-176.
Factor de impacto (JCR 2008): 1.792
Categoría: Fisheries 7/40
- II. **Autores:** González R, Celada JD, González A, García V, Carral JM, Sáez-Royuela M (2010).
Título: 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.
Revista: Aquaculture International 18, 371-378.
Factor de impacto (JCR 2008): 0.608
Categoría: Fisheries 31/40
- III. **Autores:** González R, Celada JD, Carral JM, González A, Sáez-Royuela M, García V (2009).
Título: Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different food supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions.
Revista: Aquaculture 295, 200-204.
Factor de impacto (JCR 2008): 1.678
Categoría: Fisheries 9/40
- IV. **Autores:** González R, Celada JD, García V, González A, Carral JM, Sáez-Royuela M (2010).
Título: Shelter and lighting in the intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding.
Revista: Aquaculture Research. En revisión.
Factor de impacto (JCR 2008): 0.991
Categoría: Fisheries 23/40
- V. **Autores:** González R, Celada JD, Carral JM, García V, Sáez-Royuela M, González A (2010).
Título: Intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) during the first six months: Effects of size grading.
Revista: Aquaculture. En revisión.
Factor de impacto (JCR 2008): 1.678
Categoría: Fisheries 9/40

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. ESPECIES DE CANGREJOS DE RÍO DE INTERÉS EN ACUICULTURA

Existen más de 540 especies de cangrejos de río englobadas en el Suborden Astacidea (Hogger 1988), que se encuentran distribuidas por todos los continentes, excepto en la Antártida (Holdich 2002). Dicho Suborden se divide en dos Superfamilias: Astacoidea y Parastacoidea, según estén localizadas en el Hemisferio Norte o Sur, respectivamente. Aparte de su situación geográfica, existen importantes diferencias morfológicas y biológicas entre ambos grupos al haber seguido diferentes líneas evolutivas. En el primer caso, se pueden distinguir dos grandes familias: Astacidae y Cambaridae. Los astácidos comprenden dos géneros de origen europeo (*Astacus* y *Austropotamobius*) y uno de procedencia norteamericana (*Pacifastacus*). Los cambáridos, todos ellos originarios del continente americano, engloban un gran número de géneros, entre los cuales tiene un interés preponderante el *Procambarus* por su extraordinaria capacidad adaptativa y su amplia expansión en las últimas décadas a través de buena parte de los ecosistemas dulceacuícolas del continente europeo, así como del africano y del asiático.

A nivel de especie, las de mayor importancia ecológica, productiva y gastronómica en los países europeos son: el cangrejo noble (*Astacus astacus* Linnaeus 1758), el cangrejo de patas blancas (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet 1858), muy parecido al *Austropotamobius torrentium* Schrank 1803, el cangrejo de patas largas (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz 1823), el cangrejo señal (*Pacifastacus leniusculus* Dana 1852) y el cangrejo rojo de los pantanos o de las marismas (*Procambarus clarkii* Girard 1852).

El cangrejo noble (*A. astacus*) tiene como área de origen el noroeste de Europa

(Rusia, países escandinavos, Polonia, Repúblicas Checa y Eslovaca, Alemania, Hungría, Rumanía, antigua Yugoslavia y Holanda), habiéndose extendido a algunas zonas de Francia y Portugal.



Foto 1. Cangrejo noble.

El oeste europeo es la zona de distribución natural del cangrejo de patas blancas (*A. pallipes*), principalmente España, Inglaterra, Gales, Irlanda, Francia, Italia y norte de Portugal. Existen también algunas poblaciones en Suiza y la antigua Yugoslavia.



Foto 2. Cangrejo de patas blancas.

La región centroeuropea constituye el área natural de *A. torrentium* (especialmente en Alemania y Francia).

El cangrejo de patas largas (*A. leptodactylus*) se distribuye de forma natural por el este de Europa (sur de la CEI, Turquía y Polonia), habiendo sido introducido recientemente en Francia y Alemania.

El cangrejo señal (*P. leniusculus*) procede de la zona noroeste de USA. A finales del siglo XIX fue introducido en estados del suroeste, tales como California. Su llegada al continente europeo tuvo lugar a lo largo de la década de los sesenta del siglo XX, comenzando por Suecia. Karlsson (1994) afirma que, desde entonces, se han desarrollado poblaciones de esta especie en al menos 20 países europeos.



Foto 3. Cangrejo señal.

Según Hobbs (1972), las zonas pantanosas del estado de Louisiana (localizado en el SE de Estados Unidos) y del NE de México son el área de origen del cangrejo rojo de los pantanos (*P. clarkii*). No obstante, Hobbs et al. (1989) señalan que gracias a las extraordinarias características biológicas y gran capacidad de adaptación y propagación de esta especie, se ha producido su difusión por buena parte de América Central, América del Sur, África, Asia y Europa (fundamentalmente España, Francia y Portugal).

Por lo que se refiere a los cangrejos de río del Hemisferio Sur, éstos se encuentran dentro de la familia Parastacidae. A ella pertenecen catorce géneros distribuidos por Australasia, Madagascar y la zona Sur del continente americano (Holdich 2002). Entre las especies de parastácidos de mayor interés por sus posibilidades de cultivo cabe destacar: el "yabbie" (*Cherax destructor* Clark 1936), cuya área original se corresponde con el cuadrante sudeste de Australia; el "marron" (*Cherax tenuimanus* Smith 1912), originario de la zona suroeste de Australia, y el cangrejo de pinza roja (*Cherax quadricarinatus* Clark 1936) procedente del norte de Australia. Estos dos últimos parecen ser los de mayor proyección con vistas a su explotación, aunque la producción actual toda-

vía es insuficiente para satisfacer la demanda del mercado (Lawrence y Jones 2002).

4.2. CICLO VITAL Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS PRODUCTIVO

El ciclo biológico del cangrejo de río presenta importantes diferencias en el desarrollo cronológico de sus fases según las distintas familias. De forma general y centrándonos básicamente en los astácidos, el proceso tiene lugar sólo una vez al año y se inicia con el desarrollo gonadal en machos y hembras durante la estación estival. De esta forma, 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 (Foto 4). Este tiene lugar mediante cópula, cuando el macho realiza la deposición de los espermátóforos sobre la parte ventral media del celotórax de la hembra, donde permanecen adheridos hasta que, unos días después, tiene lugar la oviposición, cuando se produce la fecundación. Los huevos quedan unidos a los pleópodos maternos hasta finalizar el desarrollo embrionario e incluso la primera muda.



Foto 4. Apareamiento.

Es de tener en cuenta que el cangrejo de río no presenta estados de metamorfosis tras la eclosión, con fases larvianas que se desplazan e ingieren alimento externo a su propio organismo, tal como sucede en otros crustáceos cultivados. La mayor cantidad de vitelo de los huevos permite un desarrollo completo, de manera que las fases larvianas tienen lugar en el interior del huevo y los juveniles eclosionan directamente.

En comparación con otras especies de crustáceos, el cangrejo de río presenta valores de fecundidad francamente bajos. Así, en *A. astacus* se citan cifras medias de 80-200 huevos (Skurdal y Taugbøl 2002). El número de huevos en el cangrejo de patas largas (*A. leptodactylus*) oscila entre 100 y 300 (Skurdal y Taugbøl 2002). Por su parte, *A. pallipes* presenta puestas muy reducidas, con medias de 50-75 huevos/hembra (Brown y Bowler 1977, Arrignon 1981, Brewis y Bowler 1985, Woodlock y Reynolds 1988, Carral et al. 1994), cifras similares a las registradas en *A. torrentium* (Schellenberg 1928-cita Laurent 1988). Según Momot (1991), los valores medios de puesta en *P. leniusculus* varían entre 110 y 180 huevos por hembra, mientras que Reynolds (2002) considera valores hasta 270.

Los cambáridos y los parastácidos poseen mayor fecundidad que los astácidos. En este sentido, las hembras de cangrejo rojo de los pantanos (*P. clarkii*) pueden presentar, como término medio, 400-450 huevos pleopodales (Lacaze 1970, Oluoch 1990), mientras que en los cangrejos del Hemisferio Sur se han registrado valores entre 200 y 1000 huevos por hembra (Morrissy 1974, Frost 1975, D.P.I. 1993, Jones 1995, Shipway 1951-cita Honan y Mitchell 1995, Lawrence y Jones 2002).

En todos los casos, el número de huevos de cada puesta se encuentra directamente relacionado con la talla de la hembra, al igual que sucede en otros animales acuáticos. Autores como Brewis y Bowler (1985), O'Keefe (1986), Carral et al. (1994) y Sáez-Royuela et al. (2006) han llegado en *A. pallipes* a fórmulas de regresión lineal que relacionan la longitud del cefalotórax con el número de huevos pleopodales. Por otra parte, Lahti y Lindqvist (1983) y Sáez-Royuela et al. (2006) no han encontrado una relación directa entre la talla de la hembra y el diámetro de los huevos, si bien parece que las hembras más grandes suelen producir huevos mayores (Woodlock y Reynolds 1988). Finalmente, Sáez-Royuela et al. (2006) afirman que existe una correlación negativa, aunque débil, entre el número

de huevos de una puesta y el diámetro de los mismos.

Referente 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, Cukerziz 1988, Matthews 1992, Skurdal y Taugbøl 1994, 2002), frente a las 2-3 semanas registradas a temperaturas de 22°C por Suko (1956), Hill y Cancienne (1963) y Huner (2002) en el cangrejo rojo. En las especies del Hemisferio Sur, la embriogénesis dura entre 1 y 3 meses (Sammy 1988, Lawrence y Jones 2002).

Una vez que se ha producido la eclosión, los individuos resultantes son juveniles estado 1 que, tras un período de 7-10 días, en dependencia de la temperatura del agua, experimentan la primera muda pasando al segundo estado juvenil, que presenta aspecto y morfología semejante al adulto. 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 62 y 85 mm de longitud total (Skurdal y Taugbøl 2002). En el caso del cangrejo de patas blancas (*A. pallipes*), la madurez aparece a los 3-4 años con una longitud de cefalotórax de 22-26 mm, mientras que *P. leniusculus* normalmente madura a los 2-3 años con 60-90 mm de longitud total en condiciones naturales, aunque en algunas regiones han sido encontrados ejemplares maduros con un año de vida (Abrahamsson y Goldman 1970, Abrahamsson 1971, Reynolds 2002). 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).

4.3. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE ASTÁCIDOS

Las primeras actividades a pequeña escala de cría de cangrejos de río datan de la Edad Media en Europa y tuvieron lugar 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.

Los primeros intentos serios de producción en condiciones relativamente controladas se remontan a finales del siglo XIX y primera mitad del XX. De esta forma, 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, mientras que Cukerzis (1984) cita a un industrial procedente de Alemania que, a partir de 1888, se dedicó en Lituania a la explotación de diversas poblaciones de cangrejos. En Alemania, Hofmann (1978) hace referencia a una explotación de cangrejo noble en funcionamiento durante la década de los 40 del siglo XX. En la década de los 90, se contabilizaban ya más de 760 astacifactorías en los 15 países de la UE (Pérez et al. 1997a).

Actualmente, según Pérez et al. (1997a) podría establecerse una clasificación de los métodos de cultivo, hasta la obtención de ju-

veniles destinados a la repoblación o de ejemplares para alimento humano, en tres grupos: 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.

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.



Foto 5. Estancos de reproductores en cultivo semiextensivo.

Así, al final del verano, los reproductores se encuentran en estanques (Foto 5), 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 lugares donde la eclosión tiene lugar bajo condiciones controladas, posibilitando así la recolección de juveniles. Estos pueden ser destinados directamente a repoblación (individuos en estados 2 ó 3) o, cuando el cultivo se encuentra orientado a la obtención de animales para alimento humano, los juveniles son transferidos posteriormente a estanques al aire libre donde crecerán en condiciones seminaturales hasta la adquisición de la talla comercial.

Intensivo. Este sistema aún no ha sido aplicado en condiciones industriales, encontrándose en la actualidad en fases experimentales. En un intento de alcanzar altos niveles productivos, todo el ciclo se llevaría a cabo ejerciendo un fuerte control de los factores ambientales, la reproducción y la alimentación.

En definitiva, se puede concluir que los sistemas de cría extensivos y semiextensivos son los que se practican en el territorio europeo, si bien se contemplan diversas modificaciones encaminadas a la mejora de los procesos productivos. Frecuentemente, las actividades se orientan a la obtención de juveniles (bien en los estados 2 ó 3 o bien de un verano de vida) con destino a la repoblación. Por lo que se refiere al cultivo de animales para alimentación humana, se está experimentando un cierto avance en algunos países, aunque la falta de conocimientos sobre aspectos tales como requerimientos nutritivos, patología y manejo durante estas etapas, obliga a trabajar en condiciones extensivas y seminaturales.

4.4. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN EN CULTIVO DE ASTÁCIDOS

4.4.1. Fase reproductiva

Tiene como principal objetivo la obtención de juveniles estado 2, de vida independiente. La baja fecundidad y el largo período de desarrollo embrionario son los principales inconvenientes de esta fase. La mayoría de los estudios sobre eficiencia reproductiva aportan resultados parciales, ya que se centran en determinadas partes del ciclo, sin considerar el conjunto de pérdidas desde el desarrollo gonadal hasta la producción de juveniles estado 2. Son escasos los trabajos que, mediante el mantenimiento de los reproductores bajo condiciones controladas durante todo este período, permiten el registro de pérdidas en cada una de sus etapas y evaluaciones globales de eficiencia. Esto es necesario para determinar cuál sería 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.

4.4.1.1. Incubación maternal

Este término se refiere al proceso de desarrollo de los huevos, eclosión de los juveniles estado 1 y muda al estado 2, que de forma natural tiene lugar en los pleópodos maternos.



Foto 6. Hembras de cangrejo señal con huevos (izquierda) y con juveniles (derecha).

La densidad de reproductores es uno de los factores que más afecta a la eficiencia reproductiva en cultivo. En estanques de tierra, la densidad es normalmente baja, no más de 6 animales m^{-2} (Pursiainen et al. 1983, 1989, Ackefors 1996), e incluso inferior: 0,4 m^{-2} (Köksal 1988, Mackevicién et al. 1997) ó 0,08 m^{-2} (De Luise y Sabbadini 1988). Celada et al. (2006) obtuvieron buenos resultados con 6,6 reproductores m^{-2} . En tanques interiores de fibra de vidrio, Taugbøl y Skurdal (1990) recomendaron que, para *A. astacus*, la densidad no debería sobrepasar los 50 individuos m^{-2} en el apareamiento/puesta y 33 m^{-2} durante la incubación, señalando que cuanto más baja sea la densidad mayores serán las tasas de supervivencia de los huevos. En diferentes estudios llevados a cabo con *A. pallipes* bajo condiciones controladas (Carral et al. 1994, 2000, Celada et al. 2001a), concentraciones entre 7 y 24 reproductores m^{-2} no provocaron efectos negativos sobre la eficiencia reproductiva. Trabajando con *P. leniusculus* en condiciones controladas, los reproductores se han mantenido en tanques de fibra de vidrio a densidades entre 6 m^{-2} y 25 m^{-2} (Celada et al. 2005, 2006) con buenos resultados, a la vez que se ha conseguido reducir la proporción machos:hembras de 1:2 a 1:4.

En condiciones de cultivo, estudios llevados a cabo con *A. astacus* han aportado datos sobre el número inicial de reproductores introducidos en estanques en verano/otoño, mortalidad, hembras con huevos en primavera y número medio de huevos por hembra en ese momento. Así, Pursiainen et al. (1983) registraron un 88% de hembras con huevos en primavera (respecto a las previamente introducidas en verano/otoño), mientras que Mackevicién et al. (1997) obtuvieron un 62% con una media de 97 huevos pleopodales/hembra antes de la eclosión y Mackevicién et al. (1999) un 76,9% con más de 100 huevos. Sin embargo, pocos autores han indicado el número de juveniles estado 2 obtenidos por hembra. Valores entre 60 y 80 juveniles de *A. astacus* fueron registrados por Pursiainen et al. (1983, 1989), mientras que Mackevicién et al. (1997) ob-

tuvieron medias de 22,4 y 70. En *A. leptodactylus*, Köksal (1988) registró una producción de 105 juveniles estado 2 por hembra.

En condiciones controladas de experimentación, la mayoría de los estudios han sido iniciados después la puesta (Mason 1974, 1977a, 1977b, Cukerzis et al. 1979, Celada et al. 1988) y pocos cubren todo el proceso reproductivo, desde la maduración hasta la obtención de juveniles estado 2. En *A. pallipes*, Matthews (1992) registró importantes pérdidas, aproximadamente un 96%. Posteriormente, Carral et al. (2000) registraron valores medios de 49,5 juveniles estado 2/hembra con una eficiencia del 54% con respecto al número inicial de huevos por puesta, mientras que en el estudio publicado por Celada et al. (2001a), la tasa de eficiencia fue del 33% (18,5 juveniles/hembra).

En *P. leniusculus*, los valores medios de huevos por hembra varían entre 110 y 180 (Momot 1991), mientras que Reynolds (2002) considera valores hasta 270. En el primer período tras la puesta, 234 huevos/hembra han sido contabilizados por Celada et al. (1987), y 207 por Arrignon y Laurent (1998). A partir de hembras con huevos trasladadas al laboratorio, Mason (1974) y Celada et al. (1988) obtuvieron medias de 104 y 74 juveniles por hembra, respectivamente. En estudios recientes, todo el ciclo reproductivo, desde el período previo al apareamiento, fue llevado a cabo bajo condiciones controladas. Partiendo del número de huevos puestos por reproductora, Celada et al. (2005) obtuvieron una eficiencia al estado 2 del 51% (165 juveniles/hembra), por medio de una combinación de incubación maternal y artificial. Posteriormente, Celada et al. (2006) registraron valores medios de 135 juveniles estado 2/hembra con una eficiencia del 45% siempre en incubación maternal.

Desde el punto de vista práctico, el rendimiento de la fase reproductiva en su conjunto ha de cuantificarse en términos del número medio de juveniles estado 2 producidos por hembra respecto al número inicial de reproductores utilizados, incluyendo todas las pér-

didias posibles, como mortalidad, fracasos en el desarrollo gonadal, en el apareamiento, en la oviposición y en el largo desarrollo embrionario, hasta llegar a la liberación de juveniles.

4.4.1.2. Incubación artificial

El desarrollo de técnicas de incubación artificial 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 en centros de producción.

La puesta en práctica de técnicas de incubación artificial resulta particularmente interesante en el caso de los astácidos, fundamentalmente por tratarse de especies que se reproducen una sola vez al año (Celada et al. 2000, González et al. 1993), con un largo desarrollo embrionario, 6-8 meses en condiciones naturales (Pérez et al. 1998a), y un reducido número de huevos en cada puesta, 20-250 huevos/hembra (Reynolds et al. 1992). Durante las últimas décadas, las técnicas de incubación artificial han sido desarrolladas a nivel de investigación para mejorar la fase reproductiva en cultivo. Numerosos autores han hecho referencia a las múltiples ventajas y posibilidades de esta práctica en el funcionamiento de los centros de cría. Así, se conseguiría 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). Además, permitiría 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). Igualmente, posibilitaría la obtención de animales libres de la temible afanomicosis (Nylund y Westman 1992) y de posibles enfermedades contagiosas que pueda adquirir la progenie por el contacto directo con los padres (Pérez et al. 1998b, 2003, Carral et al. 2003). Además, se podría actuar so-

bre la duración de la embriogénesis mediante las oportunas manipulaciones térmicas (Brodsky 1984, Carral et al. 1988, 1992, Celada et al. 1994, Pérez et al. 1998a). Finalmente, la incubación artificial ofrece la posibilidad de identificar el origen de los juveniles con más precisión, lo cual podría ser útil en programas de selección genética (Carral et al. 2003).

Los primeros intentos de incubar los huevos separados de las reproductoras fueron llevados a cabo con *A. astacus* en Alemania (Reichenbach 1886). Posteriormente, Paris (1911) en Francia usó incubadores de huevos de truchas para huevos de *A. pallipes*. Además, sistemas de incubación para ciprínidos, como botellas invertidas, han sido probados con huevos de *P. leniusculus* en los Estados Unidos (Andrews 1904) y de *A. astacus* en Alemania (Hofer 1912 - cita Hofmann 1978, Stempel 1973), Ucrania (Brodsky 1962, 1984) y Lituania (Cukerzis 1964, 1984, 1988). Los resultados solamente indicaban las tasas de supervivencia a la eclosión. Desde un punto de vista práctico, es necesario conocer la producción final de juveniles estado 2, ya que esta representa el resultado final de todo el proceso reproductivo. Así, Mason (1977a) en Canadá, Rhodes (1981) en Gran Bretaña y Köksal (1988) en Turquía, con *P. leniusculus*, *A. pallipes* y *A. leptodactylus*, respectivamente, aportaron datos de eficiencia al estado 2 utilizando incubadores para huevos de salmónidos. También se han utilizado otros aparatos especialmente diseñados para astácidos. Así, en Finlandia, Järvenpää (1995), trabajando con *A. astacus*, comparó la eficacia productiva de dos modelos de bandejas, unas dotadas con motor para proporcionar un movimiento longitudinal de vaivén y otras estáticas. En Irlanda, Matthews y Reynolds (1995) probaron un método de incubación para huevos de *A. pallipes* basado en la recirculación de agua mediante inyección de aire. En ambos casos, se aportaron datos de eficiencia tras la primera muda (juvenil estado 2).

Hasta hace pocos años, la idea general era que la incubación artificial sólo podía ser factible cuando los huevos se retiraban de

la hembra en fases avanzadas del desarrollo embrionario (Cukerzis 1984, 1988, Köksal 1988, Mason 1977b, Rhodes 1981, Stempel 1973), de forma que el éxito de la incubación artificial se encontraba condicionado por tal circunstancia. Esta situación condujo a Carral et al. (1988, 1990, 1992) en el cangrejo señal, y a Pérez et al. (1998a, 1998b, 1999) en el cangrejo de patas blancas, al planteamiento del estudio de posibles vías de solución que permitieran abarcar la mayor parte de la embriogénesis en incubación artificial.

En un primer momento, se consideró que el conocimiento en profundidad del desarrollo embrionario permitiría una mejora de las técnicas de incubación artificial al proporcionar condiciones adecuadas en las diferentes fases, por lo que se aplicaron los estudios de Celada et al. (1985, 1987, 1991). También, se diseñó un modelo de incubador para huevos de astácidos (Carral et al. 1988), que resultó ser adecuado para llevar a cabo los procesos de experimentación posteriores. En un intento de acortar el período de incubación maternal al retirar los huevos de *P. leniusculus* en fases del desarrollo embrionario más tempranas que las recomendadas hasta entonces, Carral et al. (1992) incubaron con éxito huevos desde el día 18 tras la oviposición. Estos resultados han confirmado que el éxito de la incubación artificial depende más del modelo de aparato utilizado, de las condiciones de incubación y de la calidad del agua que de la fase de retirada de los huevos. Posteriormente, Pérez et al. (1998a, 1998b, 1999) probaron el mismo incubador, pero con huevos de *A. pallipes*, determinando la influencia del régimen térmico y del momento de la retirada de los huevos.

En el proceso de incubación artificial, los huevos muertos son muy susceptibles de ser colonizados por hongos y, una vez que ocurre, la infección se propaga rápidamente a los viables circundantes provocando la muerte embrionaria. Así, la proliferación fúngica puede ser controlada mediante la extracción periódica de huevos y juveniles estado 1 inviables (Carral et al. 2004, Policar et al. 2006), aunque se recomienda la ad-

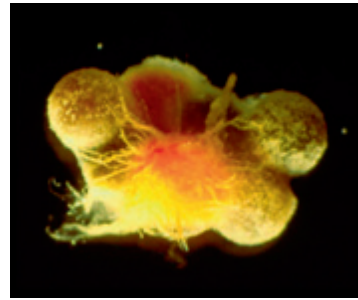


Foto 7. Huevos colonizados por hongos.

ministración de tratamientos antifúngicos. El verde de malaquita ha sido el fungicida más efectivo de los usados en acuicultura. Sin embargo, en 1991 Estados Unidos prohibió su uso en los peces destinados a alimentación humana y en sus huevos. En 1997 se prohibió en la Unión Europea (Schreier et al. 1996, Kitancharoen et al. 1997, Melendre et al. 2006). A raíz de esto, se probaron otros agentes químicos, y el formaldehído ha resultado ser el más efectivo para controlar el crecimiento fúngico en los huevos de cangrejo, permitiendo un incremento de las tasas de eclosión (Celada et al. 2004, Melendre et al. 2006, 2007). En la actualidad, su uso en acuicultura está permitido tanto en Estados Unidos como en la Unión Europea. Teniendo en cuenta la preocupación actual acerca de los posibles efectos que el uso del formaldehído puede causar sobre la salud y el medio ambiente acuático, Carral et al. (2009) y González et al. (2010b) probaron la efectividad antifúngica de otros agentes químicos en la incubación artificial de huevos de *P. leniusculus*. Los resultados indican que tanto el hidróxido de cobre como el bronopol podrían considerarse alternativas al formaldehído.

Una vez que los conocimientos sobre incubación artificial permitieron obtener aceptables tasas de eficiencia al estado 2, era conveniente desde el punto de vista productivo evaluar la posibilidad de incubar los huevos a altas densidades. Recientemente Sáez-Royuela et al. (2009), tras haber obtenido tasas de supervivencia al estado 2 próximas al 90%, afirmaron que el uso de tratamientos antifúngicos, concretamente formaldehído, es un factor clave en la incuba-

ción artificial de huevos de cangrejos a altas densidades, llegando a incubar con éxito 20 cm^{-2} (1 capa completa, Foto 8) e incluso 42 cm^{-2} (2 capas, Foto 9). También con formaldehído, González et al. (2010a) alcanzaron tasas de supervivencia al estado 2 del 68,5% con una concentración de 60 huevos cm^{-2} (tres capas). Como una aportación más en la mejora de la incubación artificial, los trabajos de Melendre et al. (2007) evidenciaron que la eficiencia final puede ser incrementada hasta un 35% reduciendo los períodos de coexistencia de los juveniles estado 1 y estado 2 en las unidades de incubación.



Foto 8. Juveniles estado 1 y 2 procedentes de la incubación de 6,6 y 20 huevos cm^{-2} .



Foto 9. Juveniles estado 1 y 2 procedentes de la incubación de 42 huevos cm^{-2} .

Así, se puede concluir que la eficiencia final de la incubación artificial, entendida como el porcentaje de juveniles estado 2 producidos respecto al número inicial de huevos incubados, depende principalmente de la duración del proceso, condiciones del agua, utilización de antifúngicos y frecuencia de extracción de juveniles de los incubadores. Habitualmente, dicha eficiencia se encuentra entre el 70 y 85%.

4.4.1.3. Almacenamiento y transporte de huevos

Una vez que se dispuso de técnicas eficaces de incubación artificial, el siguiente paso para la intensificación de la fase reproductiva consistió en el estudio de las posibilidades de almacenamiento y transporte de huevos.

Tradicionalmente, el transporte de huevos de cangrejo de río se ha venido efectuando en las propias madres. No obstante, conviene reseñar que 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 bajo un planteamiento orientado, en principio, a la superación de las limitaciones existentes en su momento.

Así, Celada et al. (2000) consiguieron almacenar con éxito huevos de cangrejo señal durante un período de 28 días. Tras la correspondiente incubación artificial, las tasas de eficiencia al estado 2 se encontraron en torno al 70%. Posteriormente, Celada et al. (2001b) realizaron un experimento con *A. pallipes*, constatando que un almacenamiento de hasta 42 días influye escasamente sobre la viabilidad de los huevos. Finalmente, Pérez et al. (2003) consiguieron alargar el período de almacenamiento hasta 126 días a una temperatura de refrigeración constante (4°C) sin provocar una disminución en las tasas de supervivencia. Estos estudios también demostraron que las condiciones utilizadas para el almacenamiento son adecuadas para el transporte.

En definitiva, considerando en conjunto la experiencia previa con el cangrejo señal y los estudios llevados a cabo con el cangrejo de patas blancas, puede afirmarse que 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. En el aspecto sanitario, la incubación artificial posibilita la producción de juveniles libres de enfermedades conocidas. Por todo ello, la incorporación de estas técnicas al funcionamiento de astacifactorías supondría un paso importante en la intensificación de la astacicultura.

4.4.2. Cría de juveniles

Desde el punto de vista tanto científico y experimental como de una cría industrial, la supervivencia y el crecimiento de juveniles constituyen un tema de difícil enfoque. De hecho, los elevados niveles de mortalidad de estos animales durante los 2-3 primeros meses de vida representan 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. A continuación, se expone un breve resumen de los niveles actuales de conocimiento en los aspectos estudiados.

4.4.2.1. Temperatura

En este aspecto hay coincidencia entre los distintos investigadores. El margen adecuado se encuentra, al igual que en condiciones naturales, entre 15° y 25°C. En general, todos los autores que han trabajado con juveniles a partir del estado 2 han llevado a cabo pruebas a temperaturas entre 20° y 24°C.

4.4.2.2. 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 no utilizar flujos excesivamente altos.

4.4.2.3. Alimentos

En hábitats naturales, estos animales consumen una amplia gama de alimentos, que incluye vegetales y animales vivos, microorganismos y detritus, en cantidades que oscilan entre el 2% y el 16% del peso vivo por día (D'Abramo y Robinson 1989).

En condiciones controladas, se han probado alimentos de muy diversa naturaleza (principalmente animales frescos o congelados y vegetales) en juveniles desde el inicio de la alimentación externa (Mason 1979, D'Abramo et al. 1985, Ackefors et al. 1989, 1995, Celada et al. 1989, Gydemo y Westin 1989, Blake et al. 1994). También se han probado varias dietas compuestas para peces y otras especies de crustáceos, así como alguna dieta seca experimental para cría de astácidos en condiciones semiextensivas, como aporte adicional a la producción espontánea de los estanques (Ackefors et al. 1989, Taugbøl y Skurdal 1992, Celada et al. 1989, 1993, Henttonen et al. 1993, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001, Savolainen et al. 2003). Todas estas dietas han sido utilizadas en laboratorio solas o suplementadas con alimento natural, aunque no han permitido mejorar los resultados anteriores. Así, considerando en conjunto los trabajos publicados, presentan una amplia variabilidad y no han sido, en general, satisfactorios, con tasas de supervivencia en torno al 50% y valores de crecimiento de 15-20 mm de longitud rostrumtelson y 90-200 mg de peso. Como excepciones a esta tónica general, Nyström (1994) y Savolainen et al. (2004) obtuvieron mejores tasas tanto de supervivencia como de crecimiento, debido probablemente a una disponibilidad adicional de alimento vivo, que no fue cuantificada (Sáez-Royuela et al. 2007).

Recientemente, los trabajos de Sáez-Royuela et al. (2007) han demostrado que, alimentando a juveniles con una dieta compuesta para salmónidos, el suplemento con *Daphnia* o nauplios vivos de *Artemia* desde el inicio de la alimentación externa permite una mejora de los resultados, lo cual sugiere que el alimento vivo posee factores nutricionales desconoci-

dos esenciales para los juveniles de astácidos. Posteriormente, González et al. (2008) cuantificaron las cantidades óptimas de nauplios vivos de *Artemia* como suplemento de una dieta compuesta seca similar. De este modo, se registraron tasas de supervivencia entre 75 y 90% a los 100 días y un crecimiento mucho mayor que el obtenido hasta entonces durante ese período (1,283 mg). Estos estudios establecen las bases para una alimentación adecuada, que ha permitido superar el bloqueo sufrido por los procesos de investigación durante 30 años, provocado por resultados que han respondido más a una deficiente alimentación que a los efectos de los tratamientos experimentales. A partir de aquí, otros factores importantes para la intensificación de la cría de juveniles de astácidos pueden ser estudiados sin el riesgo de que los resultados puedan encontrarse enmascarados por una alimentación inadecuada.

4.4.2.4. Origen de los juveniles

Cara a la mejora de los procesos productivos en astacifactoría, diversos autores han hecho referencia a las ventajas y posibilidades que pueden ofrecer las técnicas de incubación artificial respecto a la incubación maternal (Carral et al. 1992, 2003, González et al. 1993, Celada et al. 1994, Järvenpää 1995, Matthews y Reynolds 1995, Pérez et al. 1998b, 1999, 2003). Sin embargo, hace ya tres décadas que se planteó un interrogante acerca de la posterior viabilidad de los juveniles obtenidos mediante esta práctica (Mason 1977a), surgiendo la duda de si estos animales tendrían las mismas perspectivas de subsistencia que los procedentes de incubación maternal. La única comparación hasta la fecha entre juveniles procedentes de incubación maternal y artificial (sin tratamientos antifúngicos) fue realizada por Sáez-Royuela et al. (1995), sin detectar diferencias significativas en la supervivencia ni en el crecimiento. Desde entonces, se han llevado a cabo varios estudios orientados a la intensificación de la cría utilizando juveniles de astácidos procedentes de huevos incubados artificialmente (Savolainen et al. 2003, 2004, Policar et al. 2006, Sáez-Royuela et al. 2007, González et al. 2008), con la diferencia de que, en estos casos, la proliferación fúngica durante

la incubación de los huevos fue controlada con la administración de diferentes tratamientos antifúngicos. Aunque se ha comprobado que, a dosis fungicidas, estos biocidas con fuerte efecto antimicrobiano, como el formaldehído (McDonnell y Russell 1999, Stephenson et al. 2003, McDonnell 2007), no afectan negativamente a los huevos (Celada et al. 2004, Melendre et al. 2006, Sáez-Royuela et al. 2009), los posteriores efectos sobre los juveniles son todavía desconocidos.

4.4.2.5. Densidad

Éste es un factor fuertemente condicionante 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 m⁻² (Ackefors et al. 1989), que es la utilizada por Celada et al. (1989, 1993) y por Sáez-Royuela et al. (1995, 1996, 2001). Una densidad de 150 m⁻² sería adecuada únicamente para los 30 primeros días (D'Abramo et al. 1985), mientras que la máxima concentración inicial para llegar a 3,5 cm de longitud (unos 6 meses) sería 100 m⁻², disponiendo de suficientes refugios (Gydemo y Westin 1989). Según Nystrom (1994), la densidad inicial ha de ser menor de 100 m⁻² para los tres primeros meses, mientras que Savolainen et al. (2004) afirman que una mejora de la alimentación permitiría superar 200 m⁻². Considerando en conjunto los resultados obtenidos, presentan una amplia variabilidad y no son concluyentes, por lo que es conveniente el desarrollo de nuevos procesos de investigación para determinar las densidades adecuadas en función de los objetivos de producción, así como máximas densidades admisibles.

4.4.2.6. Frecuencia de aporte de alimento

En la mayoría de las investigaciones para la mejora de las tasas de supervivencia y de crecimiento a partir del inicio de la ingestión de alimento, este se ha aportado una vez al día, coincidiendo con la retirada de residuos. 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 (Nystrom 1994, Blake et al. 1994) o tres veces por semana (Savolainen et al. 2003, 2004, Taugbol y Skurdal 1992). En el único estudio llevado a cabo en este sentido, Sáez-Royuela et al. (2001) no registraron diferencias en el crecimiento aportando alimento una o dos veces al día.

4.4.2.7. Sustrato y refugios

Para todos los investigadores, es evidente que los efectos perjudiciales del comportamiento agresivo y del canibalismo pueden reducirse con los refugios adecuados. En *P. leniusculus*, Blake et al. (1994) y Savolainen et al. (2003) obtuvieron tasas de crecimiento más elevadas con el alga *Elodea* sp. o un sustrato de grava, respectivamente. En el caso de *A. pallipes*, Sáez-Royuela et al. (2001) señalaron que la supervivencia mejoró al utilizar piezas onduladas de fibrocemento como refugio, aunque el crecimiento fue menor que con tubos de PVC. En último término, se ha probado a aislar individualmente a los animales en condiciones de experimentación (Celada et al. 1989, 1993, Ackefors et al. 1992, 1995, Henttonen et al. 1993, Nystrom 1994, Sáez-Royuela et al. 1995), constatando una importante mejora de la supervivencia, pero sería muy cuestionable su viabilidad a nivel productivo, donde se requiere otro tipo de soluciones. En este sentido, han de tenerse en cuenta aspectos higiénicos, de modo que los materiales a utilizar y su disposición deben proporcionar adecuado refugio a los animales sin dificultar el manejo o las labores de limpieza ni perjudicar la calidad del agua.

4.4.2.8. Iluminación

En la mayoría de los estudios bajo condiciones controladas, no se ha manipulado la iluminación. La idea de que, tratándose de animales de hábitos mayormente nocturnos, la luz podría reducir su actividad y, por tanto, el comportamiento agresivo, condujo a algunos investigadores a experimentar modificando el fotoperíodo y la intensidad lumínica. En 1992, Taugbøl y Skurdal señalaron que la iluminación continua mejoró la supervivencia y la longitud final, pero

no redujo la pérdida de pinzas. Posteriormente, Nystrom (1994) obtuvo mayor tasa de supervivencia con la más alta intensidad de luz. Por el contrario, Blake et al. (1994) no encontraron relación de diferentes niveles de iluminación con la supervivencia ni con el crecimiento. De igual modo, Sáez-Royuela et al. (1996) no registraron diferencias significativas en la supervivencia, ni en el ritmo de crecimiento ni en la pérdida de pinzas al incrementar la iluminación. En estas circunstancias, se requieren nuevos procesos de investigación para determinar los posibles efectos de la luz.

4.4.2.9. Perspectivas de futuro

Hoy sabemos que los pobres resultados obtenidos en general durante 30 años 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. Una vez que este bloqueo ha sido superado y que se han establecido las bases para una alimentación adecuada, procede el estudio de otros factores importantes para la intensificación y mejora de los procesos de cría de juveniles de astácidos. En principio, el grado de desarrollo alcanzado en técnicas de incubación artificial, que incluye la administración de tratamientos antifúngicos sobre altas densidades de huevos, hace conveniente el estudio de la posterior viabilidad de los juveniles así obtenidos. Por otro lado, la aplicación de los recientes avances en alimentación permite alcanzar buenas tasas de supervivencia y de crecimiento, a la vez que, indudablemente, influye sobre el comportamiento ingestivo y agonístico de los cangrejos. Esto incide directamente sobre los efectos de aquellos factores estrechamente relacionados con la agresividad y el canibalismo, que son principalmente la densidad de juveniles, la frecuencia de alimentación y forma de los alimentos, la disponibilidad de refugios y las condiciones de iluminación, así como las posibilidades de reducir la presión dominante de los juveniles de crecimiento más rápido sobre los más pequeños mediante la separación por clasificación.

5. OBJETIVOS

La finalidad de esta Tesis Doctoral es la mejora de las técnicas de cría de juveniles de astácidos aplicando recientes avances en alimentación, y orientada al estudio de aspectos relacionados con prácticas de manejo y condiciones ambientales, así como a obtener información sobre la respuesta de los juveniles a períodos de cría desde el inicio de la alimentación externa más largos que los alcanzados hasta el presente. Los objetivos concretos son:

- Evaluar posibles influencias del origen de los juveniles: incubación maternal o incubación artificial. Estudio I.
- Determinar densidades adecuadas para la cría intensiva. Estudio II.
- Simplificar las prácticas vinculadas a la alimentación. Estudio III.
- Determinar condiciones adecuadas de disponibilidad de refugios y de iluminación. Estudio IV.
- Cría intensiva durante los seis primeros meses, evaluando efectos de la clasificación por peso. Estudio V.

Estos objetivos forman parte del proyecto del Plan Nacional de I+D+i “Técnicas de cría de juveniles de astácidos (*Pacifastacus leniusculus* Dana) en condiciones controladas”, referencia AGL2005-01127, y constituyen el fundamento de una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, con referencia AP2005-4860.

6. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

6.1. CANGREJOS, INSTALACIONES Y PROCEDIMIENTO BÁSICO DE EXPERIMENTACIÓN

Estas investigaciones se han llevado a cabo en las instalaciones y laboratorios de acuicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León, radicado en la Facultad de Veterinaria.

La especie de astácido utilizada fue *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). La obtención de juveniles estado 2 se realizó a partir de hembras con huevos procedentes de una astacifactoría. Fueron trasladadas al laboratorio a finales del mes de noviembre de cada año (aproximadamente 30 días después de la oviposición) y allí tuvo lugar el desarrollo embrionario durante varios meses hasta la producción de juveniles estado 2 (Foto 10).



Foto 10. Juvenil estado 2 de cangrejo señal.

Según el tipo de incubación, los juveniles procedieron de dos orígenes diferentes:

- a) Incubación maternal. Este término se refiere al proceso de desarrollo de los huevos, eclosión de los juveniles estado 1 y muda al estado 2, que de forma natural tiene lugar en los pleópodos maternos.
- b) Incubación artificial. Los huevos se separaron de las madres deslizando suavemente unas pinzas finas desde la base del pleópodo hasta su extremo (Foto 11). Posterior-



Foto 11. Separación de los huevos de los pleópodos en una hembra de cangrejo señal.

mente, el desarrollo tuvo lugar en un aparato de incubación (Foto 12) especialmente diseñado por nuestro equipo con fines experimentales (Carral et al. 1988, 1992). Como antifúngico se utilizó formaldehído, administrado a una concentración de 3000 ppm cada segundo día hasta el comienzo de las eclosiones mediante bombas dosificadoras SEKO tipo DS que vertían la solución durante 15 minutos en el flujo de entrada al incubador, según Melendre et al. (2006).

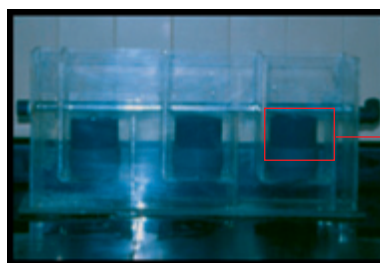


Foto 12. Aparato de incubación para huevos de astácidos diseñado por Carral et al. (1988, 1992).

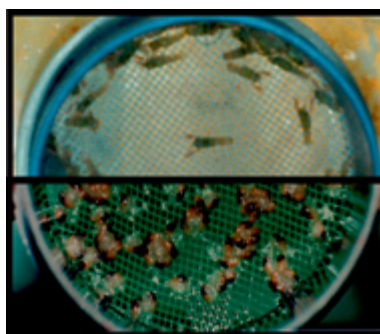


Foto 13. Unidad de incubación con juveniles estado 1 (abajo) y estado 2 (arriba).

Los ensayos se realizaron durante 3 años consecutivos. En total, se llevaron a cabo 7 experimentos: 3 de 80 días, 2 de 100, 1 de 120 y 1 de 180, iniciados con juveniles estado 2, cuando comienza la alimentación externa. En todos los casos, los animales procedían de al menos ocho hembras y fueron distribuidos al azar en 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.

El abastecimiento de agua procedía de un pozo artesiano, cuyos parámetros de calidad fueron analizados periódicamente en el laboratorio de la Oficina Municipal del Consumidor del Ayuntamiento de León, así como por 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 = 7,9
- Dureza total = 10°dH (calcio = 72 mg l⁻¹)
- Sólidos totales en suspensión = 14,2 mg l⁻¹
- Sólidos disueltos totales = 207,6 mg l⁻¹
- Conductividad = 145 $\mu\text{s cm}^{-1}$

Semanalmente, se efectuaban mediciones de oxígeno disuelto, de amonio y de nitritos del agua donde se encontraban los animales. Las medidas de oxígeno se realizaron con un oxímetro Sension6 dissolved Oxygen Meter of Hatch Company (valores en torno a 7 mg l⁻¹, mínimo 5,8 mg l⁻¹, máximo 7,7 mg l⁻¹). Amonio y nitritos fueron medidos con un Pocket-Photometer Lasa Aqua a partir de muestras de agua tomadas del interior de los tanques (amonio < 0,02 mg l⁻¹ y nitritos < 0,05 mg l⁻¹).

Las instalaciones de experimentación se encuentran ubicadas en tres recintos de la Facultad de Veterinaria. Se dispone de depósitos de fibrocemento para la recepción y el

tratamiento del agua, mientras que el mantenimiento de los animales se llevó a cabo en tanques de fibra de vidrio aglomerada con resina poliéster. En función de las características de las diferentes pruebas, se utilizaron 28 tanques de 100x100x30 cm, 24 tanques de 60x33x30 cm, 12 tanques de 53x26x20 cm y 9 tanques de 53x53x20 cm, provistos todos ellos de filtros de malla planctónica de 200 ó 250 μm con la finalidad de impedir la salida de animales o de alimento.

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 20°-23°C en todos los casos. El agua fue calentada mediante resistencias de 3.200 W blindadas y conectadas a sus correspondientes termostatos. La temperatura de los diferentes circuitos se registró diariamente con termómetros de máxima-mínima.

La limpieza del fondo de los tanques se efectuó mediante sifonado 3 veces por semana, mientras que los filtros se limpiaron 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, que se eliminaba posteriormente.

Las fotografías fueron realizadas con una cámara SONY DSC-W35 de 7,2 megapíxeles de resolución real. Para la obtención de las microfotografías se empleó un microscopio estereoscópico NIKON SMZ-25, que lleva acoplado el sistema fotográfico Microflex HFX-DX Type 115.

6.2. ALIMENTACIÓN

Los cangrejos fueron alimentados manualmente con un pienso compuesto formulado para salmónidos (T-NUTRA-0, Skretting, Trouw España SA. Cojobar, E-09620, Burgos, España, composición analítica proporcionada

por el fabricante: proteína bruta 54%, grasa bruta 18%, celulosa 0,08%, cenizas 12%, fósforo total 1,8%, Vitamina A 10000 UI kg⁻¹, D₃ 1500 UI kg⁻¹, E 150 mg kg⁻¹, diámetro de gránulo 0,9-1,5 mm) en cantidad suficiente para que resultara ligeramente en exceso (2,5-4% del peso vivo). Esta dieta seca (Foto 14) fue suplementada con nauplios de *Artemia* recién eclosionados o con quistes decapsulados de *Artemia* (quistes de INVE Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Bélgica).

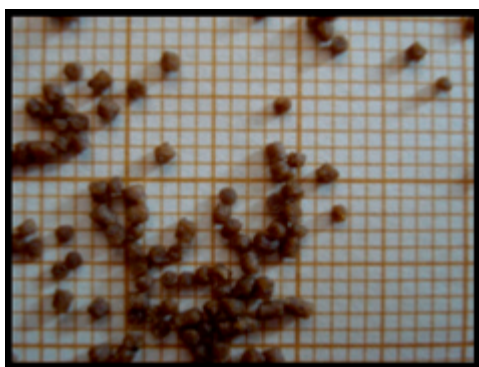


Foto 14. Pienso compuesto para salmónidos.

El proceso de decapsulación o eliminación del corion de los quistes de *Artemia* se realizó del modo descrito por Van Stappen (1996). Para la obtención de nauplios, los quistes decapsulados se incubaron durante 24 horas en botellas invertidas de plástico de 1,5 l de capacidad. Las condiciones durante la incubación fueron: iluminación continua, temperatura del agua 28 °C, salinidad de 35‰ y aireación desde el fondo para proporcionar oxígeno y mantener los quistes en suspensión.



Foto 15. Nauplio de *Artemia*.

Después de verificar las tasas medias de eclosión, que coincidieron con los datos proporcionados por la casa comercial (número de nauplios/g quistes), la cuantificación del suplemento se realizó a partir de cantidades conocidas de nauplios eclosionados en determinados volúmenes de agua y distribuyéndolos posteriormente en las correspondientes réplicas. Cuando se utilizaron los quistes directamente como alimento, se decapsulaba una cierta cantidad cada tres días y se almacenaba a 4°C. En este caso, la medida del suplemento se realizó a partir del número de quistes/g proporcionado por el fabricante.

6.3. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

En los distintos experimentos, los resultados se cuantificaron registrando los siguientes parámetros:

- Recuentos de sobrevivientes y número de animales con una sola pinza y sin pinzas cada 20 días.
- Coincidiendo con estos recuentos, se midió la longitud del cefalotórax (LC) y el peso de los individuos de muestras representativas, previa eliminación del agua retenida con papel secante.
- Número de sobrevivientes y de cangrejos con una sola pinza y sin pinzas al final del experimento. Longitud de cefalotórax y peso de todos los animales o de una muestra representativa.
- Peso vivo final del conjunto de cangrejos de cada réplica.

Con los datos obtenidos se calcularon los índices siguientes:

- Porcentaje de supervivencia.
- Porcentaje de sobrevivientes con una sola pinza y sin pinzas.
- Tasa de crecimiento específico (TCE). Es el incremento de peso diario expre-

sado en porcentaje, según la fórmula: $(\text{LnPeso final en g} - \text{LnPeso inicial en g})100/\text{días}$.

- $\text{Peso ganado (PG)} = (\text{Peso final en g} - \text{Peso inicial en g})100/\text{Peso inicial en g}$.
- Índice de conversión del alimento (IC) = $D_t/W_t - W_0$, siendo D_t la cantidad total de quistes (gramos de su forma comercial) y de dieta seca usada y $W_t - W_0$ el peso ganado (g) en un determinado período de tiempo.
- Coeficiente de variación (CV) = SD/m , siendo SD la desviación estándar y m la media.
- Biomasa final = $\text{Peso vivo final/unidad de superficie}$.

La longitud del cefalotórax se midió con calibres MITUTOYO (± 0.01 mm) (Foto 16). Para el registro del peso se empleó una balanza de precisión COBOS M-150-SX (± 0.001 g) (Foto 17).

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.

En los distintos ensayos, se establecieron 3 réplicas por tratamiento (un tanque por cada réplica). Para la realización de los correspondientes estudios estadísticos, se uti-

lizó el programa SPSS (SPSS Inc. Chicago, III., USA). Las comparaciones entre los tratamientos de los diferentes experimentos fueron realizadas sometiendo los datos a un análisis de varianza (ANOVA). En su caso, la comparación de medias se llevó a cabo por el método Duncan y el nivel de significación establecido fue siempre $P < 0.05$. Los porcentajes fueron transformados al arcoseno previamente a los análisis estadísticos. El cálculo de las medias en cada tratamiento se acompaña de \pm E.E.M. (error estándar de la media).



Foto 16. Calibre utilizado en la medición de la longitud del cefalotórax.



Foto 17. Balanza de precisión COBOS M-150-SX.

7. SECUENCIA DE EXPERIMENTACIÓN

7.1. ESTUDIO I: INCUBACIÓN ARTIFICIAL DE HUEVOS DE CANGREJO DE RÍO: REVISIÓN Y ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LOS EFECTOS DEL ORIGEN DE LOS JUVENILES (INCUBACIÓN MATERNAL O ARTIFICIAL) SOBRE SU POSTERIOR SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO

*Artificial incubation of crayfish eggs: review and report from an experimental study on effects of offspring origin (maternal or artificial incubation) on survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, *Astacidae*)*

R. González, J.D. Celada, V. García, A. González, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela
2009

Reviews in Fish Biology and Fisheries 19, 167-176

Impact factor (JCR 2008) 1.792. Category: Fisheries 7/40

7.1.1. Planteamiento experimental

Hace ya tres décadas, se planteó un interrogante acerca de la posterior viabilidad de los juveniles obtenidos mediante incubación artificial (Mason 1977a), surgiendo la duda de si estos animales tendrían las mismas perspectivas de subsistencia que los procedentes de incubación maternal. Durante la incubación artificial, es aconsejable la utilización de biocidas para evitar la proliferación fúngica sobre los huevos muertos. Aunque se ha comprobado que, a dosis fungicidas, estos compuestos con fuerte efecto antimicrobiano, como el formaldehído (McDonnell y Russell 1999, Stephenson et al. 2003, McDonnell 2007), no afectan negativamente a los huevos (Celada et al. 2004, Melendre et al. 2006, Sáez-Royuela et al. 2009), los posteriores efectos sobre los juveniles son todavía desconocidos.

Para aclarar esta cuestión, se diseñaron dos experimentos de 80 días con la finalidad

de comparar la supervivencia y el crecimiento de juveniles procedentes de dos orígenes: incubación maternal o incubación artificial con tratamientos de formaldehído, administrado a una concentración de 3000 ppm durante 15 minutos cada segundo día hasta el comienzo de las eclosiones (Melendre et al. 2006).

Los cangrejos se distribuyeron en tanques de fibra de vidrio provistos de refugios (un grupo de cuatro tubos unidos de PVC de 4 cm de longitud x 20 mm diámetro por cada tres animales) a la densidad de 100 m⁻². El fotoperíodo fue natural (aproximadamente 14 h luz:10 h oscuridad).

Los cangrejos fueron alimentados con una dieta seca para salmónidos suplementada con nauplios de *Artemia* (González et al. 2008). Diariamente, se hacían eclosionar los quistes y se comenzó suministrando manualmente 500 nauplios por cangrejo y día, cantidad que fue incrementada un 20% cada 20 días.

Experimento I.1. Se utilizaron 270 juveniles estado 2 distribuidos en 9 tanques de 0,3 m² de superficie y 0,1 m de profundidad de agua (Foto 18), abastecidos con un flujo de 0,5 l min⁻¹. La frecuencia de alimentación fue una vez al día y la temperatura del agua 20 ± 1°C.

En función del origen de los animales, los tratamientos fueron tres:

- Juveniles procedentes de incubación artificial durante 70 días.
- Juveniles procedentes de incubación maternal.
- Mezcla de juveniles de ambos orígenes (50% de incubación artificial y 50% de incubación maternal).

En los muestreos periódicos, se tomaban 20 cangrejos por réplica para pesarlos y medirlos individualmente. Al final del experimento (80 días), todos los cangrejos sobrevivientes fueron medidos y pesados individualmente.

Experimento I.2. Se utilizaron 180 juveniles estado 2 distribuidos en 12 tanques de 0,15 m² de superficie y 0,1 m de profundidad de agua (Foto 18), abastecidos con un flujo de 0,25 l min⁻¹. La temperatura del agua fue 22 ± 1° C.

En función del origen y de la frecuencia de alimentación, se diseñó un experimento bifactorial con cuatro tratamientos: juveniles procedentes de incubación artificial o maternal alimentados una vez o dos veces al día.

En los muestreos periódicos se tomaban 10 cangrejos por réplica para pesarlos y medirlos individualmente. Al final del experimento (80 días), todos los cangrejos sobrevivientes fueron medidos y pesados individualmente.

7.1.2. Resultados

Experimento I.1. Los valores de supervivencia y de crecimiento obtenidos tras los 80 días de prueba se recogen en la tabla 1. Las tasas de supervivencia se encontraron entre 87,8% y 93,3%, sin diferencias significativas entre tratamientos. No se encontraron tampoco diferencias significativas en los controles intermedios, desde el día 20 hasta el final de la prueba (día 80).

Respecto al crecimiento, los valores finales más altos y significativamente superiores de longitud de cefalotórax (11,47 mm), peso individual (373,80 mg), tasa de crecimiento específico (3,05 %) , peso ganado (1.129,61 %) y biomasa (332,27 mg dm⁻²) correspondieron a los cangrejos procedentes de incubación artificial.



Foto 18. Instalaciones donde se realizaron los experimentos I.1 y I.2.

Tabla 1. Valores finales de supervivencia y de crecimiento (80 días) de juveniles procedentes de diferentes orígenes (experimento I.1).

Origen	Incubación maternal	Mezcla	Incubación artificial
Supervivencia (%)	93,33 ± 1,9 ^a	87,78 ± 4,8 ^a	88,89 ± 2,9 ^a
LC (mm)	9,88 ± 0,13 ^a	10,82 ± 0,13 ^b	11,47 ± 0,16 ^c
Peso (mg)	236,62 ± 9,52 ^a	295,54 ± 11,19 ^b	373,80 ± 17,14 ^c
TCE (%)	2,48 ± 0,05 ^a	2,77 ± 0,05 ^b	3,05 ± 0,05 ^c
PG (%)	678,35 ± 31,30 ^a	872,19 ± 36,82 ^b	1.129,61 ± 56,40 ^c
Biomasa (mg dm ⁻²)	220,84 ± 13,97 ^a	259,42 ± 6,99 ^b	332,27 ± 9,25 ^c

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

La longitud de cefalotórax en cada uno de los controles se representa en el gráfico 1 y el peso medio en el gráfico 2. Los animales procedentes de incubación artificial crecieron siempre significativamente más rápido que los de incubación maternal. En

la mezcla de ambos orígenes, los valores de crecimiento fueron significativamente superiores a los obtenidos en incubación maternal e inferiores a los de incubación artificial, mostrando diferencias significativas desde el día 60.

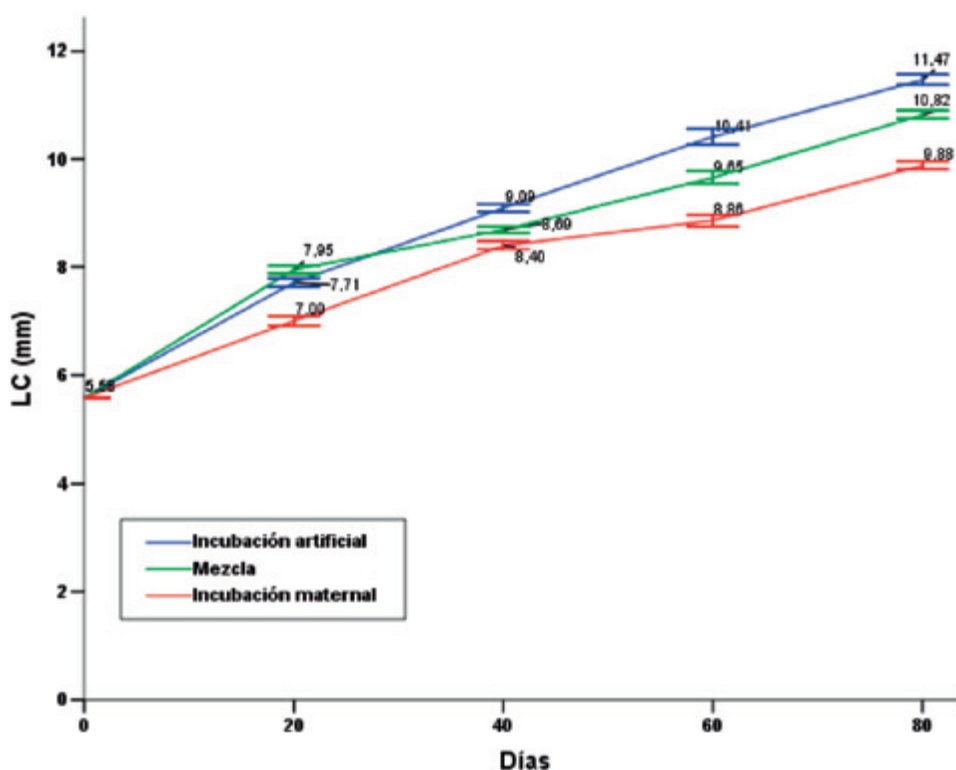


Gráfico 1. Longitud de cefalotórax de juveniles procedentes de diferentes orígenes a lo largo del período experimental (experimento I.1).

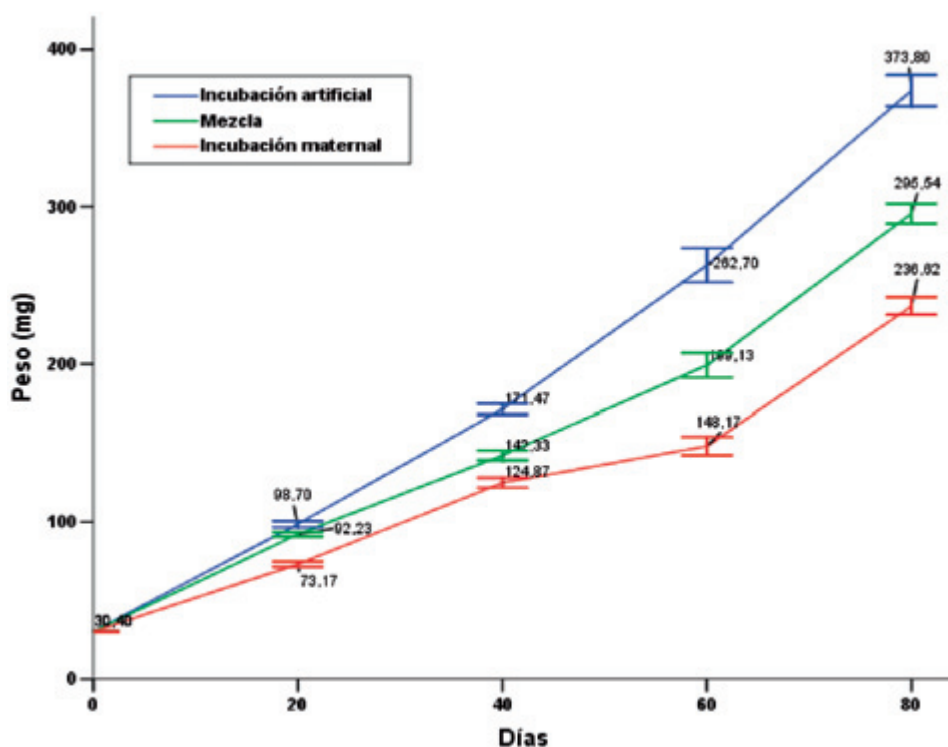


Gráfico 2. Peso de juveniles procedentes de diferentes orígenes a lo largo del período experimental (experimento I.1).

Experimento I.2. Los valores de supervivencia y de crecimiento obtenidos tras los 80 días de prueba se recogen en la tabla 2. Las tasas de supervivencia se encontraron entre 68,9% y 77,8%, sin diferencias significativas entre tratamientos. Tampoco hubo diferencias significativas en los controles intermedios, desde el día 20 hasta el final de la prueba (día 80).

Respecto al crecimiento, los valores más altos y significativamente superiores de longitud de cefalotórax (14,54 mm), peso individual (780,13 mg), tasa de crecimiento específico (3,94 %), peso ganado (2.466,20 %) y biomasa (545,42 mg dm⁻²) correspondieron a los cangrejos procedentes de incubación artificial y alimentados una vez al día, sin diferencias significativas con los juveniles procedentes del mismo origen y alimentados dos veces al día.

Si se tiene en cuenta solamente el origen, los animales producidos mediante incubación artificial crecieron significativamente más rápido (medias de 14,27 mm de longitud de cefalotórax y 750,02 mg de peso) que los de incubación maternal (medias de 12,95 mm de longitud de cefalotórax y 520,57 mg de peso). Independientemente del origen, no se encontraron diferencias entre las dos frecuencias de alimentación (una o dos veces al día).

La longitud de cefalotórax en cada uno de los controles se representa en el gráfico 3 y el peso medio en el gráfico 4. A lo largo del período experimental, los animales procedentes de incubación artificial crecieron siempre significativamente más rápido que los de incubación maternal.

Tabla 2. Valores finales de supervivencia y de crecimiento (80 días) de juveniles procedentes de incubación artificial o maternal y alimentados una o dos veces al día (experimento I.2).

Origen	Incubación maternal		Incubación artificial	
	Una vez al día	Dos veces al día	Una vez al día	Dos veces al día
Supervivencia (%)	73,33 ± 0,0 ^a	68,89 ± 2,2 ^a	77,78 ± 2,2 ^a	73,33 ± 3,8 ^a
LC (mm)	12,89 ± 0,18 ^a	13,01 ± 0,11 ^a	14,54 ± 0,33 ^b	13,99 ± 0,35 ^b
Peso (mg)	535,70 ± 41,70 ^a	505,43 ± 18,49 ^a	780,13 ± 53,11 ^b	719,91 ± 45,77 ^b
TCE (%)	3,48 ± 0,09 ^a	3,49 ± 0,04 ^a	3,94 ± 0,09 ^b	3,85 ± 0,10 ^b
PG (%)	1.662,16 ± 137,18 ^a	1.562,59 ± 60,81 ^a	2.466,20 ± 174,69 ^b	2.268,13 ± 150,56 ^b
Biomasa (mg dm ⁻²)	332,98 ± 32,52 ^a	372,46 ± 43,41 ^{a,b}	545,42 ± 40,41 ^c	495,53 ± 49,14 ^{b,c}

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

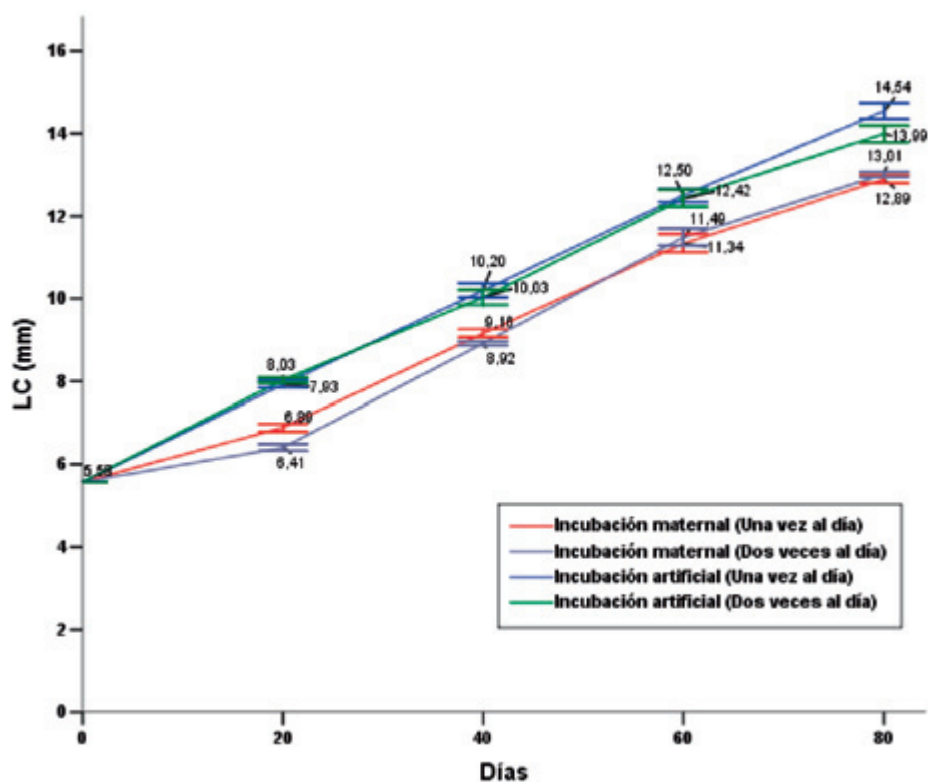


Gráfico 3. Longitud de cefalotórax de juveniles procedentes de incubación maternal o artificial y alimentados una o dos veces al día a lo largo del período experimental (experimento I.2).

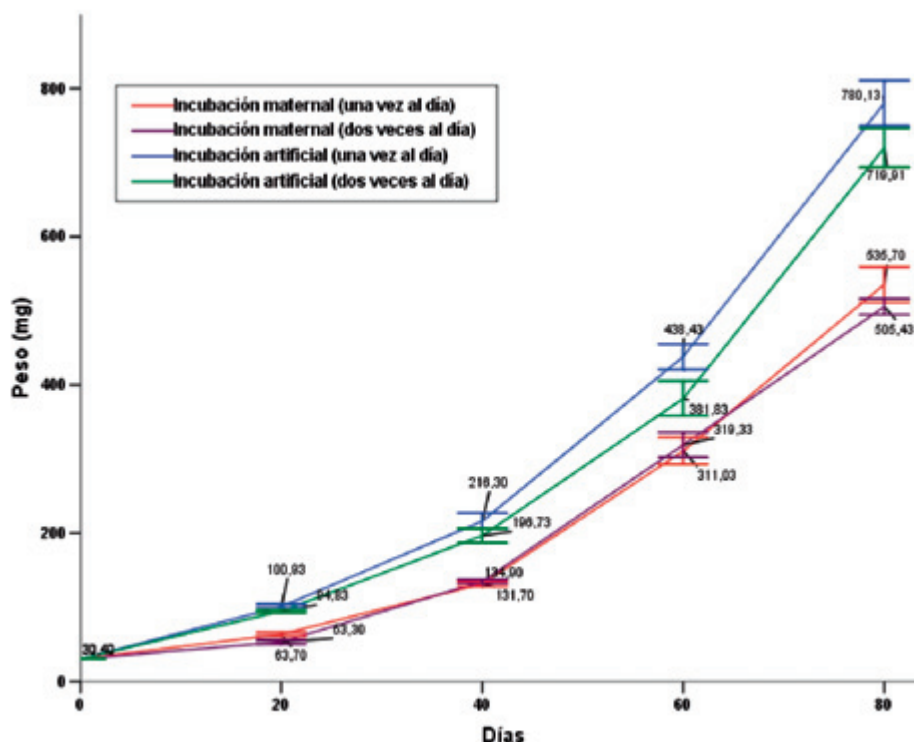


Gráfico 4. Peso de juveniles procedentes de incubación maternal o artificial y alimentados una o dos veces al día a lo largo del período experimental (experimento I.2).

7.1.3. Discusión

Se sabe que la frecuencia de alimentación puede ser un factor importante, fundamentalmente en los animales más jóvenes. Dado que en el experimento I.1 las tasas de crecimiento fueron mayores en el caso de los juveniles procedentes de incubación artificial, se planteó la hipótesis de que estos efectos beneficiosos podrían ser mejorados al incrementar la frecuencia de alimentación. En el experimento I.2, no se encontraron diferencias significativas entre las dos frecuencias (una o dos veces al día), lo cual coincide con los resultados publicados por Sáez-Royuela et al. (2001) con juveniles de *A. pallipes* procedentes de incubación maternal. Esto puede ser debido a que los cangrejos no ingieren el pienso inmediatamente, sino que lo llevan a los refugios donde el consumo final puede tener lugar cierto tiempo después. Además, los nauplios de *Artemia* son capaces de sobrevivir y nadar durante un período

prolongado en agua dulce (Celada et al. 2008), permaneciendo disponibles para los cangrejos.

Hasta la fecha, hay pocos estudios que hagan referencia al posible efecto negativo que podría ejercer sobre la descendencia el hecho de que los huevos sean incubados artificialmente y de que los primeros estados juveniles no tengan contacto directo con sus madres. En este sentido, Sáez-Royuela et al. (1995) no registraron diferencias en función de la procedencia de los juveniles aunque, en este caso, los huevos incubados artificialmente no habían recibido tratamientos antifúngicos. En el estudio de Policar et al. (2006), se utilizó un compuesto yodado como antifúngico en incubación artificial y los juveniles obtenidos no mostraron posteriormente efectos perjudiciales. De forma similar, en el presente estudio la incubación artificial con tratamientos de formaldehído no ha tenido efectos negativos sobre la supervivencia ni sobre el

crecimiento de los juveniles. Además, anteriormente se ha considerado la posibilidad de que estas técnicas puedan permitir obtener juveniles con un óptimo estado sanitario (Nylund y Westman 1992, Edgerton y Owens 1997, 1999), ya que se asume que los pro-

ducidos mediante incubación artificial con agentes biocidas y sin contacto con otros animales se encuentran libres de enfermedades conocidas, lo que explicaría en parte el mejor crecimiento de los animales producidos mediante incubación artificial.

7.2. ESTUDIO II: DENSIDAD PARA LA CRÍA INTENSIVA DE JUVENILES, UTILIZANDO NAUPLIOS DE *ARTEMIA* COMO SUPLEMENTO DE UNA DIETA SECA DESDE EL INICIO DE LA ALIMENTACIÓN EXTERNA

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

R. González, J.D. Celada, A. González, V. García, J.M. Carral, M. Sáez-Royuela
2010

Aquaculture International 18, 371-378

Impact factor (JCR 2008) 0.608. Category: Fisheries 31/40

7.2.1. Planteamiento experimental

La densidad es un factor decisivo con influencia directa sobre la productividad de los cultivos. Para mantener a los juveniles de astácidos a partir del estado 2 bajo condiciones controladas, algunos autores han recomendado diversas densidades (D'Abramo et al. 1985, Ackefors et al. 1989, Gydemo y Westin 1989, Nystrom 1994, Savolainen et al. 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos presentan una amplia variabilidad y ahora se sabe que no han respondido plenamente a efectos de los tratamientos experimentales, sino más bien a una deficiente alimentación. Los conocimientos actuales permiten superar este obstáculo y plantean la necesidad del desarrollo de nuevos procesos de investigación para determinar densidades adecuadas en función de los objetivos de producción, así como máximas densidades admisibles de cara a la intensificación del cultivo. Para ello, se diseñó la prueba siguiente:

Experimento II.1. La finalidad fue comparar la supervivencia y el crecimiento de juveniles estado 2 a las densidades iniciales de 100, 300, 600 y 1000 m⁻², alimentados una vez al día con una dieta seca para salmónidos suplementada con nauplios de *Artemia*, de acuerdo con los recientes avances aportados por González et al. (2008). Diariamente, se hacían eclosionar los quistes y se comenzó suministrando manualmente 500 nauplios por cangrejo y día, cantidad que fue incrementada un 20% cada 20 días.

Se emplearon 6.000 juveniles estado 2 procedentes de huevos incubados artificialmente con tratamientos de formaldehído, según Melendre et al. (2006). Los cangrejos fueron distribuidos en 12 tanques de fibra de vidrio de 1 m² de superficie con 200 l de agua (Foto 19) y abastecidos con un flujo de 1,5 l min⁻¹. Como refugio, se utilizaron piezas onduladas de fibrocemento minionda de 54 x 20,5 cm, cuyo número en cada uno de los tanques varió en función de la densidad



Foto 19. Instalaciones donde se realizó el experimento II.1.

(cuatro piezas para 100 animales m^{-2} , seis para 300 m^{-2} , ocho para 600 m^{-2} y doce para 1000 m^{-2}). La temperatura del agua fue $20 \pm 1^{\circ}C$ y el fotoperíodo fue natural (aproximadamente 14 h luz:10 h oscuridad).

En los muestreos periódicos, se tomaba una muestra de juveniles por réplica para pesarlos y medirlos individualmente. El tamaño de la muestra varió de acuerdo con la densidad: 10, 15, 20 y 30 cangrejos en los tratamientos de 100, 300, 600 y 1000 m^{-2} , respectivamente. Al final del experimento, se registraron la longitud de cefalotórax y el peso individual de una muestra que varió en función de la densidad: 20, 30, 40 y 60 juveniles en los tratamientos de 100, 300, 600 y 1000 m^{-2} , respectivamente.

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

La prueba duró 100 días.

7.2.2. Resultados

Tras los 100 días de prueba, los animales que se encontraron a la densidad inicial más baja (100 m^{-2}) alcanzaron mayor supervivencia (86,33%), que se redujo significativamente en cada una de las densidades superiores, hasta un mínimo de 39,13%, que correspondió a 1000 m^{-2} .

Referente al crecimiento, los valores finales medios más altos de longitud de cefalotórax (15,28 mm), peso individual (1,08 g), tasa de crecimiento específico (3,56%) y peso ganado (3.449,01%) correspondieron al tratamiento de 100 m^{-2} y fueron significativamente superiores al resto, sin que las diferencias entre las densidades de 300, 600 y 1000 m^{-2} fueran significativas, con un crecimiento final medio de 14 mm de cefalotórax y 0,72 g de peso. La biomasa más alta (271,03 g m^{-2}) se obtuvo con la densidad inicial de 1000 m^{-2} y fue significativamente inferior a medida que las densidades iniciales fueron menores.

Tabla 3. Valores finales de supervivencia y de crecimiento (100 días) de juveniles a diferentes densidades (experimento II.1).

	DENSIDAD INICIAL (animales m ⁻²)			
	100	300	600	1000
Supervivencia (%)	86,33 ± 3,38 ^a	64,89 ± 1,98 ^b	50,50 ± 2,34 ^c	39,13 ± 0,98 ^d
LC (mm)	15,28 ± 0,71 ^a	14,10 ± 0,14 ^b	13,79 ± 0,04 ^b	13,92 ± 0,31 ^b
Peso (g)	1,08 ± 0,12 ^a	0,73 ± 0,01 ^b	0,70 ± 0,02 ^b	0,73 ± 0,04 ^b
TCE (%)	3,56 ± 0,12 ^a	3,18 ± 0,02 ^b	3,13 ± 0,03 ^b	3,17 ± 0,06 ^b
PG (%)	3.449,01 ± 414,60 ^a	2.296,14 ± 42,37 ^b	2.196,02 ± 59,59 ^b	2.288,79 ± 147,72 ^b
Biomasa (g m ⁻²)	90,67 ± 7,04 ^a	133,47 ± 4,26 ^b	194,25 ± 17,45 ^c	271,03 ± 9,59 ^d

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

El gráfico 5 muestra las tasas de supervivencia en los controles efectuados a lo largo del experimento. En cada uno de ellos, el porcentaje de sobrevivientes fue significativamente superior en el tratamien-

to de densidad inicial más baja (100 m⁻²) y significativamente inferior en el de densidad inicial más alta (1000 m⁻²). En las concentraciones intermedias (300 m⁻² y 600 m⁻²), diferencias significativas en el mismo sen-

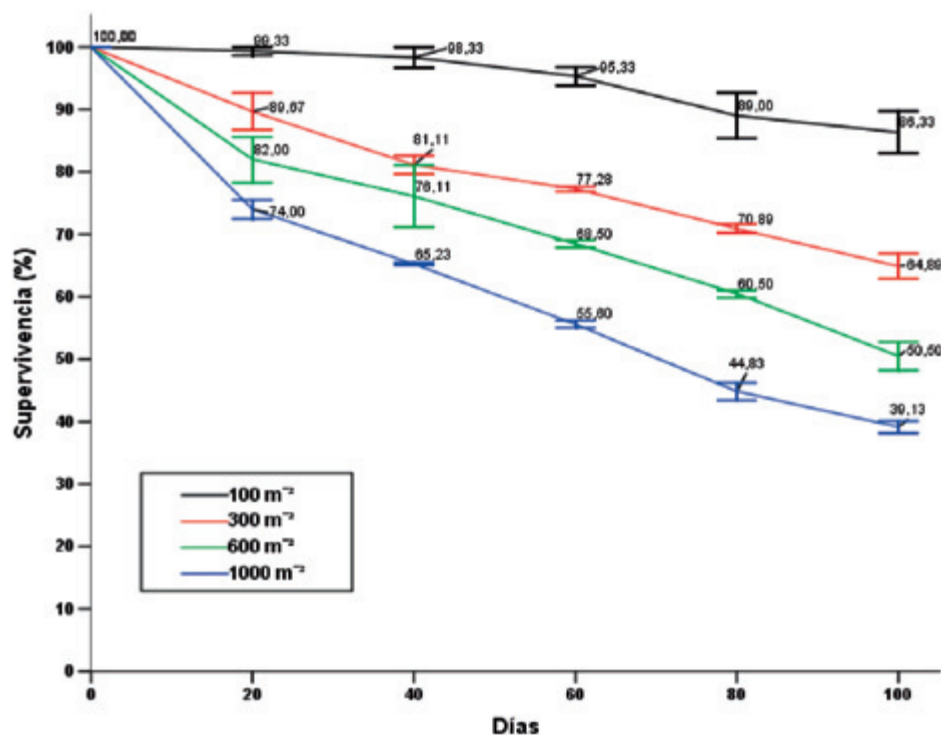


Gráfico 5. Tasas de supervivencia de juveniles mantenidos a diferentes densidades durante 100 días (experimento II.1).

tido pudieron apreciarse a partir de los 60 días de prueba.

La longitud de cefalotórax en cada uno de los controles se representa en el gráfico 6 y el peso medio en el gráfico 7. Todos los controles periódicos mostraron que partiendo de 100 m⁻² los animales crecieron significativamente más rápido que a densidades más altas. Entre éstas (300, 600 y 1000 m⁻²), ninguno de los controles mostró diferencias significativas en la longitud de cefalotórax ni en el peso durante los 100 días de prueba.

La tabla 4 recoge el porcentaje de juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas en los diferentes controles. En todos los registros efectuados hasta 80 días, se evidenció que en el tratamiento de 100 m⁻² la proporción de animales con falta de una o de ambas pinzas fue significativamente inferior a las registradas a densidades más altas (300, 600 y 1000 m⁻²), entre las que no hubo diferencias significativas. Al final del experimento, dicho porcentaje fue más elevado cuanto mayor fue la densidad inicial, encontrándose entre 14,44% (100 m⁻²) y 41,45% (1000 m⁻²).

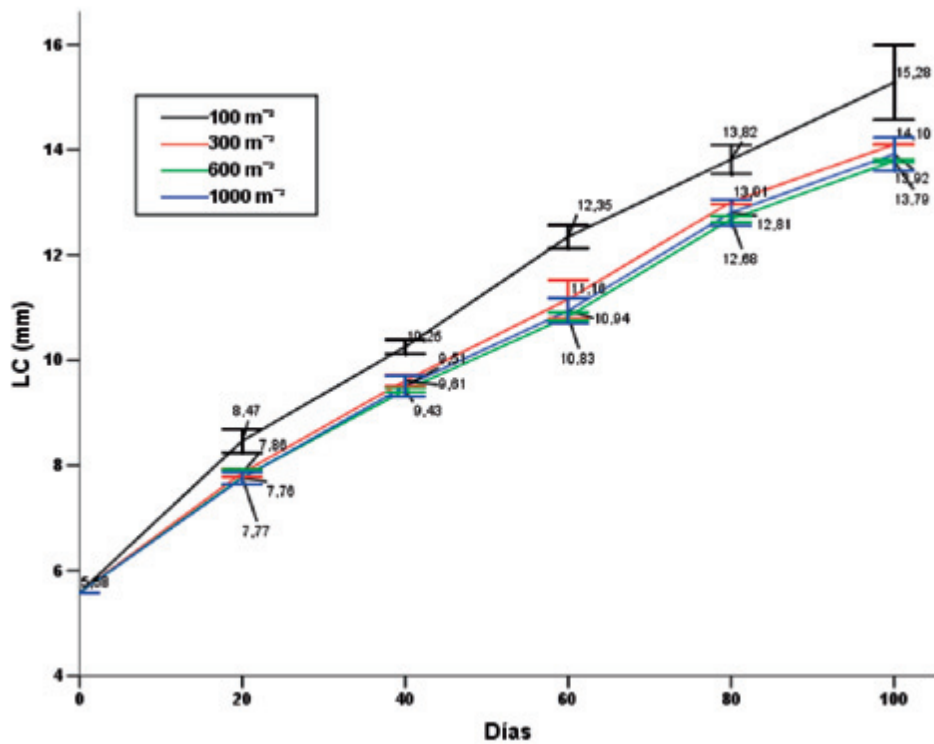


Gráfico 6. Longitud de cefalotórax de juveniles a diferentes densidades en cada uno de los controles a lo largo del período experimental (experimento II.1).

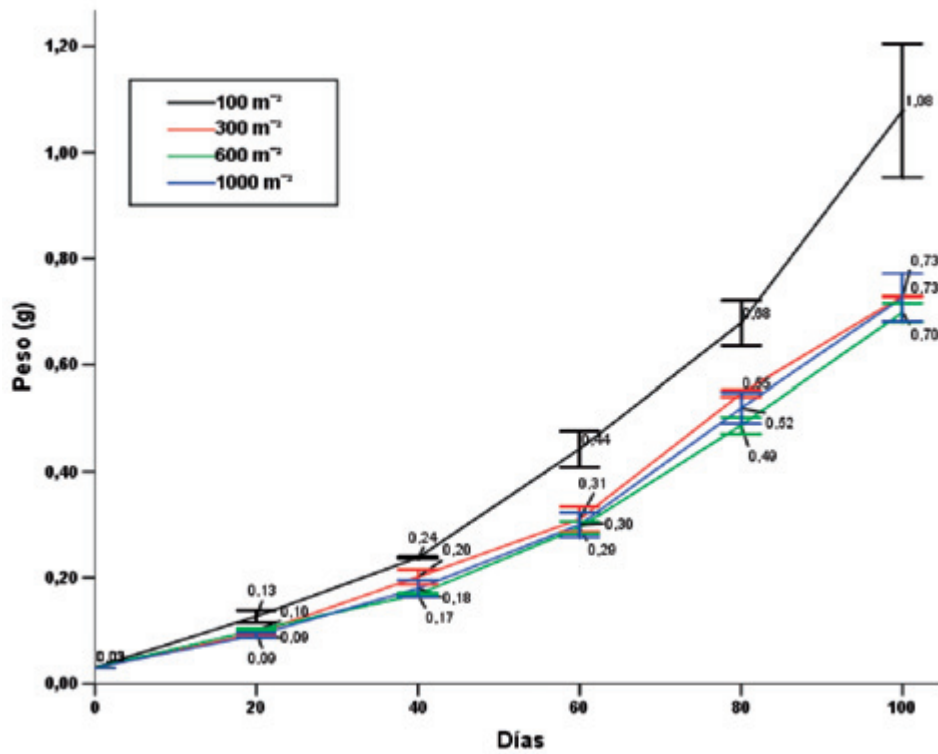


Gráfico 7. Peso de juveniles a diferentes densidades en cada uno de los controles a lo largo del período experimental (experimento II.1).

Tabla 4. Porcentaje de juveniles a diferentes densidades con pérdida de una o de ambas pinzas en cada uno de los controles a lo largo del período experimental (experimento II.1).

DÍAS	DENSIDAD INICIAL (animales m ⁻²)			
	100	300	600	1000
20	19,75 ± 3,68 ^a	40,73 ± 6,40 ^b	42,20 ± 1,67 ^b	53,36 ± 4,24 ^b
40	21,95 ± 2,70 ^a	42,22 ± 6,71 ^b	42,56 ± 2,35 ^b	50,88 ± 6,88 ^b
60	16,50 ± 3,08 ^a	33,92 ± 4,53 ^b	37,05 ± 1,21 ^b	40,10 ± 2,89 ^b
80	17,49 ± 4,36 ^a	31,57 ± 4,73 ^b	36,67 ± 1,64 ^b	41,73 ± 6,73 ^b
100	14,44 ± 2,18 ^a	27,31 ± 4,56 ^b	37,68 ± 0,61 ^c	41,45 ± 5,10 ^c

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

7.2.3. Discusión

Es un hecho conocido que, en general, los efectos de la agresividad y el canibalismo se intensifican con el incremento de la densidad, dando como resultado tanto reducciones de la tasa de supervivencia y del ritmo de crecimiento como pérdida de pinzas. Aunque diversos autores han llevado a cabo experimentos con astácidos en condiciones controladas partiendo de concentraciones entre 50 y 200 juveniles estado 2 por m^2 (Mason 1979, D'Abramo et al. 1985, Gydemo y Westin 1989, Celada et al. 1989, 1993, Taugbøl y Skurdal 1992, Ackefors et al. 1992, 1995, Henttonen et al. 1993, Blake et al. 1994, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001, Savolainen et al. 2003), solamente Ackefors et al. (1989), Nyström (1994) y Savolainen et al. (2004) se centraron específicamente en el estudio de efectos de la densidad. Savolainen et al. (2004) habían registrado los valores de crecimiento más altos hasta ese momento en astácidos. Sin embargo, estos resultados fueron inferiores a los alcanzados en nuestro experimento a la misma densidad ($100 m^{-2}$) e incluso inferiores a los obtenidos en el tratamiento de $1000 m^{-2}$, probablemente debido a que en este estudio

los animales dispusieron de mayores cantidades de alimento vivo, tal como sugieren los resultados de Sáez-Royuela et al. (2007) y González et al. (2008), que obtuvieron mayor crecimiento cuando el suplemento vivo fue incrementado.

La norma general en acuicultura de que a mayor densidad menor crecimiento no se cumplió en la presente prueba. Ciertamente que con $100 m^{-2}$ se obtuvo un crecimiento significativamente mayor que con densidades más altas, pero entre éstas (300 , 600 y $1000 m^{-2}$) las diferencias en ningún momento fueron significativas y el ritmo de crecimiento mostró escasa dependencia de la densidad (Foto 20). Ante este hecho, cabría admitir la posibilidad de que el efecto negativo sobre el crecimiento causado por la intensificación del comportamiento agonístico y del estrés a altas densidades fuese compensado por dos efectos positivos. Por un lado, el de la buena calidad de la dieta y, por otro, el de la suplementación alimenticia que representa el canibalismo, siendo mayor la ingestión de congéneres cuanto más elevada es la densidad, tal como evidencian las significativas reducciones del número de sobrevivientes.

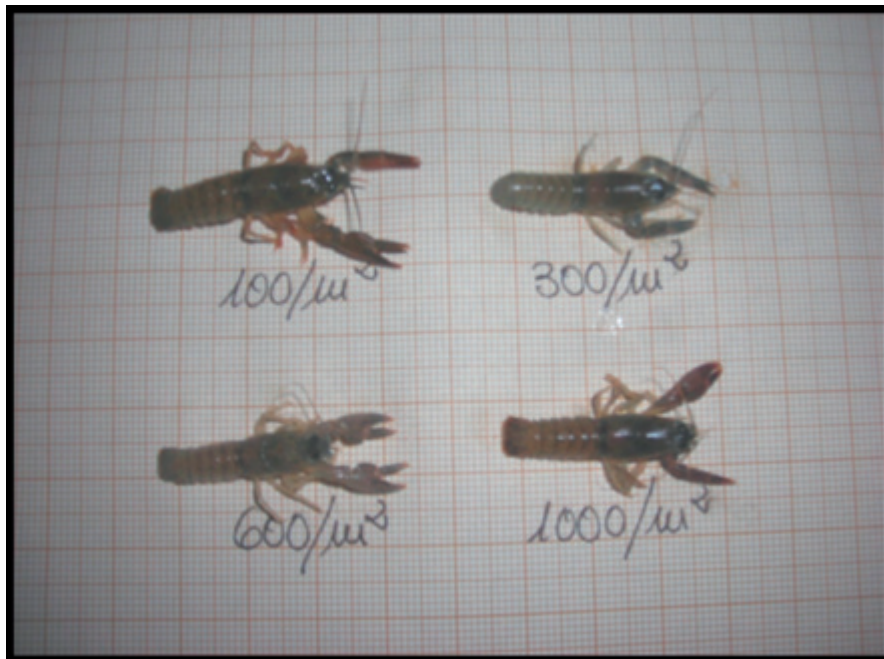


Foto 20. Ejemplares correspondientes a cada una de las densidades al final del experimento II.1.

Cara a las posibilidades aplicativas en el cultivo, ha de tenerse en cuenta la baja fecundidad de los astácidos, que no deja amplios márgenes para asumir excesiva mortalidad durante la etapa juvenil. También, la disponibilidad de infraestructura y mano de obra para el mantenimiento de animales constituye un fuerte condicionante. Por tanto, las decisiones habrían de tomarse en función

de las circunstancias y de los objetivos prioritarios en cada caso. Así, los datos generados por el presente estudio pueden servir de referencia para establecer densidades adecuadas en función de los objetivos, tanto a nivel de experimentación como de cultivo, y demuestran que la calidad de los alimentos constituye un factor decisivo para alcanzar con éxito altas densidades en condiciones controladas.

7.3. ESTUDIO III: QUISTES DECAPSULADOS DE ARTEMIA COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO PARA JUVENILES A DIFERENTES FRECUENCIAS DE ALIMENTACIÓN

Decapsulated Artemia cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (Pacifastacus leniusculus, Astacidae) at different food supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions

R. González, J.D. Celada, J.M. Carral, A. González, M. Sáez-Royuela, V. García
2009

Aquaculture (2009) 295, 200-204

Impact factor (JCR 2008) 1.678. Category: Fisheries 9/40

7.3.1. Planteamiento experimental

El empleo de nauplios de *Artemia* es generalizado en las etapas iniciales de la cría de peces y crustáceos, pero su producción diaria resulta laboriosa, cara y requiere instalaciones accesorias. Por estos motivos, el uso directo de quistes de *Artemia* puede ofrecer una interesante alternativa a los nauplios vivos. Una vez decapsulados, los quistes pueden ser manejados como una dieta inerte, están desinfectados y no pierden nutrientes en el agua (Vanhaecke et al. 1990). Esta condición de estabilidad de los quistes podría ser aprovechada a la hora de establecer la frecuencia de alimentación. Así, con el objetivo de reducir costes y mano de obra, y tras haber comprobado que el incremento de la frecuencia de alimentación de una a dos veces al día no mejoró la tasa de crecimiento (experimento I.2), se probó a distanciar más los aportes de alimento. De este modo, se diseñó la siguiente prueba factorial:

Experimento III.1. En función del suplemento y de la frecuencia de alimentación, los tratamientos fueron seis: dos dietas diferentes (pienso granulado de trucha suplementado con quistes o con nauplios de

Artemia) aportadas con tres frecuencias de alimentación (una vez al día, una vez cada dos días y una vez cada tres días).

Se emplearon 360 juveniles estado 2 procedentes de huevos incubados artificialmente. Los cangrejos fueron distribuidos en 18 tanques de fibra de vidrio de 0,20 m² de superficie con 25 l de agua (Foto 21) provistos de refugios (un grupo de cuatro tubos unidos de PVC de 4 cm de longitud x 20 mm diámetro por cada tres animales) a la densidad de 100 m⁻². El flujo fue 0,25 l min⁻¹. La temperatura del agua fue 21 ± 1°C y el fotoperíodo fue natural (aproximadamente 14 h luz:10 h oscuridad).

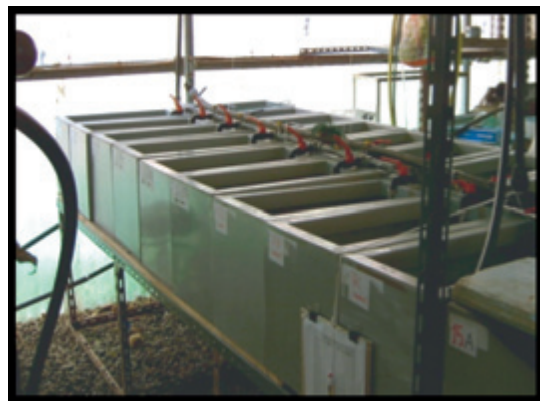


Foto 21. Tanques donde se realizó el experimento III.1.

En los muestreos periódicos, se tomaban 10 cangrejos por réplica (30 por tratamiento) para pesarlos y medirlos individualmente. Al final del experimento, todos los cangrejos sobrevivientes 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.

La prueba duró 100 días.

7.3.2. Resultados

Los valores de supervivencia y de crecimiento obtenidos tras los 100 días de prueba se recogen en la tabla 5. Las tasas de supervivencia se encontraron entre 56,7% (frecuencia de alimentación una vez cada tres días y suplemento de nauplios) y 81,7% (frecuencia de alimentación una vez al día y suplemento de quistes), incrementándose significativamente con el aumento de la frecuencia de alimentación. No se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre ambos suplementos (nauplios o quistes).

Referente al crecimiento, los valores finales medios más altos y significativamente superiores de longitud de cefalotórax (12,94 mm), peso individual (539,08 mg), tasa de crecimiento específico (2,77%), peso ganado (1.673,29%) y biomasa (440,25 mg dm⁻²) fueron alcanzados por los cangrejos que recibieron la dieta seca suplementada con quistes una vez al día.

Considerando solamente el suplemento, los juveniles alimentados con quistes crecieron significativamente más rápido (media: 12,40 mm de longitud de cefalotórax y 460,65 mg de peso) que los que recibieron nauplios (media: 11,19 mm de longitud de cefalotórax y 320,0 mg de peso).

En cuanto a la frecuencia de alimentación, el crecimiento fue significativamente más alto cuando el aporte de alimento se realizó una vez al día. No hubo diferencias significativas de crecimiento entre la frecuencia de una vez cada tres días con el suplemento de quistes y la de una vez al día con el suplemento de nauplios.

Tabla 5. Valores finales de supervivencia y de crecimiento (100 días) de juveniles alimentados con una dieta seca suplementada con quistes o nauplios de *Artemia* a diferentes frecuencias de alimentación (experimento III.1).

Suplemento	Quistes			Nauplios		
	Una vez/día	Una vez/2 días	Una vez/3 días	Una vez/día	Una vez/2 días	Una vez/3 días
Supervivencia (%)	81,67 ± 6,01 ^a	75,00 ± 5,00 ^{a,b,c}	61,67 ± 4,41 ^{c,d}	80,00 ± 2,89 ^{a,b}	65,00 ± 5,77 ^{b,c,d}	56,67 ± 3,33 ^d
LC (mm)	12,94 ± 0,28 ^a	12,11 ± 0,23 ^b	12,02 ± 0,24 ^b	11,90 ± 0,18 ^b	11,37 ± 0,21 ^b	10,07 ± 0,32 ^c
Peso (mg)	539,08 ± 37,77 ^a	421,29 ± 23,64 ^b	404,65 ± 23,65 ^{b,c}	368,65 ± 17,28 ^{b,c}	334,51 ± 19,69 ^c	241,79 ± 22,74 ^d
TCE (%)	2,77 ± 0,07 ^a	2,56 ± 0,06 ^b	2,52 ± 0,06 ^{b,c}	2,45 ± 0,05 ^{b,c}	2,34 ± 0,06 ^c	1,92 ± 0,10 ^d
PG (%)	1.673,29 ± 124,24 ^a	1.285,82 ± 77,78 ^b	1.231,08 ± 77,79 ^{b,c}	1.112,67 ± 56,83 ^{b,c}	1.000,37 ± 64,79 ^c	695,38 ± 74,79 ^d
Biomasa (mg dm ⁻²)	440,25 ± 76,20 ^a	315,97 ± 32,67 ^{a,b}	249,53 ± 26,07 ^{b,c}	293,47 ± 28,04 ^b	217,43 ± 52,19 ^{b,c}	137,02 ± 9,90 ^c

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

El gráfico 8 muestra las tasas de supervivencia en los controles efectuados a lo largo del experimento. Hasta el día 40, el porcentaje de sobrevivientes fue significativamente más alto cuando la dieta seca fue suplementada con nauplios una vez al día y significativamente más bajo cuando los quistes fueron aportados una vez cada tres días. En los días 60 y 80, las tasas de supervivencia no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

La longitud de cefalotórax en cada uno de los controles se representa en el gráfico 9 y el peso medio en el gráfico 10. Los cangrejos que recibieron quistes de *Artemia* siempre crecieron más rápido que los que recibieron nauplios, con diferencias significativas desde el día 40. En cuanto a la frecuencia de alimentación, el mayor crecimiento fue obtenido cuando el alimento fue aportado una vez al día, mostrando siempre diferencias significativas con la frecuencia más baja (una vez cada tres días).

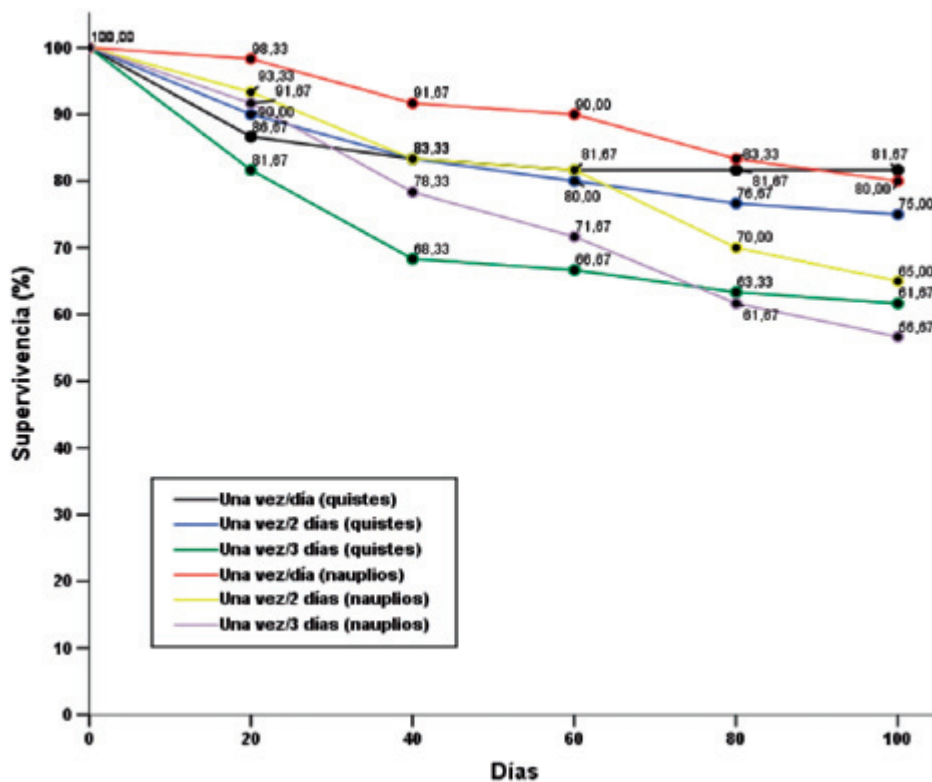


Gráfico 8. Tasas de supervivencia de juveniles alimentados con una dieta seca suplementada con quistes o nauplios de *Artemia* a diferentes frecuencias de alimentación durante 100 días (experimento III.1).

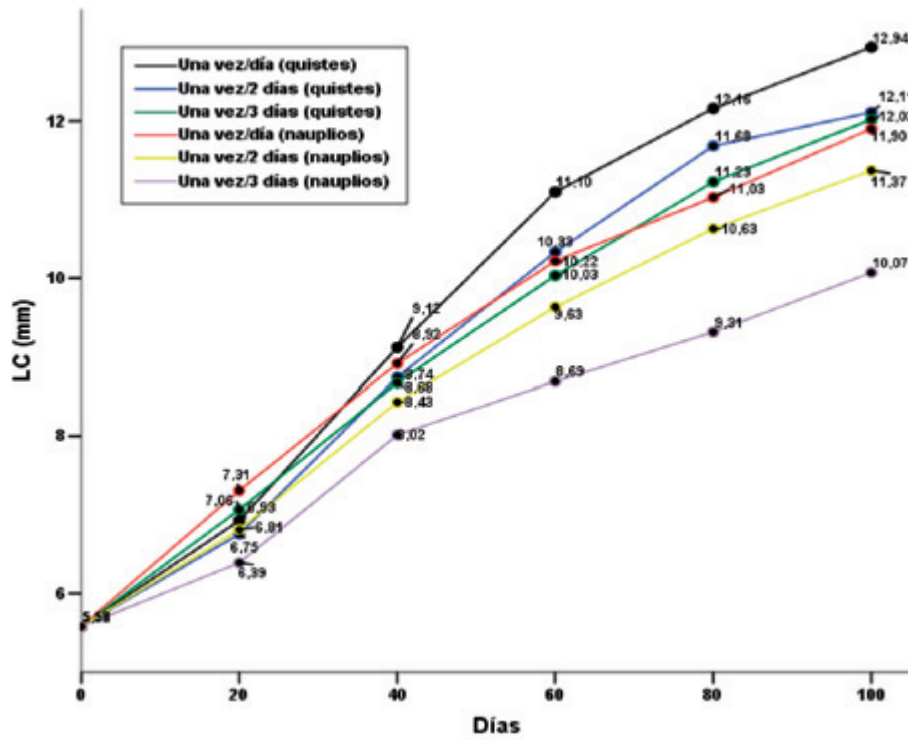


Gráfico 9. Longitud de cefalotórax de juveniles alimentados con una dieta seca suplementada con quistes o nauplios de Artemia a diferentes frecuencias de alimentación durante 100 días (experimento III.1).

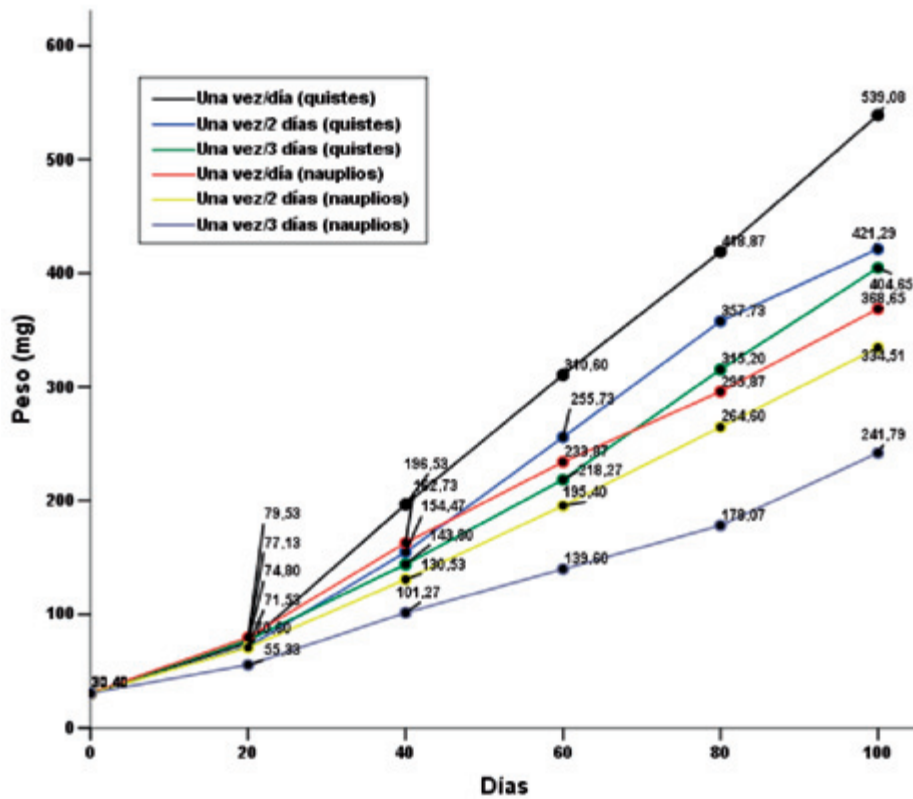


Gráfico 10. Peso de juveniles alimentados con una dieta seca suplementada con quistes o nauplios de Artemia a diferentes frecuencias de alimentación durante 100 días (experimento III.1).

La tabla 6 muestra el porcentaje de juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas en los diferentes controles. No se encontraron diferencias significativas relacionadas con el suplemento ni con la frecuencia de alimentación entre los distintos grupos a lo largo del experimento. A los 100 días, los valores se encontraron entre 1,67% y 8,33%, mientras que en controles previos el rango estuvo entre 1,67% y 10%.

El mayor porcentaje de animales muertos (calculado a partir del número inicial de cangrejos) retirados de los tanques correspondió a los grupos que recibieron nauplios (11,67%), mostrando diferencias significativas con los que recibieron quistes (3,33%). No se encontraron diferencias significativas entre las tres frecuencias de alimentación.

7.3.3. Discusión

En el cultivo de crustáceos marinos, se ha desaconsejado el uso de quistes de *Artemia* desde el inicio de la alimentación externa debido a que su rápida sedimentación en el agua salada reduce la disponibilidad para larvas planctónicas (Sorgeloos et al. 1998). Los resultados de nuestro estudio con juveniles de cangrejo de río (*P. leniusculus*) muestran que los nauplios de *Artemia* como suplemento

de una dieta seca pueden ser sustituidos por quistes decapsulados de *Artemia* desde el inicio de la alimentación externa. Esto se debió probablemente a la inexistencia de fases larvarias planctónicas en los astácidos. Además, el crecimiento fue más alto en los cangrejos que recibieron quistes. Teniendo en cuenta que no hay diferencias significativas entre la composición de los quistes decapsulados y la de los nauplios recién eclosionados (García-Ortega et al. 1998), ni entre la digestibilidad de ambos (García-Ortega et al. 2000), este resultado podría estar relacionado con un superior contenido de energía y materia seca (entre 30 y 40%) de los quistes decapsulados con respecto a los nauplios (Van Stappen 1996). Así, el mayor crecimiento de los cangrejos que recibieron quistes se debería a un mayor consumo de alimento (materia seca).

En cuanto a la frecuencia de alimentación, su reducción afectó negativamente a la supervivencia y al crecimiento. Esto puede ser debido a la influencia tanto de factores de comportamiento como nutricionales. Por un lado, la búsqueda de nuevo alimento daría lugar a una mayor movilidad, lo que conduciría a un incremento de la probabilidad de encuentros y, por tanto, del comportamiento agresivo y del estrés. La proporción de animales desaparecidos (debido al canibalismo) apoya

Tabla 6. Porcentaje de juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas en los controles a lo largo del período experimental (experimento III.1).

Días	Quistes			Nauplios		
	Una vez/día	Una vez/2 días	Una vez/3 días	Una vez/día	Una vez/2 días	Una vez/3 días
20	3,33 ± 1,67	8,33 ± 6,01	6,67 ± 4,41	1,67 ± 1,67	3,33 ± 1,67	3,33 ± 1,67
40	1,67 ± 1,67	5,00 ± 5,00	10,00 ± 5,77	6,67 ± 1,67	1,67 ± 1,67	5,00 ± 0,00
60	1,67 ± 1,67	5,00 ± 2,89	5,00 ± 2,89	5,00 ± 2,89	1,67 ± 1,67	5,00 ± 2,89
80	3,33 ± 3,33	10,00 ± 2,89	5,00 ± 2,89	3,33 ± 1,67	3,33 ± 1,67	1,67 ± 1,67
100	5,00 ± 5,00	6,67 ± 1,67	5,00 ± 2,89	3,33 ± 1,67	1,67 ± 1,67	8,33 ± 3,33

Las medias no son significativamente diferentes.

esta hipótesis, ya que el mayor porcentaje (35,83% del número inicial de cangrejos) fue registrado con la frecuencia de una vez cada tres días, disminuyendo con el incremento de la frecuencia hasta 11,67% con una vez al día. Por otro lado, la deficiente estabilidad en el agua de la dieta seca podría haber causado una pérdida de nutrientes (D'Abramo y Robinson 1989), además de que la comida resulta menos atractiva tras haber permanecido en el agua algún tiempo (Løkkeborg 1990, Burns y Avault 1991, Sáez-Royuela et al. 2001).

Es destacable que no se hayan encontrado diferencias de crecimiento entre la frecuencia de una vez cada tres días con el suplemento de quistes y la de una vez al día con el suplemento de nauplios. Por tanto, la suplementación con quistes permitió reducir la frecuencia de alimentación de una vez al día a una vez cada tres días sin afectar al crecimiento. Esto puede ser parcialmente explicado considerando el diferente comportamiento de los quistes y los nauplios en el agua. Los nauplios de *Artemia* recién eclosio-

nados permanecen vivos durante un período relativamente corto (en torno a 12 horas) en agua dulce (Celada et al. 2008) y van perdiendo progresivamente calidad nutricional. Por el contrario, los quistes decapsulados van al fondo rápidamente, donde permanecen disponibles para los cangrejos durante largos períodos, conservando su integridad nutritiva (Vanhaecke et al. 1990).

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede deducir que la suplementación con quistes decapsulados de *Artemia* ofrece ventajas sobre la de nauplios vivos, ya que los quistes pueden ser manejados como una dieta inerte y permiten una mejora de los resultados, así como una reducción de mano de obra y costes. Aunque el mayor crecimiento se obtuvo con la frecuencia de una vez al día, las diferentes posibilidades en cultivo deberían ser evaluadas en términos de mano de obra, costes y posibilidades aplicativas. El presente estudio proporciona diferentes opciones que pueden ser aplicadas en función de los objetivos de producción.

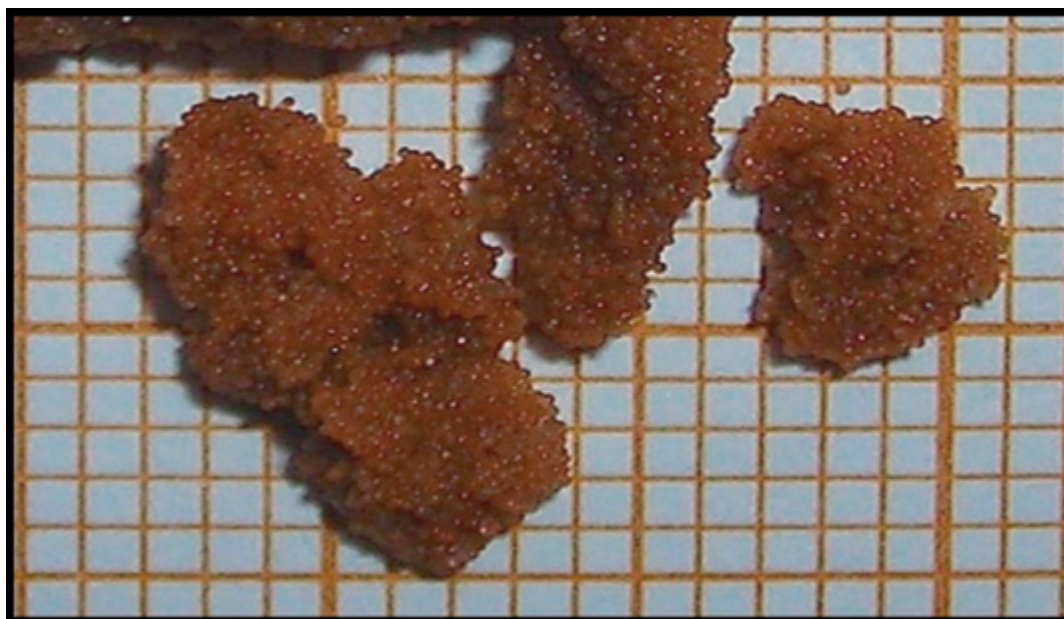


Foto 22. Quistes decapsulados de *Artemia*.

7.4. ESTUDIO IV: REFUGIOS Y CONDICIONES DE ILUMINACIÓN PARA LA CRÍA INTENSIVA DE JUVENILES DESDE EL COMIENZO DE LA ALIMENTACIÓN EXTERNA

Shelter and lighting in the intensive rearing of juvenile crayfish (Pacifastacus leniusculus, Astacidae) from the onset of exogenous feeding

R. González, J.D. Celada, V. García, J.M. Carral, A. González, M. Sáez-Royuela
2010

Aquaculture Research. En revisión.

Impact factor (JCR 2008) 0.991. Category: Fisheries 23/40

7.4.1. Planteamiento experimental

Uno de los principales problemas que afectan al cultivo intensivo de astácidos está relacionado con las pérdidas debidas al comportamiento agresivo y al canibalismo (Nyström 1994, Savolainen et al. 2004, González R. et al. 2009a). Es sabido que los efectos perjudiciales de las interacciones agresivas pueden reducirse con los refugios adecuados (Mason 1979, Celada et al. 1993, Sáez-Royuela et al. 2001, Streissl y Hödl 2002, Savolainen et al. 2003). Por otro lado, basándose en la idea de que la luz podría reducir la actividad de los cangrejos (animales nocturnos) y, por tanto, el comportamiento agresivo, algunos investigadores comenzaron a experimentar modificando el fotoperíodo y la intensidad lumínica (Taugbol y Skurdal 1992, Nystrom 1994, Sáez-Royuela et al. 1996). Considerando estos estudios en conjunto, los resultados presentan una amplia variabilidad y no es posible extraer conclusiones. Además, ha de tenerse en cuenta la influencia de la alimentación sobre los procesos vinculados al comportamiento agresivo. En este sentido, si la escasa cantidad de alimento juega un papel esencial en el incremento del canibalismo, la calidad de la dieta no es menos importante (Ackefors y Lindqvist 1994, Nyström 2002). De este modo,

los conocimientos actuales sobre alimentación plantean la necesidad del desarrollo de nuevos procesos de investigación sobre los efectos de la disponibilidad de refugios y las condiciones de iluminación durante los primeros meses.

Para ello, se diseñaron dos experimentos con la finalidad de determinar los efectos de diversas condiciones de disponibilidad de refugios y de iluminación sobre la supervivencia y el crecimiento de juveniles alimentados una vez al día con una dieta seca para salmónidos combinada con quistes decapsulados de *Artemia*, de acuerdo con los recientes avances aportados por González et al. (2009a).

Los cangrejos, procedentes de huevos incubados artificialmente, se distribuyeron en tanques de fibra de vidrio a la densidad de 100 m⁻². La temperatura del agua fue 22 ± 1°C.

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

Las curvas de supervivencia se compararon usando el método de Kaplan-Meier y el test de Log Rank.

Experimento IV.1. Se utilizaron 270 juveniles estado 2 distribuidos en 9 tanques de 0,3 m² de superficie y 0,1 m de profundidad de agua (Foto 23), abastecidos con un flujo de 0,5 l min⁻¹. El fotoperíodo fue natural (aprox. 14 h luz:10 h oscuridad). El experimento duró 80 días.



Foto 23. Tanques donde se realizó el experimento IV.1.

Considerando la conveniencia del uso de materiales higiénicos en el interior de los tanques, se utilizaron tubos de PVC (4 cm longitud x 20 mm diámetro) como refugio (1 tubo=1 refugio).

Los tratamientos fueron 3: cuatro, dos o un tubo (refugios) por cangrejo.

En los muestreos periódicos, se tomaban 20 cangrejos por réplica (66,7% del número inicial) para pesarlos y medirlos individualmente. Al final del experimento (80 días), todos los cangrejos sobrevivientes fueron medidos y pesados de forma individual.

Experimento IV.2. Se utilizaron 180 juveniles estado 2 distribuidos en 9 tanques de 0,2 m² de superficie y 0,1 m de profundidad de agua (Foto 24), abastecidos con un flujo de 0,25 l min⁻¹. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento IV.1, sólo se proporcionó un tubo de PVC (4 cm longitud x 20 mm diámetro) por animal. El experimento duró 120 días.



Foto 24. Instalaciones utilizadas en el experimento IV.2.

En función de las condiciones de iluminación, los tratamientos fueron 3:

- Iluminación continua de 925 lux. Los tanques fueron aislados de los otros tratamientos y del exterior. La fuente de luz era una lámpara fluorescente.
- Oscuridad continua. Se cubrió cada tanque con plástico negro opaco, que impedía la entrada de luz exterior.
- Fotoperíodo natural (aprox. 14 h luz:10 h oscuridad).

En los muestreos periódicos, se tomaban 10 cangrejos por réplica (50% del número inicial) para pesarlos y medirlos individualmente. Al final del experimento (120 días), todos los cangrejos sobrevivientes fueron medidos y pesados de forma individual.

7.4.2. Resultados

Experimento IV.1

Los valores finales de supervivencia y de crecimiento tras los 80 días de prueba se encuentran en la tabla 7. Las tasas de supervivencia se encontraron entre el 81,1% y el 91,1%, sin diferencias significativas entre

tratamientos. Referente al crecimiento, los valores finales medios más altos de longitud de cefalotórax (11,69 mm), peso individual (384,81 mg), tasa de crecimiento específico (3,07% día⁻¹), peso ganado (1.165,82%) y biomasa (31.212,2 mg m⁻²) fueron obtenidos en los tanques provistos con 1 refugio por cangrejo, pero las diferencias con el resto no fueron significativas.

El gráfico 11 muestra las tasas de supervivencia en los controles efectuados a lo largo del experimento. Hasta el día 20, el porcentaje de sobrevivientes fue significativamente más bajo con 1 refugio por animal. Desde el día 40 hasta el final de la prueba, las tasas de supervivencia no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (4, 2 ó 1 refugio por cangrejo).

Tabla 7. Valores finales de supervivencia y crecimiento de juveniles bajo diferentes condiciones de disponibilidad de refugios durante 80 días (experimento IV.1).

	4 refugios/cangrejo	2 refugios/cangrejo	1 refugio/cangrejo
Supervivencia (%)	91,11 ± 4,0	87,78 ± 2,5	81,11 ± 2,5
LC (mm)	11,28 ± 0,15	11,26 ± 0,15	11,69 ± 0,18
Peso (mg)	341,60 ± 15,81	339,95 ± 13,94	384,81 ± 19,69
TCE (% día⁻¹)	2,94 ± 0,05	2,92 ± 0,05	3,07 ± 0,06
PG (%)	1.023,68 ± 52,00	1.018,25 ± 45,87	1.165,82 ± 64,78
Biomasa (mg m⁻²)	31.123,3 ± 2.798,3	29.265,6 ± 1660,9	31.212,2 ± 2.485,6

Las medias no son significativamente diferentes.

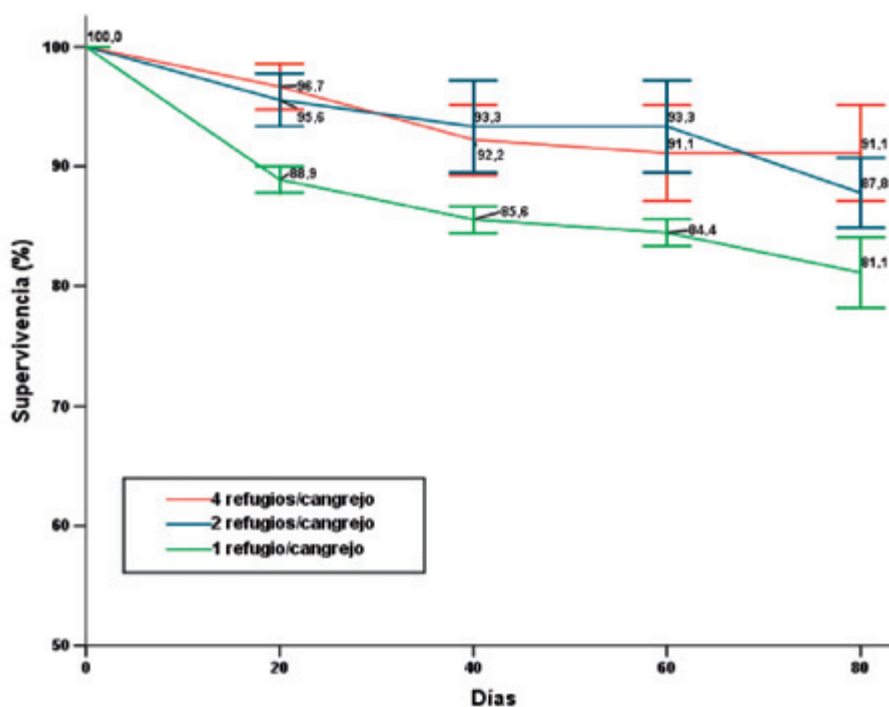


Gráfico 11. Tasas de supervivencia de juveniles bajo diferentes condiciones de disponibilidad de refugios durante 80 días (experimento IV.1).

Los gráficos 12 y 13 muestran los cambios de la longitud de cefalotórax y del peso, respectivamente, a lo largo del experimento. No se encontraron diferencias significativas durante los 80 días de prueba.

La tabla 8 muestra el porcentaje de

juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas en los diferentes controles. A los 80 días, los valores se encontraron entre 4,4% y 5,6%, mientras que en controles previos el rango estuvo entre 2,2% y 10%. No se encontraron diferencias significativas a lo largo del experimento.

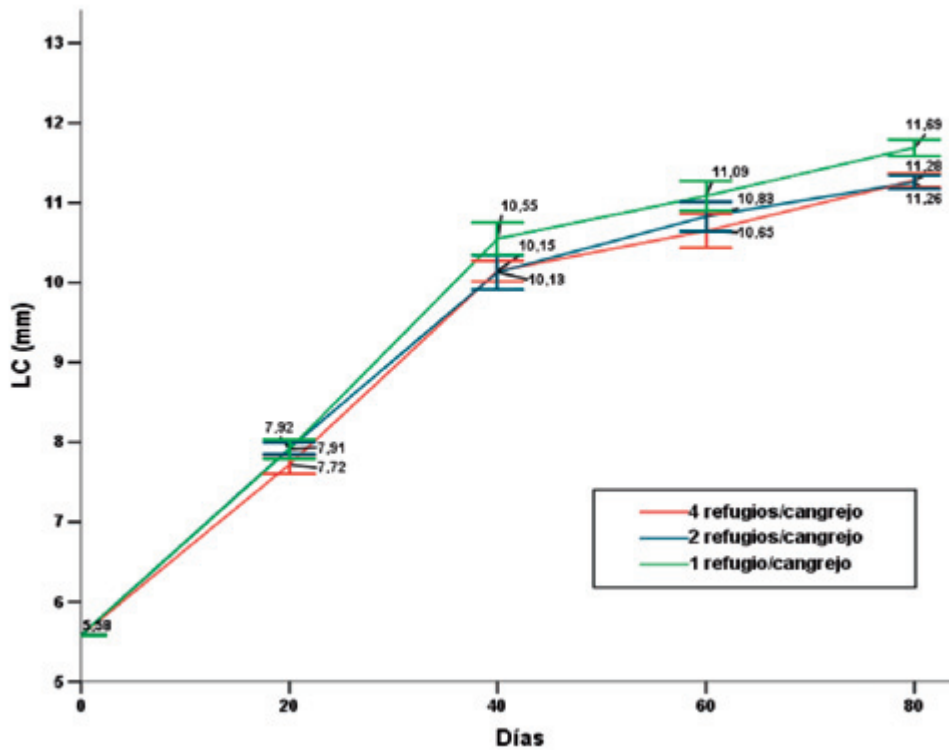


Gráfico 12. Longitud de cefalotórax de juveniles bajo diferentes condiciones de disponibilidad de refugios en cada uno de los controles durante 80 días (experimento IV.1).

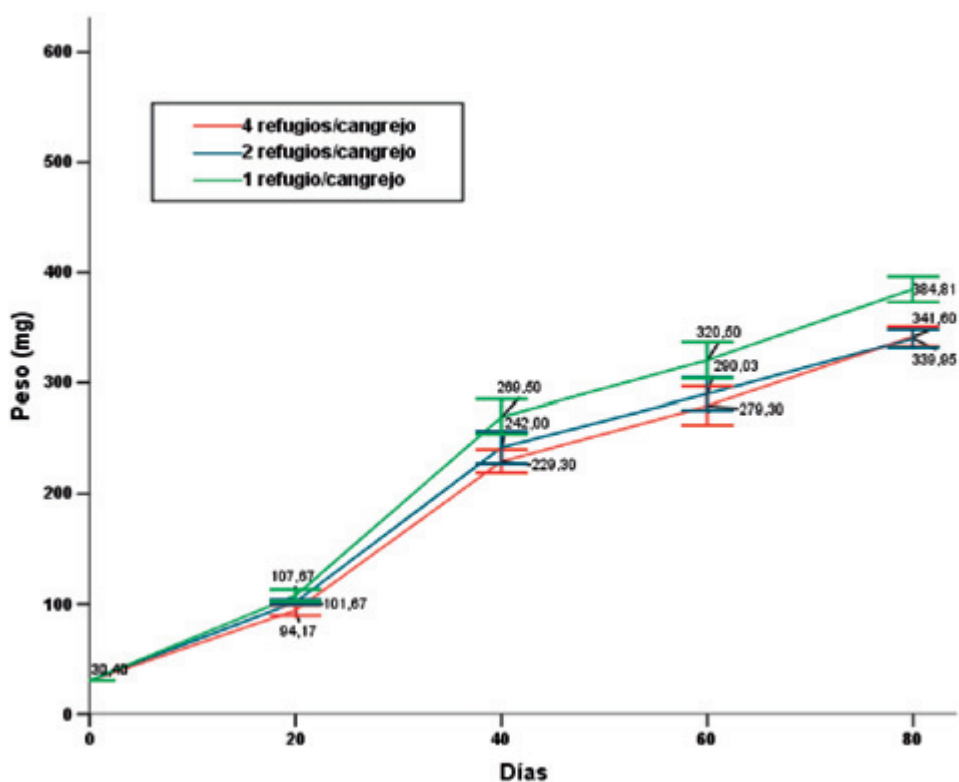


Gráfico 13. Peso de juveniles bajo diferentes condiciones de disponibilidad de refugios en cada uno de los controles durante 80 días (experimento IV.1).

Tabla 8. Porcentaje de juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas en cada uno de los controles a lo largo del experimento IV.1 (80 días).

Días	Refugios		
	4/cangrejo	2/cangrejo	1/cangrejo
20	10,0 ± 5,1	5,6 ± 2,9	10,0 ± 3,3
40	2,2 ± 1,1	5,6 ± 1,1	4,5 ± 2,2
60	3,3 ± 1,9	5,6 ± 1,1	4,4 ± 1,1
80	4,4 ± 2,9	5,6 ± 2,2	4,5 ± 2,2

Las medias no son significativamente diferentes.

Experimento IV.2

Los valores finales de supervivencia y de crecimiento (120 días) se recogen en la tabla 9. Las tasas de supervivencia se encontraron entre 76,7% y 88,3%, sin diferencias significativas entre tratamientos.

Respecto al crecimiento, los valores más altos de longitud de cefalotórax (12,70 mm), peso individual (543,08 mg), tasa de crecimiento específico (2,32 % día⁻¹), peso ganado (1.686,44 %) y biomasa (46.161,7 mg m⁻²) correspondieron a los cangrejos so-

metidos a oscuridad continua, mostrando diferencias significativas con el resto en peso individual, tasa de crecimiento específico y peso ganado.

El gráfico 14 muestra las tasas de supervivencia en los controles efectuados a lo largo del experimento. A los 80 días, los valores se encontraron entre 83,3% y 91,7% (similares a los obtenidos en el experimento IV.1). No se encontraron diferencias significativas en los controles intermedios, desde el día 20 hasta el final de la prueba (día 120).

Tabla 9. Valores finales de supervivencia y crecimiento de juveniles bajo tres condiciones diferentes de iluminación durante 120 días (experimento IV.2).

	Iluminación continua	Oscuridad continua	Fotoperiodo natural
Supervivencia (%)	88,33 ± 4,4 ^a	85,00 ± 5,0 ^a	76,67 ± 8,3 ^a
LC (mm)	12,09 ± 0,20 ^a	12,70 ± 0,25 ^a	12,50 ± 0,23 ^a
Peso (mg)	442,21 ± 22,96 ^a	543,08 ± 39,50 ^b	448,66 ± 25,23 ^a
TCE (% día⁻¹)	2,17 ± 0,04 ^a	2,32 ± 0,05 ^b	2,19 ± 0,05 ^a
PG (%)	1354,63 ± 75,52 ^a	1686,44 ± 129,95 ^b	1375,85 ± 83,00 ^a
Biomasa (mg m⁻²)	39.061,7 ± 3.595,1 ^a	46.161,7 ± 8.628,2 ^a	34.261,7 ± 2.344,8 ^a

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

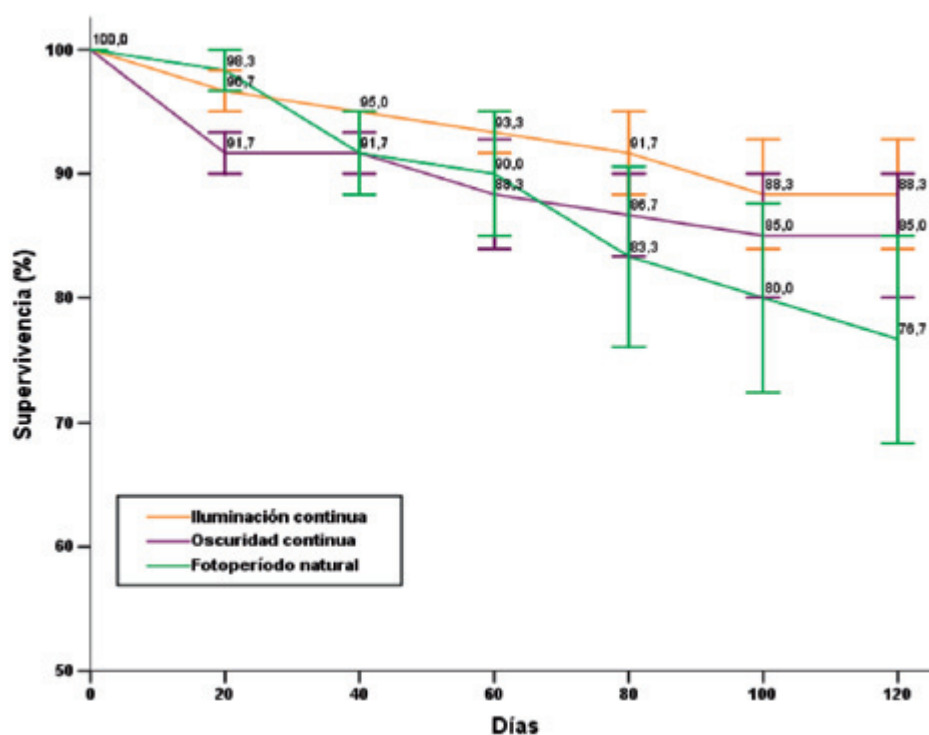


Gráfico 14. Tasas de supervivencia de juveniles bajo tres condiciones diferentes de iluminación durante 120 días (experimento IV.2).

Los gráficos 15 y 16 muestran los cambios de la longitud de cefalotórax y del peso, respectivamente, a lo largo de los 120 días de prueba. Los cangrejos en oscuridad continua crecieron siempre significativamente más rápido que el resto, apreciándose diferencias significativas en el peso a partir del día 80.

La tabla 10 muestra el porcentaje de juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas en los diferentes controles. A los 120 días, los valores se encontraron entre 1,7% y 8,3%, mientras que en controles previos el rango estuvo entre 1,7% y 13,3%. No se encontraron diferencias significativas a lo largo del experimento.

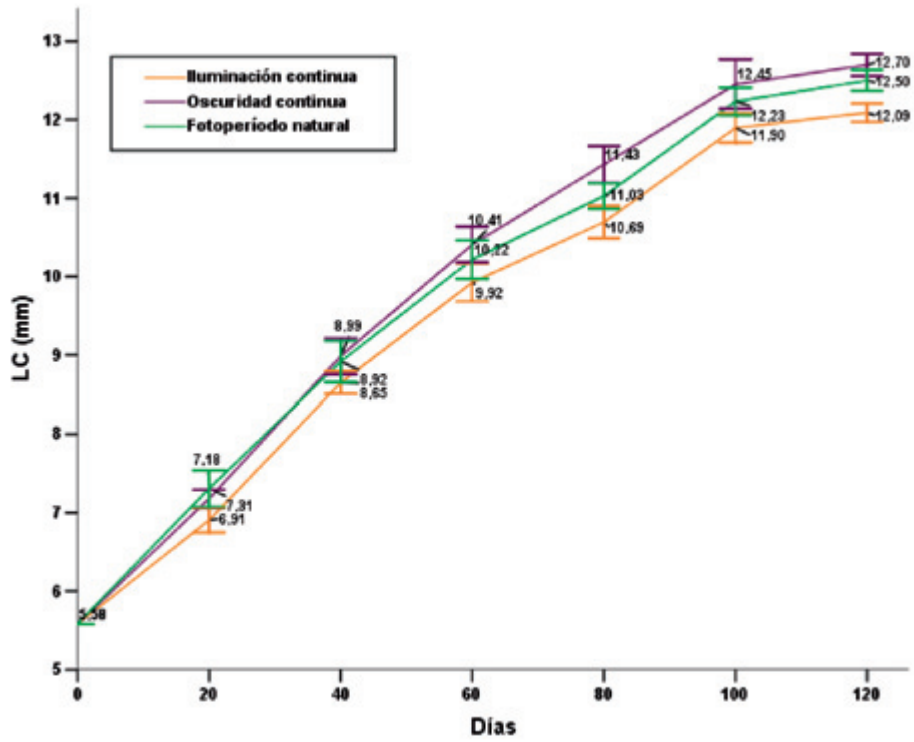


Gráfico 15. Longitud de cefalotórax de juveniles bajo tres condiciones diferentes de iluminación en cada uno de los controles durante 120 días (experimento IV.2).

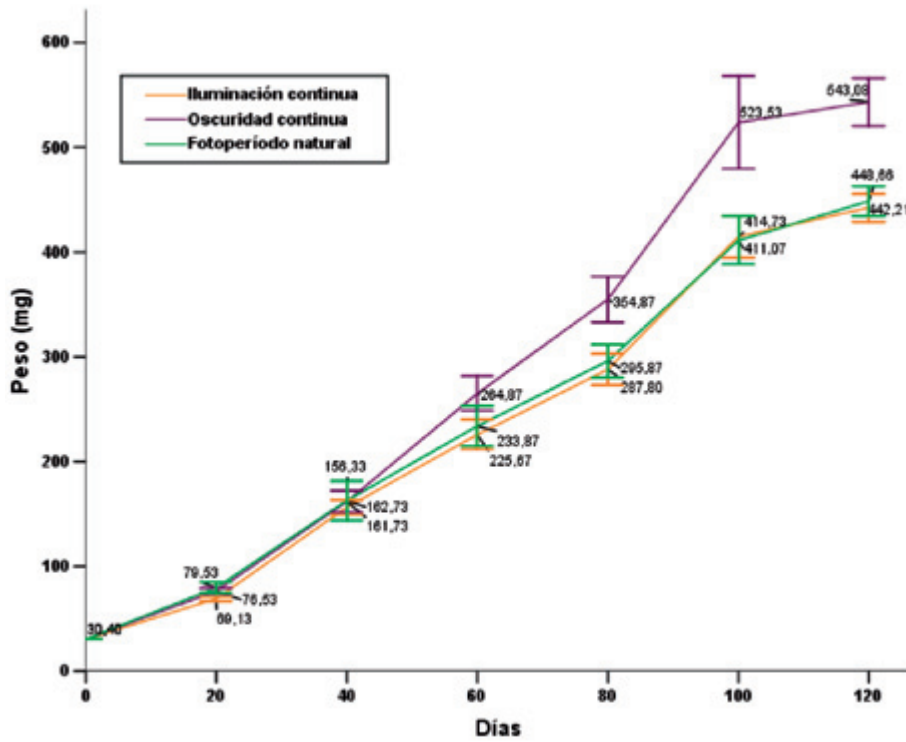


Gráfico 16. Peso de juveniles bajo tres condiciones diferentes de iluminación en cada uno de los controles durante 120 días (experimento IV.2).

Tabla 10. Porcentaje de juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas en cada uno de los controles a lo largo del experimento IV.2 (120 días).

Días	Condiciones de iluminación		
	Iluminación continua	Oscuridad continua	Fotoperíodo natural
20	8,3 ± 3,3	3,3 ± 1,7	1,7 ± 1,7
40	6,7 ± 4,4	13,3 ± 3,3	6,7 ± 1,7
60	5,0 ± 2,9	11,7 ± 4,4	5,0 ± 2,9
80	5,0 ± 5,0	6,7 ± 6,7	3,3 ± 1,7
100	3,3 ± 3,3	5,0 ± 0,0	3,3 ± 1,7
120	1,7 ± 1,7	8,3 ± 3,3	1,7 ± 1,7

Las medias no son significativamente diferentes.

7.4.3. Discusión

Se ha demostrado que los efectos de la agresividad y el canibalismo se pueden reducir con el incremento de la disponibilidad de refugios, dando como resultado mayores tasas de supervivencia y crecimiento (Nyström 1994, Sáez-Royuela et al. 1995, 2001, Streissl and Hödl 2002, Savolainen et al. 2003). En este sentido, debe considerarse que los materiales a utilizar no sólo tienen que proporcionar refugio a los animales, sino que también deberían ser atractivos para ellos y facilitar las operaciones a realizar durante esta fase del cultivo, todo ello sin dañar la calidad del agua. Se han probado diversos tipos de sustratos similares a los existentes en hábitats naturales, como grava (Mason 1979, Savolainen et al. 2003) o el alga *Elo-dea sp.* (Blake et al. 1994). Sin embargo, estos materiales no serían adecuados en sistemas intensivos, ya que plantean problemas para el manejo de los animales y la limpieza de los tanques. Por otro lado, las piezas onduladas de fibrocemento y los tubos de PVC cumplen en gran medida los requisitos mencionados y permiten obtener mejores resultados. Sáez-Royuela et al. (1995, 2001) obtuvieron mayor crecimiento con tubos de PVC

y señalaron que la disponibilidad de grava adicional no afectó a la supervivencia ni al crecimiento. En nuestro estudio con tubos de PVC, se registraron tasas de supervivencia más altas que las obtenidas anteriormente. Además, los resultados mostraron que 1 refugio por animal puede ser suficiente, facilitando las prácticas higiénicas y el manejo de animales. En *P. leniusculus*, es especialmente importante proporcionar condiciones de refugios adecuadas (al menos uno por cangrejo), ya que se trata de una especie territorial (Peeke et al. 1995, Edsman y Jonsson 1996) con tendencia a no compartir el mismo refugio (Ranta y Lindström 1992).

En cuanto a las condiciones de iluminación, diversos autores (Mason 1979, Taugbøl y Skurdal 1992, Nyström 1994, Sáez-Royuela et al. 1996) han obtenido mejores tasas de supervivencia y crecimiento con altas intensidades de luz o con iluminación continua. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en el presente estudio, ya que no hubo diferencias significativas en la supervivencia ni en la pérdida de pinzas, y el crecimiento fue mayor en oscuridad continua. Esto puede deberse a que los cangrejos son animales nocturnos y la duración de su actividad

está relacionada con las horas de oscuridad (Gherardi 2002), de tal forma que la búsqueda de alimento tiene lugar principalmente durante la noche. De este modo, las condiciones de oscuridad continua permitirían a los cangrejos alimentarse durante más tiempo con una dieta de mayor calidad que la utilizada en estudios anteriores.

Considerando en conjunto los dos experimentos, los resultados muestran que, bajo las condiciones de alimentación de este estudio, se puede reducir el número de refugios al mínimo posible (1 por cangrejo), lo que facilita el manejo y las prácticas higiénicas, así como conseguir un mayor crecimiento bajo condiciones de oscuridad continua.

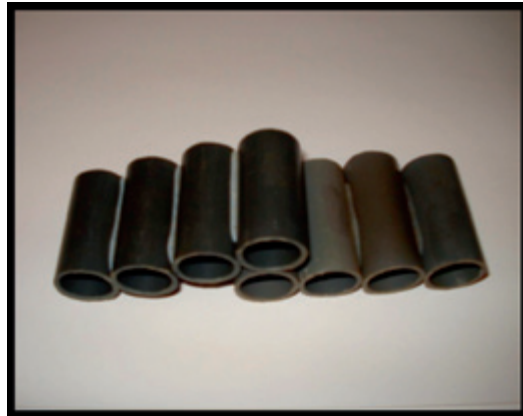


Foto 25. Refugios utilizados en los experimentos IV.1 y IV.2.

7.5. ESTUDIO V: CRÍA INTENSIVA DE JUVENILES DURANTE LOS SEIS PRIMEROS MESES: EFECTOS DE LA CLASIFICACIÓN POR PESO

*Intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) during the first six months: Effects of size grading*

R. González, J.D. Celada, J.M. Carral, V. García, M. Sáez-Royuela, A. González
2010

Aquaculture. En revisión.

Impact factor (JCR 2008) 1.678. Category: Fisheries 9/40

7.5.1. Planteamiento experimental

La clasificación por tamaño es una práctica habitual en el cultivo de la mayoría de las especies de peces de interés comercial debido a sus efectos beneficiosos sobre la supervivencia, el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento. Además, esta práctica se recomienda especialmente en especies agresivas con tendencia al canibalismo y a competir por el alimento, como es el caso de los crustáceos. En el cultivo intensivo de astácidos, las bajas tasas de supervivencia y crecimiento obtenidas durante tres décadas (ver revisión de González et al. 2009a) no han permitido aceptables resultados tras los primeros meses desde el inicio de la alimentación externa, lo que ha impedido el desarrollo de estudios de clasificación. Gracias a recientes avances en alimentación bajo condiciones controladas (Sáez-Royuela et al. 2007, González A. et al. 2008, González R. et al. 2009b), este obstáculo ha sido superado. En consecuencia, se diseñó la prueba siguiente:

Experimento V.1. El objetivo fue la cría intensiva de juveniles de cangrejo señal durante los seis primeros meses de vida libre, evaluando los efectos de la clasificación por peso a 60 y 100 días sobre la supervivencia,

el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento.

Para ello, se emplearon 1500 juveniles estado 2 procedentes de huevos incubados artificialmente. Los cangrejos fueron distribuidos a la densidad de 100 m⁻² en 15 tanques de fibra de vidrio de 1 m² de superficie con 200 l de agua (Foto 26). Se utilizaron 3 piezas onduladas de fibrocemento minionda de 54 x 20,5 cm y 6 grupos de cuatro tubos de PVC de 4 cm de longitud x 20 mm diámetro unidos como refugio en cada uno de los tanques. El flujo fue 1,5 l min⁻¹ y la temperatura del agua se mantuvo a 22 ± 1 C. El fotoperíodo fue natural (aprox. 14 h luz:10 h oscuridad).



Foto 26. Instalaciones donde se realizó el experimento V.1.

Los cangrejos fueron alimentados una vez al día con una dieta seca para salmónidos suplementada con quistes decapsulados de *Artemia* (González et al. 2009b).

Los juveniles fueron alojados en 15 tanques bajo las mismas condiciones desde el inicio de la alimentación externa hasta el momento de la clasificación. A los 60 días, los cangrejos de seis tanques se mezclaron y se pesaron individualmente para clasificarlos en grandes (clase G) y pequeños (clase P). Cada clase fue distribuida aleatoriamente en tres réplicas (tanques), de tal forma que el número de cangrejos por tanque fue el mismo (± 1 cangrejo). A los 100 días, se repitió el proceso con juveniles procedentes de otros seis tanques no clasificados previamente.

De este modo, los tratamientos fueron cinco:

- Sin clasificación.
- Clasificación a los 60 días: grandes (> 405 mg).
- Clasificación a los 60 días: pequeños (< 405 mg).
- Clasificación a los 100 días: grandes (> 581 mg).
- Clasificación a los 100 días: pequeños (< 581 mg).

En los muestreos periódicos, se tomaban 20 cangrejos por réplica (60 por trata-

miento) para pesarlos y medirlos individualmente. Al final del experimento (180 días), se pesaron y midieron todos los cangrejos sobrevivientes.

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

7.5.2. Resultados

Los valores de supervivencia, crecimiento e índices de conversión del alimento (180 días) de los animales no clasificados y de los clasificados (media de las clases G y P) se recogen en la tabla 11. Las tasas de supervivencia se encontraron entre 71,67% y 74,83%, sin diferencias significativas.

Referente al crecimiento, los valores finales medios más altos de longitud de cefalotórax (17,39 mm), peso individual (1,43 g), tasa de crecimiento específico (2,06%) y peso ganado (4.575,84%) correspondieron a los cangrejos clasificados a 60 días, mostrando diferencias significativas con los no clasificados en longitud de cefalotórax, peso y tasa de crecimiento específico. No se detectaron diferencias significativas entre la clasificación a 100 días y el resto. La biomasa más alta (103,11 g m⁻²) fue alcanzada por los juveniles clasificados a 100 días, sin diferencias significativas con los otros grupos.

Tabla 11. Valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento (180 días) en los juveniles no clasificados y en los clasificados (media de las clases G y P).

	No clasificados	Clasificación a 60 d	Clasificación a 100 d
Supervivencia (%)	72,67 \pm 2,19 ^a	71,67 \pm 1,09 ^a	74,83 \pm 1,70 ^a
LC (mm)	16,78 \pm 0,21 ^a	17,39 \pm 0,15 ^b	17,18 \pm 0,14 ^{a,b}
Peso (g)	1,30 \pm 0,06 ^a	1,43 \pm 0,03 ^b	1,38 \pm 0,02 ^{a,b}
TCE (% día ⁻¹)	1,99 \pm 0,02 ^a	2,06 \pm 0,01 ^b	2,03 \pm 0,01 ^{a,b}
PG (%)	4.182,71 \pm 184,00 ^a	4.575,84 \pm 130,05 ^a	4.432,51 \pm 126,88 ^a
Biomasa (g m ⁻²)	94,61 \pm 6,19 ^a	101,87 \pm 13,72 ^a	103,11 \pm 17,97 ^a
IC	3,23 \pm 0,13 ^a	2,67 \pm 0,06 ^b	2,61 \pm 0,06 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$). Los valores de crecimiento derivan de todos los sobrevivientes de 3 réplicas en el control (n=218) y de 6 réplicas en los grupos clasificados a 60 días (n=430) y a 100 días (n=449).

El índice de conversión del alimento fue más bajo en los animales clasificados (media 2,64), mostrando diferencias significativas con los no clasificados (3,23).

La tabla 12 muestra los valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento en la clase G de ambas clasificaciones. No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia ni en el crecimiento, con valores medios de 74,5% de supervivencia, 19,11 mm de LC, 1,84 g de peso, 2,23 % día⁻¹ de TCE, 5.948,29% de PG y 137,03 g m⁻² de biomasa. El índice de conversión del alimento no mostró diferencias significativas (media 2.36).

La tabla 13 muestra los valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento en la clase P de ambas clasificaciones. No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia (media 72%). Los valores más altos de longitud de cefalotórax (15,72 mm), peso (1,03 g), TCE (1,89% día⁻¹), PG (3.255,42%) y biomasa (72,76 g m⁻²) fueron alcanzados por los cangrejos clasificados a 60 días, mostrando diferencias significativas con los clasificados a 100 días. El índice de conversión del alimento no mostró diferencias significativas (media 2,93).

Tabla 12. Valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento (180 días) en los juveniles de la clase G de ambas clasificaciones (experimento V.1).

	Clasificación a 60 d	Clasificación a 100 d
Supervivencia (%)	72,00 ± 1,58	77,00 ± 2,53
LC (mm)	19,04 ± 0,19	19,17 ± 0,16
Peso (g)	1,82 ± 0,06	1,86 ± 0,05
TCE (% día ⁻¹)	2,22 ± 0,02	2,24 ± 0,01
PG (%)	5.884,04 ± 197,85	6.012,54 ± 180,34
Biomasa (g m ⁻²)	130,98 ± 6,92	143,08 ± 1,20
IC	2,40 ± 0,08	2,31 ± 0,06

Las medias no son significativamente diferentes.

Los valores de crecimiento derivan de todos los sobrevivientes de 3 réplicas (n=216 en los grupos clasificados a 60 días y n=231 en los grupos clasificados a 100 días).

Tabla 13. Valores finales de supervivencia, crecimiento e índice de conversión del alimento (180 días) en los juveniles de la clase P de ambas clasificaciones (experimento V.1).

	Clasificación a 60 d	Clasificación a 100 d
Supervivencia (%)	71,33 ± 2,33 ^a	72,67 ± 2,73 ^a
LC (mm)	15,72 ± 0,15 ^a	15,06 ± 0,14 ^b
Peso (g)	1,03 ± 0,03 ^a	0,87 ± 0,03 ^b
TCE (% día ⁻¹)	1,89 ± 0,02 ^a	1,81 ± 0,02 ^b
PG (%)	3.255,42 ± 110,74 ^a	2.758,25 ± 82,59 ^b
Biomasa (g m ⁻²)	72,76 ± 6,81 ^a	63,14 ± 4,04 ^a
IC	2,93 ± 0,09 ^a	2,92 ± 0,09 ^a

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas (P < 0,05).

Los valores de crecimiento derivan de todos los sobrevivientes de 3 réplicas (n=214 en los grupos clasificados a 60 días y n=218 en los grupos clasificados a 100 días).

El gráfico 17 muestra las tasas de supervivencia en los controles efectuados a lo largo del experimento. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de sobrevivientes desde el día 20 hasta el final de la prueba (día 180). A los 60 días (primera clasificación) la supervivencia media fue 84%, mientras que a los 100 días (segunda clasificación) fue 83%.

La longitud de cefalotórax en cada uno de los controles se representa en el gráfico

18 y el peso en el gráfico 19. En los juveniles no clasificados, los valores fueron siempre significativamente inferiores a los obtenidos en la clase G de ambas clasificaciones y significativamente superiores a los de la clase P. No se detectaron diferencias significativas entre ambas clases G desde el día 100 hasta el día 180. Durante el mismo período, la longitud de cefalotórax y el peso de la clase P de la clasificación a 60 días fueron significativamente más altos que los de la clase P de la clasificación a 100 días.

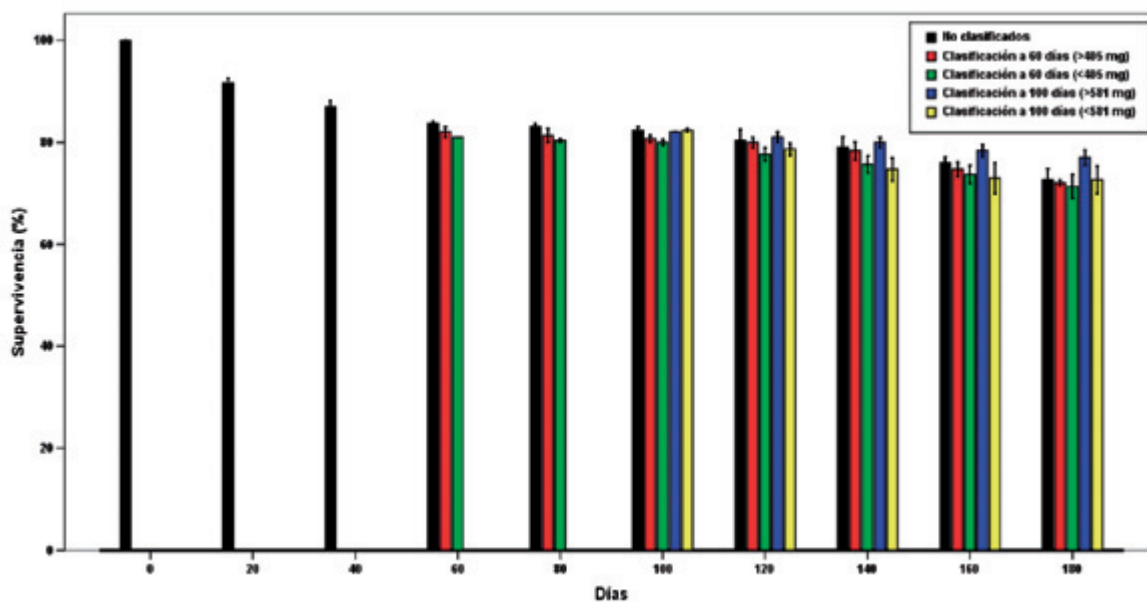


Gráfico 17. Tasas de supervivencia de juveniles en los controles efectuados durante 180 días (experimento V.1).

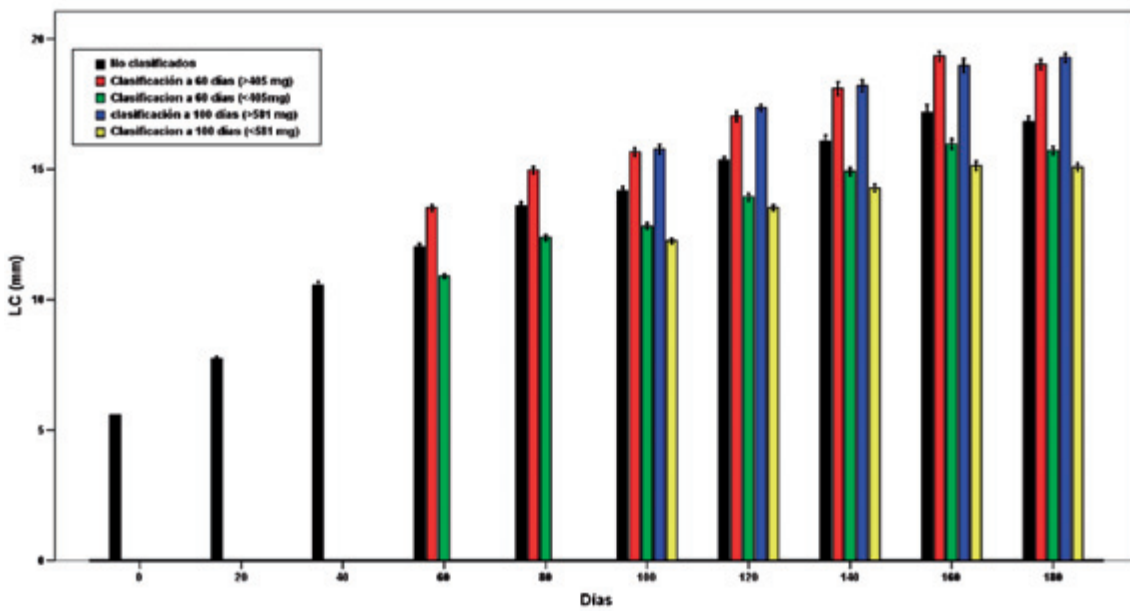


Gráfico 18. Longitud de cefalotórax de juveniles en los controles efectuados durante 180 días (experimento V.1).

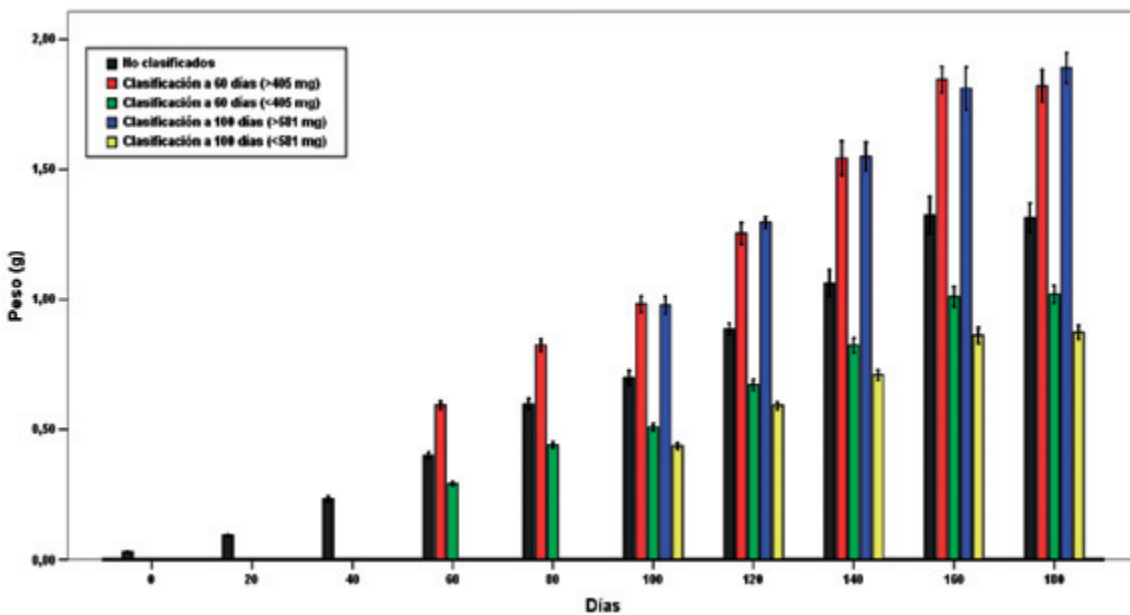


Gráfico 19. Peso de juveniles en los controles efectuados durante 180 días (experimento V.1).

Los valores de tasa de crecimiento específico, peso ganado e índice de conversión del alimento en diferentes periodos (0-60, 0-100, 60-180 y 100-180 días) se recogen en la tabla 14. La clasificación tanto a 60 como a 100 días ha permitido mejorar dichos valores, aunque las diferencias no resultaron significativas. A medida que los animales avanzaron en su desarrollo, la tasa de crecimiento es-

pecífico fue disminuyendo desde una media de $4,37\% \text{ día}^{-1}$ durante los primeros 60 días hasta una media de $0,81\% \text{ día}^{-1}$ durante el último periodo (100-180 días). Por el contrario, el índice de conversión del alimento fue aumentando desde una media de 0,92 durante los primeros 60 días hasta una media de 3,19 durante el último periodo (100-180 días).

Tabla 14. Tasa de Crecimiento Específico (% día⁻¹), Peso Ganado (%) e Índice de Conversión del Alimento en los juveniles no clasificados y en los clasificados durante 180 días (experimento V.1).

Días		No clasificados	Clasificación a 60 días	Clasificación a 100 días
0-60 ¹	TCE (% día ⁻¹)	4,29 ± 0,09	4,40 ± 0,08	4,41 ± 0,04
	PG (%)	1.215,13 ± 76,27	1.310,99 ± 63,76	1.310,39 ± 32,43
	ICA	0,96 ± 0,06	0,91 ± 0,04	0,89 ± 0,02
0-100 ²	TCE (% día ⁻¹)	3,13 ± 0,06	3,14 ± 0,15	3,16 ± 0,07
	PG (%)	2.198,85 ± 135,44	2.351,75 ± 361,61	2.258,11 ± 69,44
	ICA	1,44 ± 0,09	1,53 ± 0,23	1,51 ± 0,05
60-180	TCE (% día ⁻¹)	0,98 ± 0,03	0,99 ± 0,04	0,98 ± 0,14
	PG (%)	226,09 ± 13,54	228,41 ± 17,71	227,42 ± 51,63
	ICA	2,82 ± 0,19	3,03 ± 0,42	3,01 ± 0,82
100-180	TCE (% día ⁻¹)	0,78 ± 0,01	0,82 ± 0,04	0,83 ± 0,02
	PG (%)	86,31 ± 1,51	92,90 ± 6,56	94,32 ± 3,86
	ICA	3,20 ± 0,18	3,19 ± 0,49	3,17 ± 0,51

Las medias no son significativamente diferentes.

Los valores de crecimiento derivan de muestras tomadas de 3 réplicas en el control (n=60) y de 6 réplicas en los grupos clasificados (n=120) en los muestreos intermedios y de todos los sobrevivientes el día 180.

¹ Valores calculados antes de la clasificación (condiciones similares).

² Los valores de los no clasificados y de la clasificación a 100 días fueron calculados antes de la clasificación (condiciones similares).

La tabla 15 muestra el porcentaje de juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas a lo largo del período experimental. A los 180 días, los valores se encontraron entre 5,33% y 9,33%, mientras que en los controles previos el rango estuvo entre 2,33% y 9,67%. No se encontraron diferencias significativas a lo largo del experimento.

La tabla 16 recoge los coeficientes

de variación de la longitud de cefalotórax (CVLC) y del peso (CVP) al final del experimento (180 días). Los valores obtenidos en el control (18,29% en longitud de cefalotórax, 62,75% en peso) fueron significativamente más altos que los obtenidos en la clasificación a 60 días (en torno a 13% en longitud de cefalotórax y 46% en peso) y a 100 días (en torno a 13% en longitud de cefalotórax y 44% en peso).

Tabla 15. Porcentaje de juveniles con pérdida de una o de ambas pinzas en cada uno de los controles a lo largo del experimento V.1 (180 días).

Días	No clasificados	Clasificación a 60 días (>405 mg)	Clasificación a 60 días (<405 mg)	Clasificación a 100 días (>581 mg)	Clasificación a 100 días (<581 mg)
20	3,33 ± 0,67	6,33 ± 2,33	5,00 ± 1,00	5,67 ± 1,67	6,33 ± 1,20
40	8,33 ± 1,86	7,33 ± 2,33	7,33 ± 0,88	7,67 ± 1,67	9,00 ± 2,65
60	8,00 ± 3,06	3,33 ± 2,33	6,33 ± 0,33	6,33 ± 0,67	4,33 ± 1,45
80	5,00 ± 2,08	6,67 ± 1,45	3,00 ± 0,58	3,00 ± 0,58	6,00 ± 1,53
100	4,33 ± 0,67	4,67 ± 0,67	2,33 ± 0,88	3,00 ± 0,58	4,00 ± 1,00
120	4,67 ± 1,45	7,33 ± 0,19	3,67 ± 0,88	4,00 ± 0,58	5,33 ± 0,33
140	3,33 ± 1,45	5,67 ± 1,67	5,33 ± 1,20	5,00 ± 1,53	3,67 ± 1,76
160	9,67 ± 1,20	7,01 ± 1,00	7,00 ± 1,15	8,33 ± 1,45	7,67 ± 0,33
180	9,33 ± 2,33	6,67 ± 1,86	5,33 ± 0,33	6,00 ± 2,31	6,67 ± 2,03

Las medias no son significativamente diferentes.

Tabla 16. Coeficientes de variación (%) de la longitud de cefalotórax y del peso en los diferentes grupos al final del experimento V.1 (180 días).

	No clasificados	Clasificación a 60 días (> 405 mg)	Clasificación a 60 días (< 405 mg)	Clasificación a 100 días (> 581 mg)	Clasificación a 100 días (< 581 mg)
CVLC (%)	18,29 ± 0,98 ^a	14,25 ± 0,43 ^b	13,62 ± 0,36 ^b	12,86 ± 0,69 ^b	13,24 ± 0,61 ^b
CVP (%)	62,75 ± 4,36 ^a	47,41 ± 2,34 ^b	46,12 ± 2,46 ^b	44,40 ± 3,09 ^b	42,46 ± 2,51 ^b

Valores en las filas con distinto superíndice presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

7.5.3. Discusión

En astácidos, no se han llevado a cabo, hasta el momento, estudios de clasificación desde el inicio de la alimentación externa. Para ello, habría sido necesario superar previamente los inconvenientes de las bajas tasas de supervivencia y crecimiento durante los primeros meses de cría bajo condiciones controladas. Sin embargo, un estudio (Ahvenharju et al. 2005) ha sido posible, pero comenzando con animales de 3,5 a 6 meses de edad. En parastácidos, Qin et al. (2001) iniciaron la prueba clasificando *Cherax tenuimanus* con pesos comprendidos entre 10 y 160 g. Estos experimentos co-

menzaron en el momento de la clasificación, sin considerar el período previo, que implica criar a los animales desde el inicio de la alimentación externa hasta que sus diferencias de crecimiento puedan dar lugar a la formación de distintos grupos. En este sentido, conviene señalar que un estudio completo de clasificación debería incluir datos tanto de crecimiento como de pérdidas a lo largo de todo el proceso, antes y después de la clasificación.

Nuestro estudio se llevó a cabo desde el inicio de la alimentación externa, comparando los efectos de la clasificación a diferentes períodos. Los resultados obtenidos in-

dican que ambas clasificaciones, tanto a 60 como a 100 días, mejoraron los valores de crecimiento (tabla 11). Además, los cangrejos pequeños clasificados a 60 días crecieron más que los clasificados a 100 días (tabla 13). Esto se debe probablemente a que los animales más pequeños se han beneficiado de la ausencia de los más grandes y dominantes durante más tiempo. Sin embargo, la clasificación implica manejo de los animales que, según Farrell y Leonard (2000) y Ahvenharju et al. (2005), podría tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento o la pérdida de pinzas. En nuestro estudio, la clasificación no incrementó la pérdida de pinzas ni afectó negativamente a la supervivencia o al crecimiento. Considerando que la densidad inicial fue de 100 m⁻² y que los efectos perjudiciales del comportamiento agresivo y del canibalismo aumentan con la concentración de animales (González et al. 2009a), se podría esperar que los beneficios de la clasificación fuesen más evidentes a densidades más altas.

En cuanto al índice de conversión del alimento, la clasificación permitió mejoras significativas. Comparados con los animales no clasificados, los cangrejos clasificados fueron más eficientes para convertir el alimento en biomasa, al igual que se ha señalado en peces (Leitritz y Lewis 1976, Coche y Muir 1998) y en el crustáceo *Macrobrachium rosenbergii* (New 2002). La clasificación puede reducir, en los animales más pequeños, los niveles de estrés y dominación por parte de los más grandes, lo que les permitiría alimentarse de forma óptima y expresar su máximo potencial de crecimiento (Ahvenharju et al. 2005, Martins et al. 2006, Strand et al. 2007) ya que, al emplear menos energía en luchas, pueden destinar una mayor proporción a los procesos de crecimiento (Davis 2006, Martínez-Porchas et al. 2009).

Considerando en conjunto los resultados de este estudio, la cría intensiva de juveniles de cangrejo durante los primeros seis meses se ha llevado a cabo con éxito y buenas tasas de crecimiento (Foto 27), lo que ha posibilitado la clasificación en cangrejos criados desde el inicio de la alimentación externa, obteniéndose información a lo largo de todo el proceso, antes y después de la clasificación. Con vistas a las posibilidades de aplicación en cultivo, la clasificación puede ser recomendable una vez que aparecen marcadas diferencias de tamaño, ya que ha permitido mejorar tanto el crecimiento como el índice de conversión del alimento.



Foto 27. Individuos a los 20 días y al final del experimento V.1 (180 días).

8. DISCUSIÓN GENERAL

El hecho de que la fecundidad de los astácidos sea muy inferior a la del langostino, bogavante y camarón de agua dulce determina que la obtención de unas tasas de supervivencia elevadas durante las primeras etapas de la cría de juveniles resulte crítica para mantener un nivel de producción viable.

Una característica diferencial del cultivo de astácidos respecto al resto de crustáceos cultivados es la ausencia de fases larvianas tras la eclosión (nauplio, zoea, mysis). Sin embargo, puede establecerse cierta similitud entre las postlarvas de langostino, bogavante y camarón de agua dulce, una vez que pasan al estado bentónico, y los juveniles estado 2 de los astácidos. De este modo, el cultivo de las primeras etapas de vida libre se podría equiparar a la fase de pre-engorde o “nursery” de las postlarvas de los restantes crustáceos cultivados, de forma que algunos aspectos del ciclo productivo podrían ser comunes a ambos grupos.

La alimentación tras la fase de cría larvaria constituye un problema aún no solventado de forma satisfactoria en la mayoría de las especies de crustáceos cultivados. En la investigación para el cultivo intensivo del bogavante, langostino y camarón de agua dulce, se sigue recurriendo a una gran variedad de dietas. Así, se han utilizado nauplios de *Artemia* recién eclosionados, diversos alimentos frescos como pescado, moluscos, otros crustáceos y vegetales, y también piensos compuestos granulados específicos o formulados para otras especies (Shleser y Gallagher 1974, Boghen y Castell 1981, Waddy 1988, D’Abramo y New 2000, Coyle et al. 2003, Karani et al. 2005, Schmalenbach et al. 2009). En cuanto a la investigación para la cría de juveniles de astácidos en condiciones controladas desde el inicio de la alimentación externa, la utilización de alimentos inertes, naturales o elaborados artificialmente, no ha permitido

resultados satisfactorios (ver revisión de González et al. 2009a). Recientemente, Sáez-Royuela et al. (2007) han demostrado que, alimentando a los juveniles con una dieta compuesta para salmónidos, el suplemento con *Daphnia* o nauplios vivos de *Artemia* desde el inicio de la alimentación externa permite una mejora de los resultados, lo cual sugiere que el alimento vivo posee factores nutricionales desconocidos esenciales para los juveniles de astácidos. Posteriormente, González et al. (2008) cuantificaron las cantidades óptimas de nauplios vivos de *Artemia* como suplemento de una dieta compuesta seca similar y alcanzaron un crecimiento mucho mayor que el obtenido hasta entonces durante el mismo período (100 días). Así, se ha demostrado que el alimento vivo ejerce un efecto beneficioso en la alimentación inicial de juveniles de astácidos, tal como hace tiempo que se conoce en otros crustáceos cultivados.

Aunque el empleo de nauplios de *Artemia* es generalizado en las etapas iniciales de la cría de peces y crustáceos, su producción diaria resulta laboriosa, cara y requiere instalaciones accesorias. Por estos motivos, el uso directo de quistes decapsulados de *Artemia* puede ofrecer una interesante alternativa a los nauplios vivos. En postlarvas de langostinos, Stael et al. (1995) y Ribeiro y Jones (1998) obtuvieron mejores tasas de supervivencia y crecimiento al reemplazar nauplios vivos de *Artemia* por quistes decapsulados. En nuestros experimentos con *P. leniusculus*, se comprobó que los nauplios vivos como suplemento de una dieta seca pueden ser sustituidos por quistes decapsulados en la misma proporción desde el inicio de la alimentación externa, ya que el crecimiento fue mayor cuando los cangrejos recibieron quistes.

Las prácticas de incubación artificial no resultan especialmente interesantes en el caso del langostino o del camarón de agua

dulce, fundamentalmente por tratarse de especies con un corto desarrollo embrionario y un elevado número de huevos en cada puesta. Sin embargo, en astácidos se planteó la conveniencia de la incubación artificial ya en el siglo XIX y, hace tres décadas, surgió un interrogante acerca de la posterior viabilidad de los juveniles obtenidos mediante incubación artificial, planteando la duda de si estos animales tendrían las mismas perspectivas de subsistencia que los procedentes de incubación maternal (Mason 1977b). Posteriormente, Sáez-Royuela et al. (1995) señalaron que la procedencia de los juveniles no influye sobre la futura viabilidad de los mismos. Tampoco se detectaron efectos negativos al usar un compuesto yodado como antifúngico en incubación artificial (Policar et al. 2006). De forma similar, en el presente estudio la incubación artificial con tratamientos de formaldehído no ha tenido efectos perjudiciales sobre la posterior supervivencia de los juveniles, que además crecieron significativamente más rápido que los obtenidos mediante incubación maternal, lo que atribuimos principalmente al mejor estado sanitario de los animales que, en principio, puede asumirse que nacen libres de enfermedades.

El comportamiento agresivo y el canibalismo representan un obstáculo importante para el cultivo de crustáceos en general, con excepción de los langostinos (Walne 1977, Barnabé 1991). La pérdida de apéndices, las heridas y la amplia diversidad de tamaños son las principales consecuencias y todas ellas afectan marcadamente a su valor en el mercado. Este comportamiento bajo condiciones de cultivo ha sido considerado por diversos investigadores como un serio problema para la cría de postlarvas de *M. rosenbergii* (Wickins 1972, Sandifer y Smith 1976, 1985, Walne 1977) y *Homarus sp.* (Walne 1977, Van Olst y Carlberg 1978, Coll 1983, Lee y Wickins 1992), así como de juveniles de cangrejo de río (Mason 1979, Ackefors et al. 1989, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001). El mantener a los animales a una densidad adecuada, fijar frecuencias de alimentación apropiadas, proporcionar suficientes refugios y condicio-

nes idóneas de iluminación podría mejorar los resultados de forma significativa (Aiken et al. 1981, Sáez-Royuela et al. 1995, 2001, 2007, Coyle et al. 2003, Whangchai et al. 2007).

En crustáceos juveniles, el incremento de la densidad ocasiona un mayor número de encuentros agonísticos, lo que determina una disminución del porcentaje de supervivencia y de las tasas de crecimiento (Lee y Wickins 1992, Gherardi 2002). En el camarón de agua dulce y el langostino, el cultivo a altas densidades parece ser factible. Así, Marques et al. (2000) recomiendan densidades iniciales de 800 postlarvas de *M. rosenbergii* por m², mientras que Arnold et al. (2006) obtuvieron resultados aceptables con 2000 *Penaeus monodon* por m³. Por el contrario, en el bogavante sólo se obtienen valores de supervivencia aceptables cuando se mantiene a los animales en compartimentos individuales, donde el canibalismo y las heridas debidas a las interacciones agresivas pueden ser evitadas (Lee y Wickins 1992, Prodöhl et al. 2006). En astácidos, se han utilizado sistemas de aislamiento en investigación (Celada et al. 1989, 1993, Ackefors et al. 1992, 1995, Henttonen et al. 1993, Nystrom 1994, Sáez-Royuela et al. 1994, 1995), pero en cultivo no son aconsejables debido a su elevado coste y al reducido valor unitario de los animales en el mercado. Por tanto, es conveniente el desarrollo de sistemas de cría en grandes grupos. Algunos autores han aconsejado densidades para mantener a los juveniles desde el estado 2 en condiciones controladas. Así, D'Abramo et al. (1985), Ackefors et al. (1989), Gydemo y Westin (1989) y Nyström (1994) recomendaron densidades iniciales entre 50 y 150 juveniles por m² hasta los 4 meses, mientras que Savolainen et al. (2004), en un intento de equilibrar resultados de la cría y costes de producción, consideraron que la concentración inicial debería encontrarse entre 200 m⁻² y 400 m⁻² durante los 3 primeros meses. Teniendo en cuenta los recientes avances en alimentación, en este estudio se probaron densidades iniciales entre 100 y 1000 cangrejos m⁻², obteniéndose unos resultados que superaron ampliamente a los obtenidos

en anteriores investigaciones. Las tasas más altas de supervivencia y crecimiento se alcanzaron con 100 juveniles m^{-2} , mientras que el crecimiento mostró escasa dependencia de la densidad entre 300 m^{-2} y 1000 m^{-2} .

Referente a la frecuencia de alimentación, tanto en postlarvas de bogavante como de langostino se han probado aportes de alimento desde varias veces al día hasta una vez cada cuatro días (Shleser 1974, Robertson et al. 1993, Schmalenbach et al. 2009). Los resultados obtenidos en *Homarus americanus* (Shleser 1974) indican que es conveniente alimentar a las postlarvas al menos una vez al día. Sin embargo, Schmalenbach et al. (2009), con *Homarus gammarus*, obtuvieron altas tasas de supervivencia y crecimiento incluso con una frecuencia de alimentación de una vez cada cuatro días. En *Penaeus vannamei*, Robertson et al. (1993) recomiendan una frecuencia mínima de cuatro veces al día. En juveniles de astácidos bajo condiciones controladas, Sáez-Royuela et al. (2001) no encontraron diferencias significativas entre una y dos veces al día, lo cual coincide con los resultados de nuestro trabajo (experimento I.2). Pero esto supone una tarea laboriosa y las posibilidades de su reducción deberían ser estudiadas. Así, en el estudio III se probó a distanciar los aportes de alimento de una vez al día a una vez cada tres días. En este caso, las tasas de supervivencia y crecimiento fueron negativamente afectadas cuando la frecuencia se redujo de una vez al día a una vez cada dos o cada tres días. Sin embargo, la suplementación con quistes una vez cada tres días permitió un crecimiento similar al obtenido con el suplemento de nauplios una vez al día, lo que puede confirmar la mayor capacidad de los quistes para conservar su integridad nutritiva en el agua.

En crustáceos cultivados, la disponibilidad de refugios apropiados conduce a una disminución del número de encuentros entre animales y, por tanto, de los ataques y del canibalismo (Van Olst et al. 1975, Aiken y Wady 1977, Sáez-Royuela et al. 1995, 2001, Savolainen et al. 2003, Streissl y Hödl 2002).

Así, cuando postlarvas de *M. rosenbergii* y de *Homarus sp.* son mantenidas en tanques sin refugios adecuados, la tasa de mortalidad es muy elevada (Fujimura y Okamoto 1970). Según Spanier et al. (1998), Abgrall et al. (2000) y Whangchai et al. (2007), la adición de diversos tipos de sustratos artificiales a los tanques permite obtener mayores porcentajes de supervivencia y crecimiento, además de facilitar las operaciones de manejo y limpieza. En condiciones de laboratorio con juveniles de cangrejo, los sustratos utilizados como refugios han sido de diversa naturaleza (Mason 1979, Blake et al. 1994, Sáez-Royuela et al. 1995, 2001, Savolainen et al. 2003). Sin embargo, deben considerarse materiales que sirvan no sólo de refugio para los juveniles, sino también que sean atractivos para ellos y faciliten tanto el manejo de los animales como la limpieza de los tanques, todo ello sin dañar la calidad del agua. Sáez-Royuela et al. (1995, 2001) registraron un mayor crecimiento usando tubos de PVC y comprobaron que la disponibilidad adicional de grava no afecta a la supervivencia ni al crecimiento. Aplicando los conocimientos actuales sobre alimentación, en nuestros estudios con tubos de PVC, las tasas de supervivencia y crecimiento fueron superiores a las obtenidas en trabajos previos, demostrando que 1 refugio por cangrejo puede ser suficiente, facilitando las prácticas higiénicas y el manejo de los animales. No obstante, la utilización de piezas onduladas de fibrocemento (estudio II) o la combinación de estas con tubos de PVC (estudio V) han mostrado una eficacia similar para proporcionar refugio a los juveniles.

En cuanto a condiciones de iluminación para la cría de postlarvas de crustáceos, se han obtenido resultados diversos. En *H. americanus*, Carlberg et al. (1979) registraron mayores tasas de supervivencia en condiciones de luz constante. De forma similar, en los experimentos llevados a cabo por Aiken et al. (1981) con la misma especie, las mayores tasas de crecimiento se alcanzaron al incrementar el fotoperíodo. No obstante, los resultados obtenidos por Koshio et al. (1990) no mostraron influencia del fotoperíodo sobre el creci-

miento. Por el contrario, en *Macrobrachium* sp. se obtuvo un mayor crecimiento en condiciones de oscuridad continua (Withyachumnarnkul et al. 1990, Subramanian et al. 2005). En el caso del cangrejo de río, el incremento del fotoperíodo y de la intensidad lumínica permitió obtener un mayor porcentaje de supervivencia en los trabajos de Mason (1979), Taugbøl y Skurdal (1992), Nyström (1994) y Sáez-Royuela et al. (1996). Sin embargo, en nuestra prueba no se encontraron diferencias en la supervivencia, mientras que el crecimiento fue mayor en los animales sometidos a oscuridad continua. Esto puede deberse a que los cangrejos son animales nocturnos y la búsqueda de alimento tiene lugar principalmente durante la noche (Gherardi 2002). De este modo, las condiciones de oscuridad continua habrían permitido a los cangrejos alimentarse durante más tiempo con una dieta de mayor calidad que la utilizada en los anteriores estudios con astácidos.

Se han registrado amplias diferencias de crecimiento entre individuos de la misma especie y edad, tanto en peces como en crustáceos (D'Abramo et al. 1985, D'Abramo y Robinson 1989, New 1990, Lee y Wickins, 1992, Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001, Coche y Muir 1998), debido posiblemente a la dominancia ejercida por los animales más agresivos (Walne 1977, Atencio-García y Zaniboni-Filho 2006, Ahvenharju y Ruohonen 2007). La separación de los ejemplares que han alcanzado mayores dimensiones permitiría un incremento del ritmo de crecimiento de los individuos más pequeños, cuyo desarrollo se habría encontrado inhibido por los grandes. Así, la clasificación por tamaños es una práctica habitual en el cultivo de peces debido a sus efectos beneficiosos sobre la supervivencia, el crecimiento (Southgate 1993, Barki et al. 2000) y la eficiencia de utilización del alimento (Leitritz y Lewis 1976, Coche y Muir 1998). Esta práctica es especialmente recomendada en especies agresivas, con fuerte tendencia al canibalismo, aunque sus efectos sobre el cultivo de crustáceos no han sido suficientemente estudiados. En el camarón de agua dulce, hay referencias que indi-

can los beneficios de esta práctica (Daniels y D'Abramo 1994, Daniels et al. 1995, New 2002, Tidwell et al. 2003, 2004). En las investigaciones con astácidos desde el comienzo de la alimentación externa, las bajas tasas de supervivencia y crecimiento obtenidas durante tres décadas han impedido el desarrollo de estudios de clasificación, ya que no han permitido que las circunstancias pudieran dar lugar a este planteamiento. La mayor disponibilidad de conocimientos actual ha conducido a la realización con éxito de nuestra prueba de cría durante los primeros seis meses, donde la clasificación tanto a 60 como a 100 días permitió un incremento de los valores de crecimiento y una disminución de los índices de conversión del alimento.

Considerando en conjunto los porcentajes de supervivencia en nuestros experimentos, iniciados todos ellos desde el comienzo de la alimentación externa (juvenil estado 2), los valores fueron altos en las condiciones básicas de los diferentes estudios (densidad inicial de 100 cangrejos m⁻² y aporte una vez al día de una dieta compuesta para salmónidos suplementada con nauplios o con quistes de *Artemia*), encontrándose en torno al 80% a los 100 días y al 73% a los 180 días. El origen de los juveniles (incubación maternal o incubación artificial), la disponibilidad de refugios, las condiciones de iluminación o la clasificación por peso no causaron cambios en la supervivencia. Sin embargo, la mortalidad aumentó significativamente cuando se redujo la frecuencia de alimentación de una vez al día a una vez cada dos o tres días y cuando se alojaron a densidades iniciales de 300 m⁻² o superiores.

Respecto al crecimiento, fue afectado por los diferentes factores estudiados con excepción de la disponibilidad de refugios. En primer lugar, los juveniles procedentes de incubación artificial alcanzaron en 80 días un peso 49% superior al de los procedentes de incubación maternal. Los juveniles a la densidad inicial de 100 m⁻² llegaron a pesar después de 100 días un 50% más que los alojados a densidades más altas. El suplemento de quistes decapsulados de *Artemia* permitió

aumentar un 44% el peso de los cangrejos frente al suplemento de nauplios. Con una frecuencia de alimentación de una vez al día durante 100 días, los juveniles alcanzaron un 40% más de peso que con las mismas cantidades de alimento aportadas una vez cada tres días. La oscuridad permanente durante 120 días permitió incrementar el peso un 22% frente a condiciones de fotoperíodo natural o iluminación continua. Después de los seis primeros meses de cría, el peso medio de los animales clasificados a 60 días fue un 10% más alto que el de los no clasificados.

Por otra parte, los porcentajes de animales con una sola pinza o sin pinzas no se vieron afectados por los diferentes factores estudiados con excepción de la densidad. Con 100 m² se encontraron en torno al 5% a los 100 días y al 7% a los 180 días. Dichos porcentajes fueron más elevados cuanto mayor fue la densidad inicial.

Cara a las posibilidades de aplicación en los procesos productivos, nuestras investigaciones aportan resultados de gran utilidad para la mejora de las técnicas de cultivo, que podrían resumirse en los siguientes aspectos:

a) En principio, la introducción progresiva de la incubación artificial con tratamientos de formaldehído en las factorías de producción debería ser considerada, ya que se aprovecharían las ventajas de esta técnica, que permite obtener juveniles con un óptimo estado sanitario, pues puede asumirse que los producidos mediante incubación artificial con agentes biocidas y sin contacto con otros animales se encuentran libres de enfermedades conocidas. Además, los juveniles procedentes de incubación artificial no sólo han presentado una tasa de supervivencia similar a los nacidos de huevos incubados por las madres, sino que crecieron significativamente más rápido.

b) En cuanto a la densidad, aunque los valores más altos de supervivencia y crecimiento fueron obtenidos con 100 m², entre 300, 600 y 1000 m² las diferencias de crecimiento en ningún momento fueron significati-

vas. Sin embargo, la biomasa más alta se obtuvo con la densidad inicial de 1000 m² y fue inferior a medida que las densidades iniciales fueron menores. Cara a las posibilidades aplicativas en cultivo, las decisiones habrían de tomarse en función de las circunstancias y de los objetivos prioritarios en cada caso. Si el propósito es obtener un elevado número de animales por m² o una alta biomasa final, la densidad inicial habría de ser mayor que si, en el mismo período, lo que interesa es conseguir individuos con rápido ritmo de crecimiento y menor mortalidad.

c) Respecto a la frecuencia de alimentación, como las diferentes opciones en cultivo deberían ser evaluadas en términos de mano de obra, costes y posibilidades aplicativas, ha de valorarse si el mayor crecimiento (correspondiente a una frecuencia de una o dos veces al día) es la opción óptima. El presente estudio proporciona diferentes alternativas que pueden ser aplicadas en función de los objetivos de producción.

d) El uso de quistes decapsulados de *Artemia* como suplemento de un pienso compuesto seco ofrece una interesante alternativa a los nauplios vivos desde el punto de vista del cultivo, ya que permiten un mayor crecimiento, se pueden manejar como una dieta inerte, están desinfectados y no pierden nutrientes en el agua, además de facilitar un ahorro de mano de obra y costes, ya que se puede prescindir de las instalaciones y del trabajo para la producción de alimento vivo.

e) Bajo las condiciones de alimentación de nuestro estudio, el número de refugios por cangrejo no influyó sobre los resultados, sugiriendo que 1 refugio por animal puede ser suficiente. Por este motivo, en condiciones de cultivo sería interesante reducir el material para refugios al mínimo posible, lo que facilitaría el manejo y las prácticas higiénicas.

f) En cuanto a las condiciones de iluminación, no hubo diferencias significativas en la supervivencia, mientras que el crecimiento fue mayor en los animales sometidos a oscu-

ridad continua. De este modo, en condiciones intensivas puede contemplarse la posibilidad de mantener a los juveniles en condiciones de relativa ausencia de luz durante el primer período de cría.

g) La etapa más crítica en la cría de juveniles se encuentra en los primeros meses. En el presente estudio, se ha superado esta fase con buenos resultados, llegando incluso a seis meses. Dentro de ello, la clasificación parece ser recomendable en condiciones de cultivo, ya que permite un incremento de los valores de crecimiento, así como una mejora de los índices de conversión del alimento. Además, comparando los efectos de la clasificación a dos períodos diferentes, se ha demostrado la conveniencia de clasificar a los cangrejos después de 60 días desde el comienzo de la alimentación externa, debido al mayor crecimiento final de los animales más pequeños comparado con el de los clasificados a 100 días. Por otro lado, nuestro trabajo aporta datos sobre la evolución de las tasas de crecimiento y del índice de conversión del alimento en condiciones intensivas durante 180 días. Así, la tasa de crecimiento específico fue disminuyendo desde una media de 4,37% día⁻¹ durante los primeros 60 días

hasta una media de 0,81% día⁻¹ durante el último período (100-180 días). Por el contrario, el índice de conversión del alimento se fue incrementando desde una media de 0,92 durante los primeros 60 días hasta una media de 3,23 durante el último período (100-180 días).

Los conocimientos adquiridos durante el período experimental 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:

- Estudiar efectos de la densidad y de las condiciones de iluminación a partir de los tres meses.
- Valorar los efectos de la clasificación por sexo.
- Adquirir conocimientos básicos de nutrición, orientados a la cría en condiciones controladas.
- Elaboración de dietas compuestas secas específicas para cangrejos.

9. CONCLUSIONES

1. En las condiciones básicas de experimentación de los diferentes estudios (densidad inicial de 100 cangrejos m^{-2} y aporte una vez al día de una dieta compuesta para salmónidos suplementada con nauplios o con quistes de *Artemia*), se obtuvieron valores medios del 80% de supervivencia y 663 mg tras 100 días desde el comienzo de la alimentación externa y del 73% de supervivencia y 1370 mg tras 180 días. Los porcentajes medios de cangrejos con una sola pinza o sin pinzas fueron del 5% tras 100 días y del 7% tras 180 días.

2. El tratamiento antifúngico administrado durante la incubación artificial de los huevos (3000 ppm de formaldehído 15 minutos en días alternos) no ha mostrado efectos perjudiciales sobre la posterior viabilidad de los juveniles producidos. Dentro de tasas de supervivencia en torno al 86% tras 80 días de cría, los animales obtenidos mediante incubación artificial pesaron un 49% más que los procedentes de incubación maternal.

3. Las densidades iniciales de juveniles influyeron marcadamente sobre las tasas de supervivencia a los 100 primeros días de cría, que se redujeron desde un 86% con 100 cangrejos m^{-2} hasta un 39% con 1000 m^{-2} . El crecimiento fue superior con 100 m^{-2} y no hubo diferencias entre 300, 600 y 1000 m^{-2} .

4. Frecuencias de alimentación de una o dos veces al día no dieron lugar a diferentes resultados. La reducción a una vez cada dos o tres días durante 100 días afectó negativamente tanto a la supervivencia como al crecimiento.

5. Los quistes decapsulados de *Artemia* en sustitución de los nauplios vivos como suplemento de una dieta compuesta seca desde el comienzo de la alimentación externa no ha afectado a las tasas de supervivencia a 100 días de cría y ha permitido alcanzar un 44% más de peso. No hubo diferencia de cre-

cimiento entre el aporte de alimento una vez cada tres días con el suplemento de quistes y una vez al día con el de nauplios.

6. En condiciones controladas, ha de procurarse que cada juvenil tenga posibilidad de encontrar al menos un refugio, que puede ser suficiente, ya que no hubo diferencia entre disponibilidades de 1 y 4 refugios por cangrejo.

7. Dentro de tasas de supervivencia en torno al 83% a 120 días, la oscuridad permanente permitió incrementar el peso un 22% frente a condiciones de fotoperíodo natural o iluminación continua.

8. Las clasificaciones efectuadas tanto a 60 como a 100 días desde el comienzo de la alimentación externa han posibilitado uniformar las dimensiones de los cangrejos dentro de cada clase después de 180 días de cría. Los coeficientes de variación del peso de los juveniles clasificados han sido por término medio un 28% inferiores a los de los no clasificados.

9. La clasificación a los 60 días de cría permitió incrementar el peso medio final (180 días) un 10% respecto a los cangrejos no clasificados. El peso final de los juveniles clasificados como pequeños a los 60 días fue un 18% más alto que el de los pequeños clasificados a los 100 días.

10. Después de 180 días de cría, el índice de conversión del alimento de los cangrejos clasificados (media 2,6) fue más bajo que el de los no clasificados (3,2).

11. Desde el comienzo de la alimentación externa, la tasa de crecimiento específico fue disminuyendo desde una media de 4,4% $día^{-1}$ durante los primeros 60 días hasta 0,8% $día^{-1}$ en el último tramo (100-180 días) mientras que el índice de conversión durante los mismos períodos fue aumentando desde una media de 0,9 hasta 3,2.

10. CONCLUSIONS

1. Under the basic experimental conditions of the different studies (stocking density of 100 crayfish per m² and provision of a dry diet for salmonids supplemented with *Artemia* nauplii or cysts once a day), mean values of 80% survival and 663 mg were obtained after 100 days from the onset of exogenous feeding and 73% survival and 1370 mg after 180 days. The mean percentages of crayfish lacking one or two chelae were 5% after 100 days and 7% after 180 days.

2. The antifungal treatment administered during artificial incubation of eggs (3000 ppm of formaldehyde for 15 min every other day) had no harmful effects on the subsequent survival of juveniles. Within the 86% survival rate recorded after 80 days of rearing, the animals derived from artificial incubation weighed 49% more than those from maternal incubation.

3. Juvenile stocking densities greatly influenced survival rates for the first 100 days of rearing, dropping from 86% with 100 crayfish per m² to 39% with 1000 m⁻². The highest growth rate was obtained with 100 m⁻² and no differences were found between 300, 600 and 1000 m⁻².

4. Feeding frequencies of once or twice a day did not produce different results. The reduction of frequency to once every two or every three days for 100 days negatively affected both survival and growth.

5. Decapsulated *Artemia* cysts as a substitute for live *Artemia* nauplii to supplement a dry diet from the onset of exogenous feeding did not affect survival rates after 100 days of rearing, and allowed a 44% increase in weight. There were no differences in

growth between the frequency of once every three days with cyst supplement and that of once a day with nauplii supplement.

6. Under controlled conditions, each juvenile should have the opportunity to find at least one shelter, which can be enough, since there were no differences between 1 and 4 shelters per crayfish.

7. Within the 83% survival rate recorded after 120 days of rearing, continuous darkness allowed a 22% increase in weight compared to the natural photoperiod or continuous light conditions.

8. Gradings at either 60 or 100 days from the onset of exogenous feeding allowed uniform crayfish size within each class after 180 days of rearing. The coefficients of weight variation in the graded juveniles were 18% lower than in the ungraded crayfish.

9. Grading at 60 days allowed a 10% increase in final mean weight with regard to ungraded crayfish. The final weight of the lower-class juveniles graded at 60 days was 18% higher than that of lower-class juveniles graded at 100 days.

10. After 180 days of rearing, the food conversion ratio of the graded crayfish (average 2.6) was lower than that of ungraded crayfish (3.2).

11. From the onset of exogenous feeding, specific growth rate decreased from a mean of 4.4% day⁻¹ over the first 60 days to a mean of 0.8% day⁻¹ during the final period (100-180 days), whereas the food conversion ratio for the same periods increased from a mean of 0.9 to 3.2.

11. RESUMEN

A partir de los años 60, se ha venido desarrollando un creciente interés por el cultivo de astácidos en Europa, donde son considerados un alimento de lujo y alcanzan elevados precios en el mercado. 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 con *P. le-niusculus* y *A. pallipes*, este grupo ha llegado a la puesta a punto de técnicas de gran valor aplicativo en la fase reproductiva, que abarcan desarrollo gonadal, maduración, apareamiento, oviposición, embriogénesis en incubación maternal, 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 finalmente culmina con la obtención del juvenil estado 2.

Una vez que se ha logrado una aceptable eficiencia en la producción de juveniles, el siguiente paso ha de abordar el incremento de las tasas de supervivencia y de crecimiento de los animales obtenidos en la fase reproductiva. Ahora sabemos que las causas de los pobres resultados obtenidos durante 30 años se encuentran vinculadas a deficiencias nutritivas, relacionadas con factores esenciales desconocidos que pueden ser aportados por alimento vivo, lo cual ha permitido superar el bloqueo sufrido por los procesos de investigación y establece las bases para una alimentación adecuada. A partir de aquí, otros factores importantes en la cría de juveniles pueden ser estudiados sin el riesgo de que los resultados se distorsionen, enmascarados por una deficiente alimentación. En principio, el grado de desarrollo alcanzado en técnicas de incubación

artificial, que incluye la administración de tratamientos antifúngicos sobre altas densidades de huevos, hace conveniente el estudio de la posterior viabilidad de los juveniles así obtenidos. Por otro lado, la aplicación de los recientes avances en alimentación permite alcanzar buenas tasas de supervivencia y de crecimiento, a la vez que, indudablemente, influye sobre el comportamiento ingestivo y agonístico de los cangrejos. Esto incide directamente sobre los efectos de aquellos factores estrechamente relacionados con la agresividad y el canibalismo, que son principalmente la densidad de juveniles, la frecuencia de alimentación y forma de los alimentos, la disponibilidad de refugios y las condiciones de iluminación, así como las posibilidades de reducir la presión dominante de los cangrejos de crecimiento más rápido sobre los más pequeños mediante la separación por clasificación.

Sobre esta base, la finalidad de esta Tesis Doctoral es la mejora de las técnicas de cría de juveniles de astácidos aplicando recientes avances en alimentación, orientada al estudio de aspectos relacionados con prácticas de manejo y condiciones ambientales, así como a obtener información sobre la respuesta de los juveniles a períodos de cría desde el inicio de la alimentación externa más largos que los alcanzados hasta el presente. Los objetivos concretos son:

- Evaluar posibles influencias del origen de los juveniles: incubación maternal o incubación artificial. Estudio I.
- Determinar densidades adecuadas para la cría intensiva. Estudio II.
- Simplificar las prácticas vinculadas a la alimentación. Estudio III.
- Determinar condiciones adecuadas de disponibilidad de refugios y de iluminación. Estudio IV.

- Cría intensiva durante los seis primeros meses, evaluando efectos de la clasificación por peso. Estudio V.

Estas investigaciones se desarrollaron en los laboratorios de acuicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León a lo largo de tres años consecutivos, en el marco del proyecto del Plan Nacional de I+D+i "Técnicas de cría de juveniles de astácidos (*Pacifastacus leniusculus* Dana) en condiciones controladas", referencia AGL2005-01127, y de una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, con referencia AP2005-4860.

Se llevaron a cabo 7 experimentos entre 80 y 180 días de duración, iniciados todos ellos con juveniles estado 2 de la especie *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). Se utilizaron en total 8760 juveniles, obtenidos a partir de hembras con huevos procedentes de una astacifactoría que cada año se trasladaban a nuestras instalaciones de experimentación, aproximadamente un mes después de la oviposición, para la aplicación de técnicas de control de la reproducción durante varios meses hasta la conclusión del proceso con la producción del juvenil estado 2.

En los distintos experimentos, los cangrejos fueron alimentados manualmente con un pienso compuesto formulado para salmónidos suplementado con nauplios de *Artemia* recién eclosionados (estudios I, II y III) o con quistes decapsulados de *Artemia* (estudios III, IV y V).

Estudio I (*Publicación I: Reviews in Fish Biology and Fisheries 19, 2009*).— Durante la incubación artificial, es aconsejable la utilización de biocidas para evitar la proliferación fúngica sobre los huevos muertos. Aunque se ha comprobado que estos compuestos no afectan negativamente a los huevos, los posteriores efectos sobre los juveniles son todavía desconocidos. Para aclarar esta cuestión, se diseñaron dos experimentos de 80 días con la finalidad de comparar la supervivencia y el crecimiento de juveniles procedentes de

dos orígenes: incubación maternal o incubación artificial con tratamientos de formaldehído (3000 ppm de formaldehído 15 minutos en días alternos hasta la eclosión).

En el experimento I.1, los tratamientos fueron tres: juveniles procedentes de incubación artificial, juveniles procedentes de incubación maternal y mezcla de juveniles de ambos orígenes. Los porcentajes finales de supervivencia se encontraron entre 87,78% y 93,33%, sin diferencias entre tratamientos, mientras que los cangrejos procedentes de incubación artificial crecieron significativamente más rápido (11,47 mm de longitud de cefalotórax y 373,80 mg de peso) que los obtenidos mediante incubación maternal (9,88 mm y 236,62 mg).

Dado que en el experimento I.1, las tasas de crecimiento obtenidas fueron mayores en el caso de los juveniles procedentes de incubación artificial, se planteó la hipótesis de que estos efectos beneficiosos podrían ser mejorados al incrementar la frecuencia de alimentación. Así, se diseñó un experimento bifactorial (I.2) con cuatro tratamientos: juveniles procedentes de incubación artificial o maternal alimentados una o dos veces al día. Sin diferencias entre las dos frecuencias, los porcentajes de supervivencia finales se encontraron entre 68,89% y 77,78%, y los cangrejos procedentes de incubación artificial crecieron significativamente más rápido (media: 14,27 mm de longitud de cefalotórax y 750,02 mg de peso) que los de incubación maternal (media: 12,95 mm y 520,57 mg). Los resultados muestran que la incubación artificial con tratamientos de formaldehído no ha provocado posteriores efectos perjudiciales, permitiendo además un mayor crecimiento de los juveniles producidos.

Estudio II (*Publicación II: Aquaculture International 18, 2010*).— La determinación de densidades adecuadas, así como máximas cargas admisibles, es indispensable de cara a la intensificación del cultivo. En una prueba de 100 días (experimento II.1), se probó el efecto de cuatro densidades iniciales (100,

300, 600 y 1000 m⁻²) de juveniles estado 2. Las tasas de supervivencia se redujeron desde un 86,33% con 100 cangrejos m⁻² hasta un 39% con 1000 m⁻². La proporción de animales con falta de una o ambas pinzas al final del experimento fue más elevada cuanto mayor fue la densidad inicial, encontrándose entre 14,44% (100 m⁻²) y 41,45% (1000 m⁻²). El crecimiento fue superior con 100 m⁻² (15,28 mm de longitud de cefalotórax y 1,08 g de peso) y no hubo diferencias entre 300, 600 y 1000 m⁻² (media: 13,94 mm y 0,72 g). Este estudio demuestra que la dieta es un factor decisivo para alcanzar con éxito altas densidades en condiciones controladas y aporta información que puede servir de referencia para establecer densidades adecuadas en función de los objetivos de producción.

Estudio III (*Publicación III: Aquaculture 295, 2009*).— Se valoró la utilización de quistes decapsulados de *Artemia* como alternativa a los nauplios recién eclosionados, lo que supondría una simplificación de las prácticas de alimentación y prescindir de las instalaciones y del trabajo necesarios para el proceso de producción de nauplios. Además, los quistes, una vez decapsulados, pueden ser manejados como una dieta inerte, están desinfectados y no pierden nutrientes en el agua. Esta condición de estabilidad de los quistes podría ser aprovechada a la hora de establecer la frecuencia de alimentación. Así, tras haber comprobado que el incremento de la frecuencia de una a dos veces al día no mejoró la tasa de crecimiento (experimento I.2), también se probó a distanciar más los aportes de alimento.

Para ello, se diseñó una prueba de 100 días (experimento III.1) en la que dos dietas diferentes (pienso de trucha suplementado con quistes o con nauplios de *Artemia*) se aportaron con tres frecuencias de alimentación (una vez al día, una vez cada dos días y una vez cada tres días). Las tasas de supervivencia se encontraron entre 56,7% (frecuencia de alimentación una vez cada tres días y suplemento de nauplios) y 81,7% (frecuencia de alimentación una vez

al día y suplemento de quistes), incrementándose significativamente con el aumento de la frecuencia de alimentación. Considerando sólo el suplemento, los juveniles alimentados con quistes crecieron significativamente más rápido que los que recibieron nauplios (media: 460,65 mg frente a 320 mg). En cuanto a la frecuencia de alimentación, el crecimiento fue significativamente más alto cuando el aporte de alimento se realizó una vez al día. Sin embargo, la suplementación con quistes una vez cada tres días permitió un crecimiento similar al obtenido con el suplemento de nauplios una vez al día, lo que puede confirmar la mayor capacidad de los quistes para conservar su integridad nutritiva en el agua. De este modo, se puede deducir que la suplementación con quistes decapsulados ofrece ventajas sobre la de nauplios vivos. En cultivo de crustáceos, esta es la primera vez que los quistes decapsulados de *Artemia* son utilizados desde el inicio de la alimentación externa alcanzando buenos resultados.

Estudio IV (*Publicación IV: Aquaculture Research, en revisión, 2010*).— Uno de los principales problemas que afectan a las posibilidades de intensificación del cultivo de astácidos está relacionado con las pérdidas debidas al comportamiento agresivo y al canibalismo, cuyos efectos perjudiciales podrían reducirse con las condiciones adecuadas de refugios y de iluminación. Así, se dedicó una prueba de 80 días (experimento IV.1) a evaluar efectos de diversas condiciones de disponibilidad de refugios (4, 2 y 1 refugio por animal) sobre la supervivencia y el crecimiento de los juveniles. No se encontraron diferencias entre los diferentes tratamientos (media: 86,67% de supervivencia, 11,41 mm de longitud de cefalotórax y 355,45 mg de peso tras 80 días). En el experimento IV.2, se estudiaron los efectos de tres condiciones de iluminación (iluminación continua de 925 lux, oscuridad permanente y fotoperíodo natural) durante 120 días. Los cangrejos sometidos a oscuridad continua crecieron significativamente más rápido que los criados bajo las otras dos condiciones de iluminación (media:

543,08 mg frente a 445,44 mg). Este estudio muestra que se puede reducir el número de refugios al mínimo posible (1 por cangrejo), lo que facilita las prácticas higiénicas y el manejo de animales, así como conseguir un mayor crecimiento bajo condiciones de oscuridad permanente.

Estudio V (*Publicación V: Acuicultura, en revisión, 2010*).— La clasificación es una práctica especialmente recomendada en especies agresivas, con fuerte tendencia al canibalismo y a competir por el alimento, debido a sus efectos beneficiosos sobre la supervivencia, el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento. Sin embargo, sus posibilidades en el cultivo de crustáceos no han sido suficientemente estudiadas. En las investigaciones con astácidos, los recientes avances en alimentación nos han permitido evaluar los efectos de la clasificación por peso a diversos períodos en una prueba de seis meses desde el inicio de la alimentación externa (experimento V.1). Según el momento de la clasificación, los tratamientos fueron cinco: sin clasificación, clasificación a 60 días (grandes > 405 mg y pequeños < 405 mg) y clasificación a 100 días (grandes > 581 mg y pequeños < 581 mg). Las tasas de supervivencia a 180 días de cría se encontraron entre 71,67% y 74,83% sin diferencias significativas entre grupos. Los valores finales medios más altos (17,39 mm de longitud de cefalotórax y 1,43 g de peso) correspondieron a los cangrejos clasificados a 60 días, mostrando diferencias significativas con los no clasificados (16,78 mm y 1,30 g). Los cangrejos clasificados como pequeños a los 60 días crecieron significativamente más rápido que los pequeños clasificados a 100 días. El índice de conversión del alimento fue más bajo en los animales clasificados (media: 2,64), mostrando diferencias significativas con los no clasificados (3,23). A medida que los animales avanzaron en su desarrollo, la tasa de crecimiento específico fue disminuyendo desde una media de 4,37% día⁻¹ durante los primeros 60 días hasta una media de 0,81% día⁻¹ durante el último período (100-180 días). Por el contrario, el índice de

conversión del alimento fue aumentando desde una media de 0,92 durante los primeros 60 días hasta una media de 3,19 durante el último período (100-180 días). Así, este estudio aporta información sobre la respuesta de los juveniles durante los seis primeros meses de cría intensiva desde el inicio de la alimentación externa y muestra que la clasificación por peso permite mejorar el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento.

Considerando en conjunto los porcentajes de supervivencia en nuestros experimentos, los valores fueron altos en las condiciones básicas de los diferentes estudios (aporte de alimento una vez al día con una densidad inicial de 100 cangrejos m⁻²), encontrándose en torno al 80% a los 100 días y al 73% a los 180 días. Sin embargo, la mortalidad aumentó significativamente cuando se redujo la frecuencia de alimentación a una vez cada dos o cada tres días o cuando los juveniles se alojaron a densidades iniciales de 300 m⁻² o superiores.

Respecto al crecimiento, fue afectado por los diferentes factores estudiados con excepción de la disponibilidad de refugios. En primer lugar, los juveniles procedentes de incubación artificial alcanzaron en 80 días un peso 49% superior al de los procedentes de incubación maternal. Los juveniles a la densidad inicial de 100 m⁻² llegaron a pesar después de 100 días un 50% más que los alojados a densidades más altas. El suplemento de quistes decapsulados de *Artemia* permitió aumentar un 44% el peso de los cangrejos frente al suplemento de nauplios. Con una frecuencia de alimentación de una vez al día durante 100 días, los juveniles alcanzaron un 40% más de peso que con las mismas cantidades de alimento aportadas una vez cada tres días. La oscuridad permanente durante 120 días permitió incrementar el peso un 22% respecto a condiciones de fotoperíodo natural o de iluminación continua. Después de los seis primeros meses de cría, el peso medio de los animales clasificados a 60 días fue un 10% más alto que el de los no clasificados.

Por otra parte, los porcentajes de animales con una sola pinza o sin pinzas no fueron afectados por los diferentes factores estudiados con excepción de la densidad. Con 100 m⁻² se encontraron en torno al 5% a los 100 días y al 7% a los 180 días. Dichos porcentajes fueron más elevados cuanto mayor fue la densidad inicial.

Cara a las posibilidades de aplicación en los procesos productivos, nuestras investigaciones aportan resultados de gran utilidad para la mejora de las técnicas de cultivo. En principio, la introducción de la incubación artificial con tratamientos de formaldehído en las factorías de producción debería ser considerada, ya que se aprovecharían las ventajas de esta técnica, que facilita la obtención de juveniles con un óptimo estado sanitario y, además, mejora el crecimiento posteriormente. Referente a la densidad, los mejores resultados de supervivencia y crecimiento individual se obtuvieron con 100 cangrejos m⁻², pero la biomasa por unidad de superficie ha sido superior con densidades más altas. A nivel de cultivo, las decisiones habrán de tomarse en función de las circunstancias y de los objetivos productivos. El uso de quistes decapsulados de *Artemia* como suplemento de un pienso compuesto seco ofrece una interesante alternativa a los nauplios vivos, ya

que se alcanza un mayor crecimiento, además de facilitar un ahorro de mano de obra y costes. En cuanto a la frecuencia, el aporte de alimento una vez al día ha mostrado ser adecuado para obtener altos valores de supervivencia y crecimiento. Bajo las mencionadas condiciones de alimentación, ha de procurarse que cada juvenil tenga posibilidad de encontrar al menos un refugio, que puede ser suficiente, lo que facilita la higiene y el manejo de animales. Además, el mayor crecimiento en condiciones de oscuridad permanente abre la posibilidad de mantener a los juveniles en una relativa ausencia de luz. Finalmente, el proceso de cría durante 180 días aporta valiosa información sobre la respuesta de los animales y muestra que la clasificación puede ser recomendable en cultivo una vez que aparecen marcadas diferencias de tamaño, ya que permite un incremento de los valores de crecimiento y una mejora de los índices de conversión del alimento.

Cabe concluir que los conocimientos adquiridos a lo largo del período experimental contribuyen en gran medida a mejorar las técnicas de cultivo de juveniles de astácidos desde el inicio de la alimentación externa hasta los seis meses de edad, y constituyen una sólida base para el desarrollo de futuras líneas de investigación.

12. SUMMARY

Since the sixties, an increasing interest has been shown in astacid crayfish culture in Europe, due to its gastronomic quality as well as its high market price. Culture systems are generally extensive or semiextensive at best. In such circumstances, the different phases of the productive process are subject to uncontrolled factors, resulting in a low and unpredictable yield. This has led to the development of research lines investigating means to intensify and improve the culture phases in several countries.

In previous research with *P. leniusculus* and *A. pallipes*, this team developed techniques with a high application value in the reproductive phase, including gonadal development, maturation, mating, spawning, embryogenesis in maternal incubation, artificial incubation systems, as well as egg transport and storage, aimed at improving each phase of the long process which ends with obtaining the stage 2 juvenile.

Having obtained acceptable efficiency in juvenile production, the next step was to increase animal survival and growth rates. It is known that the poor results obtained for 30 years were mainly due to nutritional deficiencies, related to unknown essential elements that can be provided by live food; this knowledge constituted an advance in the research process and laid the foundations for an adequate feeding regime. Once the effects of the experimental treatments were no longer masked by deficient feeding, other important factors in juvenile rearing could be studied. Firstly, the development achieved in artificial incubation, including the administration of antifungal treatments on high egg densities, makes the study of viability of juveniles obtained advisable. In addition, recent advances in feeding, which allow high survival and growth rates, also influence the ingestive and agonistic behaviour of crayfish. This has a direct effect on those factors related to

aggressiveness and cannibalism, which are mainly density, feeding frequency and shape of food, shelter availability and lighting conditions, as well as introducing the possibility of reducing domination by the faster growing crayfish through size grading.

In this context, the aim of this thesis was to improve astacid juvenile rearing techniques through the application of recent advances in feeding and to study aspects related to management and environmental conditions, in addition to obtaining information about the response of juveniles to rearing periods from the onset of exogenous feeding which were longer than those tested so far. The specific objectives are as follows:

- Assessing possible influences of juvenile origin: maternal incubation or artificial incubation. Study I.
- Determining adequate densities for intensive rearing. Study II.
- Simplifying the practices linked with feeding. Study III.
- Determining adequate conditions of shelter and lighting. Study IV.
- Intensive rearing for the first six months, assessing effects of size grading. Study V.

This research was carried out in the aquaculture laboratories of the Animal Production Department at the University of León, over three consecutive years, within the framework of Research Project AGL2005-01127 "Rearing techniques of astacid juvenile (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under controlled conditions" funded through the Plan Nacional de I+D+i, and a grant from the Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, reference AP2005-4860.

Seven experiments initiated with stage 2 juveniles *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) were conducted for 80-180 days. A total of 8,760 juveniles were used. Every year, females with eggs were brought to our facilities from a farm, to control the reproduction process for several months until production of the stage 2 juvenile.

In all experiments, crayfish were fed a dry diet for salmonids supplemented with live freshlyhatched *Artemia* nauplii (studies I, II and III) or with decapsulated *Artemia* cysts (studies III, IV and V).

Study I (*Publication I: Reviews in Fish Biology and Fisheries 19, 2009*).— In artificial incubation, it is advisable to use biocide treatments in order to avoid fungal proliferation on dead eggs. Although eggs are not negatively affected by the antifungal treatment, the longterm effects of biocides with a strong antimicrobial effect, such as formaldehyde, on juveniles are still unknown. To clarify this question, two experiments lasting 80 days were designed with the aim of comparing survival and growth of juveniles from two sources: maternal incubation or artificial incubation with repeated treatments of formaldehyde (3000 ppm 15 min every other day until eclosion).

In the experiment I.1, three conditions were analyzed: juveniles derived from artificial incubation, juveniles derived from maternal incubation and mixed juveniles from the two different sources. Survival rates ranged from 87.78% and 93.33%, with no significant differences between treatments, whereas crayfish from artificial incubation grew significantly faster (11.47 mm carapace length and 373.80 mg weight) than crayfish from maternal incubation (9.88 mm and 236.62 mg).

Since juveniles produced through artificial incubation grew faster in experiment I.1, it was hypothesized that the possible beneficial effect of this origin on growth could be enhanced by increasing feeding frequency. Thus, on the basis of the origin of offspring

and feeding frequency, a bifactorial trial (experiment I.2) was conducted which included four conditions: juveniles derived from artificial or maternal incubation and fed once or twice a day. With no differences between either frequencies, the final percentages of survival ranged from 68.89% and 77.78%, and crayfish from artificial incubation grew significantly faster (average: 14.27 mm carapace length and 750.02 mg weight) than crayfish from maternal incubation (average: 12.95 mm and 520.57 mg). Results showed that artificial incubation with formaldehyde treatments had no harmful effects and made it feasible to obtain a better performance from the juveniles thus produced.

Study II (*Publication II: Aquaculture International 18, 2010*).— The determination of adequate densities, as well as maximum acceptable densities, is essential for culture intensification. In a 100-day trial (experiment II.1), effects of four stage 2 juvenile stocking densities (100, 300, 600 and 1000 m⁻²) were tested. Mean survival rates were reduced significantly as stocking density increased, ranging from 86.33% at 100 m⁻² to 39.13% at 1,000 m⁻². The final proportion of animals with chelae autotomy rose significantly with increasing stocking density, ranging from 14.44% (100 m⁻²) to 41.45% (1,000 m⁻²). All checks showed that at the lowest initial density (100 m⁻²) animals grew significantly faster than those kept at higher densities (15.28 mm and weight of 1.08 g), and there were no differences between 300, 600 and 1,000 m⁻² (average: 13.94 mm and 0.72 g). This study shows that diet is a decisive factor for successfully stocking high densities under controlled conditions and provides useful information for establishing adequate densities in accordance with production objectives.

Study III (*Publication III: Aquaculture 295, 2009*).— The use of decapsulated *Artemia* cysts as direct food for juvenile crayfish could be an alternative to live nauplii, leading to simplification of feeding practices and a reduction in the facilities and labor needed for the process of nauplii production. More-

over, after the nondigestible shell has been chemically removed, decapsulated cysts can be handled as an inert diet, are sterile and do not leach nutrients. This stable condition could be considered to establish feeding frequency. Once it has been demonstrated that an increase in frequency from once to twice a day did not improve growth figures (experiment I.2), longer food supply intervals were tested.

To this end, a 100-day factorial trial (experiment III.1) was designed. It included six conditions, differing in the supplement provided and feeding frequency: the dry diet supplemented with *Artemia* nauplii or decapsulated cysts was supplied once a day, once every two days and once every three days. Survival rates ranged from 56.7% (feeding frequency once every three days and nauplii supplement) to 81.7% (feeding frequency once a day and cyst supplement), rising significantly as feeding frequency increased. As regards the supplement, the cysts supported significantly higher growth than the nauplii (average: 460.65 mg against 320 mg). Regarding the feeding frequency, growth was higher when the food was supplied once a day, showing significant differences from the other two frequencies (once every two days and once every three days). However, the growth obtained from supplying the dry diet supplemented with cysts once every three days showed no significant differences from the growth obtained from supplying the dry diet supplemented with nauplii once a day, which confirms the higher capacity of cysts for maintaining nutritional integrity in water. This study shows that decapsulated cysts constitute better dietary supplement than live nauplii. In crustacean culture, this is the first report of successful use of *Artemia* cysts from the onset of exogenous feeding.

Study IV (*Publication IV: Aquaculture Research, under review, 2010*).— One of the main problems affecting possibilities of intensifying astacid culture is related to losses due to agonistic behaviour and cannibalism, the harmful effects of which could be greatly

reduced by provision of adequate shelter and lighting conditions. Thus, an 80-day trial (experiment IV.1) was conducted to assess effects of different shelter availability conditions (4, 2 and 1 shelters per animal) on survival and growth of juveniles. No significant differences were found between groups (final average: 86.67% survival, 11.41 mm carapace length and 355.45 mg weight). In experiment IV.2, three lighting conditions were tested for 120 days: continuous lighting of 925 lux, continuous darkness and natural photoperiod. The crayfish kept under continuous darkness consistently grew faster than those reared under the other two lighting conditions (average: 543.08 mg against 445.44 mg). This study shows that, under improved feeding conditions, a minimum number of shelters can be provided, making management and hygienic practices easier, and faster growth can be obtained in continuous darkness.

Study V (*Publication V: Aquaculture, under review, 2010*).— Size grading is a practice which is especially recommended in aggressive species where competition for food and even cannibalism are common, due to the benefits for survival, growth and improved feeding efficiency. However, effects on crustacean culture are not wellknown. In the research on intensive juvenile astacid crayfish rearing, recent advances in feeding under controlled conditions enabled us to evaluate the effects of size grading at two different periods by means of a 6-month trial from the onset of exogenous feeding (experiment V.1). Five conditions were studied, related to the time of size grading: no grading, size grading at 60 days (large size > 405 mg and small size < 405 mg) and size grading at 100 days (large size > 581 mg and small size < 581 mg). After six months, survival ranged from 71.67% to 74.83% with no significant differences between groups. The highest final growth (average of upper and lower classes: 17.39 mm carapace length, 1.43 g weight) was attained by crayfish sorted at 60 days, showing significant differences from the ungraded group (16.78 mm and 1.30 g). Smaller crayfish graded at

60 days grew significantly faster than smaller crayfish graded at 100 days. The food conversion ratio was lower in the grading groups (mean 2.64), showing significant differences from the ungraded group (3.23). On the contrary, food conversion ratio increased from a mean of 0.92 during the first 60 days to a mean of 3.19 during the final period (100-180 days). This study provides valuable information about the response of juvenile crayfish over six months of intensive rearing from the onset of exogenous feeding and shows that size grading allows better performance and improved feeding efficiency.

Considering all survival rates, high values were recorded for the basic conditions of the different studies (feeding frequency of once a day at a stocking density of 100 crayfish per m²), ranging around 80% at day 100 and 73% at day 180. However, mortality increased significantly when feeding frequency was reduced to once every two days or every three days and when juveniles were stocked at densities of 300 m² or higher.

With regard to growth, this was affected by all the different factors studied except for shelter availability. Firstly, juveniles coming from artificial incubation weighed 49% more than those from maternal incubation after 80 days. Juveniles stocked at a density of 100 m² weighed 50% more than those stocked at higher densities after 100 days. The cyst supplement allowed a 44% increase in weight compared with the nauplii supplement. When food was supplied once a day for 100 days, the weight achieved by the juveniles was 40% higher than supplying the same amount of food once every three days. Continuous darkness for 120 days allowed a 22% increase in weight compared to natural photoperiod or continuous lighting conditions. After six months of rearing, mean weight of crayfish graded at 60 days was 10% higher than that of ungraded animals.

On the other hand, the percentages of animals lacking one or two chelae were not

affected by any of the different factors, except for density. At a density of 100 m², values were around 5% at day 100 and around 7% at day 180. Such percentages rose significantly as stocking density increased.

With a view to application possibilities in productive processes, our research provides results which are highly pertinent to improving culture techniques. Firstly, the introduction of artificial incubation with formaldehyde treatment in production factories makes improved growth rates feasible, since this technique provides health protection for the crayfish thus obtained. Regarding density, the highest survival and individual growth rates were obtained with 100 crayfish per m², but biomass per unit of surface area rose significantly with increasing stocking densities. In culture, decisions would have to be taken according to circumstances and priority objectives in each case. The use of decapsulated cysts as a supplement to a dry diet provides an interesting alternative to live nauplii, as cysts improve crayfish performance and reduce labor and costs. As for frequency, food supply once a day proved to be effective in obtaining high survival and growth values. Under the aforementioned feeding conditions, each juvenile should have the chance to find at least one shelter, which can be enough, since there were no differences between 1 and 4 shelters per crayfish. Furthermore, the higher growth obtained under continuous darkness offers the possibility of keeping juveniles in relative light absence. Finally, the rearing process for 180 days provides valuable information on response of juveniles and shows that size grading may be advisable once differences in growth appear, as it allows better performance and improved feeding efficiency.

To conclude, the information acquired throughout the experimental period contributes greatly to improving astacid juvenile culture techniques from the onset of exogenous feeding to six months, and establishes solid grounds for developing future research lines.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abgrall P, Rangeley RW, Burrige LE, Lawton P (2000) Sublethal effects of azame-thiphos on shelter use by juvenile lobsters (*Homarus americanus*). **Aquaculture** **181**, 1-10.
- Abrahamsson SA, Goldman CR (1970) Dis-tribution, density and production of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in Lake Tahoe, California-Nevada. **Oikos** **21**, 83-91.
- Abrahamsson SA (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: de Pauw N, Jaspers E, Ackefors H, Wilkins N (Eds.) **Aquaculture - A Biotechnology in Progress**. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 365-373.
- Ackefors H, Castell JD, Boston LD, Rätty P, Svensson M (1992) Standard experimen-tal diets for crustacean nutrition research. II.- Growth and survival of juvenile cray-fish *Astacus astacus* (Linné) fed diets containing various amounts of protein, carbohydrate and lipid. **Aquaculture** **104**, 341-356.
- Ackefors H, Lindqvist OV (1994) Cultivation of Freshwater Crayfishes in Europe. En: Huner JV (Ed.) **Freshwater Crayfish Aquaculture**. The Haworth Press Inc., Binghamton, NY, pp. 157-216.
- Ackefors H, Gydemo R, Keyser P (1995) Growth and moulting in confined juvenile noble crayfish *Astacus astacus* (L.) (De-capoda: Astacidae). **Freshwater Crayfish** **X**, 396-409.
- Ackefors H (1996) The development of cray-fish culture in Sweden during the last de-cade. **Freshwater Crayfish** **XI**, 627-654.
- Ahvenharju T, Savolainen R, Tulonen J, Ruohonen K (2005) Effects of size grading on growth, survival and cheliped injuries of signal crayfish (*Pacifastacus leniuscu-lus* Dana) summerlings (age 0+). **Aquac. Res.** **36**, 857-867.
- Ahvenharju T, Ruohonen K (2007) Agonistic be-haviour of signal crayfish (*Pacifastacus lenius-culus* Dana) in different social environments: Effect of size heterogeneity on growth and food intake. **Aquaculture** **271**, 307-318.
- Aiken DE, Waddy SL (1977) Communal rear-ing of juvenile lobsters (*Homarus america-nus*) in a culture system. **Third Meeting, International Council for the Explora-tion of the Sea, Working Groups on Mariculture** **4**, 283 (resumen).
- Aiken DE, Martin DJ, Meisner JD, Sochasky JB (1981) Influence of photoperiod on survival and growth of larval American lobsters (*Homarus americanus*). **J. World Maricul. Soc.** **12(1)**, 225-230.
- Andrews EA (1904) Breeding habits of cray-fish. **Am. Nat.** **38**, 165-206.
- Arnold SJ, Sellars MJ, Crocos PJ, Coman GJ (2006) Intensive production of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*: An evalu-ation of stocking density and artificial sub-strates. **Aquaculture** **261(3)**, 890-896.
- Arrignon J (1981) **L'écrevisse et son éle-vage**. 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.

- Arrignon J, Laurent PJ (1998) *Pacifastacus leniusculus*, miracle ou fléau? **L'Astaciculteur de France** **55**, 6-12.
- Atencio-García V, Zaniboni-Filho E (2006) El canibalismo en larvicultura de peces. **Rev. MVZ Córdoba** **11(1)**, 9-19.
- Barki A, Harpaz S, Hulata G, Karplus L (2000) Effects of larger fish and size-grading on growth and size variation in fingerling silver perch. **Aquacult. Int.** **8**, 391-401.
- Barnabé G (1991) **Acuicultura**. Ediciones Omega S.A., Barcelona, 1099 p. (2 vols.).
- 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. **Ann. Zool. Fennici** **31**, 297-306.
- Boghren AD, Castell JD (1981) Nutritional value of different dietary proteins to juvenile lobsters, *Homarus americanus*. **Aquaculture** **22**, 343-351.
- Brewis JM, Bowler K (1985) A study of reproductive females of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*. **Hydrobiologia** **121**, 145-149.
- Brodsky SJ (1962) L'élevage artificiel des écrevisses de rivière - Une méthode perfectionnée de reproduction de leurs réserves. **Vopr. Ecologii i Biosenologii** **4**.
- Brodsky SJ (1984) Sur l'élevage en Union Soviétique des écrevisses de rivière (Astacidae) par la méthode industrielle et sur les perspectives de cette méthode. **La Pisciculture Française** **78**, 5-9.
- Brown DK, Bowler K (1977) A population study of the British freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). **Freshwater Crayfish III**, 35-50.
- Burns CM, Avault Jr JW (1991) Effects of bait composition and of water temperature on harvestability of crawfish baits. **J. Appl. Aquacult.** **1**, 57-64.
- Carlberg JM, Van Olst JC, Ford RF (1979) Potential for communal rearing of the nephropid lobsters (*Homarus spp.*). **Proc. World Maricul. Soc.** **10**, 840-853.
- Carral JM, Celada JD, Gaudioso VR, Temiño C, Fernandez R (1988) Artificial incubation improvement of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under low temperatures during embryonic development. **Freshwater Crayfish VII**, 239-250.
- Carral JM (1990) **Incubación artificial en el cangrejo de río *Pacifastacus leniusculus* Dana y desarrollo de los huevos de *Austropotamobius pallipes* Lereboullet**. Tesis Doctoral, Ed. Universidad de León, España, 229 p.
- Carral JM, Celada JD, Gonzalez J, Gaudioso VR, 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 JM, Celada JD, González J, Sáez-Royuela M, Gaudioso VR (1994) Mating and spawning of freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) under laboratory conditions. **Aquacult. Fish. Manage.** **25**, 721-727.
- Carral JM, Celada JD, Muñoz R, Sáez-Royuela M, Pérez JR (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 JM, Sáez-Royuela M, Celada JD, Pérez JR, Melendre PM, Aguilera A (2003) Advantages of artificial reproduction techniques for white-clawed crayfish (*Austro-*

- potamobius pallipes* Lereboullet). **Bull. Fr. Pêche Piscic.** **370-371**, 181-184.
- Carral JM, Pérez JR, Celada JD, Sáez-Royuela M, Melendre PM, 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 JM, González A, Celada JD, Sáez-Royuela M, Melendre PM, 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.
- Celada JD, Gaudioso VR, Paz P, Fernandez R (1985) Identification et chronologie des phases de développement des œufs de l'écrevisse (*Pacifastacus leniusculus* Dana) par observation directe. **La Pisciculture Française** **82**, 5-8.
- Celada JD, Paz P, Gaudioso VR, Fernandez R (1987) Embryonic development of the freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana): a scanning electron microscopic study. **The Anat. Rec.** **219**, 304-310.
- Celada JD, Carral JM, Gaudioso VR, 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 JD, Carral JM, Gaudioso VR, 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 JD, Carral JM, 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 JD, Carral JM, Gaudioso VR, 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(1)**, 108-111.
- Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, Gaudioso VR, Muñoz MC, Pérez JR (1994) Investigación sobre cangrejos de río en la Universidad de León. **Anales de la Facultad de Veterinaria** **38**, 55-70.
- Celada JD, González J, Carral JM, Fernández R, Pérez JR, Sáez-Royuela M (2000) Storage and transport of embryonated eggs of the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. **N. Am. J. Aquac.** **62**, 308-310.
- Celada JD, Carral JM, Saez-Royuela M, Muñoz C, Perez JR (2001a) 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 JD, Carral JM, Perez JR, Sáez-Royuela M, Muñoz C (2001b) Successful storage and transport of eggs of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet). **Aquacult. Int.** **9**, 269-276.
- Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, Melendre PM, Aguilera A (2004) Effects of different antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs. **Aquaculture** **239**, 249-259.
- Celada JD, Antolín JI, Carral JM, 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 JD, Antolín JI, Carral JM, Pérez JR, 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 JD, Aguilera A, Carral JM, Sáez-Royuela M, Melendre PM (2008) Rearing tench (*Tinca tinca* L.) larvae on live feed (*Artemia*) and on two transition schedules from live to dry diets. **J. Appl. Ichthyol.** **24**, 595-600.
- Coche AG, Muir JF (1998) **Management for freshwater fish culture: fish stocks and farm management**. F.A.O. training series 21/2, Rome.
- Coll J (1983) **Acuicultura marina animal**. Mundi-Prensa, Madrid, España, 670 p.
- Coyle S, Tidwell JH, Vanarnum A, Bright LA (2003) A comparison of two feeding technologies in freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, raised at high biomass densities in temperate ponds. **J. Appl. Aquac.** **14(1/2)**, 125-135.
- Cukerzis JM (1964) Experiment of incubation of crayfish eggs. **Akad. Naut. Lithuan. SSR C1** **33**, 87-93.
- Cukerzis JM (1969) Larval ecology and physiology of *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*. **Inst. Zool. Bot. Ac. Sci. Eston. SSR**, Tallin, pp. 171-177.
- Cukerzis JM, Sheshtokas J, Terentyev AL (1979). Method for accelerated artificial breeding of crayfish juveniles. **Freshwater Crayfish IV**, 451-458.
- Cukerzis JM (1984) **La biologie de l'écrevisse (*Astacus astacus* L.)**. INRA, Versailles.
- Cukerzis JM (1988) *Astacus astacus* in Europe. En: Holdich DM, Lowery RS (Eds.) **Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation**. Croom Helm, London, pp. 309-340.
- D'Abramo LR, Wright JS, Wright KH, Bordner CE, Conklin DE (1985) Sterol requirements of cultured juvenile crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Aquaculture** **49**, 245-255.
- D'Abramo LR, Robinson EH (1989) Nutrition of crayfish. **Rev. Aquat. Sci.** **1(4)**, 711-728.
- D'Abramo LR, Castell JD (1997) Research methodology. En: D'Abramo LD, Conklin DE, Akiyama D (Eds.) **Crustacean Nutrition**. Advances in World Aquaculture 6, World Aquaculture Society, Barton Rouge, Louisiana, The United States, pp. 3-25.
- D'Abramo LR, New MB (2000) Nutrition, feeds and feeding. En: New MB, Valenti WC (Eds.) **Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii***. Oxford, England, Blackwell Science, pp. 203-220.
- Daniels WH, D'Abramo LR (1994) Pond production characteristics of freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* as influenced by the stocking of size-graded populations of juveniles. **Aquaculture** **122**, 33-45.
- Daniels WH, D'Abramo LR, Fondren MW, Durant MD (1995) Effects of stocking density and feed on pond production characteristics and revenue of harvested freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* stocked as size-graded juveniles. **J. World Aquacult. Soc.** **26**, 38-47.
- Davis KB (2006) Management of physiological stress in finfish 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 VII**, 267-270.
- D.P.I. (Departamento de Industrias Primarias de Queensland) (1993) **Overview of red-claw (*Cherax quadricarinatus*)**. Fisheries Information Leaflet, Department of Primary Industries, Queensland, Australia, 1p.
- Edgerton BF, Owens L (1997) Age at first infection of *Cherax quadricarinatus* by *Cherax quadricarinatus* bacilliform virus and *Cherax Giardivirus*-like virus, and production of putative virus-free crayfish. **Aquaculture 152**, 1-12.
- Edgerton BF, Owens L (1999) Histopathological surveys of the redclaw freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Australia. **Aquaculture 180**, 23-40.
- Edsman L, Jonsson A (1996) The effect of size, antennal injury, ownership, and ownership duration on fighting success in male signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana). **Nordic. J. Freshw. Res. 72**, 80-87.
- FAO, 2008. Estado Mundial de la pesca y la acuicultura – Parte 1: **Examen mundial de la pesca y la acuicultura**. Departamento de Acuicultura y Pesca de la Fao. Roma, 93 pp.
- Farrell P, Leonard B (2000) Frequent handling adversely affects the growth of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor*. **J. Appl. Aquacult. 10**, 29-36.
- Frost JV (1975). Australian crayfish. **Freshwater Crayfish II**, 87-96.
- Fujimura T, Okamoto H (1970) **Notes on progress made in developing a mass culturing technique for *Macrobrachium rosenbergii* in Hawaii**. Indo-Pac. Fish. Counc. Proc., 14th Sesión, Bangkok, Tailandia, Sym. 53, 17 pp.
- García-Ortega A, Verreth J, Coutteau P, Segner H, Huisman EA, Sorgeloos P (1998) Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. **Aquaculture 161**, 501-514.
- García-Ortega A, Koussoulaki A, Boer H, Verreth J (2000) In vitro protein digestibility of *Artemia* decapsulated cysts and nauplii, and of microbound diets for larval fish. **Aquac. Res. 31**, 475-478.
- Gherardi F (2002) Behaviour. En: Holdich DM (Ed) **Biology of Freshwater Crayfish**. Oxford, Blackwell, pp. 152-191.
- González J, Carral JM, Celada JD, Sáez-Royuela M, Gaudioso VR, Fernández R, López-Baissón C (1993) Management of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) for intensification of juvenile production. **Freshwater Crayfish IX**, 144-146.
- González Á, Celada JD, González R, García V, Carral JM, 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 Á, Celada JD, González R, García V, Carral JM, Sáez-Royuela M (2010a) Increasing density in artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). **Freshwater Crayfish XVII**, 19-21.
- González Á, Celada JD, Melendre PM, Carral JM, Sáez-Royuela M, González R, García V (2010b) Effects of different bronopol treatments on final survival rates in the artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). **Aquaculture**. En prensa.
- González R, Celada JD, González Á, García V, Carral JM, Sáez-Royuela M (2009a)

- 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.** doi: 10.1007/s10499-009-9250-x.
- González R, Celada JD, Carral JM, González Á, Sáez-Royuela M, García V (2009b) Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different food supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. **Aquaculture** **295**, 200-204.
- Gydemo R, Westin L (1989) Growth and survival of juvenile *Astacus astacus* L. at optimized water temperature. En: de Pauw N, Jaspers E, Ackefors H, Wilkins N (Eds.) **Aquaculture - A Biotechnology in Progress**. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 383-391.
- Henttonen P, Huner JV, Lindqvist OV, Henttonen L, Pitkaniemi 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 IX**, 426-441.
- Hill L, Cancienne EA (1963) **Grow crawfish in rice fields**. Louisiana Agricultural Extension Service Publication 1346, 11p.
- Hobbs HH Jr (1972) Crayfishes (Astacidae) of North and Middle America. En: **Biota of Freshwater Ecosystems Identification Manual**, **9**: i-x, 1-173. Water Poll. Res. Contrl., Ser., Washington, D.C.
- Hobbs HH Jr, Jass JP, Huner JV (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 JB (1986a) A report of some of the first introductions of *Pacifastacus leniusculus* into the UK. **Freshwater Crayfish VI**, 134-145.
- Hogger JB (1986b) Aspects of the introduction of "signal crayfish" *Pacifastacus leniusculus* (Dana), into the southern United Kingdom. 1. Growth and survival. **Aquaculture** **58**, 27-44.
- Hogger JB (1988) Ecology, population biology and behaviour. En: Holdich DM, Lowery RS (Eds.) **Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation**. Croom Helm, Londres, Inglaterra, pp. 114-144
- Holdich DM (2002) Background and functional morphology. En: Holdich DM (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Oxford, Blackwell, pp. 3-29.
- Honan JA, Mitchell BD (1995) Reproduction of *Euastacus bispinosus* Clark (Decapoda: Parastacidae), and trends in reproductive characteristics of freshwater crayfish. **Mar. Freshwater Res.** **46**, 485-499.
- Huner JV (2002) *Procambarus*. En: Holdich DM (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Oxford, Blackwell, pp. 541-584.
- Järvenpää T (1995) Artificial incubation of crayfish eggs on moving tray (abstract). **Freshwater Crayfish VIII**, 716.
- Jones CM (1995) Production of juvenile red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae). I. Development of hatchery and nursery procedures. **Aquaculture** **38**, 221-238.
- Karani I, Kitsos MS, Chartosia N, Koukouras A (2005) Diet composition of the penaeid shrimp, *Melicerthus Kerathurus* (Forskål, 1775) (Decapoda, Penaeidae) in the Aegean Sea. **Crustaceana** **78**(4), 385-396.
- Karlsson AS (1994) Restoration of crayfish waters in Europe with foreign species. Ex-

- periences and practical aspects. En: **Jornadas sobre conservación y reintroducción del cangrejo de río**, Oyeregui (Navarra), 17-18 de marzo de 1994, 13 pp.
- Kitancharoen N, Yamamoto A, Hatai K (1997) Fungicidal effect of hydrogen peroxide on fungal infection of rainbow trout eggs. **Mycoscience** **38**, 375-378.
- Köksal G (1988) *Astacus leptodactylus* in Europe. En: Holdich DM, Lowery RS (Eds.) **Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation**. Croom Helm, London, pp. 365-400.
- Koshio S, O'Dor RK, Castell JD (1990) The effects of different dietary energy levels on growth and survival of eyestalk ablated and intact juvenile lobsters *Homarus americanus*. **J. World Aquacult. Soc.** **21(3)**, 160-169.
- Lacaze C (1970) **Crawfish farming**. Louisiana Wildlife and Fisheries Commission, Fisheries Bulletin 7, 20 p.
- Lahti E, Lindqvist OV (1983) On the reproductive cycle of the crayfish *Astacus astacus* L. in Finland. **Freshwater Crayfish V**, 18-26.
- Laurent PJ (1988) *Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium* with observations on their interactions with other species in Europe. En: Holdich DM, Lowery RS (Eds.) **Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation**. Croom Helm, London, pp. 341-364
- Lawrence C, Jones C (2002) *Cherax*. En: Holdich DM (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Oxford, Blackwell, pp. 635-669.
- Lee DO'C, Wickins JF (1992) **Crustacean Farming**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Gran Bretaña, 392 p.
- Leitritz E, Lewis RC (1976) Trout and salmon culture: hatchery methods. California Department of Fish and Game. **Fish Bulletin** **164**, 197 p.
- Løkkeborg S (1990) Rate of release of potential feeding attractants from natural and artificial bait. **Fish. Res.** **8**, 253-261.
- Mackevicienė G, Mickėnienė L, Burba A, Korieva G (1997) Aquaculture of the noble crayfish *Astacus astacus* L. in Lithuania. **Freshwater Crayfish XI**, 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 XII**, 462-470.
- Marques HL de A, Lombardi JV, Boock MV (2000) Stocking densities for nursery phase culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in cages. **Aquaculture** **187**, 127-132.
- Martínez-Porchas M, Martínez-Córdova LR, Ramos-Enríquez R (2009) Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. **Revista electrónica de veterinaria** **10(10)**, 16 p.
- Martins CIM, Schrama JW, Verreth JAJ (2006) The relationship between individual differences in feed efficiency and stress response in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture** **256**, 588-595.
- Mason JC (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 JC (1977a) Reproductive efficiency of *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in culture. **Freshwater Crayfish III**, 101-117.
- Mason JC (1977b) Artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana). **Freshwater Crayfish III**, 119-132.

- Mason JC (1979) Effects of temperature, photoperiod, substrate and shelter on survival, growth and biomass accumulation of juvenile *Pacifastacus leniusculus* in culture. **Freshwater Crayfish IV**, 73-82.
- Matthews M (1992) **Reproduction, growth and aquaculture potential of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet)**. Tesis Doctoral, Universidad de Dublín, Irlanda, 222 p.
- Matthews M, Reynolds JD (1995) The *in vitro* culture of crayfish eggs using a recirculating airlift incubator. **Freshwater Crayfish VIII**, 300-306.
- McDonnell GE, Russell D (1999) Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** **12**, 147-179.
- McDonnell G (2007) **Antisepsis, Disinfection and Sterilization: Types, Action and Resistance**. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Melendre PM, Celada JD, Carral JM, 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 PM, Celada JD, Carral JM, 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.
- Momot WT (1991) Potential for exploitation of freshwater crayfish in coolwater systems: management guidelines and issues. **Fisheries** **16(5)**, 14-21.
- Morrissy NM (1974) Spawning variation and its relationship to growth rate and density on the marron, *Cherax tenuimanus* (Smith). **Fisheries Research Bulletin Western Australia** **16**, 1-32.
- New MB (1990) Freshwater prawn culture: a review. **Aquaculture** **88**, 99-143.
- New MB (2002) **Farming freshwater prawns. A manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)**. FAO Fisheries Technical Paper 428. FAO, Rome.
- Nylund V, Westman K (1992) Crayfish diseases and their control in Finland. **Finnish Fish. Res.** **14**, 107-118.
- Nyström P (1994) Survival of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in relation to light intensity and density. **Nordic J. Freshw. Res.** **69**, 162-166.
- Nyström P (2002) Ecology. En: Holdich DM (Ed) **Biology of freshwater crayfish**. Oxford, Blackwell, pp. 192-235.
- O'Keefe C (1986) **The ecology of two populations of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) in Ireland**. Thesis, University of Dublin, 254 p.
- Oluoch AO (1990) Breeding biology of the Louisiana Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii* Girard in Lake Naivasha, Kenya. **Hydrobiologia** **208**, 85-92.
- Paris P (1911) Essai d'incubation artificielle des oeufs d'écrevisse. **Bull. Soc. Nat. D'Aclim. Fr.** **58**, 56-58.
- Peeke HVS, Sippel J, Figler MH (1995) Prior residence effects in shelter defense in adult signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* (Dana)): results in same- and mixed-sex dyads. **Crustaceana** **68**, 873-881.
- Pérez JR, Carral JM, Celada JD, 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 JR, Celada JD, Carral JM, 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 JR, Carral JM, Celada JD, Sáez-Royuela M, Romero MP (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 JR, Carral JM, Celada JD, Sáez-Royuela M, Muñoz C, Antolín JI (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 JR, Carral JM, Celada JD, Muñoz C, Sáez-Royuela M, Antolín JI (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 JR, Celada JD, González J, Carral JM, 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.
- Polícar T, Kozák P, Martín J (2006) Effects of egg bath and daily removal of dead eggs on hatching success and production of stage 2 juveniles during artificial incubation in noble crayfish (*Astacus astacus* L.). **Bull. Fr. Pêche Piscic.** **380-381**, 1197-1206.
- Prodöhl PA, Jørstad KE, Triantafyllidis A, Katsares V, Triantaphyllidis C (2006) European lobster – *Homarus gammarus*. **GenImpact final scientific report**, 91-98.
- 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 ChR (Ed.) **Freshwater Crayfish V**. 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 PI (Eds.) **Crayfish Culture in Europe**. Report from the Workshop on Crayfish Culture, 16-19 Nov. 1987, Trondheim, Noruega, pp. 69-78.
- Qin JG, Ingerson T, Geddes MC, Kumar M, Clarke S (2001) Size grading did not enhance growth, survival and production of marron (*Cherax tenuimanus*) in experimental cages. **Aquaculture** **195**, 239-251.
- Ranta E, Lindström K (1992) Power to hold sheltering burrows by juveniles of the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. **Ethology** **92**, 217-226.
- Reichenbach H (1886) Studien zur Entwicklungsgeschichte des Flusskrebse. **Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft** **14**, 1-137.
- Reynolds JD, Celada JD, Carral JM, Matthews MA (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 JD (2002) Growth and Reproduction. En: Holdich DM (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Oxford, Blackwell, pp. 152-191.
- Rhodes CP (1981) Artificial incubation of the eggs of the crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. **Aquaculture** **25**, 129-140.

- Ribeiro FALT, Jones DA (1998) The potential of dried, low-hatch, decapsulated *Artemia* cysts for feeding prawn post-larvae. **Aquacult. Int.** **6**, 421-440.
- Robertson L, Lawrence AL, Castille FL (1993) Effect of feeding frequency and feeding time on growth of *Penaeus vannamei* (Boone). **Aquaculture Research** **24(1)**, 1-6.
- Sáez-Royuela M (1994) **Supervivencia y crecimiento de juveniles de los astácidos *Austropotamobius pallipes* Lereboullet y *Pacifastacus leniusculus* Dana a partir del estado 2 en condiciones de laboratorio.** Tesis Doctoral, Ed. Universidad de León, España, 322 p.
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Muñoz C (1995) Effects of management on survival and growth of stage 2 juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under laboratory conditions. **Aquaculture** **133**, 123-133.
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Muñoz C, Pérez JR (1996) Modified photoperiod and light intensity influence on survival and growth of stage 2 juvenile signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **J. Appl. Aquac.** **6(3)**, 33-37.
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Pérez JR (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. **Aquacult. Int.** **9**, 489-497.
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Pérez JR, González A (2006) Pleopodal egg production of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet under laboratory conditions: relationship between egg number, egg diameter and female size. **Bull. Fr. Pêche Piscicult.** **380-381**: 1207-1214.
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Pérez JR, González A (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 PM, Celada JD, Carral JM, 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.
- Sammy N (1988) Breeding biology of *Cherax quadricarinatus* in the Northern Territory. **Proceedings of the 1st Australian Shellfish Aquaculture Conference.** Curtin University of Technology, Perth, Western Australia, pp. 79-88.
- Sandifer PA, Smith TIJ (1976) **Experimental aquaculture of the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, in South Carolina, USA.** FAO Technical Conference on Aquaculture, Kyoto, Japan 26 May-2 June 1976, 9 p.
- Sandifer PA, Smith TIJ (1985) Freshwater prawns. En: Huner JV, Brown EE (Eds.) **Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States.** Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut. USA, pp. 266-271.
- 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. **Aquac. Res.** **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.

- Schmalenbach I, Buchholz F, Franke H-D, Saborowski R (2009) Improvement of rearing conditions for juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) by co-culturing with juvenile isopods (*Idotea emarginata*). **Aquaculture** **289**, 297-303.
- Schreier TM, Rach JJ, Howe GE (1996) Efficacy of formalin, hydrogen peroxide and sodium chloride on fungal infected rainbow trout eggs. **Aquaculture** **140**, 323-331.
- Shleser R (1974) Studies of the effects of feeding frequency and space on the growth of the American lobster, *Homarus americanus*. **Proc. World Maricul. Soc.** **5**, 149-155.
- Shleser R, Gallagher M (1974) Formulations of rations for the American lobster, *Homarus americanus*. **Proc. World Maricul. Soc.** **5**, 157-164.
- 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 DM (Ed.) **Biology of freshwater crayfish**. Oxford, Blackwell, pp. 467-510.
- Sorgeloos P, Coutteau P, Dhert P, Merchie G, Lavens P (1998) Use of brine shrimp, *Artemia spp.*, in larval crustacean nutrition: a review. **Rev. Fish. Sci.** **6**, 55-68.
- Southgate P (1993) Disease in Aquaculture. En: Brown L (Ed.) **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Pergamon Press Ltd, Headington Hill Hall, Oxford, pp. 91-129.
- Spanier E, McKenzie TP, Cobb JS, Clancy M (1998) Behavior of juvenile American lobsters, *Homarus americanus*, under predation risk. **Marine Biology** **130**, 397-406.
- Stael M, Sanggontanagit T, Van Ballaer E, Puwapanich N, Tunsutapanich A, Lavens P (1995) Decapsulated cysts and *Artemia* flakes as alternative food sources for the culture of *Penaeus monodon* postlarvae. En: Lavens P, Jaspers E, Roelants I (Eds.) Larvi'95 - Fish and Shellfish Larviculture Symposium, Gent, Belgium. **European Aquaculture Society, Special publication No. 24**, pp. 342-345.
- Stephenson H, Gabela M, Barnes ME (2003) Microbial inhibition in response to treatments of hydrogen peroxide and formalin on landlocked fall chinook salmon eyed eggs, as determined by scanning electron microscopy. **N. Am. J. Aquac.** **65**, 324-329.
- Strand Å, Alanärä A, Magnhagen C (2007) Effect of group size on feed intake, growth and feed efficiency of juvenile perch. **J. Fish Biol.** **71(2)**, 615-619.
- Streissl F, Hödl W (2002) Habitat and shelter requirements of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* Schrank. **Hydrobiologia** **477**, 195-199.
- Strempele KM (1973) Edelkrebserbrütung in Zuger-Gläsern und Anfütterung der Krebsbrut. **Freshwater Crayfish I**, 234-238.
- Subramanian P, Amutha C, Kannan R (2005) Impact of photoperiod on molt and growth of the juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. **Exp. Zool. India** **8** (Abstract).
- Suko T (1956) Studies on the development of the crayfish. IV.- The development of winter eggs. **Sci. Rept. Saitama Univ., Series B**, **2(2)**, 213-219.
- Taugbøl T, Skurdal J (1990) 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 (1992) Growth, mortality and molting rate of noble crayfish *Astacus*

- astacus* L. juveniles in aquaculture experiments. **Aquacult. Fish. Manag.** **23**, 411-420.
- Tidwell JH, Coyle SD, Bright LA, Vanarnum A, Weibel C (2003) The effects of size grading and length of nursery period on growth and population structure of freshwater prawns stocked in temperate zone ponds with added substrates. **Aquaculture** **218**, 209-218.
- Tidwell JH, Coyle SD, Dasgupta S (2004) Effects of stocking different fractions of size graded juvenile prawns on production and population structure during a temperature-limited growout period. **Aquaculture** **231**, 123-134.
- Van Olst JC, Carlberg JM, Ford RF (1975) Effects of substrate type and other factors on the growth, survival, and cannibalism of juvenile *Homarus americanus* in mass rearing systems. **Proc. Annu. Meet. World Maricult. Soc.** **6**, 261-274.
- Van Olst JC, Carlberg JM (1978) The effects of container size and transparency on growth and survival of lobster cultured individually. **Proc. World Maricult. Soc.** **9**, 469-479.
- Van Stappen G (1996) Use of cysts. En: Lavens P, Sorgeloos P (Eds.) **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper 361, FAO, Rome, pp. 107-136.
- Vanhaecke P, De Vrieze L, Tackaert W, Sorgeloos P (1990) The use of decapsulated cysts of the brine shrimp *Artemia* as direct food for carp *Cyprinus carpio* L. larvae. **J. World Aquac. Soc.** **21(4)**, 257-262.
- Waddy SL (1988) Farming the homarid lobsters: state of the art. **World Aquac.** **19**, 63-71.
- Walne PR (1977) **The potential for the culture of crustacean in salt water in the United Kingdom**. Lab. Leaflet, MAFF Direct. Fish. Res., Lowestoft, No. 40, 15 p.
- Whangchai N, Ungsethaphand T, Chitmanat C, Mengumphan K, Uraivan S (2007) Performance of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) Reared in Earthen Ponds Beneath Plastic Film Shelters. **Chiang Mai J. Sci.** **34(1)**, 89-96.
- Wickins JF (1972) Experiments on the culture of the spot prawn *Pandalus platyceros* and the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish. Invest. Minist. Agric. Fish. Food G.B. (2 Sea Fish.)**, **27(5)**, 23 p.
- Withyachumnarnkul, Poolsanguan B, Poolsanguan W (1990) Continuous darkness stimulates body growth of the juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* De Man. **Chronobiol. Int.** **7(2)**, 93-97.
- Woodlock B, Reynolds JD (1988) Laboratory breeding studies of freshwater crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). **Freshwater Biology** **19**, 71-78.

14. AGRADECIMIENTOS

Después de todos estos años de arduo trabajo, de buenos y malos momentos y de experiencias inolvidables con personas que de otra manera no hubiese podido conocer, finalmente aquí está. Esta Tesis Doctoral tiene para mí un significado especial. Además de haberme aportado conocimientos relacionados con el área de Producción Animal, me ha permitido crecer como persona y sentirme orgullosa de mi trabajo. Confío en la aplicación práctica de este estudio y en que haya gente que lo sepa valorar debidamente.

A continuación quiero hacer referencia a todas aquellas personas que, de manera directa o indirecta, han sido fundamentales en el desarrollo de esta Tesis y sin las cuales todo hubiese sido mucho más difícil.

Al Dr. **Jesús Domingo Celada Valladares**, director de esta Tesis Doctoral, por su esfuerzo y dedicación a lo largo de estos cuatro años. Sus conocimientos y sus orientaciones han sido clave en mi formación pero, en particular, valoro su persistencia y rigor académico. Le agradezco sinceramente la confianza que ha depositado en mí al brindarme esta oportunidad, que tantas cosas positivas me ha aportado.

Al Dr. **José Manuel Carral Llamazares**, codirector de esta Tesis Doctoral, y a la Dra. **María Sáez-Royuela Gonzalo**, Profesora Titular del Departamento de Producción Animal, por sus consejos, ayuda y apoyo no sólo en el ámbito académico sino también en el personal, que para mí es igual o más importante. Les agradezco su actitud receptiva ante las opiniones, ideas o cambios planteados, pero lo que valoro especialmente es su cercanía que ha hecho de la palabra “jefe” algo agradable al oído.

Al **Ministerio de Educación y Ciencia** por el soporte económico prestado a lo largo de estos cuatro años a través del proyecto del Plan Nacional de I+D+i AGL2005-01127 “Técnicas de cría de juveniles de astácidos (*Pacifastacus leniusculus* Dana) en condiciones controladas” y de una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, con referencia AP2005-4860.

A la astacifactoría **Quiñón S.A.** (San Esteban de Gormaz, Soria) por su ayuda y colaboración, especialmente en el abastecimiento de efectivos animales.

A la Lda. **Jessica Martín Hernán** por sus consejos, su apoyo y su buena acogida a mi llegada al departamento. Su ayuda en el desarrollo de parte de los procesos experimentales ha sido fundamental, pero lo que más aprecio y recuerdo de ese primer año es su compañerismo y el buen ambiente de trabajo creado.

Al Ldo. **Álvaro González Martín** por su directa colaboración en el desarrollo de los procesos experimentales a lo largo de estos cuatro años.

A los técnicos de laboratorio **Pedro De Vega Álvarez** y **Faustino García Olmos** por su ayuda en las labores de mantenimiento de los juveniles.

Al Dr. **Lennart Edsman**, investigador principal en el Institute of Freshwater Research (Swedish Board of Fisheries) en Drottningholm (Suecia), al Dr. **Ravi Fotedar**, Profesor Asociado en Curtin University of Technology, Perth (Australia) y a la Dra. **Paula Henttonen**, Profesora Titular del Departament of Biosciences, University of Kuopio (Finlandia) por haberme permitido formar parte de sus equipos de investigación durante unos meses. Su hospitalidad, acogida a mi llegada, paciencia y constante preocupación por mi bienestar hicieron que me sintiese como en casa, por lo que les estoy muy agradecida. La posibilidad de intervenir en otros estudios y de intercambiar experiencias con gente tan diversa ha sido muy positivo, ya que no sólo ha contribuido a mi formación en el ámbito científico sino que me ha permitido también crecer como persona. Gracias a todos mis compañeros de trabajo: Anna, Jenny, Patrik, Roseana, Teresa, Julieta... que tantas cosas nuevas me han enseñado y con los que tanto me he reído.

A mis amigas **Lucía Peteira Fernández**, **María Rey Insua** y **María Álvarez Sáez**, por haberme soportado todos estos años. Su paciencia, sinceridad y transparencia son dignas de admiración. Han sido unas de las pocas personas a las que he recurrido en los momentos difíciles y las que siempre han estado cuando más lo he necesitado, por todo eso merecen mi más sincero agradecimiento. Por vuestro apoyo constante y, sobre todo, por haber confiado en mí, gracias.

A **Laura Chova Martí**, **Rosa María Gregori Escrivá** y **Roberto Riaño Suárez** por tantas cosas... Por encontrar siempre una sonrisa al final del día, por su apoyo y sus consejos, por su paciencia, por su tolerancia y, en general, por la convivencia. Gracias por haberme hecho la vida más fácil durante este último año y medio, por escucharme cuando lo necesité y por hacerme ver las cosas siempre desde el lado positivo. Laura, gracias por tus abrazos.

A **Laura González Garrido**, **Eva Santolaya Meca**, **Alejandra Morán Ordóñez** y **Cynthia Cenzano** por los buenos momentos. Su alegría y su forma particular de ver la vida me han permitido evadirme del trabajo y darme el empujón necesario para seguir adelante. Gracias a todas por vuestro apoyo y por haber estado ahí.

Debido a la importancia que han tenido en el día a día a lo largo de estos cuatro años, las tres personas que menciono a continuación merecen mi agradecimiento más especial.

A la Lda. y futura doctora **Vanesa García Moreno**, porque sin ella esta Tesis no habría generado tantos buenos recuerdos. Por las largas jornadas de trabajo, por los intensos días de muestreo a temperaturas bajo cero, por su manera de trabajar, por el buen ambiente de trabajo y, especialmente, por todo lo que he aprendido de ella. Su colaboración ha sido fundamental en el desarrollo de todos y cada uno de los experimentos que componen este estudio, pero su apoyo y sus palabras de aliento en los momentos difíciles son los que merecen mi más profunda admiración y agradecimiento. Me considero una persona realmente afortunada por haberla tenido como compañera de trabajo y estoy muy orgullosa de poder contar con ella como amiga.

A mis padres **Justo González Rego** e **Isabel López Ferro**, a los que va dedicada esta Tesis por su amor incondicional, sus consejos y su espíritu de lucha que tan bien han sabido inculcarme. Por haberme soportado y escuchado cuando más lo he necesitado, por su bondad, humildad y sinceridad aunque duela son mi mejor ejemplo a seguir. Les agradezco de corazón su apoyo a lo largo de estos cuatro años y la confianza que siempre han tenido en mí. Isabel, gracias por las largas conversas que tan bien me hicieron sentir, por tu fuerza a pesar de todo e porque nadie me entiende mejor que tú. Sólo decir que espero os sintáis orgullosos de mí y que tengo mucha suerte de teneros como padres.

Finalmente, a todos aquellos que me habéis dado ánimos para continuar, por los momentos buenos y malos que he pasado con vosotros: **Álvaro, Bautista, Bea, Carlos, Elkin, Eva, David, Heike, Herminia, Iker, Ito, Javi, Jorge, Katta, Lucía, Manolo, María, Maricarmen, Miriam, Paco, Roberto, Sabela, Teresa...** También a los que no habéis podido llegar al final, pero que no por ello dejaréis de estar en mi recuerdo.

A todos,

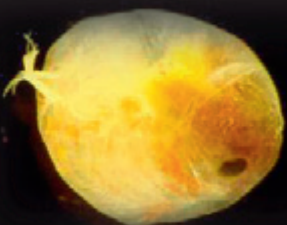
Gracias.

ANEXO

Publicaciones

- I. González R, Celada JD, García V, Carral JM, González A, Sáez-Royuela M (2009). The artificial incubation of crayfish eggs: review and report from an experimental study concerning the effects of offspring origin (maternal or artificial incubation) on the survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries** **19**, 167-176.
- II. González R, Celada JD, González A, García V, Carral JM, Sáez-Royuela M (2009). 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.
- III. González R, Celada JD, Carral JM, González A, Sáez-Royuela M, García V (2009). Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different food supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. **Aquaculture** **295**, 200-204.
- IV. González R, Celada JD, García V, González A, Carral JM, Sáez-Royuela M (2009). Shelter and lighting in the intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae), from the onset of exogenous feeding. **Aquaculture Research**. En revisión.
- V. González R, Celada JD, Carral JM, García V, Sáez-Royuela M, González A. (2010). Intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) during the first six months: Effects of size grading. **Aquaculture**. En revision.

I



The artificial incubation of crayfish eggs: review and report from an experimental study concerning the effects of offspring origin (maternal or artificial incubation) on the survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae)

Rocío González · Jesus D. Celada ·
Vanessa García · Álvaro González ·
José M. Carral · María Sáez-Royuela

Received: 28 April 2008 / Accepted: 4 August 2008 / Published online: 7 September 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract The development of artificial incubation techniques in astacid crayfish has attracted attention from scientists in many countries ever since the nineteenth century. It is only in the last few years that these techniques, along with studies on egg storage and transport, have provided reliable options for improving the reproductive phase in farming. The juveniles produced need to be reared until they reach a sufficient size both for restocking and for growing purposes. In view of the current level of knowledge of rearing juvenile astacids, two 80-day experiments were carried out under controlled conditions to compare the survival and growth of Stage 2 juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) from two origins: maternal or artificial incubation. In the first experiment, three treatments were tested: juveniles from artificially incubated eggs with formaldehyde treatments, juveniles from maternal incubation and a mixture from both origins (50% each). Survival rates ranged from 87.8% to 93.3% with no significant differences among treatments. Crayfish from artificial incubation grew significantly faster (11.47 mm carapace length (CL), 373.80 mg weight) than crayfish from maternal incubation. In the second experiment, a

bifactorial design included four treatments: the crayfish was derived from artificial or from maternal incubation and was fed once a day or twice a day. Final survival rates ranged from 68.89% to 77.78%, with no significant differences among treatments. Crayfish from artificial incubation grew significantly faster than crayfish from maternal incubation. The highest CL (14.54 mm) and weight (780.13 mg) were reached by the juveniles from artificial incubation that were fed once a day. No significant differences were found between the two feeding frequencies. Results showed that artificial incubation with formaldehyde treatments had no harmful effects and made it feasible to get a better performance from the juveniles obtained.

Keywords Astacid crayfish ·
Pacifastacus leniusculus · Artificial incubation ·
Juvenile rearing · Offspring origin

Introduction

There are more than 540 recognised species of crayfish, which exhibit a circum-temperate distribution and are native to every continent except Africa and Antarctica (Hobbs 1988). Currently crayfish fauna comprise three families, Astacidae, Cambaridae and Parastacidae, and 29 genera. The family Astacidae occurs in Europe, western Asia (to the west of the Ural

R. González (✉) · J. D. Celada · V. García ·
Á. González · J. M. Carral · M. Sáez-Royuela
Departamento de Producción Animal, Universidad de
León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain
e-mail: rgonl@unileon.es

Mountains) and in western North America (Taylor 2002). The family Cambaridae occurs in North America (except for the Pacific slope of the western United States and Canada), in the far East of Asia and in Japan (Hobbs 1988). The family Parastacidae, also known as Southern Hemisphere crayfish, occurs in Australia, New Guinea, New Zealand, Madagascar and in southern South America (Hobbs 1988).

The family Astacidae comprises three genera with three species of *Astacus* and two species of *Austropotamobius* in Europe or western Asia (Gherardi and Holdich 1999), whereas the other genus (*Pacifastacus*), with four extant species, is endemic to western North America. The signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, has been introduced into new habitats in North America, Europe and Japan (Lewis 2002) for both restocking and aquaculture purposes. The reproductive activity of astacid crayfish is subject to an annual cyclic chronology. The drop in water temperature and photoperiod at the end of summer determines the beginning of sexual activity in September–October. In the wild, after mating and spawning, eggs remain attached to the maternal pleopods for 4–10 months (Reynolds 2002), depending on the mean water temperature and the species. After hatching, the juvenile Stage 1 still remains attached to the mother until its first moult, whereupon juvenile Stage 2 appears and its independent life begins. This is known as maternal incubation.

The development of artificial incubation techniques in astacid crayfish has attracted attention from scientists and aquaculturists in many countries for a long time. The first attempts were carried out with *Astacus astacus* in Germany (Reichenbach 1886). Subsequently, Paris (1911) in France used trout incubators to incubate the eggs of *Austropotamobius pallipes*. Moreover, cyprinid incubation systems, such as inverted bottles, have been tried for eggs of *P. leniusculus* in the U.S.A. (Andrews 1904) and *A. astacus* in Germany (Hofer 1912—cited by Hofmann 1978; Stempel 1973), the Ukraine (Brodsky 1962, 1984) and Lithuania (Cukerzis 1964, 1984, 1988). The results reported only indicated survival rates after hatching. From a practical point of view, the total production of Stage-2 juveniles needs to be known as it represents the final result of the reproductive process. Data of this were provided by Mason (1977) from Canada, Rhodes (1981) from Great Britain and Köksal (1988) from Turkey, for

P. leniusculus, *A. pallipes* and *Astacus leptodactylus*, respectively, a device for salmonid egg incubation having been used. Other devices have been used for astacid crayfish. In Finland, Järvenpää (1995) reported a system of moving trays for the artificial incubation of *A. astacus* eggs. In Ireland, Matthews and Reynolds (1995) developed a re-circulating airlift incubator for eggs of *A. pallipes*. In both cases, efficiency data after the first moult were also reported.

It has been generally accepted that artificial incubation of astacid crayfish eggs can be performed successfully only by removing eggs at later stages of embryonic development. That limitation on the use of this technique led Carral et al. (1988, 1992) and Pérez et al. (1998a, 1998b, 1999) in Spain to seek possible solutions that would allow egg artificial incubation from earlier stages. Since an in-depth knowledge of embryonic development would allow the improvement of artificial incubation techniques by providing adequate conditions for the different phases, studies of Celada et al. (1985, 1987, 1991) were undertaken. Firstly, Carral et al. (1988) designed an incubator model for astacid eggs, which proved to be appropriate for carrying out later trials. In an attempt to shorten the period of maternal incubation by removing the eggs of *P. leniusculus* at earlier embryonic stages than those hitherto recommended, Carral et al. (1992) successfully incubated eggs from 18 days after spawning. These results proved that the success of artificial incubation does not depend solely on the stage reached in embryonic development, but rather on this and other factors such as the model of incubator used, incubation conditions and water quality. Later, Pérez et al. (1998a, 1998b, 1999) tested the same incubator with *A. pallipes*, reporting on the effects of thermal regime and the time at which eggs were stripped.

Apart from the Astacidae family, experiments in artificial incubation have also been carried out with species belonging to the other two families of freshwater crayfish: Parastacidae and Cambaridae. In Australia, Evans et al. (1993) and Henryon and Purvis (2000) incubated eggs of *Cherax tenuimanus* King (1993); Edgerton and Owens (1997) worked with *Cherax quadricarinatus* and Leonard et al. (2001) with *Cherax destructor*. In Japan, Nakata et al. (2004) carried out a study with *Cambaroides japonicus*.

Over the past few decades, artificial incubation techniques have been developed to improve the

reproductive phase in culture. Several authors refer to the advantages of this practice. This makes considerable savings of space, water and energy (Carral et al. 1992; Celada et al. 1994; Evans et al. 1993; González et al. 1993; Järvenpää 1995) feasible and may also avoid the loss of eggs due to their detachment from the maternal pleopods or to the mother's death (Arrignon 1981; Carral et al. 2003; Celada et al. 1994; Cukerzis 1969; Matthews and Reynolds 1995; Nakata et al. 2004; Pérez et al. 1998b, 1999; Rhodes 1981). This practice can also control the length of embryogenesis by means of appropriate temperature adjustments (Brodsky 1984; Carral et al. 1988, 1992; Celada et al. 1994; Pérez et al. 1998a). Moreover, artificial incubation can produce juveniles free of aphanomycosis from infected (Nylund and Westman 1992), as well as virus-free *C. quadricarinatus* (Edgerton and Owens 1997), while the use of biocide treatments may assist in obtaining disease-free offspring (Carral et al. 2003). Finally, artificial incubation offers a possibility of identifying the origin of offspring more accurately, which could be useful for genetic selection programmes (Carral et al. 2003).

Once efficient techniques for artificial incubation had been developed, the next step for an intensification of the reproductive processes was the study of the potential for storing and transporting live embryonated eggs. Such practices would allow the development of egg marketing, as well as staggered production of juveniles at hatchery centres over long periods of time. In this way, artificial incubation facilities would be more efficiently used. Furthermore, embryonic development continues while eggs are stored, without any expenditure of water or labour. Over the last few years, studies into techniques of egg storage and transport have been conducted. Celada et al. (2000) achieved successful storage for up to 28 days with eggs of *P. leniusculus*. In later investigations, Celada et al. (2001) achieved storage over a 42-day period with *A. pallipes*. Finally, Pérez et al. (2003) stated that the storage of signal crayfish eggs for up to 126 days at a constant refrigeration temperature is not detrimental to survival rates. In general, the combined use of artificial incubation, storage and transport techniques have important applications to the production of juvenile crayfish for both restocking and growing purposes (Carral et al. 2003).

During artificial incubation, dead eggs are usually invaded by fungi with an ability to spread to the surrounding healthy eggs. Although fungal proliferation can be controlled by means of the periodic removal of non-viable eggs (Carral et al. 2004; Policar et al. 2006), the administration of antifungal treatments is advisable. Malachite green has been the most effective fungicide used for many years in aquaculture. However, in 1991 the use of this chemical agent on food fishes and their eggs was forbidden in the U.S.A. and in 1997 it was banned in the European Union (Melendre et al. 2006). For this reason, other chemicals have been tested, and formaldehyde has proved to be the most effective in controlling fungal growth on crayfish eggs (Celada et al. 2004; Melendre et al. 2006, 2007). At present, this fungicide is approved for use in fish farming in the U.S.A. and the E.U. Although eggs are not negatively affected by the antifungal treatment, the long-term effects of biocides with a strong antimicrobial effect, such as formaldehyde (McDonnell and Russell 1999; McDonnell 2007; Stephenson et al. 2003), on juveniles are still unknown.

To date, the only comparison between juveniles derived from maternal or artificial incubation (without antifungal treatments) was performed by Sáez-Royuela et al. (1995) and no significant differences in survival and growth were found. Since then, several studies have been performed with astacid juveniles produced by artificial incubation (Policar et al. 2006; Sáez-Royuela et al. 2007; Savolainen et al. 2003, 2004). Regardless of origin, survival and growth after 2–3 months of independent life under controlled conditions showed great variability and, in general, high mortality (Ackefors et al. 1989; Celada et al. 1989, 1993; D'Abramo et al. 1985; Gydemo and Westin 1989; Nyström 1994; Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001; Savolainen et al. 2003). From recent results (Sáez-Royuela et al. 2007), it can be deduced that live feed supplementation from the onset of external feeding guarantees viability during the first few months of life.

Usually, diets tested with astacid juveniles have been supplied once a day or less frequently (Ackefors et al. 1989, 1992; Blake et al. 1994; Celada et al. 1989, 1993; Mason 1979; Nyström 1994; Sáez-Royuela et al. 1995, 1996; Savolainen et al. 2003, 2004; Taugbøl and Skurdal 1992). In a study carried out on this topic, Sáez-Royuela et al. (2001) reported

that an increase in the frequency of supplying food from once to twice a day allowed a slight improvement in growth figures.

The main problem in rearing juvenile astacid crayfish is the high mortality and slow growth during the first few months of independent life. Nowadays, research aims at getting past this phase while obtaining good survival and growth rates, which would allow the animals produced to be used for growing purposes or the enhancement of wild stocks with a greater likelihood of success. Furthermore, the information obtained during these early months can be applied to make feasible a grow-out phase under intensive conditions. Currently, artificial incubation techniques are able to produce Stage-2 juvenile crayfish, but it would be interesting to know if these animals perform like those derived from maternal incubation. Hence, the aim of this present work was to compare the survival and growth of juveniles from two origins: eggs attached to the females throughout the whole embryonic development (maternal incubation) or eggs stripped and artificially incubated under repeated treatments of formaldehyde. In addition, the frequency of food supply, either once or twice a day, was tested for offspring of both origins.

Materials and methods

Two 80-day experiments were carried out in indoor facilities with Stage-2 juveniles of *P. leniusculus* (mean carapace length (CL) 5.58 ± 0.03 mm and weight 30.4 ± 0.3 mg) hatched in the laboratory. Juveniles were placed in fibreglass tanks provided with shelters (one group of four jointed sections of P.V.C. pipe 4 cm long and 20 mm in diameter for every three animals) at a density of 100 crayfish/m². To avoid any escape of live feed, each tank was fitted with a 250 µm-mesh filter outlet. Aerated artesian well water was supplied as an open system, and each tank had its own water inlet and outlet. The quality parameters for the incoming water were: pH 7.9, hardness 18°f (calcium 72 mg/l), total dissolved solids 207.6 mg/l and total suspended solids 14.2 mg/l. Throughout the trial, oxygen content was measured in the tanks by means of a Sension6 dissolved Oxygen Meter produced by the Hatch Company (values approximately 7 mg/l, minimum 5.8 mg/l, maximum 7.7 mg/l). Ammonia and nitrites were measured with a Pocket-Photometer

Lasa Aqua from water samples taken inside the tanks (values were always <0.02 mg/l for ammonia and <0.05 mg/l for nitrites). The photoperiod was set by natural daylight (approximately 14 h light and 10 h dark). Tanks were cleaned twice a week.

Crayfish were fed a dry diet for salmonids (T-NUTRA-0, Skretting & Trouw España S.A., Cojobar, 09620, Burgos, Spain, with the composition data provided by the manufacturer being: crude protein 54%, crude fat 18%, crude cellulose 0.08%, ash 12%, total phosphorus 1.8%, vitamin A 10,000 international units (IU) per kilogram, D₃ 1500 IU/kg, vitamin E 150 mg/kg, pellet diameter 0.9–1.5 mm) supplied by hand moderately in excess (around 4% body weight) in such a manner that a small remainder of uneaten food could be always seen in the bottom. Live freshly-hatched *Artemia* nauplii (cysts of INVE Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium) were obtained daily to supplement the dry diet, starting at 500 nauplii per crayfish per day (later increased by 20% every 20 days). Cysts were decapsulated according to the method described by Van Stappen (1996). After verifying mean hatching rates, which coincided with the data provided by the supplier (250,000 nauplii per gram of cysts), supplement assessment was performed using known amounts of nauplii hatched in determinate water volumes and distributing them into the corresponding replicates.

Every 20 days, survivors were counted, excess water was removed with tissue paper and juveniles were weighed and measured individually. The animals were thereafter gently returned to their respective tanks. CL was measured with a digimatic calliper (to the nearest 0.01 mm) and individual wet weight (BW) was determined by means of a precision balance (to the nearest 0.1 mg). Specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) were expressed as $(\ln W_t - \ln W_i) \times 100/T$ and $(W_t - W_i) \times 100/W_i$, respectively, where W_t is the mean final weight (mg), W_i is the mean initial weight, and T is the duration of the experiment (in days). At the end of the experiments, survival percentages were calculated, samples of surviving crayfish were weighed and measured individually, total weight in each tank was recorded and final biomass (milligram per square decimetre) was calculated.

All experimental groups were in triplicate (three tanks per treatment). Results were examined by

analysis of variance (ANOVA) using the computer package SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, U.S.A). A Duncan test was applied to compare means at $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

Experiment 1

About 270 Stage-2 juveniles were placed in nine tanks (0.3 m² bottom and 0.1 m water depth). The flow rate was 0.5 l/min and feeding frequency was once a day. Water temperature was $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

In accordance with the different origins of offspring, three treatments were tested:

- Juveniles from eggs are artificially incubated for 70 days. In accordance with Melendre et al. (2006, 2007), formaldehyde was administered at 3,000 ppm for 15 min every other day up to the beginning of hatching.
- Juveniles maternally incubated under laboratory conditions. Eggs remained attached to the females throughout the whole period of embryonic development and no chemical treatment was performed.
- Mixed juveniles of the two origins (50% artificial incubation and 50% maternal incubation).

Every 20 days, 20 crayfish per replicate were sampled in order to record CL and weight. At the end of the experiment, all surviving crayfish were measured and weighed.

Experiment 2

About 180 Stage-2 juveniles were placed in twelve tanks (0.15 m² bottom and 0.1 m water depth). The

flow rate was 0.25 l/min. Water temperature was $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

On the basis of the origin of offspring and feeding frequency, a bifactorial design included four treatments: juveniles derived from artificial or maternal incubation and fed once or twice a day. Every 20 days, 10 animals per replicate were sampled to record CL and weight. At the end of the experiment, all surviving crayfish were measured and weighted.

Results

Experiment 1

Final survival and growth values are presented in Table 1. Survival rates ranged from 87.8% to 93.3%, with no significant differences among treatments. All checks from day 20 up to the end of the trial (day 80) showed no significant differences in the survival rates.

Regarding growth, the highest final CL (11.47 mm), weight (373.80 mg), SGR (3.05%), WG (1129.61%) and biomass (332.27 mg/dm²) were reached by the crayfish produced by artificial incubation, with significant differences from the others.

Figures 1 and 2 show the evolution of CL and weight over the 80 days of the experiment. All checks showed that animals derived from artificial incubation grew significantly faster than crayfish from maternal incubation. When both origins were mixed, growth figures were always higher than those for animals originating from maternal incubation and lower than those for animals derived from artificial incubation, significant differences being visible from day 60 onwards.

Table 1 Final survival and growth performance (80 days) of juvenile crayfish coming from different origins (experiment 1)

Origin	Maternal incubation	Mixing	Artificial incubation
Survival (%)	93.3 \pm 1.9 ^a	87.8 \pm 4.8 ^a	88.9 \pm 2.9 ^a
CL (mm)	9.88 \pm 0.13 ^a	10.82 \pm 0.13 ^b	11.47 \pm 0.16 ^c
BW (mg)	236.62 \pm 9.52 ^a	295.54 \pm 11.19 ^b	373.80 \pm 17.14 ^c
SGR (%)	2.48 \pm 0.05 ^a	2.77 \pm 0.05 ^b	3.05 \pm 0.05 ^c
WG (%)	678.35 \pm 31.30 ^a	872.19 \pm 36.82 ^b	1129.61 \pm 56.40 ^c
Biomass (mg/dm ²)	220.84 \pm 13.97 ^a	259.42 \pm 6.99 ^b	332.27 \pm 9.25 ^c

* Values are mean \pm SEM

* Values followed by the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$) from other in the same line

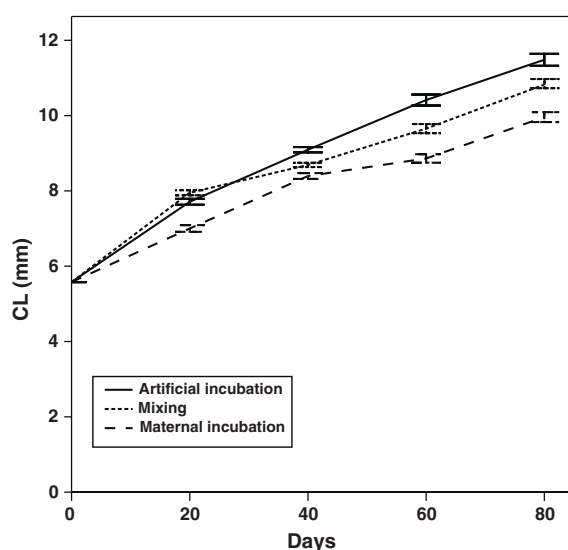


Fig. 1 Mean carapace length of juvenile crayfish coming from different origins at the 20 day checks from Experiment 1

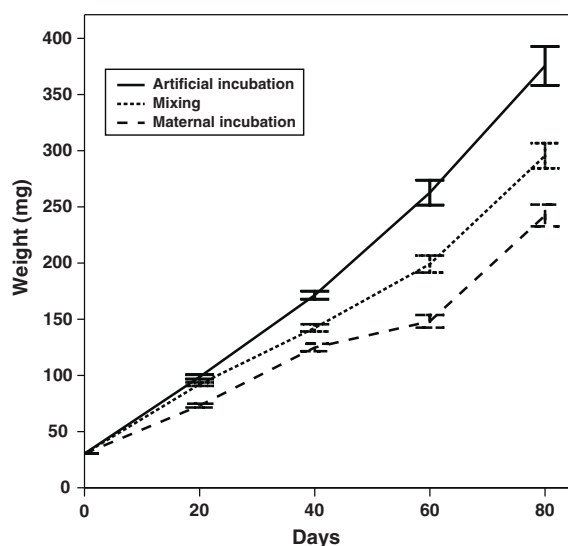


Fig. 2 Mean weight of juvenile crayfish coming from different origins at the 20 day checks from Experiment 1

Experiment 2

Final survival and growth values are presented in Table 2. Survival rates ranged from 68.9% to 77.8%, with no significant differences among treatments. All checks from day 20 up to the end of the trial (day 80) showed no significant differences in survival rates.

With respect to growth, crayfish derived from artificial incubation and fed once a day reached the

highest final CL (14.54 mm), weight (780.13 mg), SGR (3.94%), WG (2466.20%) and biomass (545.42 mg/dm²). There were no significant differences when they were compared to juveniles of the same origin fed twice a day.

If origin alone is taken into account, animals derived from artificial incubation grew significantly faster, with averages of 14.27 mm for CL and 750.02 mg for weight), than animals from maternal incubation, whose averages were 12.95 mm for CL and 520.57 mg for weight. Independent of origin of offspring, no differences were found between the two feeding frequencies (once or twice a day).

Figures 3 and 4 show the evolution of CL and weight over the 80 days of the experiment. All checks showed that crayfish artificially incubated grew significantly faster than crayfish maternally incubated.

Discussion

In most tests carried out with astacid crayfish during the first 2–3 months of independent life under controlled conditions, high mortalities have been recorded. Only three studies (Nyström 1994; Sáez-Royuela et al. 2007; Savolainen et al. 2004) reported high survival rates (around 80% after 100 days). The survival percentages in the study being reported here were in the same range, but in this case growth improved. The weight reached by crayfish derived from either maternal or artificial incubation (535.70 mg and 780.13 mg after 80 days, respectively) was higher than figures reported hitherto (Ackefors et al. 1992, 1995; Celada et al. 1993; D'Abramo et al. 1985; Gydemo and Westin 1989; Henttonen et al. 1993; Mason 1979; Nyström 1994; Sáez-Royuela et al. 1995, 2001, 2007; Savolainen et al. 2003, 2004; Taugbøl and Skurdal 1992). This is probably due to the improved feeding achieved by adding a supplement of *Artemia* nauplii to the dry diet used. According to Sáez-Royuela et al. (2007), live feed seems to be the source of some unknown nutritional factors required by juvenile astacid crayfish from the onset of external feeding.

It is known that feeding frequency can be an important factor, especially in younger animals. Since juveniles produced through artificial incubation grew faster in the first experiment, when the second experiment was being designed it was hypothesized

Table 2 Final survival and growth performance (80 days) of juvenile crayfish coming from maternal or artificial incubation fed once or twice a day (experiment 2)

Origin	Maternal incubation		Artificial incubation	
	Once a day	Twice a day	Once a day	Twice a day
Survival (%)	73.3 ± 0.0 ^a	68.9 ± 2.2 ^a	77.8 ± 2.2 ^a	73.33 ± 3.8 ^a
CL (mm)	12.89 ± 0.18 ^a	13.01 ± 0.11 ^a	14.54 ± 0.33 ^b	13.99 ± 0.35 ^b
BW (mg)	535.70 ± 41.70 ^a	505.43 ± 18.49 ^a	780.13 ± 53.11 ^b	719.91 ± 45.77 ^b
SGR (%)	3.48 ± 0.09 ^a	3.49 ± 0.04 ^a	3.94 ± 0.09 ^b	3.85 ± 0.10 ^b
WG (%)	1662.16 ± 137.18 ^a	1562.59 ± 60.81 ^a	2466.20 ± 174.69 ^b	2268.13 ± 150.56 ^b
Biomass (mg/dm ²)	332.98 ± 32.52 ^a	372.46 ± 43.41 ^{a,b}	545.42 ± 40.41 ^c	495.53 ± 49.14 ^{b,c}

* Values are mean ± SEM

* Values followed by the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$) from other in the same line

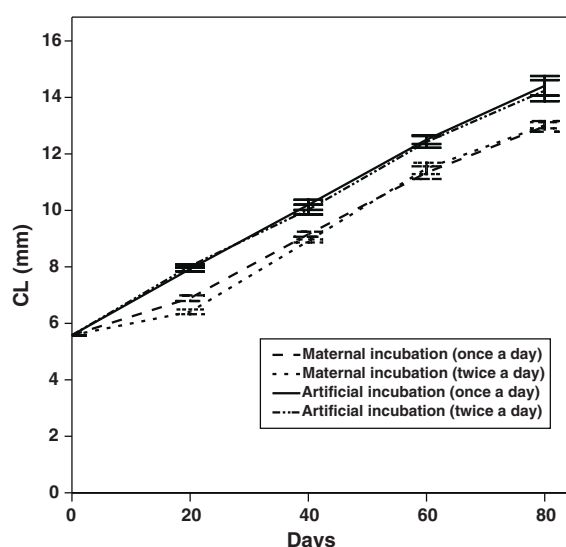


Fig. 3 Mean carapace length of juvenile crayfish coming from maternal or artificial incubation fed once or twice a day at the 20 day checks from Experiment 2

that the possible beneficial effect of this origin on growth could be enhanced by increasing feeding frequency. In previous work using *A. pallipes* juveniles maternally incubated (Sáez-Royuela et al. 2001), a slight improvement in growth values was seen when the food supply frequency was increased from once a day to twice a day, although the difference was not significant. This coincides with the present results, in which no differences were found between the two feeding frequencies. Hence, splitting the ration into two meals during the day did not improve growth. The feed consumption behaviour of juvenile crayfish may partially explain this fact. Dry pellets are not consumed immediately, but

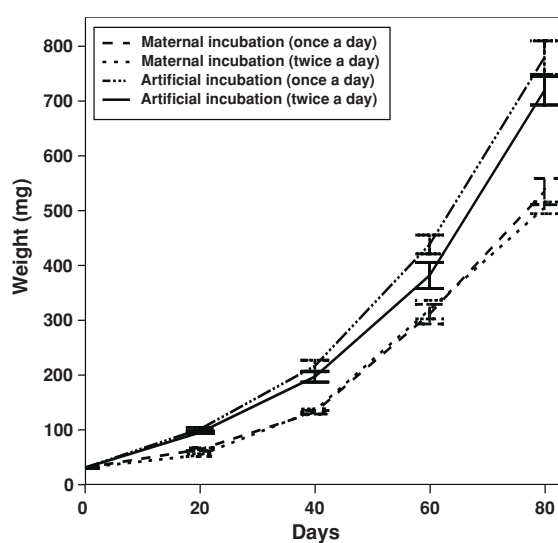


Fig. 4 Mean weight of juvenile crayfish coming from maternal or artificial incubation fed once or twice a day at the 20 day checks from Experiment 2

rather are collected by crayfish and carried to shelters where final consumption may take a long time. Furthermore, *Artemia* nauplii are able to survive and swim for a prolonged period in artesian well water (Celada et al. 2008), remaining available for crayfish.

Little information on comparisons between crayfish whose origin is maternal versus artificial incubation is available. Sáez-Royuela et al. (1995) found similar survival and growth in signal crayfish (*P. leniusculus*) artificially or maternally incubated, but in this case artificially incubated eggs did not receive any antifungal treatment. Using iodine detergent, no negative effects of artificial incubation on the growth and survival of juveniles were detected

(Policar et al. 2006). Similarly, this present study showed that artificial incubation with formaldehyde treatments has no harmful effects on the further survival and growth of the juveniles obtained. Moreover, the possibility that artificial incubation techniques may improve the health of the hatched crayfish has been considered by several authors previously. Thus, Nylund and Westman (1992) reported that artificial incubation can produce pest-free juveniles and it may also be feasible to reduce the spread of other crayfish diseases. Edgerton and Owens (1997) noticed specific virus-free *C. quadricarinatus* can be produced by removing eggs from females, disinfecting the surface of eggs with formalin, and hatching the eggs in uncontaminated water. This practice might improve the general state of health of the hatched crayfish which, under aquaculture conditions, might then perform better than those obtained by maternal incubation (Edgerton and Owens 1999). In the experiments reported here, the crayfish derived from artificial incubation always grew significantly faster than those maternally incubated. These results support the views of the authors mentioned, as it is possible that the use of formaldehyde throughout artificial incubation provides health protection for the crayfish obtained, making an improvement in their growth feasible.

To sum up, the current state of knowledge of storage, transport and artificial incubation of crayfish eggs provides reliable options for improving the reproductive phase in aquaculture and would also facilitate the development of an embryonated egg market. Eggs can be detached early from the berried females and artificially incubated or stored previous to incubation for periods up to 4 months, with or without transport. In artificial incubation, the use of formaldehyde greatly increases juvenile production. In addition, crayfish derived from this origin grow faster than those maternally incubated. Juvenile rearing can be successfully performed under controlled conditions by supplying dry diets supplemented with *Artemia* nauplii once a day.

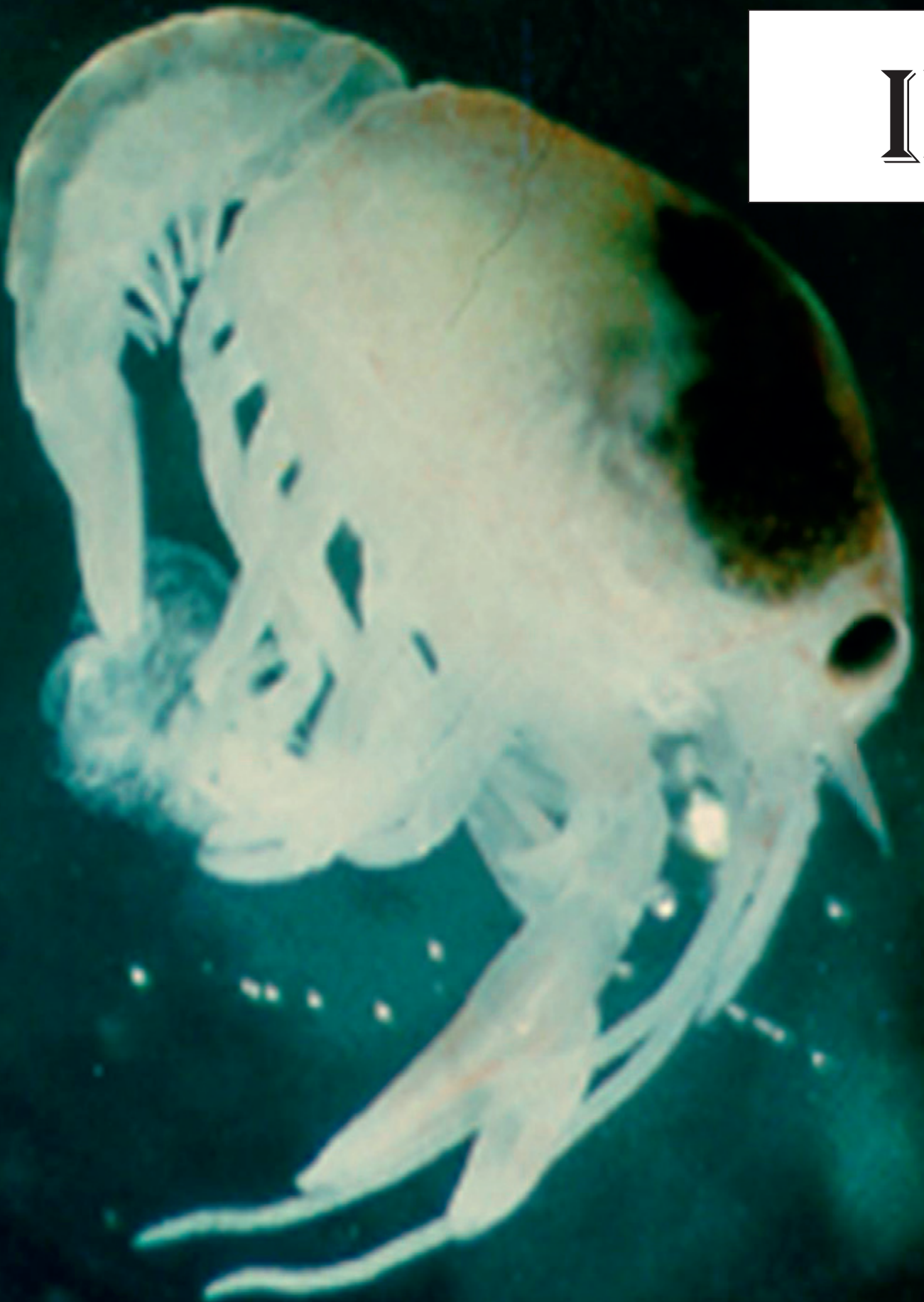
Acknowledgements Funding of this study was the Plan Nacional de I + D+i, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, Research Project AGL2005-01127. We thank the financing of a grant for Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, reference AP2005-4860. We should also like to thank the Quiñón S.A. crayfish farm for their collaboration.

References

- Ackefors H, Gydemo R, Westin L (1989) Growth and survival of juvenile crayfish, *Astacus astacus*, in relation to food and density. In: de Pauw N, Jaspers E, Ackefors H, Wilkins N (eds) Aquaculture—a biotechnology in progress. European Aquaculture Society, Bredene, pp 365–373
- Ackefors H, Castell JD, Boston LD, 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. doi:10.1016/0044-8486(92)90215-7
- Ackefors H, Gydemo R, Keyser P (1995) Growth and moulting in confined juvenile noble crayfish *Astacus astacus* (L.) (Decapoda: Astacidae). Freshw Crayfish 10:396–409
- Andrews EA (1904) Breeding habits of crayfish. Am Nat 38:165–206. doi:10.1086/278387
- Arrignon J (1981) L'écrevisse et son élevage. Gauthier-Villars, Paris
- 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. Ann Zool Fenn 31:297–306
- Brodsky SJ (1962) L'élevage artificiel des écrevisses de rivière - Une méthode perfectionnée de reproduction de leurs réserves. Vopr. Ecologii i Biosenologii 4
- Brodsky SJ (1984) Sur l'élevage en Union Soviétique des écrevisses de rivière (Astacidae) par la méthode industrielle et sur les perspectives de cette méthode. Piscic Fr 78:5–9
- Carral JM, Celada JD, Gaudioso VR, Temiño C, Fernández R (1988) Artificial incubation improvement of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under low temperatures during embryonic development. Freshw Crayfish 7:239–250
- Carral JM, Celada JD, González J, Gaudioso VR, Fernández R, Lopez-Baissón C (1992) Artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) from early stages of embryonic development. Aquaculture 104:261–269. doi:10.1016/0044-8486(92)90208-3
- Carral JM, Sáez-Royuela M, Celada JD, Pérez JR, Melendre PM, Aguilera A (2003) Advantages of artificial reproduction techniques for white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet). Bull Fr Peche Piscicult 370–371:181–184. doi:10.1051/kmae:2003013
- Carral JM, Pérez JR, Celada JD, Sáez-Royuela M, Melendre PM, Aguilera A (2004) Effects of dead egg removal frequency on stage 2 juvenile production in artificial incubation of *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. Bull Fr Peche Piscicult 372–373:425–430. doi:10.1051/kmae:2004015
- Celada JD, Gaudioso VR, Paz P, Fernández R (1985) Identification et chronologie des phases de développement des œufs de l'écrevisse (*Pacifastacus leniusculus* Dana) par observation directe. Piscic Fr 82:5–8
- Celada JD, Paz P, Gaudioso VR, Fernández R (1987) Embryonic development of the freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana): a scanning electron microscopic study. Anat Rec 219:304–310. doi:10.1002/ar.1092190311

- Celada JD, Carral JM, Gaudioso VR, Temiño C, Fernández R (1989) Response of juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) to several fresh and artificially compounded diets. *Aquaculture* 76:67–78. doi:10.1016/0044-8486(89)90252-4
- Celada JD, Carral JM, 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. doi:10.1163/156854091X00119
- Celada JD, Carral JM, Gaudioso VR, 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(1):108–111. doi:10.1111/j.1749-7345.1993.tb00157.x
- Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, Gaudioso VR, Muñoz MC, Pérez JR (1994) Investigación sobre cangrejos de río en la Universidad de León. *Fac Vet* 38:55–70
- Celada JD, González J, Carral JM, Fernández R, Pérez JR, Sáez-Royuela M (2000) Storage and transport of embryonated eggs of the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *N Am J Aquac* 62:308–310. doi:10.1577/1548-8454(2000)062<0308:SATOOE>2.0.CO;2
- Celada JD, Carral JM, Pérez JR, Sáez-Royuela M, Muñoz C (2001) Successful storage and transport of eggs of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet). *Aquac Int* 9:269–276. doi:10.1023/A:1015337211733
- Celada JD, Carral JM, Sáez-Royuela M, Melendre PM, Aguilera A (2004) Effects of different antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs. *Aquaculture* 239:249–259. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.06.003
- Celada JD, Aguilera A, Carral JM, Sáez-Royuela M, Melendre PM (2008) Rearing tench (*Tinca tinca* L.) larvae on live feed (*Artemia*) and on two transition schedules from live to dry diets. *J Appl Ichthyol*. doi:10.1111/j.1439-0426.2008.01078.x
- Cukerzis JM (1964) Experiment of incubation of crayfish eggs. *Akad Naut Lithuan SSR C1* 33:87–93
- Cukerzis JM (1969) Larval ecology and physiology of *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*. *Inst Zool Bot Ac Sci Eston SSR, Tallin*, pp 171–177
- Cukerzis JM (1984) La biologie de l'écrevisse (*Astacus astacus* L.). INRA, Versailles
- Cukerzis JM (1988) *Astacus astacus* in Europe. In: Holdich DM, Lowery RS (eds) *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Croom Helm, London, pp 309–340
- D'Abramo LR, Wright JS, Wright KH, Bordner CE, Conklin DE (1985) Sterol requirements of cultured juvenile crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Aquaculture* 49:245–255
- Edgerton BF, Owens L (1997) Age at first infection of *Cherax quadricarinatus* by *Cherax quadricarinatus* bacilliform virus and *Cherax* *Giardivirus*-like virus, and production of putative virus-free crayfish. *Aquaculture* 152:1–12
- Edgerton BF, Owens L (1999) Histopathological surveys of the redclaw freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Australia. *Aquaculture* 180:23–40
- Evans LH, Tsvetenko E, Graham T, Fan A, Finn S, Knott B, Costa N (1993) Part II: artificial reproduction experiments. In: *Improving commercial viability of crayfish farming*. Department of Commerce and Trade, Western Australia, pp 24–52
- Gherardi F, Holdich DM (1999) Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?. AA Balkema, Rotterdam
- González J, Carral JM, Celada JD, Sáez-Royuela M, Gaudioso VR, Fernández R, López-Baissón C (1993) Management of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) for intensification of juvenile production. *Freshw Crayfish* 9:144–146
- Gydemo R, Westin L (1989) Growth and survival of juvenile *Astacus astacus* L. at optimized water temperature. In: de Pauw N, Jaspers E, Ackefors H, Wilkins N (eds) *Aquaculture- A Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp 383–391
- Henryon M, Purvis IW (2000) Eggs and hatchlings of freshwater crayfish, marron (*Cherax tenuimanus*), can be successfully incubated artificially. *Aquaculture* 184:247–254
- Henttonen P, Huner JV, Lindqvist OV, Henttonen L, Pitkänemi 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. *Freshw Crayfish* 9:426–441
- Hobbs HH Jr (1988) Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. In: Holdich DM, Lowery RS (eds) *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Croom Helm, London, pp 52–82
- Hofmann J (1978) Cangrejos de río. Compañía Editorial Continental, Barcelona
- Järvenpää T (1995) Artificial incubation of crayfish eggs on moving tray (abstract). *Freshw Crayfish* 8:716
- King CR (1993) Eggs development time and storage for red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus* von Martens. *Aquaculture* 109:275–280
- Köksal G (1988) *Astacus leptodactylus* in Europe. In: Holdich DM, Lowery RS (eds) *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Croom Helm, London, pp 365–400
- Leonard BV, Lennard WA, Kildea D (2001) A method for testing the effectiveness of artificial incubation of eggs vs. maternal brooding in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture* 195:299–309
- Lewis SD (2002) *Pacifastacus*. In: Holdich DM (ed) *Biology of freshwater crayfish*. School of Life and Environmental Sciences, University of Nottingham, Nottingham, pp 511–540
- Mason JC (1977) Artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana). *Freshw Crayfish* 3:119–132
- Mason JC (1979) Effects of temperature, photoperiod, substrate and shelter on survival, growth and biomass accumulation of juvenile *Pacifastacus leniusculus* in culture. *Freshw Crayfish* 4:73–82
- Matthews M, Reynolds JD (1995) The in vitro culture of crayfish eggs using a recirculating airlift incubator. *Freshw Crayfish* 8:300–306
- McDonnell GE, Russell D (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12:147–179

- McDonnell G (2007) Antisepsis, disinfection and sterilization: types, action and resistance. American Society for Microbiology, Washington, DC
- Melendre PM, Celada JD, Carral JM, 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 PM, Celada JD, Carral JM, 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
- Nakata K, Matsubara H, Goshima S (2004) Artificial incubation of Japanese crayfish (*Cambaroides japonicus*) eggs by using a simple, easy method with a microplate. *Aquaculture* 230:273–279
- Nylund V, Westman K (1992) Crayfish diseases and their control in Finland. *Finnish Fish Res* 14:107–118
- Nyström P (1994) Survival of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in relation to light intensity and density. *Nord J Freshw Res* 69:162–166
- Paris P (1911) Essai d'incubation artificielle des oeufs d'écrevisse. *Bull Soc Nat D'Aclim Fr* 58:56–58
- Pérez JR, Carral JM, Celada JD, Sáez-Royuela M, Romero MP (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 JR, Carral JM, Celada JD, Sáez-Royuela M, Muñoz C, Antolín JI (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 JR, Carral JM, Celada JD, Muñoz C, Sáez-Royuela M, Antolín JI (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 JR, Celada JD, González J, Carral JM, 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
- Polcar T, Kozák P, Martín J (2006) Effects of egg bath and daily removal of dead eggs on hatching success and production of stage 2 juveniles during artificial incubation in noble crayfish (*Astacus astacus* L.). *Bull Fr Pêche Piscic* 380–381:1197–1206
- Reichenbach H (1886) Studien zur Entwicklungsgeschichte des Flusskrebsses. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 14:1–137
- Reynolds JD (2002) Growth and reproduction. In: Holdich DM (ed) *Biology of freshwater crayfish*. School of Life and Environmental Sciences, University of Nottingham, Nottingham, pp 152–191
- Rhodes CP (1981) Artificial incubation of the eggs of the crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. *Aquaculture* 25:129–140
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Muñoz C (1995) Effects of management on survival and growth of stage 2 juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under laboratory conditions. *Aquaculture* 133:123–133
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Muñoz C, Pérez JR (1996) Modified photoperiod and light intensity influence on survival and growth of stage 2 juvenile signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Appl Aquac* 6(3):33–37
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Pérez JR (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. *Aquacult Int* 9:489–497
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Pérez JR, González A (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
- 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. *Aquac Res* 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
- Stephenson H, Gabela M, Barnes ME (2003) Microbial inhibition in response to treatments of hydrogen peroxide and formalin on landlocked fall chinook salmon eyed eggs, as determined by scanning electron microscopy. *N Am J Aquac* 65:324–329
- Stempel KM (1973) Edelkrebserbrütung in Zuger-Gläsern und Anfütterung der Krebsbrut. *Freshw Crayfish* 1:234–238
- Taugbøl T, Skurdal J (1992) Growth, mortality and molting rate of noble crayfish *Astacus astacus* L. juveniles in aquaculture experiments. *Aquac Fish Manag* 23:411–420
- Taylor CA (2002) Taxonomy and conservation of native crayfish stocks. In: Holdich DM (ed) *Biology of freshwater crayfish*. School of Life and Environmental Sciences, University of Nottingham, Nottingham, pp 236–257
- Van Stappen G (1996) Use of cysts. In: Lavens P, Sorgeloos P (eds) *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome, pp 107–136



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

R. González · J. D. Celada · A. González · V. García · J. M. Carral · M. Sáez-Royuela

Received: 1 August 2008 / Accepted: 16 February 2009 / Published online: 28 February 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract Recent advances in intensive rearing of astacid juvenile crayfish have greatly improved the results. This challenges the current application possibilities of the studies performed previously, and new research on density is required. A 100-day experiment was carried out under controlled conditions to evaluate density effects on survival and growth rates of juvenile crayfish in optimal conditions of feeding. Juvenile stage 2 *Pacifastacus leniusculus* were stocked in fibreglass tanks (1 m², 200 l water) at 20 ± 1°C and fed a dry diet for salmonids supplemented with restricted amounts of *Artemia* nauplii. Stocking densities were 100, 300, 600 and 1,000 crayfish m⁻². Mean survival rate was reduced significantly with increased stocking density, ranging from 86.33% (100 m⁻²) to 39.13% (1,000 m⁻²). All checks showed that at the lowest initial density (100 m⁻²) animals grew significantly faster those at higher densities, recording a final carapace length of 15.28 mm and weight of 1.08 g. Among the treatments of 300, 600 and 1,000 m⁻² no differences were found either in carapace length or in weight throughout the experimental period, with a final mean growth of 14 mm carapace length and 0.72 g weight. The final proportion of animals with chelae autotomy rose significantly with increasing stocking density, ranging from 14.44% (100 m⁻²) to 41.45% (1,000 m⁻²). This study shows that diet is a decisive factor for stocking successfully high densities under controlled conditions and provides useful information to set adequate densities in accordance with the production objectives.

Keywords *Artemia* nauplii · Astacid crayfish · Density · Intensive breeding · *Pacifastacus leniusculus*

Introduction

Up to now, intensification of astacid culture had posed serious problems as low survival and growth rates during the first months of independent life. In studies carried out under controlled conditions, a wide variety of foods have been tested in juveniles from the onset

R. González (✉) · J. D. Celada · A. González · V. García · J. M. Carral · M. Sáez-Royuela
Dpto. Producción Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain
e-mail: rgonl@unileon.es

of exogenous feeding. Fresh *Daphnia*, earthworms, chironomid larvae, *Chlorella*, fresh fish, vegetables and experimental dry pellets for crayfish and for fish species have been tried by Mason (1979), D'Abramo et al. (1985), Celada et al. (1989, 1993), Blake et al. (1994), Sáez-Royuela et al. (1995, 1996) and Savolainen et al. (2003, 2004) with *Pacifastacus leniusculus*. Gydemo and Westin (1989), Ackefors et al. (1989, 1992, 1995), Taugbøl and Skurdal (1992) and Henttonen et al. (1993) used different combinations of frozen fish and vegetables, oat flakes, *Chara*, frozen insect larvae and *Neomysis*, fresh *Mysis* and formulated feedstuffs for other crustaceans with *Astacus astacus*, whereas Sáez-Royuela et al. (2001) tested fresh *Daphnia* and a feed formulated for rainbow trout with *Austropotamobius pallipes*. In all of these cases, after exceeding the critical period of the first 2–3 months and leaving aside the high mortalities sometimes recorded, survival rates were about 50% with growth values of 8–12 mm carapace length and 90–200 mg in a temperature range of 18–22°C. Currently, we know that these poor results were mainly due to a nutritional deficiency, which was also able to mask the effects of the experimental treatments. According to Sáez-Royuela et al. (2007) and González et al. (2008), this deficiency is related to unknown essential factors that can be provided by zooplanktonic live feed. Thus, exceptional and high survival (around 80% after 100 days) has been reported (Nyström 1994; Sáez-Royuela et al. 2007; González et al. 2008) with *P. leniusculus* under conditions of live feed availability (*Artemia* or *Daphnia*). In addition, the growth reported by González et al. (2008) is much higher than that achieved so far.

These improvements give rise to new considerations on intensive rearing of juveniles during the first months of life. The most important factor involved is the density, as the optimum stocking density is closely dependent on further survival and growth rates. In consequence, the aim of this study was to evaluate density effects in improved conditions of feeding, according to the advances reported by González et al. (2008), and to obtain information about suitable densities with a view to intensification of this culture phase.

Materials and methods

Crayfish, facilities and experimental procedure

A 100-day experiment was carried out in indoor facilities with 6,000 stage 2 *P. leniusculus* (Dana, 1852) (mean carapace length 5.58 ± 0.03 mm and weight 30.4 ± 0.3 mg) hatched in the laboratory by means of the experimental artificial incubation devices described by Carral et al. (1992). During the incubation, formaldehyde at 3,000 ppm was administered every other day by peristaltic pump until the beginning of hatchings, discharging anti-fungal solution for 15 min to the incoming water flow, according to Melendre et al. (2006). Juveniles were placed in 12 fiberglass tanks (1 m² bottom area, 200 l water) provided with a 250 µm mesh filter outlet to avoid escape of live feed. Stocking densities were 100, 300, 600 and 1,000 crayfish m⁻². Corrugated fibre-cement sheets (54 × 20.5 cm) were provided as shelter according to density (4 pieces for 100 animals m⁻², 6 for 300 m⁻², 8 for 600 m⁻² and 12 for 1,000 m⁻²). Aerated artesian well water was supplied in an open system, and each tank had its own water inlet (flow rate 1.5 l min⁻¹) and outlet. Quality parameters of the incoming water were pH 7.9, hardness 10°dH (calcium 72 mg l⁻¹), total dissolved solids 207.6 mg l⁻¹ and total suspended solids 14.2 mg l⁻¹. Throughout the trial, oxygen content was measured in the tanks with a Sension6 dissolved Oxygen Meter (Hach Company, Loveland, CO, USA) with values

around 7 mg l^{-1} (minimum 5.8 mg l^{-1} , maximum 7.7 mg l^{-1}). Ammonia and nitrites were measured with a Pocket-Photometer Lasa Aqua 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 maintained at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, and the photoperiod was natural (ca. 14 h light and 10 h dark). Tanks were cleaned every other day.

Diet and feeding

Crayfish were fed a dry diet for salmonids (T-NUTRA-0, Skretting, Trouw España SA; Cojobar, Burgos, Spain) with composition data provided by the manufacturer of crude protein 54%, crude lipid 18%, crude cellulose 0.08%, crude ashes 12%, total phosphorus 1.8%, Vitamin A $10,000 \text{ UI kg}^{-1}$, D_3 $1,500 \text{ UI kg}^{-1}$, E 150 mg kg^{-1} and a pellet diameter 0.9–1.5 mm. This feed was supplied by hand moderately in excess (around 4% body weight) in such a manner that a small remainder of uneaten food could always be seen at the bottom. Live freshly-hatched *Artemia* nauplii (cysts of High HUFA 430 μm ; INVE Aquaculture Nutrition, Dendermonde, Belgium) were obtained daily to supplement the dry diet, starting on 500 nauplii per crayfish and day (later increasing by 20% every 20 days). Cysts were decapsulated according to the method described by Van Stappen (1996). After verifying mean hatching rates, which coincided with data provided by the supplier ($250,000 \text{ nauplii g}^{-1}$ cysts), supplement assessment was performed using known amounts of nauplii hatched in determinate water volumes, and distributing them into the corresponding replicates. Food was supplied once a day at around 8 PM.

Data collection and analysis

Every 20 days survival percentages were calculated. A sample of juveniles from each replicate was collected for recording carapace length (CL) and wet body weight (BW) individually. The sample size varied according to density, i.e. 10, 15, 20 and 30 juveniles in the treatments of 100, 300, 600 and $1,000 \text{ m}^{-2}$, respectively. Subsequently, animals were gently returned to their respective tanks. At the end of the experiment, survivors were counted and total crayfish biomass (g m^{-2}) in each tank (replicate) was recorded. Carapace length and individual weight of a sample, which varied according to density (20, 30, 40 and 60 juveniles in the treatments of 100, 300, 600 and $1,000 \text{ m}^{-2}$, respectively), were recorded. Carapace length was measured with digimatic calliper (to the nearest 0.01 mm). To obtain individual weight, excess water was removed with tissue paper and a precision balance (to the nearest 0.001 g) was used. Specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) were determined with $(\ln W_t - \ln W_i) \times 100/T$ and $(W_t - W_i)100/W_i$, respectively, 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).

In all checks and at the end of the experiment, percentages of crayfish lacking one or two chelae were determined.

All experimental groups were in triplicate (three tanks per treatment). Growth data were derived from pooled samples of three replicates, and all results were examined by analysis of variance (ANOVA) using the computer programme SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, Ill., USA). The Duncan test was applied to compare means at $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

Results

Final survival and growth values (100 days) are presented in Table 1. Mean survival rate was reduced significantly the higher the stocking density, ranging from 86.33% (100 m^{-2}) to 39.13% ($1,000 \text{ m}^{-2}$).

Regarding growth, the highest final carapace length (15.28 mm), weight (1.08 g), specific growth rate (3.56%) and weight gain (3,449.01%) were reached by the juveniles stocked at the density of 100 m^{-2} , showing significant differences from the others. No differences were found among 300, 600 and $1,000 \text{ m}^{-2}$, with a final mean growth of 14 mm carapace length and 0.72 g weight. Biomass increased significantly with increasing stocking density, ranging from 90.67 g m^{-2} (100 m^{-2}) to 271.03 g m^{-2} ($1,000 \text{ m}^{-2}$).

Table 1 Final survival and growth values of juvenile signal crayfish reared at different densities over 100 days

Survival and growth values	Density (crayfish m^{-2})			
	100	300	600	1,000
Survival (%)	86.33 \pm 3.38	64.89 \pm 1.98	50.50 \pm 2.34	39.13 \pm 0.98
CL (mm)	15.28 \pm 0.71	14.10 \pm 0.14*	13.79 \pm 0.04*	13.92 \pm 0.31*
BW (g)	1.08 \pm 0.12	0.73 \pm 0.01*	0.70 \pm 0.02*	0.73 \pm 0.04*
SGR (%)	3.56 \pm 0.12	3.18 \pm 0.02*	3.13 \pm 0.03*	3.17 \pm 0.06*
WG (%)	3,449.01 \pm 414.60	2,296.14 \pm 42.37*	2,196.02 \pm 59.59*	2,288.79 \pm 147.72*
Biomass (g m^{-2})	90.67 \pm 7.04	133.47 \pm 4.26	194.25 \pm 17.45	271.03 \pm 9.59

CL carapace length, BW body weight, SGR specific growth rate, WG weight gain

Values are given as mean \pm standard error

* Values within each row marked with an asterisk are not significantly different ($P < 0.05$)

Fig. 1 Survival rates of juvenile signal crayfish reared at different densities over 100 days

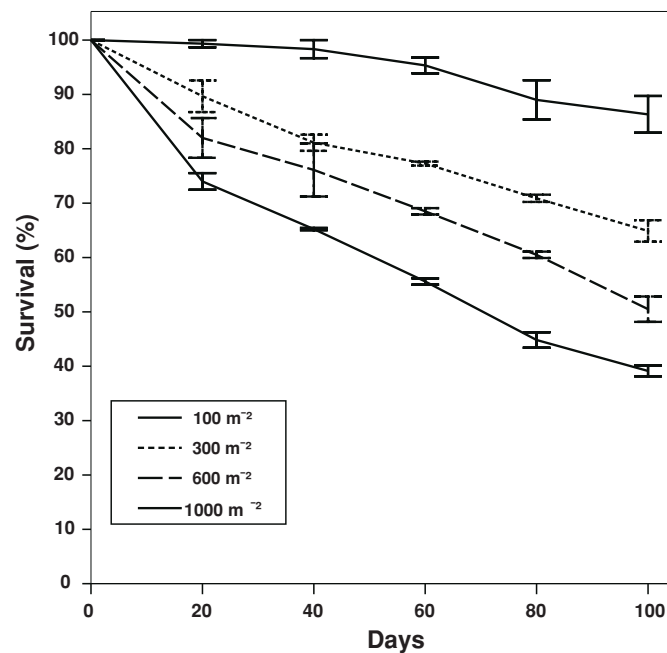


Figure 1 shows the survival rates in the checks throughout the experimental period. In each check from day 20 up to the end of the trial (day 100), percentage of survivors was significantly higher at the lowest initial density (100 m⁻²) and thus significantly lower at the highest initial density (1,000 m⁻²). In intermediate treatments (300 and 600 m⁻²), similar significant differences were detected from day 60.

Fig. 2 Mean carapace length of juvenile signal crayfish in the checks throughout the experimental period

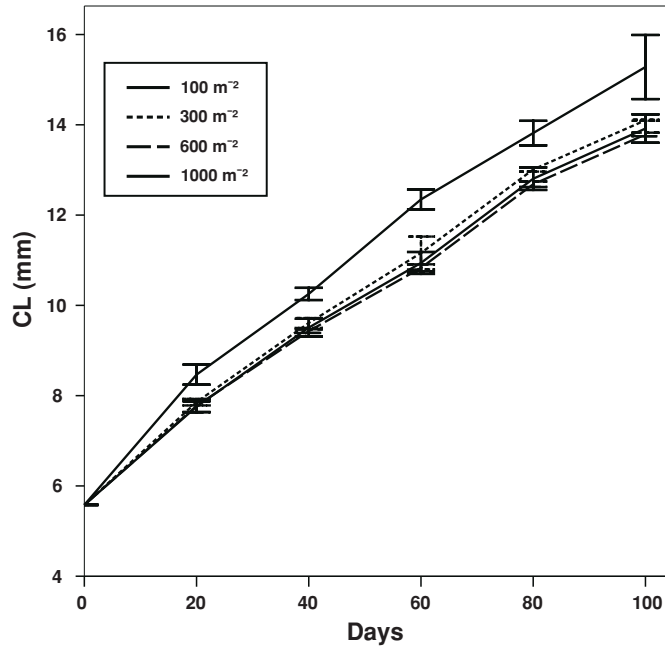


Fig. 3 Mean weight of juvenile signal crayfish in the checks throughout the experimental period

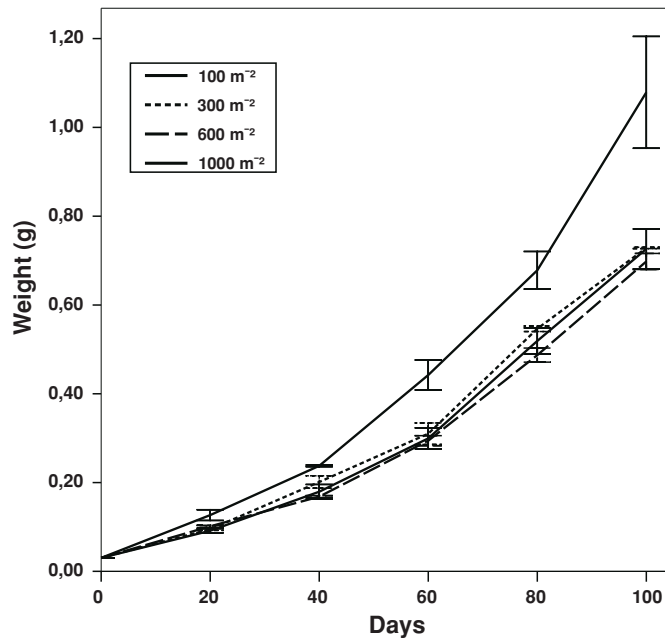


Table 2 Percentages of juvenile signal crayfish lacking chelae in the checks throughout the experiment

Days	Density (crayfish m ⁻²)			
	100	300	600	1,000
20	19.75 ± 3.68	40.73 ± 6.40*	42.20 ± 1.67*	53.36 ± 4.24*
40	21.95 ± 2.70	42.22 ± 6.71*	42.56 ± 2.35*	50.88 ± 6.88*
60	16.50 ± 3.08	33.92 ± 4.53*	37.05 ± 1.21*	40.10 ± 2.89*
80	17.49 ± 4.36	31.57 ± 4.73*	36.67 ± 1.64*	41.73 ± 6.73*
100	14.44 ± 2.18	27.31 ± 4.56	37.68 ± 0.61*	41.45 ± 5.10*

Values are mean ± standard error

* Values within each row marked with an asterisk are not significantly different ($P < 0.05$)

Figures 2 and 3 show mean carapace length and weight, respectively, throughout the 100 days. All checks showed that at the lowest initial density (100 m⁻²) crayfish grew significantly faster than crayfish at higher densities. Among the treatments of 300, 600 and 1,000 m⁻² no differences were found either in carapace length or in weight throughout the experimental period.

Table 2 summarizes the percentages of juveniles lacking one or two chelae in each check. The proportion of animals with chelae autotomy in the treatment of 100 m⁻² was always significantly lower than that of higher densities. No significant differences were found among 300, 600 and 1,000 m⁻² over 80 days. At the end of the experiment, this percentage rose with increasing stocking density, ranging from 14.44% (100 m⁻²) to 41.45% (1,000 m⁻²).

Discussion

In crayfish, it is known that effects of aggressiveness and cannibalism rise with increasing stocking density, resulting in reductions in survival and growth rates, as well as lack of chelae. Several authors have carried out experiments with astacid crayfish at initial concentrations between 50 and 200 stage 2 juveniles per m² under controlled conditions but focussed on productive factors other than density (Mason 1979; D'Abramo et al. 1985; Ackefors et al. 1989; Gydemo and Westin 1989; Celada et al. 1989, 1993; Taugbøl and Skurdal 1992; Ackefors et al. 1992, 1995; Henttonen et al. 1993; Blake et al. 1994; Sáez-Royuela et al. 1995, 1996, 2001; Savolainen et al. 2003). The studies of Ackefors et al. (1989), Nyström (1994) and Savolainen et al. (2004) have focussed on density effects. In *A. astacus*, Ackefors et al. (1989) tested densities up to 1,000 per m², with low survival rates. In *P. leniusculus*, Nyström (1994) and Savolainen et al. (2004) obtained 75% and 86% survival, respectively, after 3 months at a density of 100 m⁻². In our study with the same species, that density allowed 86.33% survival after 100 days. Regarding growth, Savolainen et al. (2004) recorded average values of 13.80 mm carapace length and 0.580 g weight (maximum of 14.62 mm and 0.690 g in one replicate) which are higher than those obtained previously by other authors. This can be due to the possible presence of natural food in the incoming lake water used which, as the authors pointed out, was not quantified. However, these results are lower than those obtained in our experiment (15.28 mm and 1.08 g) after 100 days at the same density (100 m⁻²) and even lower than those of the treatment of 1,000 m⁻². The higher live feed availability in these studies is the cause of

this improvement in growth rate, which is supported by Sáez-Royuela et al. (2007) and González et al. (2008).

As a general rule in aquaculture, growth rate is reduced with higher stocking density (Morrissy 1992; Savolainen et al. 2004), but this did not happen in this trial. At the density of 100 m⁻² growth values were significantly higher than those obtained at the other densities, but among these (300, 600 and 1,000 m⁻²), no differences were found and growth rate was scarcely affected by density. The negative effect on growth caused by magnification of agonistic behaviour and stress at high densities could have been compensated by two positive effects: good quality of the diet and food supplementation due to cannibalism, which increased with increasing stocking density, as the number of animals which disappeared became evident.

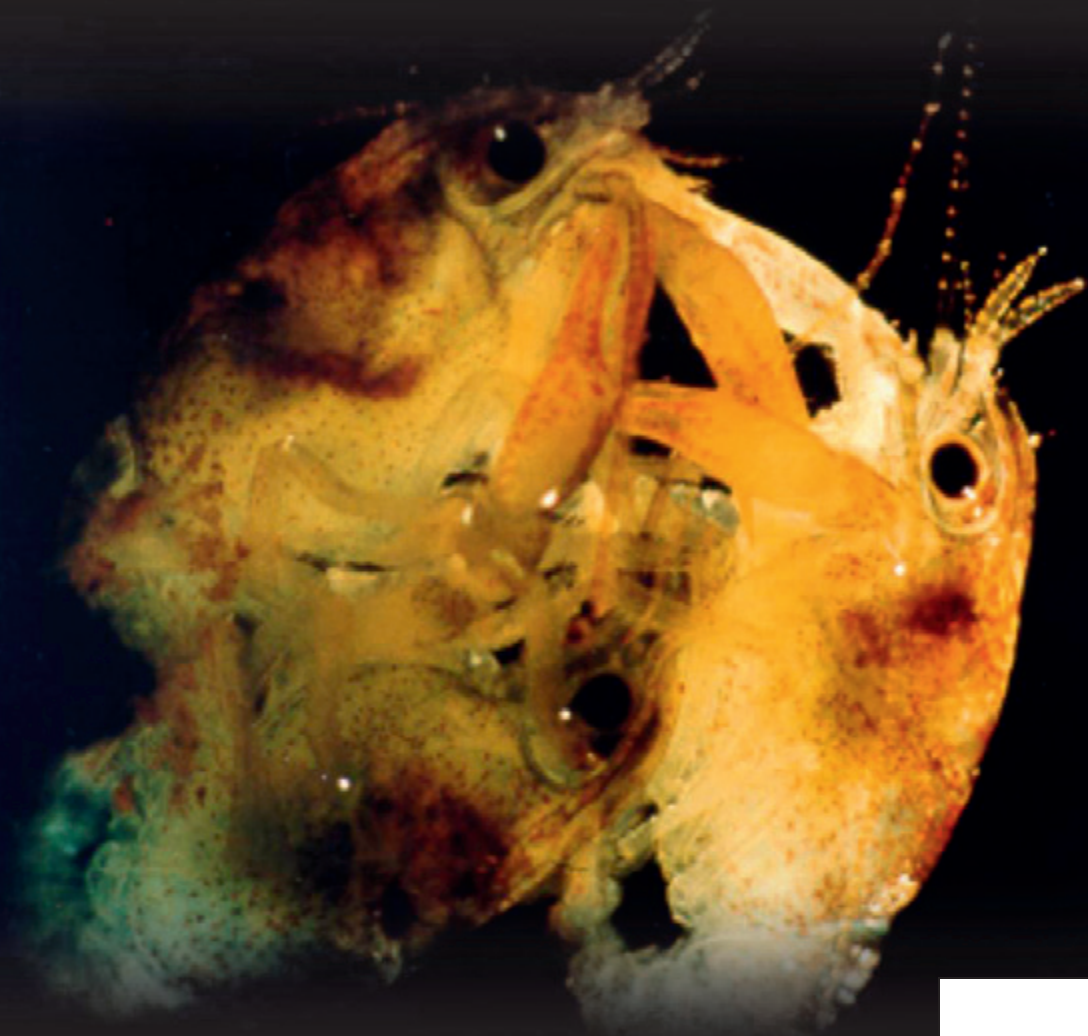
With a view to a possible intensification of astacid juvenile rearing, some authors have advised densities for keeping juveniles from stage 2 under controlled conditions. Ackefors et al. (1989) recommended 50 m⁻², whereas Gydemo and Westin (1989) suggested that 100 m⁻² may be an adequate stocking density with enough shelters. The appropriate density for D'Abramo et al. (1985) would be higher (150 m⁻²), but only for the first 30 days. If juveniles are kept in groups for a period of 3 or 4 months, Nyström (1994) assessed the initial concentration has to be <100 m⁻². From the economic point of view in culture conditions, Savolainen et al. (2004) advise an initial density of 400 m⁻² which resulted in 260 individuals m⁻² with 0.43 g. In our study, higher growth values were obtained even at the density of 1,000 m⁻² (0.80 g), although the final number of animals was slightly lower (194 crayfish m⁻²). Regarding the final biomass, in our study the values obtained by stocking 300 crayfish m⁻² (133 g m⁻²) were similar to those achieved by Savolainen et al. (2004) at the density of 800 crayfish m⁻² (146 g m⁻²). Considering these results as a whole, recommendations about the appropriate stocking density could not have general application and decisions would have to be taken according to circumstances and priority objectives in each case. The low fecundity of astacid crayfish should be taken into account, which does not allow excessive mortality for the first months of life. Infrastructure and labour for animal maintenance also are a strong limiting factor. Thus, the information provided by this study is useful to set appropriate densities in accordance with the production objectives, showing that the diet seems to be a decisive factor for stocking high densities successfully under controlled conditions.

Acknowledgments Funding for this study was provided by the Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, Research Project AGL2005-01127. We thank the financing of a grant for the Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, reference AP2005-4860.

References

- Ackefors H, Gydemo R, Westin L (1989) Growth and survival of juvenile crayfish, *Astacus astacus*, in relation to food and density. In: de Pauw N, Jaspers E, Ackefors H, Wilkins N (eds) Aquaculture—a biotechnology in progress. European Aquaculture Society, Bredene, pp 365–373
- Ackefors H, Castell JD, Boston LD, 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. doi: [10.1016/0044-8486\(92\)90215-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90215-7)
- Ackefors H, Gydemo R, Keyser P (1995) Growth and moulting in confined juvenile crayfish *Astacus astacus* (L.) (Decapoda: Astacidae). *Freshw Crayfish* 10:396–409
- 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. *Ann Zool Fenn* 31:297–306

- Carral JM, Celada JD, González J, Gaudioso VR, Fernández R, Lopez-Baissón C (1992) Artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) from early stages of embryonic development. *Aquaculture* 104:261–269. doi:10.1016/0044-8486(92)90208-3
- Celada JD, Carral JM, Gaudioso VR, Temiño C, Fernández R (1989) Response of juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) to several fresh and artificially compounded diets. *Aquaculture* 76:67–78. doi:10.1016/0044-8486(89)90252-4
- Celada JD, Carral JM, Gaudioso VR, 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 formulate feeds. *J World Aquac Soc* 24(1):108–111. doi:10.1111/j.1749-7345.1993.tb00157.x
- D'Abramo LR, Wright JS, Wright KH, Bordner CE, Conklin DE (1985) Sterol requirements of cultured juvenile crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Aquaculture* 49:245–255. doi:10.1016/0044-8486(85)90083-3
- González A, Celada JD, González R, García V, Carral JM, 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.015
- Gydemo R, Westin L (1989) Growth and survival of juvenile *Astacus astacus* L. at optimized water temperature. In: de Pauw N, Jaspers E, Ackefors H, Wilkins N (eds) *Aquaculture—a biotechnology in progress*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp 383–391
- Henttonen P, Huner JV, Lindqvist OV, Henttonen L, Pitkaniemi 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. *Freshw Crayfish* 9:426–441
- Mason JC (1979) Effects of temperature, photoperiod, substrate and shelter on survival, growth and biomass accumulation of juvenile *Pacifastacus leniusculus* in culture. *Freshw Crayfish* 4:73–82
- Melendre PM, Celada JD, Carral JM, 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02.064
- Morrissy NM (1992) Density-dependent pond growout of single year-class cohorts of a freshwater crayfish *Cherax tenuimanus* (Smith) to two years of age. *J World Aquac Soc* 23(2):154–168. doi:10.1111/j.1749-7345.1992.tb00764.x
- Nyström P (1994) Survival of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in relation to light intensity and density. *Nord J Freshw Res* 69:162–166
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Muñoz C (1995) Effects of management on survival and growth of stage 2 juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under laboratory conditions. *Aquaculture* 133:123–133. doi:10.1016/0044-8486(95)00004-L
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Muñoz C, Pérez JR (1996) Modified photoperiod and light intensity influence on survival and growth of stage 2 juvenile signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Appl Aquac* 6(3):33–37. doi:10.1300/J028v06n03_03
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Pérez JR (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. *Aquacult Int* 9:489–497. doi:10.1023/A:1020509627870
- Sáez-Royuela M, Carral JM, Celada JD, Pérez JR, González A (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. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.053
- 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. *Aquacult Res* 34(4):289–297. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00817.x
- 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.09.045
- Taugbøl T, Skurdal J (1992) Growth, mortality and molting rate of noble crayfish *Astacus astacus* L. juveniles in aquaculture experiments. *Aquac Fish Manage* 23:411–442
- Van Stappen G (1996) Use of cysts. In: Lavens P, Sorgeloos P (eds) *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper, 361, FAO, Rome, pp 107–136



III





Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different food supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions

R. González*, J.D. Celada, J.M. Carral, Á. González, M. Sáez-Royuela, V. García

Dpto. Producción Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2009
Received revised form 8 July 2009
Accepted 9 July 2009

Keywords:

Astacid crayfish
Pacifastacus leniusculus
Juvenile rearing
Artemia cysts
Feeding frequency

ABSTRACT

Considering that the use of decapsulated *Artemia* cysts as direct food for juvenile crayfish could be an alternative to live nauplii, a 100-day experiment was carried out under controlled conditions to evaluate the effects of cysts, comparing with nauplii, as supplement to a dry diet for salmonids on the survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) from the onset of exogenous feeding (stage 2). The reduction of feeding frequency was also tested. According to a bifactorial design, six treatments, differing in the supplement and feeding frequency, were tested: the dry diet supplemented with *Artemia* nauplii or decapsulated cysts was supplied once a day, once every two days and once every three days. Survival rates ranged from 56.7% to 81.7%, rising significantly with increasing the feeding frequency. The highest growth (12.94 mm carapace length and 593.08 mg weight) was reached by the crayfish that received the dry diet supplemented with cysts once a day, with significant differences from the rest of the treatments. Considering the supplement, the cysts supported significantly higher growth than the nauplii. Regarding the feeding frequency, growth was higher when the food was supplied once a day, showing significant differences from the other two frequencies (once every two days and once every three days). This study shows that decapsulated cysts are better dietary supplement than live nauplii. In crustacean culture, this is the first report of successful use of *Artemia* cysts from the onset of exogenous feeding.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The process for the intensification of astacid crayfish culture had posed serious problems as low survival and growth during the first months of independent life. As feeding is a key factor for successful juvenile farming, during three decades a wide variety of foods have been tested (see review by González et al., 2008) but results were usually unsatisfactory. Recently, Sáez-Royuela et al. (2007) reported that when juveniles were fed with a dry diet for salmonids, the supplementation with live feed (*Artemia* nauplii or *Daphnia*) improved the survival and growth rates. Later, González et al. (2008) determined the optimum quantities of supplementation with *Artemia* nauplii, allowing to enhance the growth rates obtained so far.

The daily production of nauplii is laborious, expensive and it requires additional facilities. For these reasons, the use of *Artemia* cysts may offer an interesting alternative to live nauplii. After the nondigestible shell has been chemically removed, decapsulated cysts can be handled as an inert diet, they are disinfected and do not leach nutrients (Vanhaecke et al., 1990). Decapsulated cysts have been

tried instead of live nauplii as starter food for several freshwater fish species (Bardócz et al., 1999; Celada et al., 2008a; Hung et al., 2002; Kaiser et al., 2003; Lim et al., 2002; Shiri Harzevili et al., 2003; Vanhaecke et al., 1990). In crustaceans, Sorgeloos et al. (1998) stated that the rapid settling of the decapsulated cysts in water can make them unavailable for planktonic larvae. In later stages (post-larvae), decapsulated *Artemia* cysts have been used for feeding *Penaeus monodon* (Stael et al., 1995) and *Penaeus indicus* (Ribeiro and Jones, 1998) as complete replacement of live nauplii.

It is known that feeding frequency can be an important factor, especially in young animals. Astacid crayfish maintained under controlled conditions from the onset of external feeding have been fed from twice a day to three times a week (Blake et al., 1994; Celada et al., 1989, 1993; González et al., 2008; Henttonen et al., 1993; Mason, 1979; Nyström, 1994; Sáez-Royuela et al., 1995, 1996, 2007; Savolainen et al., 2003, 2004; Taugbøl and Skurdal, 1992). Specific studies on this topic (González et al., 2009; Sáez-Royuela et al., 2001) have shown that an increase in food supply frequency from once to twice a day do not improve growth figures.

At present, live *Artemia* nauplii are an appropriate supplement when dry diets, originally formulated for other species, are used for feeding juvenile crayfish under intensive conditions (González et al., 2008; González et al., 2009). Taking in mind that decapsulated

* Corresponding author. Fax: +34 987 291187.
E-mail address: rgon@unileon.es (R. González).

Table 1

Final survival and growth performance (100 days) of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) fed with a dry diet supplemented with *Artemia* cysts or nauplii at different feeding frequencies.

Supplement	Cysts			Nauplii		
	Once/day	Once/2 days	Once/3 days	Once/day	Once/2 days	Once/3 days
Survival (%)	81.67 ± 6.01 ^a	75.00 ± 5.00 ^{a,b,c}	61.67 ± 4.41 ^{c,d}	80.00 ± 2.89 ^{a,b}	65.00 ± 5.77 ^{b,c,d}	56.67 ± 3.33 ^d
CL (mm)	12.94 ± 0.28 ^a	12.11 ± 0.23 ^b	12.02 ± 0.24 ^b	11.90 ± 0.18 ^b	11.37 ± 0.21 ^b	10.07 ± 0.32 ^c
BW (mg)	539.08 ± 37.77 ^a	421.29 ± 23.64 ^b	404.65 ± 23.65 ^{b,c}	368.65 ± 17.28 ^{b,c}	334.51 ± 19.69 ^c	241.79 ± 22.74 ^d
SGR (%)	2.77 ± 0.07 ^a	2.56 ± 0.06 ^b	2.52 ± 0.06 ^{b,c}	2.45 ± 0.05 ^{b,c}	2.34 ± 0.06 ^c	1.92 ± 0.10 ^d
WG (%)	1673.29 ± 124.24 ^a	1285.82 ± 77.78 ^b	1231.08 ± 77.79 ^{b,c}	1112.67 ± 56.83 ^{b,c}	1000.37 ± 64.79 ^c	695.38 ± 74.79 ^d
Biomass (mg dm ⁻²)	440.25 ± 76.20 ^a	315.97 ± 32.67 ^{a,b}	249.53 ± 26.07 ^{b,c}	293.47 ± 28.04 ^b	217.43 ± 52.19 ^{b,c}	137.02 ± 9.90 ^c

Values are mean ± standard error.

Values followed by the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$) from the others in the same line.

Artemia cysts could be an advantageous alternative to live nauplii, since their use could save labour and costs, the present research aims to establish basic feeding conditions for crayfish rearing from the onset of exogenous feeding, focusing on the use of *Artemia* cysts comparing with nauplii as supplement to a dry diet. In the same way, as food supply requires a lot of labour, the reduction of feeding frequency was also tested.

2. Materials and methods

2.1. Crayfish, facilities and experimental procedure

A 100-day experiment was carried out in indoor facilities with 360 stage 2 juvenile *Pacifastacus leniusculus* (5.58 ± 0.03 mm carapace length and 30.4 ± 0.3 mg weight) hatched in the laboratory by means of artificial incubation, controlling fungal growth with formaldehyde, according to Melendre et al. (2006). Crayfish were placed in 18 fiberglass tanks (0.20 m² bottom area, 25 l water) provided with shelters (one group of four jointed sections of PVC pipe 4 cm long × 20 mm diameter per three animals) at a density of 100 crayfish m⁻². Aerated artesian well water was supplied in open system, and each tank had its own water inlet (flow rate 250 ml min⁻¹) and outlet. To avoid the escape of feed, each tank was provided with a filter outlet (200 µm). Quality parameters of the incoming water were pH 7.9, hardness 18 °dH (calcium 72 mg l⁻¹), total dissolved solids 207.6 mg l⁻¹ and total suspended solids 14.2 mg l⁻¹. Throughout the trial, oxygen content was measured in the tanks with a Sension6 dissolved Oxygen Meter of Hatch

Company (values around 7 mg l⁻¹, minimum 5.8 mg l⁻¹, maximum 7.7 mg l⁻¹). Ammonia and nitrites were measured with a Pocket-Photometer Lasa Aqua from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia <0.02 mg l⁻¹ and nitrites <0.05 mg l⁻¹). Water temperature was maintained at 21 ± 1 °C and photoperiod was natural (ca. 14 h light:10 h dark). Tanks were cleaned every other day. The water quality parameters were measured once a week, after the first cleaning.

2.2. Diets and feeding

Crayfish were manually fed to excess (approximately 4% body weight per day) a dry diet for salmonids (T-NUTRA-0, Skretting, Trouw España SA, Cojobar, E-09620, Burgos, Spain, composition data provided by the manufacturer: crude protein 54%, crude lipid 18%, crude cellulose 0.08%, crude ashes 12%, total phosphorus 1.8%, Vitamin A 10,000 UI kg⁻¹, D₃ 1500 UI kg⁻¹, E 150 mg kg⁻¹, pellet diameter 0.9–1.5 mm) supplemented with live freshly hatched *Artemia* nauplii or decapsulated *Artemia* cysts (cysts of INVE Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium). The initial amount of *Artemia* supplement was 500 nauplii or cysts per crayfish and day, being each supply of 500, 1000 and 1500 for once a day, once every two days and once every three days, respectively. These amounts were later increased by 15% every 20 days. Cysts were decapsulated according to the method described by Van Stappen (1996). After verifying mean hatching rates, which coincided with the

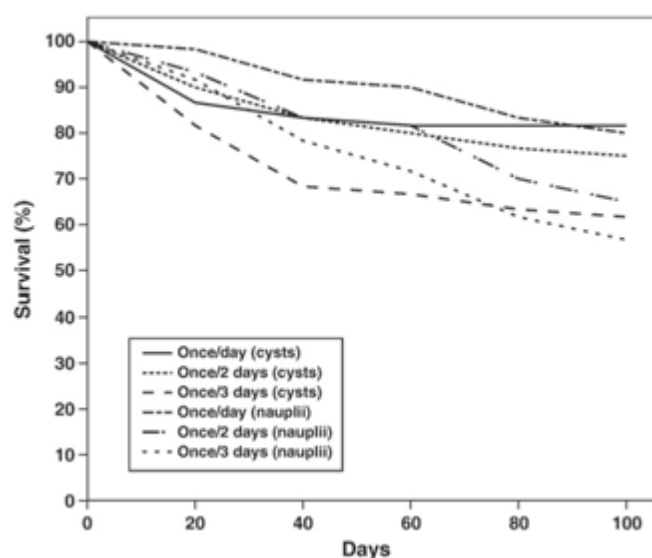


Fig. 1. Survival rates of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) fed with a dry diet supplemented with *Artemia* cysts or nauplii at different feeding frequencies during 100 days.

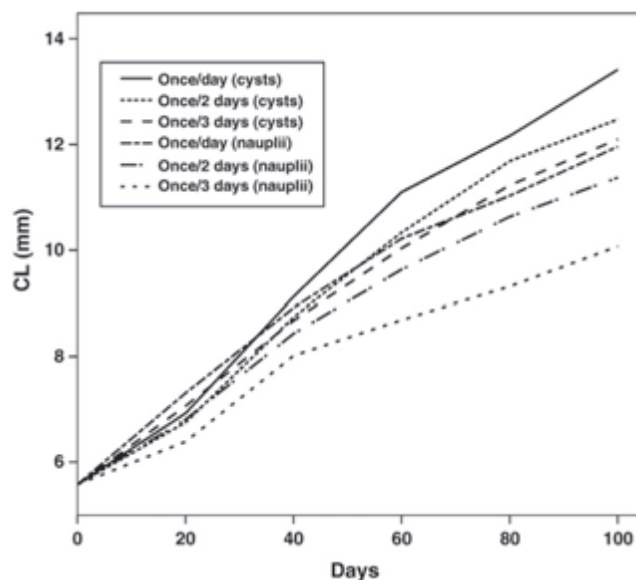


Fig. 2. Mean carapace length of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) fed with a dry diet supplemented with *Artemia* cysts or nauplii at different feeding frequencies during 100 days.

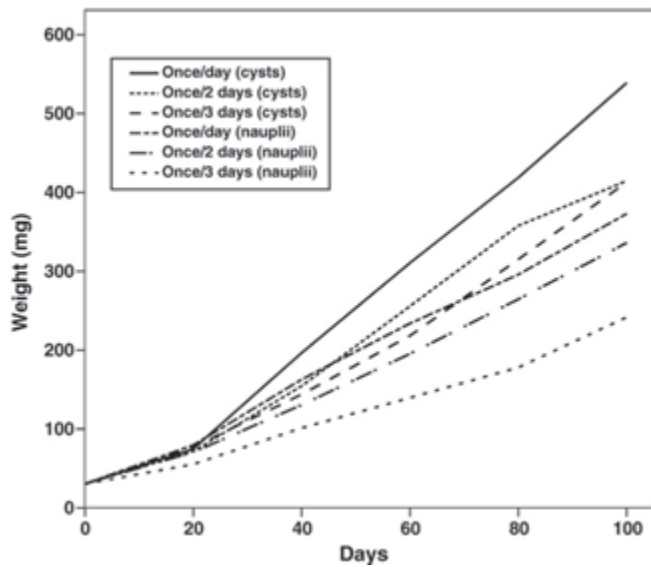


Fig. 3. Mean weight of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) fed with a dry diet supplemented with *Artemia* cysts or nauplii at different feeding frequencies during 100 days.

data provided by the supplier (250,000 nauplii g^{-1} cysts), supplement assessment was performed from known amounts of nauplii hatched in determinate water volumes and distributing them into the corresponding replicates. When decapsulated cysts were directly used as food, fresh stocks were prepared every three days and stored at 4 °C. Supplement assessment was performed from the number of cysts g^{-1} provided by the manufacturer.

According to a bifactorial design, six treatments, differing in the supplement and feeding frequency, were tested: the dry diet supplemented with *Artemia* nauplii or decapsulated cysts was supplied once a day, once every two days and once every three days.

2.3. Data collection and analysis

Every twenty days, the percentage of survivors was calculated and a sample of 10 juveniles from each replicate (30 per treatment) was collected to register carapace length (CL) and wet weight (BW) individually. Subsequently, animals were gently returned to their respective tanks. At the end of the experiment, surviving crayfish were counted, measured and individually weighted. Carapace length was measured with digimatic calliper (to the nearest 0.01 mm). Excess water was removed with tissue paper and crayfish were weighed using a precision balance (to the nearest 0.001 g). Specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) were expressed as $(\ln W_t - \ln W_i) \times 100/T$ and $(W_t - W_i)100/W_i$, respectively, where W_t is the mean final weight (mg), W_i is the mean initial weight, and T is the duration of the experiment (days). Total weight in each tank (replicate) was recorded and final biomass ($mg\ dm^{-2}$) was calculated.

Table 2

Percentages (%) of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) lacking chelae in each treatment (the dry diet supplemented with *Artemia* cysts or nauplii at different feeding frequencies) and in the checks throughout the experiment.

Days	Cysts			Nauplii		
	Once/day	Once/2 days	Once/3 days	Once/day	Once/2 days	Once/3 days
20	3.33 ± 1.67	8.33 ± 6.01	6.67 ± 4.41	1.67 ± 1.67	3.33 ± 1.67	3.33 ± 1.67
40	1.67 ± 1.67	5.00 ± 5.00	10.00 ± 5.77	6.67 ± 1.67	1.67 ± 1.67	5.00 ± 0.00
60	1.67 ± 1.67	5.00 ± 2.89	5.00 ± 2.89	5.00 ± 2.89	1.67 ± 1.67	5.00 ± 2.89
80	3.33 ± 3.33	10.00 ± 2.89	5.00 ± 2.89	3.33 ± 1.67	3.33 ± 1.67	1.67 ± 1.67
100	5.00 ± 5.00	6.67 ± 1.67	5.00 ± 2.89	3.33 ± 1.67	1.67 ± 1.67	8.33 ± 3.33

Values are mean ± standard error.
Means are not significantly different.

In all checks and at the end of the experiment, percentages of crayfish lacking one or two chelae were determined. In order to record and remove dead animals, every tank was carefully inspected daily.

All experimental groups were in triplicate (three tanks per treatment). Results were examined by analysis of variance (ANOVA) using the computer programme SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, Ill., USA). Kolmogorov–Smirnov and Levene's tests were used to assess normality and homogeneity of variances of data, respectively. Duncan test was applied to compare differences between treatments. The significant level was $P < 0.05$. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

3. Results

Final survival and growth values are presented in Table 1. Survival ranged from 56.7% (feeding frequency once every three days and supplement of nauplii) to 81.7% (feeding frequency once a day and supplement of cysts), rising significantly with increasing the feeding frequency. No significant differences in survival were detected between both supplements (nauplii or cysts).

Fig. 1 shows the survival rates in the checks throughout the experimental period. Up to day 40, the percentage of survivors was significantly higher when the dry diet was supplemented with nauplii once a day and significantly lower when cysts were supplied once every three days. From day 60 up to day 80 survival rates did not differ significantly among groups.

Regarding growth, the highest final carapace length (12.94 mm), weight (539.08 mg), specific growth rate (2.77%), weight gain (1673.29%) and biomass ($440.25\ mg\ dm^{-2}$) were reached by the crayfish that received the dry diet supplemented with cysts once a day, with significant differences from the rest of the treatment groups.

Considering only the supplement, *Artemia* cysts supported significantly faster growth (average: 12.40 mm carapace length and 460.65 mg weight) than that achieved by co-feeding with *Artemia* nauplii (average: 11.19 mm carapace length and 320.0 mg weight).

Regarding the feeding frequency, growth was higher when food was supplied once a day, showing significant differences from the other two frequencies (once every two days and once every three days). There were no significant differences in growth between the frequency of once every three days with cysts supplement and that of once a day with nauplii supplement.

Figs. 2 and 3 show the evolving of carapace length and weight, respectively, throughout the 100 days. Crayfish that received *Artemia* cysts always showed higher growth than those that received live nauplii, with significant differences from day 40. Regarding feeding frequency, the highest growth was obtained by feeding once a day, showing always significant differences from the lowest frequency (once every three days).

Table 2 summarizes the percentages of crayfish lacking one or two chelae in each check throughout the 100 days of trial. No significant differences were found related to supplement or feeding frequency among groups along the experiment. At day 100, values were from 1.67% to 8.33%, whereas in previous controls the range was between

1.67% and 10%. These percentages did not vary significantly within each treatment among the different counts.

The highest percentage of dead animals (calculated from the initial number of crayfish) removed from the tanks was recorded in the groups that received nauplii (11.67%), showing significant differences from the groups that received cysts (3.33%). There were no significant differences among the three feeding frequencies.

4. Discussion

In marine crustacean culture, the use of decapsulated *Artemia* cysts from the onset of exogenous feeding has been unadvised because the rapid settling of the cysts in seawater can make them unavailable for planktonic larvae (Sorgeloos et al., 1998). In the post-larvae rearing, decapsulated *Artemia* cysts showed to be an adequate substitute for live *Artemia* nauplii in *P. monodon* (Stael et al., 1995) and *P. indicus* (Ribeiro and Jones, 1998). In our study with juvenile crayfish (*P. leniusculus*), cysts or nauplii were tried as supplement to a dry diet from the onset of exogenous feeding, and the results showed that live nauplii can be successfully substituted by decapsulated cysts in the same amounts, since higher growth was achieved when crayfish received cysts. Probably, these results have been possible because astacid crayfish have no free-living larval stages. Thus, this is the first report of a crustacean species in which decapsulated cysts can be used successfully from the onset of exogenous feeding. Cysts have also showed to be a valuable alternative to live nauplii for the larval rearing of several freshwater fish species, and even decapsulated cysts resulted in significantly higher growth than freshly hatched nauplii in the guppy, *Poecilia reticulata* (Lim et al., 2002), the goldfish, *Carassius auratus* (Kaiser et al., 2003) and the tench, *Tinca tinca* (Celada et al., 2008a). From the assertion that, on an individual basis, there is no significant difference in the proximate composition between decapsulated *Artemia* cysts and freshly hatched nauplii (García-Ortega et al., 1998), this better performance can be related to the energy content and dry weight of decapsulated cysts, which are 30–40% higher than for instar 1 nauplii (Van Stappen, 1996).

It is known that high feeding frequencies involve big labour and, therefore, possibilities of their reduction should be studied. As previous studies on this topic in juvenile crayfish (González et al., 2009; Sáez-Royuela et al., 2001) showed no significant differences between supplying food once or twice a day, in the present trial longer food supply intervals were tested. Survival and growth rates were negatively affected by the reduction of feeding frequency. This may be due to the influence of both behavioural and nutritional factors. On one hand, the search for new food would cause a higher motility which would lead to an increase of encounter probability and, therefore, of aggressive behaviour and stress. The proportion of disappeared animals (due to cannibalism) supports this hypothesis, since the highest percentages (average: 35.83% initial number of stocked crayfish) were recorded in the longest interval of food supply (once every three days), decreasing with increasing feeding frequency (average: 11.67% when supplying once a day). On the other hand, the insufficient water stability of the dry diet would lead to a nutrient loss (D'Abramo and Robinson, 1989). In addition, the food becomes less attractive after remaining in water for some time (Burns and Avault, 1991; Løkkeborg, 1990; Sáez-Royuela et al., 2001).

It is noticeable that the growth recorded by supplying the dry diet supplemented with cysts once every three days showed no significant differences from the growth obtained by supplying the dry diet supplemented with nauplii once a day. Thus, the supplementation with cysts allowed reducing the feeding frequency from once a day to once every three days without decreasing in growth. This fact could be partly explained considering the different behaviour of nauplii and cysts in the water. Freshly hatched *Artemia* nauplii can remain living and swimming for a short period (around 12 h) in artesian well water (Celada et al., 2008b) and later they die. Nauplii are progressively losing nutritional quality, both alive as well as after dying. On the

contrary, fresh decapsulated cysts quickly sink to the bottom, where they remain available for crayfish during long periods conserving their nutritional quality, since cysts do not leach (Vanhaecke et al., 1990).

From the results of this study, it can be deduced that fresh decapsulated *Artemia* cysts are better supplement to a dry diet than live nauplii, since cysts can be handled as an inert diet, improve the performance of crayfish and allow to reduce labour and costs. Although the highest growth during the first 100 days of juvenile rearing was obtained supplying both dry diet and cysts once a day, the different options in culture must be evaluated in terms of labour, cost and application possibilities. For this reason, it should be considered that the highest growth could not be the optimum, and this study provides different choices, which can be applied according to the production objectives.

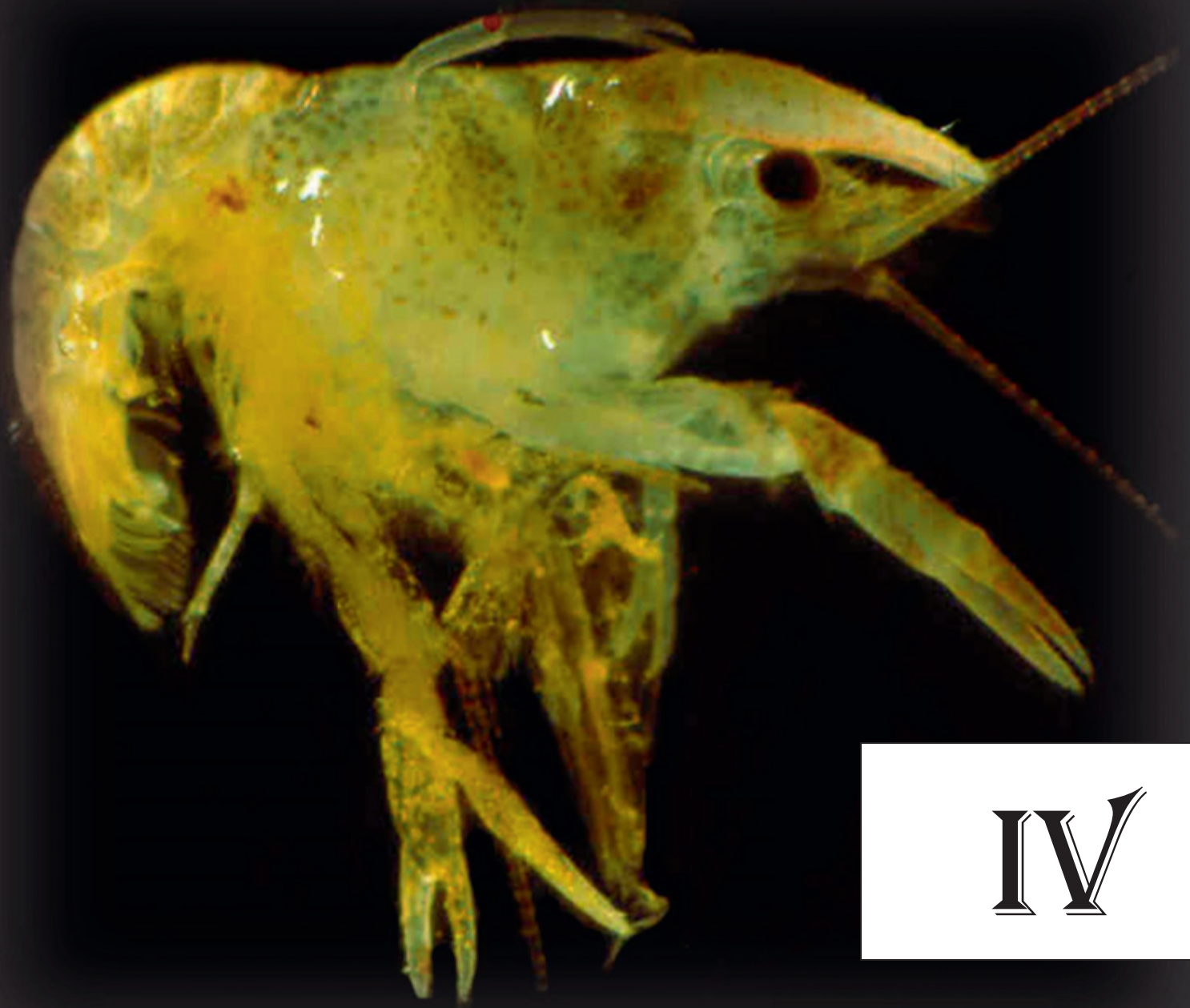
Acknowledgements

Funding of this study was provided by the Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, Research Project AGL2005-01127. We thank the financing of a grant for Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, reference AP2005-4860. We should also like to thank the Quiñón S.A. crayfish farm for their collaboration.

References

- Bardóc, T., Kovács, É., Radics, F., Sándor, Z., 1999. Experiments for the improved use of decapsulated *Artemia* cysts in intensive culture of African catfish larvae. *J. Fish Biol.* 55 (A), 227–232.
- 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. *Ann. Zool. Fennici* 31, 297–306.
- Burns, C.M., Avault Jr., J.W., 1991. Effects of bait composition and of water temperature on harvestability of crawfish baits. *J. Appl. Aquacult.* 1, 57–64.
- 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-Baission, 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 Aquacult. Soc.* 24 (1), 108–111.
- Celada, J.D., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González, R., González, Á., 2008a. Larval rearing of tench (*Tinca tinca* L.) using decapsulated *Artemia* cysts as direct food. In: Gasco, L., Lussiana, C. (Eds.), *Biology and Culture of the Tench (Tinca tinca L.)*. ISBN: 978-88-902754-1-8. Proceedings of the Fifth International Workshop, September–October 2008, Ceresole d'Alba Italy. Dipartimento di Science Zootecnica, Torino, Italy, p. 5.
- Celada, J.D., Aguilera, A., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., Melendre, P.M., 2008b. Rearing tench (*Tinca tinca* L.) larvae on live feed (*Artemia*) and on two transition schedules from live to dry diets. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 595–600.
- D'Abramo, L.R., Robinson, E.H., 1989. Nutrition of crayfish. *Rev. Aquat. Sci.* 1 (4), 711–728.
- García-Ortega, A., Verreth, J., Coutteau, P., Segner, H., Huisman, E.A., Sorgeloos, P., 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* 161, 501–514.
- 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 under controlled conditions. *Aquaculture* 281, 83–86.
- González, R., Celada, J.D., García, V., González, A., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2009. The artificial incubation of crayfish eggs: review and report from an experimental study concerning the effects of offspring (maternal or artificial incubation) on the survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). *Rev. Fish Biol. Fish.* 19, 167–176.
- Henttonen, P., Huner, J.V., Lindqvist, O.V., Henttonen, L., Pitkaniemi, 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.
- Hung, L.T., Tuan, N.A., Cacot, P., Lazard, J., 2002. Larval rearing of the Asian catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time. *Aquaculture* 212, 115–127.
- Kaiser, H., Endemann, F., Paulet, T.G., 2003. A comparison of artificial and natural foods and their combinations in the rearing of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Aquacult. Res.* 34, 943–950.
- Lim, L.C., Cho, Y.L., Dhert, P., Wong, C.C., Nelis, H., Sorgeloos, P., 2002. Use of decapsulated *Artemia* cysts in ornamental fish culture. *Aquacult. Res.* 33 (8), 575–589.
- Løkkeborg, S., 1990. Rate of release of potential feeding attractants from natural and artificial bait. *Fish. Res.* 8, 253–261.

- Mason, J.C., 1979. Effects of temperature, photoperiod, substrate and shelter on survival, growth and biomass accumulation of juvenile *Pacifastacus leniusculus* in culture. *Freshwater Crayfish* 4, 73–82.
- 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.
- Nyström, P., 1994. Survival of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in relation to light intensity and density. *Nord. J. Freshwat. Res.* 69, 162–166.
- Ribeiro, F.A.L.T., Jones, D.A., 1998. The potential of dried, low-hatch, decapsulated *Artemia* cysts for feeding prawn post-larvae. *Aquacult. Int.* 6, 421–440.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Muñoz, C., 1995. Effects of management on survival and growth of stage 2 juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under laboratory conditions. *Aquaculture* 133, 123–133.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Muñoz, C., Pérez, J.R., 1996. Modified photoperiod and light intensity influence on survival and growth of stage 2 juvenile signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Appl. Aquacult.* 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. *Aquacult. Int.* 9, 489–497.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Pérez, J.R., González, A., 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.
- 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. *Aquacult. Res.* 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.
- Shiri Harzevili, A., De Charleroy, D., Auwerx, J., Vught, I., Van Slycken, J., 2003. Larval rearing of chub, *Leuciscus cephalus* (L.), using decapsulated *Artemia* cysts as direct food. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 123–125.
- Sorgeloos, P., Coutteau, P., Dhert, P., Merchie, G., Lavens, P., 1998. Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in larval crustacean nutrition: a review. *Rev. Fish. Sci.* 6, 55–68.
- Stael, M., Sanggontanagit, T., Van Ballaer, E., Puwapanich, N., Tunsutapanich, A., Lavens, P., 1995. Decapsulated cysts and *Artemia* flakes as alternative food sources for the culture of *Penaeus monodon* postlarvae, in: Lavens, p., Jaspers, E., Roelants, I. (Eds.), Larvi'95 — Fish and Shellfish Larviculture Symposium, Gent, Belgium. European Aquaculture Society, Special. Publication No. 24, 342–345.
- Taugbøl, T., Skurdal, J., 1992. Growth, mortality and molting rate of noble crayfish *Astacus astacus* L. juveniles in aquaculture experiments. *Aquacult. Fish. Manage.* 23, 411–442.
- Vanhaecke, P., De Vrieze, L., Tackaert, W., Sorgeloos, P., 1990. The use of decapsulated cysts of the brine shrimp *Artemia* as direct food for carp *Cyprinus carpio* L. larvae. *J. World Aquac. Soc.* 21 (4), 257–262.
- Van Stappen, G., 1996. Use of cysts, in: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome, pp. 107–136.



IV

Shelter and lighting in the intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding

R. González*, J. D. Celada, V. García, J. M. Carral, A. González, M. Sáez-Royuela

Dpto. Producción Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain.

*Corresponding author. Tel.: +34-987-291110 ext.: 5191; fax: +34-987-291187, e-mail address: rgonl@unileon.es

Keywords: Astacid crayfish; feeding; intensive rearing; lighting; *Pacifastacus leniusculus*; shelter

1. Abstract Recent advances on feeding in intensive rearing of juvenile astacids enable research of other factors influencing growth and survival without the confounding effect of inadequate feeding. Two experiments were conducted to evaluate effects of the number of shelters per crayfish and to test different lighting conditions. Juvenile stage 2 *Pacifastacus leniusculus* were stocked in fibreglass tanks and fed a dry diet for salmonids combined with restricted amounts of decapsulated *Artemia* cysts. In the experiment 1, four, two or one shelters per crayfish were tested for 80 days. No significant differences were found among groups either in survival (final mean: 86.67%) or in growth (final mean: 11.41 mm mean carapace length, 355.45 mg mean weight). In the experiment 2, three lighting conditions were tested for 120 days: continuous lighting of 925 lux, continuous darkness, and natural photoperiod. Survival rates ranged from 76.7% to 88.3% with no significant differences among groups. The crayfish kept under continuous darkness grew faster (final mean: 12.70 mm carapace length, 543.08 mg weight) than those reared under the other two light conditions. This study shows that, under improved feeding conditions, one shelter per crayfish can be enough and faster growth can be obtained in continuous darkness.

2. Introduction

During three decades, the research for the intensification of astacid culture had posed serious problems with low survival and growth rates during the first months of independent life (see review by González R., Celada, González A., García, Carral and Sáez-Royuela 2010). This situation was overcome when Sáez-Royuela, Carral, Celada, Pérez and González A. (2007) reported that live feed (*Artemia* nauplii or *Daphnia*) from the onset of exogenous feeding can be the source of unknown nutritional factors needed by astacid juveniles. Later, González A., Celada, González R.,

García, Carral and Sáez-Royuela (2008) determined the optimum quantities of *Artemia* nauplii supplementation to a dry diet for salmonids, allowing to enhance the growth rates obtained so far. Recently, González R., Celada, Carral, González A. and Sáez-Royuela (2009) proved that decapsulated *Artemia* cysts can be better supplement than live nauplii, since cysts improved the performance of crayfish, allowing to reduce labour and costs. These studies laid the foundations for an adequate feeding, providing an advance in the investigation processes, which have been at a standstill possibly because the effects of the experimental treatments could have been masked by a deficient feeding.

Once these drawbacks can be overcome, a major problem is related to the losses due to agonistic behavior and cannibalism (Nyström 1994; Savolainen, Ruohonen and Railo 2004; González R. et al. 2010). In this sense, density, shelter availability and lighting conditions are the most important factors involved. Regarding density, the studies carried out by Savolainen et al. (2004) and González R. et al. (2010) have improved the previous results and provide valuable information on the effects of this factor. On the contrary, the available information on shelter and lighting is confused, and provides scarce knowledge on adequate conditions for intensive rearing.

It is known that intraspecific competition and cannibalism may be reduced by increasing the availability of effective shelter in communal systems (Mason 1979; Celada, Carral, Gaudioso, González and López-Baissón 1993; Sáez-Royuela, Carral, Celada and Pérez 2001; Streissl and Hödl 2002; Savolainen, Ruohonen and Tulonen 2003). Pebbles (gravel) or plants have been used as shelter (Mason 1979; Blake, Nyström and Hart 1994; Savolainen et al. 2003), although Sáez-Royuela, Carral, Celada and Muñoz (1995) and Sáez-Royuela et al. (2001) recommended the use of other materials, such as fiber-cement sheets or PVC pipes, which facilitate cleaning, hygienic conditions and handling of crayfish. On the other hand, changes in lighting conditions have been tried in order to decrease crayfish activity and, therefore, aggressive behavior. Taugbøl and Skurdal (1992) and Nyström (1994) obtained better results with continuous or extended lighting, whereas no significant differences in survival or growth rate were found by Sáez-Royuela, Carral, Celada, Muñoz and Pérez (1996) with increased lighting. Considering these studies as a whole, results show wide variability and no conclusions can be drawn from their comparison. In addition, it should be taken into account that although low amount of food is an essential factor favouring cannibalism in freshwater crayfish, food quality is not less important. Deficiency of necessary nutrients in diet causes an increase in aggressive

interactions (Ackefors and Lindqvist 1994) and agonistic behaviour can be kept to a minimum by improving the food quality (Nyström 2002). Thus, the recent advances on feeding give rise to new considerations on the effects of shelter and lighting during the first months. This study was aimed to evaluate effects of the number of shelters per crayfish as well as to test different lighting regimes under conditions of improved feeding.

3. Material and Methods

Two experiments were carried out in indoor facilities with stage 2 juvenile *Pacifastacus leniusculus* (Dana) (mean carapace length 5.58 ± 0.03 mm and weight 30.4 ± 0.3 mg) hatched in the laboratory by means of artificial incubation, controlling fungal growth with formaldehyde (Melendre, Celada, Carral, Sáez-Royuela and Aguilera 2006). Crayfish were placed in opaque fibre-glass tanks at a density of 100 m⁻². To avoid the escape of feed, each tank was provided with a 200 µm mesh filter outlet. Aerated artesian well water was supplied in open system, and each tank had its own water inlet and outlet. Quality parameters of the incoming water were pH 7.9, hardness 18 °f (French grades, calcium 72 mg l⁻¹), total dissolved solids 207.6 mg l⁻¹ and total suspended solids 14.2 mg l⁻¹. Throughout the trial, oxygen content was measured in the tanks, ranging from 5.8 mg l⁻¹ to 7.7 mg l⁻¹ (average values around 7 mg l⁻¹). Ammonia and nitrites were measured once a week from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia < 0.02 mg l⁻¹ and nitrites < 0.05 mg l⁻¹). Water temperature was maintained at 22 ± 1 °C. Tanks were cleaned twice a week.

Crayfish were manually fed to excess (ca. 3% body weight per day) a dry diet for salmonids (T-NUTRA-0, Skretting, Trouw España SA. Cojobar, E-09620, Burgos, Spain, composition data provided by the manufacturer: crude protein 54%, crude lipid 18%, crude cellulose 0.08%, ashes 12%, total phosphorus 1.8%, Vitamin A 10000 UI kg⁻¹, D₃ 1500 UI kg⁻¹, E 150 mg kg⁻¹, pellet diameter 0.9-1.5 mm) combined with decapsulated *Artemia* cysts (cysts of INVE Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200

Dendermonde, Belgium). The initial amount was 500 cysts per crayfish per day (later increasing by 15% every 20 days), according to González et al. (2009). Cysts were decapsulated according to the method described by Van Stappen (1996) and fresh stocks were prepared every three days and stored at 4 °C. *Artemia* cysts assessment was performed from the number of cysts g⁻¹ provided by the manufacturer. Feeding frequency was once a day.

Every twenty days, survivors were counted and crayfish lacking one or two chelae recorded. After removing excess water with tissue paper, a sample of juveniles were weighed and measured individually. Subsequently, animals were gently returned to their respective tanks. Carapace length (CL) was measured with a digimatic calliper (to the nearest 0.01 mm) and wet individual weight (BW) was determined by means of a precision balance (to the nearest 0.1 mg). Specific Growth Rate (SGR) and Weight Gain (WG) were expressed as $(\ln W_f - \ln W_i) \times 100/T$ and $(W_f - W_i)/100/W_i$, respectively, where W_f is the mean final weight (mg), W_i is the mean initial weight, and T is the period (days). At the end of the experiments, survival percentages were calculated and all surviving crayfish were weighed and measured individually. Total weight in each tank was recorded and final biomass (mg m⁻²) was calculated.

All experimental groups were in triplicate (three tanks per treatment). Data were examined by analysis of variance (ANOVA) using the computer programme SPSS 16 (SPSS Inc. Chicago, Ill., USA) and Duncan test was applied to compare differences among treatments. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis. Moreover, the Kaplan-Meier method and Log Rank test were used to compare survival curves. In all cases, the significant level was $P < 0.05$.

3.1. Experiment 1

A total of 270 stage 2 juveniles were placed in nine tanks of 0.3 m² bottom and 0.1 m

water depth (30 crayfish per tank). The flow rate was 0.5 l min⁻¹. The experiment was conducted for 80 days.

Taking into account the convenience of the use of hygienic material inside the tanks, PVC pipes (4 cm long x 20 mm diameter) were used as shelter (one pipe=one shelter). Moreover, considering that shelters hinder both cleaning and handling of animals, this experiment was aimed to decrease their number to a minimum. However, it is reasonable to assume that at least one shelter per crayfish is essential; especially in *P. leniusculus* since this species shows clear shelter-related territoriality (Edsman and Jonsson 1996; Peeke, Sippel and Figler 1995) and tend not to share the same shelter (Ranta and Lindström 1992). Thus, three treatments were tested: four, two or one pipes (shelters) per crayfish.

Every 20 days, 20 crayfish per replicate (66.7% of the initial number) were sampled for recording carapace length and weight individually.

3.2. Experiment 2

A total of 180 stage 2 juveniles were placed in nine tanks of 0.20 m² bottom and 0.1 m water depth (20 crayfish per tank). Considering the results obtained in experiment 1, only one PVC pipe (4 cm long x 20 mm diameter) per animal was provided as shelter. The flow rate was 0.25 l min⁻¹. The experiment was conducted for 120 days.

Three lighting conditions were tested:

- Continuous lighting of 925 lux. Tanks were isolated from the other treatments and from room lights, being the only light source a fluorescent providing 925 lux for 24 hours a day.
- Continuous darkness. Each tank was covered with matt-surface, opaque black plastic, so that it was isolated from the other treatments and from room lights.
- Natural photoperiod (ca. 14 h light:10 h dark).

Every 20 days, 10 crayfish per replicate (50% of the initial number) were sampled for recording carapace length and weight individually.

4. Results

4.1. Experiment 1

Final survival and growth values (80 days) are presented in Table 1. Survival rates ranged from 81.1% to 91.1% with no significant differences among groups. Figure 1 shows the survival rates at various periods throughout the experiment. Up to day 20, the percentage of survivors was significantly lower with 1 shelter per crayfish. From day 40 up to the end of the trial, survival rates did not differ significantly among groups (4, 2 or 1 shelters per crayfish).

Regarding growth, the highest final carapace length (11.69 mm), weight (384.81 mg), specific growth rate (3.07% day⁻¹), weight gain (1165.82%) and biomass (31212.22 mg m⁻²) were obtained in the tanks provided with 1 shelter per crayfish, with no significant differences from the other groups.

Figures 2 and 3 show the changes in carapace length and weight, respectively, throughout the 80 days. No significant differences were found among groups during the experiment.

Table 2 summarizes the percentages of crayfish lacking one or two chelae at various periods throughout the 80 days of trial. The range was between 2.22% and 10%. No significant differences were found among groups for the experimental period.

4.2. Experiment 2

Final survival and growth values (120 days) are presented in Table 3. Survival rates ranged from 76.7% to 88.3% with no significant differences among groups. Figure 4 shows the survival rates at various periods during the experiment. At day 80, the range was between

83.3% and 91.7% (similar to the one obtained in the experiment 1). In all checks from day 20 up to the end of the trial (day 120), no significant differences were detected.

Regarding growth, the highest final carapace length (12.70 mm), weight (543.08 mg), specific growth rate (2.32% day⁻¹), weight gain (1686.44%) and biomass (46161.67 mg m⁻²) were achieved by the crayfish reared under continuous darkness, showing significant differences from the others in body weight, specific growth rate and weight gain.

Figures 5 and 6 show the changes in carapace length and weight, respectively, throughout the 120 days. The crayfish kept under continuous darkness grew always faster than those reared under the other two light conditions, showing significant differences in weight from day 80.

Table 4 summarizes the percentages of crayfish lacking one or two chelae at various periods during the 120 days of trial. The range was between 1.67% and 13.33%. No significant differences were found among groups throughout the experimental period.

5. Discussion

It is generally accepted that providing shelters is necessary in the intensive rearing of juvenile crayfish. Studies carried out with stocking densities between 50 and 200 juveniles m⁻² have showed that aggressiveness and cannibalism can be greatly reduced with increasing in availability of shelters, allowing an increase in survival and growth rates (Nyström 1994; Sáez-Royuela et al. 1995, 2001; Streissle and Hödl 2002; Savolainen et al. 2003). It should be taken into account that refuges not only have to provide defence against aggressive behavior, but also should be hygienic, allowing easy access for cleaning and management without damaging water quality. Thus, although gravel bottom (Mason 1979; Savolainen et al. 2003) or the weed *Elodea sp.* (Blake et al. 1994) have been tested as shelter, these materials would not be appropriate for intensive systems. On the other hand, fibre-cement sheets are

commonly used in crayfish farms and provide a wide area for groups to hide and avoid attack, whereas PVC pipes offer a more individualized refuge. Sáez-Royuela et al. (1995, 2001) obtained a better growth using PVC pipes at a density of 50 juvenile crayfish m^{-2} and pointed out that additional gravel availability had no effect either on survival or on growth. In the present study PVC pipes were used at a stocking density of 100 m^{-2} , suitable for intensive rearing according to Savolainen et al. (2004) and González et al. (2010). Considering that *P. leniusculus* shows clear shelter-related territoriality (Edsman and Jonsson 1996; Peeke, Sippel and Figler 1995) and tend not to share the same shelter (Ranta and Lindström 1992), each juvenile should have the possibility to find at least one shelter, which may be enough as there were no significant differences between one and four shelters per crayfish.

Regarding lighting conditions, it has been reported that continuous or extended lighting had a positive effect on crayfish juvenile survival and decreased chelae lacking (Mason 1979; Taugbøl and Skurdal 1992; Nyström 1994; Sáez-Royuela et al. 1996). However, our present results are in disagreement with those reports. While no significant differences were found in survival or lack of chelae among the lighting conditions tested, the crayfish reared under continuous darkness grew significantly faster than those reared under continuous lighting. This could be because crayfish are nocturnal animals and the duration of their activity is related to the length of the dark period (Gherardi 2002), in such a way that food finding takes place mainly during the night. Thus, continuous darkness can have made animals keep eating for longer a better-quality diet than those used in the mentioned studies.

From the present results, it can be concluded that under the improved feeding conditions of this study, a minimum number of shelters can be provided (one per crayfish), making management and hygienic practices easier, and faster growth can be obtained in continuous darkness.

6. Acknowledgements

Funding of this study was the Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, Research Project AGL2005-01127. We thank the financing of a grant for Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, reference AP2005-4860. We should also like to thank the Quiñón S.A. crayfish farm for their collaboration.

7. References

- Ackefors H., Lindqvist O.V. (1994) Cultivation of Freshwater Crayfishes in Europe. In: *Freshwater Crayfish Aquaculture* (ed. by J.V. Huner), pp. 157-216. The Haworth Press Inc., Binghamton, NY.
- 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. *Ann. Zool. Fenn.* **31**, 297-306.
- Celada J.D., Carral J.M., Gaudioso V.R., González J., Lopez-Baissón C., Fernandez R. (1993) Survival and growth of juvenile freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana fed two raw diets and two commercial formulated feeds. *J. World Aquacult. Soc.* **24** (1), 108-111.
- Edsman L., Jonsson A. (1996) The effect of size, antennal injury, ownership, and ownership duration on fighting success in male signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *Nordic. J. Freshw. Res.* **72**, 80-87.
- Gherardi F. (2002) Behaviour. In: *Biology of Freshwater Crayfish* (ed. by D.M. Holdich), pp. 152-191. School of Life and Environmental Sciences, University of Nottingham, Nottingham.
- 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 under controlled conditions. *Aquaculture* **281**, 83-86.
- González R., Celada J.D., Carral J.M., González A., Sáez-Royuela M., García V. (2009) Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different food 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.
- Mason J.C. (1979) Effects of temperature, photoperiod, substrate and shelter on survival, growth and biomass accumulation of juvenile *Pacifastacus leniusculus* in culture. *Freshwater Crayfish* **4**, 73-82.
- 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.
- Nyström P. (1994) Survival of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in relation to light intensity and density. *Nordic. J. Freshw. Res.* **69**, 162-166.
- Nyström P. (2002) Ecology. In: *Biology of Freshwater Crayfish* (Ed. by D.M. Holdich), pp. 192-235. School of Life and Environmental Sciences, University of Nottingham, Nottingham.
- Peeke H.V.S., Sippel J., Figler M.H. (1995) Prior residence effects in shelter defense in adult signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* (Dana)): results in same- and mixed-sex dyads. *Crustaceana* **68**, 873-881.
- Ranta E., Lindström K. (1992) Power to hold sheltering burrows by juveniles of the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Ethology* **92**, 217-226.
- Sáez-Royuela M., Carral J.M., Celada J.D., Muñoz C. (1995) Effects of management on survival and growth of stage 2 juvenile freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under

- laboratory conditions. *Aquaculture* **133**, 123-133.
- Sáez-Royuela M., Carral J.M., Celada J.D., Muñoz C., Pérez J.R. (1996) Modified photoperiod and light intensity influence on survival and growth of stage 2 juvenile signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Appl. Aquac.* **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. *Aquacult. Int.* **9**, 489-497.
- Sáez-Royuela M., Carral J.M., Celada J.D., Pérez J.R., González A. (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.
- 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. *Aquac. Res.* **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.
- Streissl F., Hödl W. (2002) Habitat and shelter requirements of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* Schrank. *Hydrobiologia* **477**, 195-199.
- Taugbøl T., Skurdal J. (1992) Growth, mortality and molting rate of noble crayfish *Astacus astacus* L. juveniles in aquaculture experiments. *Aquacult. Fish. Manag.* **23**, 411-420.
- Van Stappen G. (1996) Use of cysts. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture (ed. by P. Lavens and P. Sorgeloos), pp. 107-136. FAO Fisheries Technical Paper, 361, FAO, Rome.

Table 1

Final survival and growth values of juvenile crayfish reared under different shelter availability during 80 days (experiment 1)

	4 shelters/crayfish	2 shelters/crayfish	1 shelter/crayfish
Survival (%)	91.1 ± 4.0	87.8 ± 2.5	81.1 ± 2.5
CL ¹ (mm)	11.28 ± 0.15	11.26 ± 0.15	11.69 ± 0.18
BW ² (mg)	341.60 ± 15.81	339.95 ± 13.94	384.81 ± 19.69
SGR ³ (% day ⁻¹)	2.94 ± 0.05	2.92 ± 0.05	3.07 ± 0.06
WG ⁴ (%)	1023.68 ± 52.00	1018.25 ± 45.87	1165.82 ± 64.78
Biomass (mg m ⁻²)	31123.3 ± 2798.3	29265.6 ± 1660.9	31212.2 ± 2485.6

Values are mean ± standard error
Means are not significantly different ($P < 0.05$)

¹ Carapace length

² Wet individual weight

³ Specific growth rate

⁴ Weight gain

Table 2

Crayfish (%) lacking chelae at various periods under different shelter availability during 80 days

Days	Shelters		
	4/crayfish	2/crayfish	1/crayfish
20	10.0 ± 5.1	5.6 ± 2.9	10.0 ± 3.3
40	2.2 ± 1.1	5.6 ± 1.1	4.5 ± 2.2
60	3.3 ± 1.9	5.6 ± 1.1	4.4 ± 1.1
80	4.4 ± 2.9	5.6 ± 2.2	4.5 ± 2.2

Values are mean ± standard error
Means are not significantly different ($P < 0.05$)

Table 3

Final survival and growth values of juvenile crayfish reared under three lighting conditions during 120 days (experiment 2)

	Continuous lighting	Continuous darkness	Natural photoperiod
Survival (%)	88.3 ± 4.4 ^a	85.0 ± 5.0 ^a	76.7 ± 8.3 ^a
CL ¹ (mm)	12.09 ± 0.20 ^a	12.70 ± 0.25 ^a	12.50 ± 0.23 ^a
BW ² (mg)	442.21 ± 22.96 ^a	543.08 ± 39.50 ^b	448.66 ± 25.23 ^a
SGR ³ (% day ⁻¹)	2.17 ± 0.04 ^a	2.32 ± 0.05 ^b	2.19 ± 0.05 ^a
WG ⁴ (%)	1354.63 ± 75.52 ^a	1686.44 ± 129.95 ^b	1375.85 ± 83.00 ^a
Biomass (mg m ⁻²)	39061.7 ± 3595.1 ^a	46161.7 ± 8628.2 ^a	34261.7 ± 2344.8 ^a

Values are mean ± standard error

Values in the same row having the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$)

¹ Carapace length

² Wet individual weight

³ Specific growth rate

⁴ Weight gain

Table 4

Crayfish (%) lacking chelae at various periods under three lighting conditions during 120 days

Days	Lighting conditions		
	Continuous lighting	Continuous darkness	Natural photoperiod
20	8.3 ± 3.3	3.3 ± 1.7	1.7 ± 1.7
40	6.7 ± 4.4	13.3 ± 3.3	6.7 ± 1.7
60	5.0 ± 2.9	11.7 ± 4.4	5.0 ± 2.9
80	5.0 ± 5.0	6.7 ± 6.7	3.3 ± 1.7
100	3.3 ± 3.3	5.0 ± 0.0	3.3 ± 1.7
120	1.7 ± 1.7	8.3 ± 3.3	1.7 ± 1.7

Values are mean ± standard error

Means are not significantly different ($P < 0.05$)

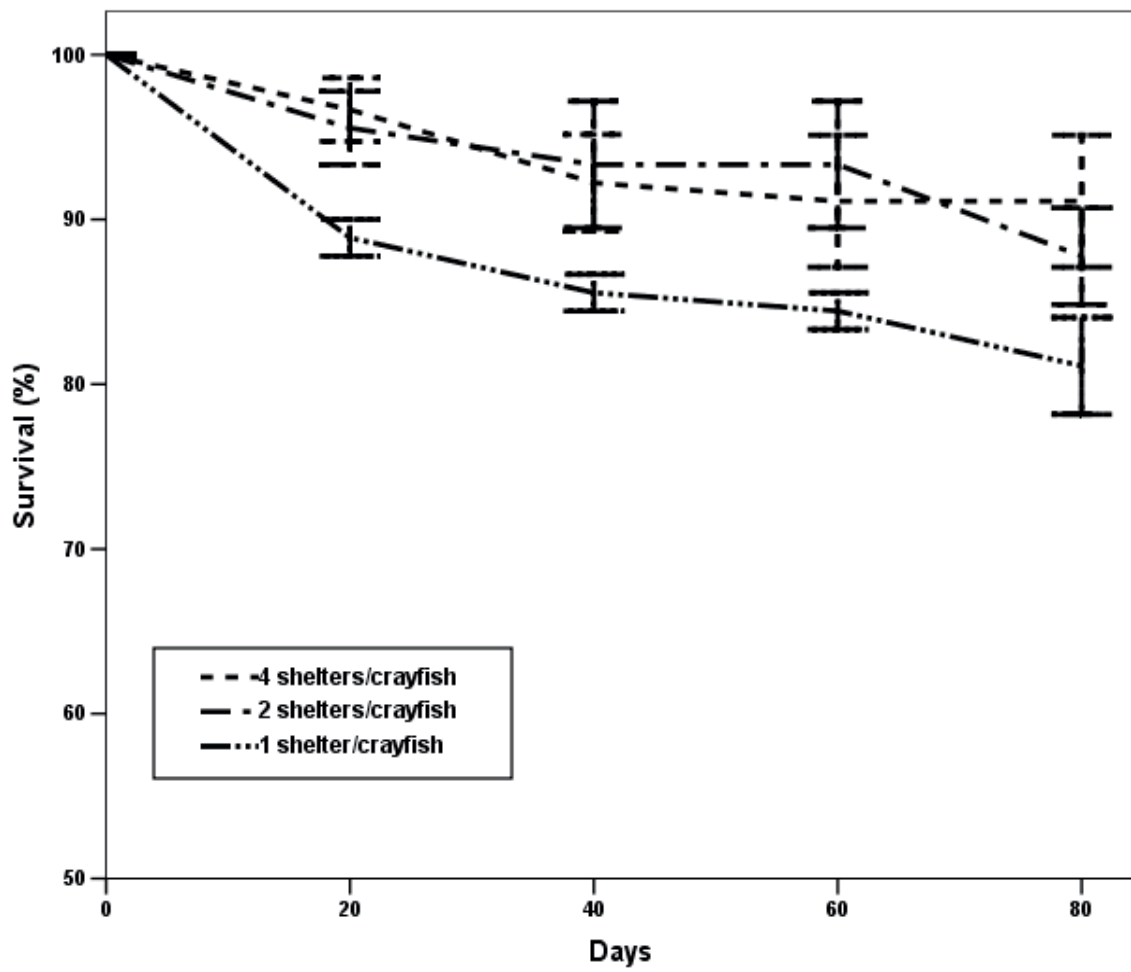


Figure 1. Survival rates at various periods of juvenile crayfish breeding under different shelter availability during 80 days. Error bars represent standard errors of the means

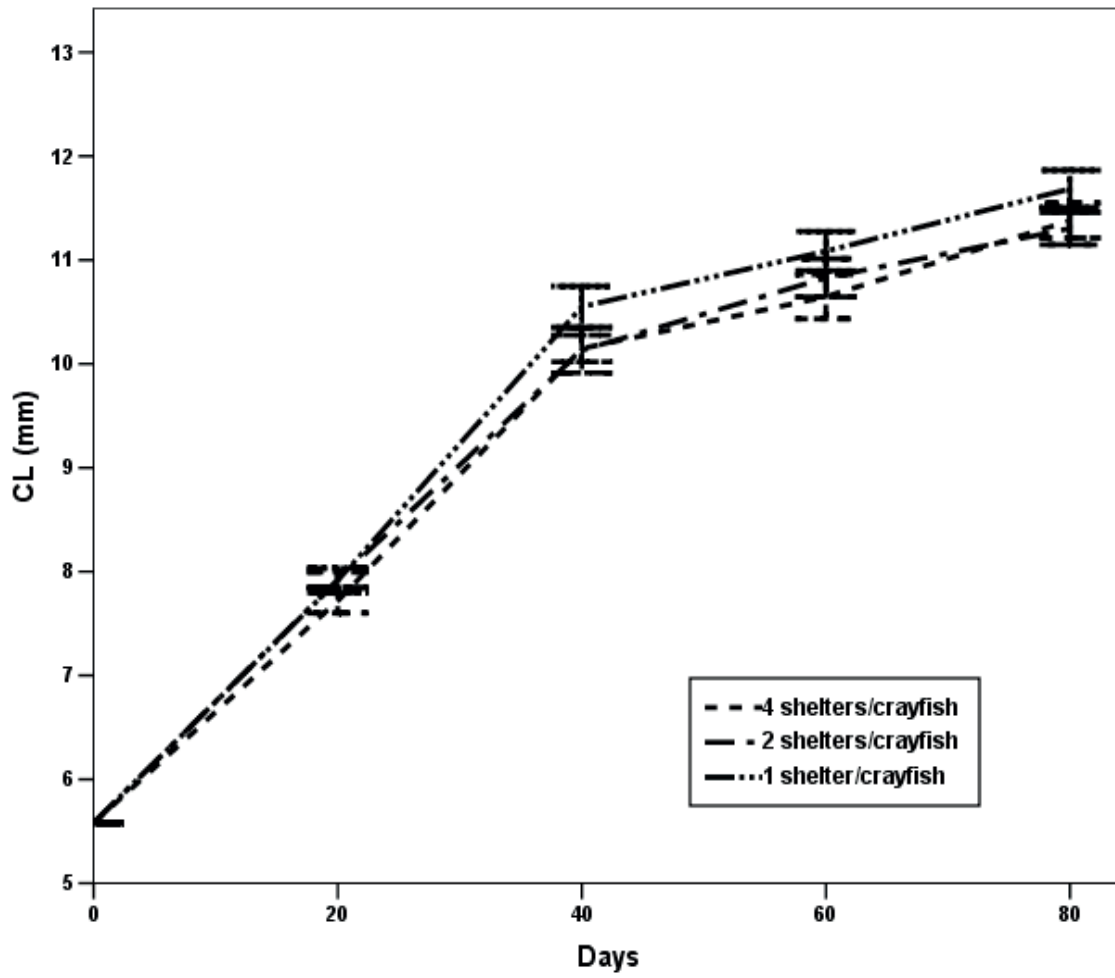


Figure 2. Average carapace length at various periods of juvenile crayfish breeding under different shelter availability during 80 days. Error bars represent standard errors of the means

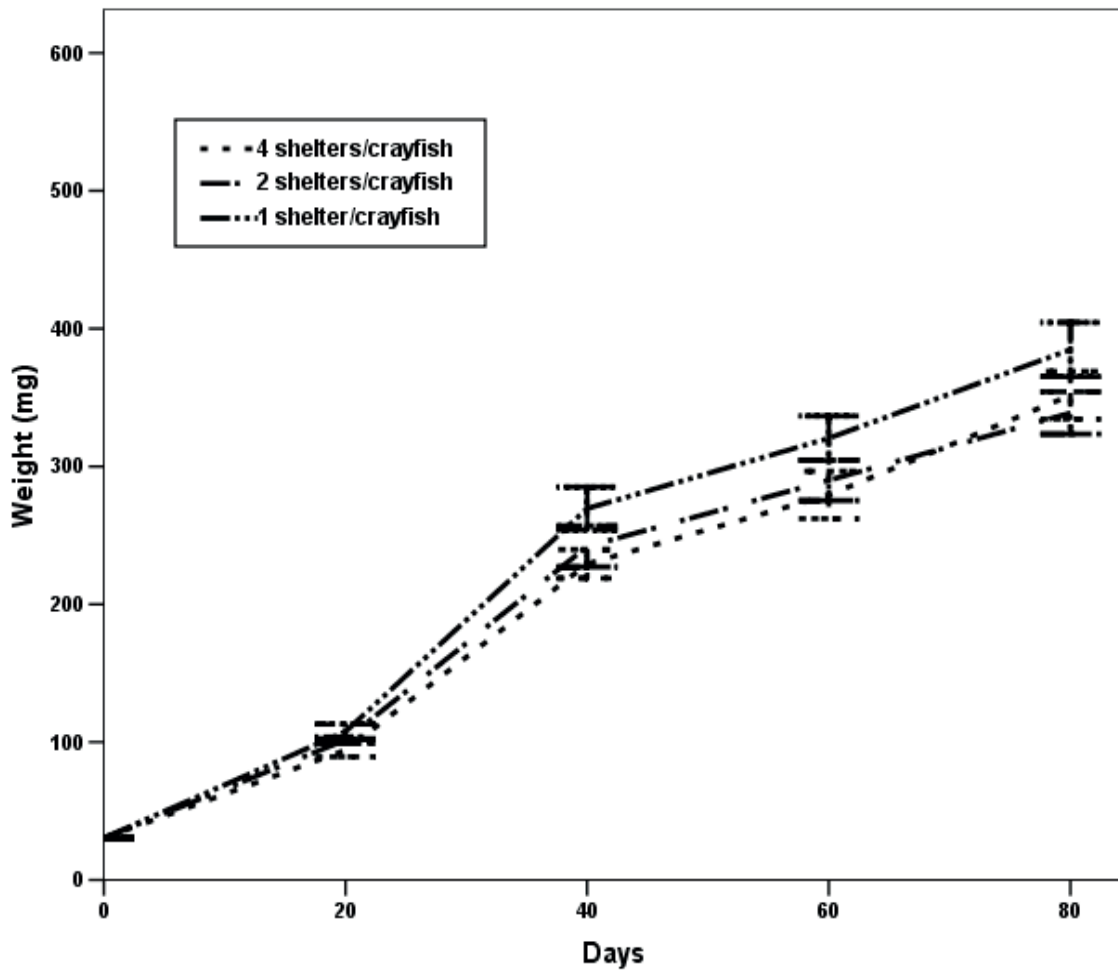


Figure 3. Average weight at various periods of juvenile crayfish breeding under different shelter availability during 80 days. Error bars represent standard errors of the means

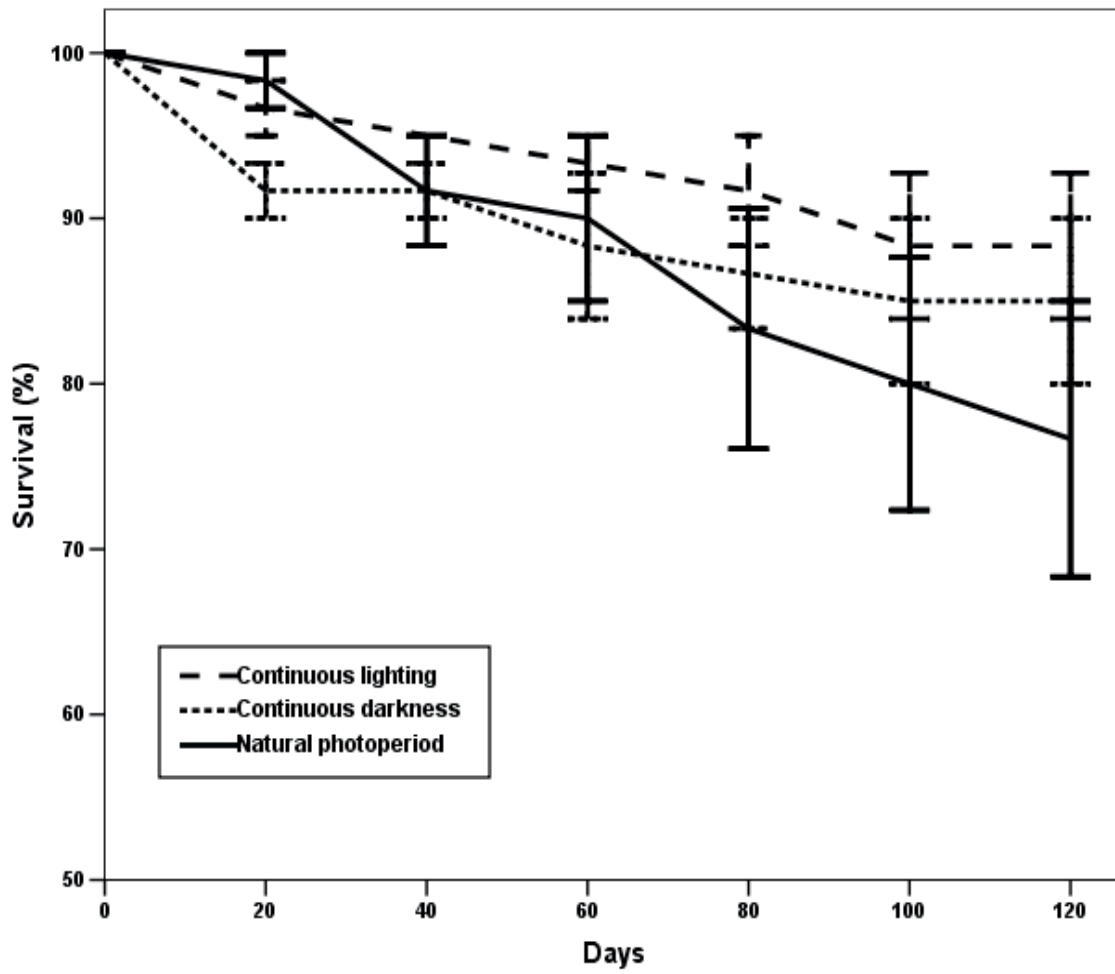


Figure 4. Survival rates at various periods of juvenile crayfish breeding under three lighting conditions during 120 days. Error bars represent standard errors of the means

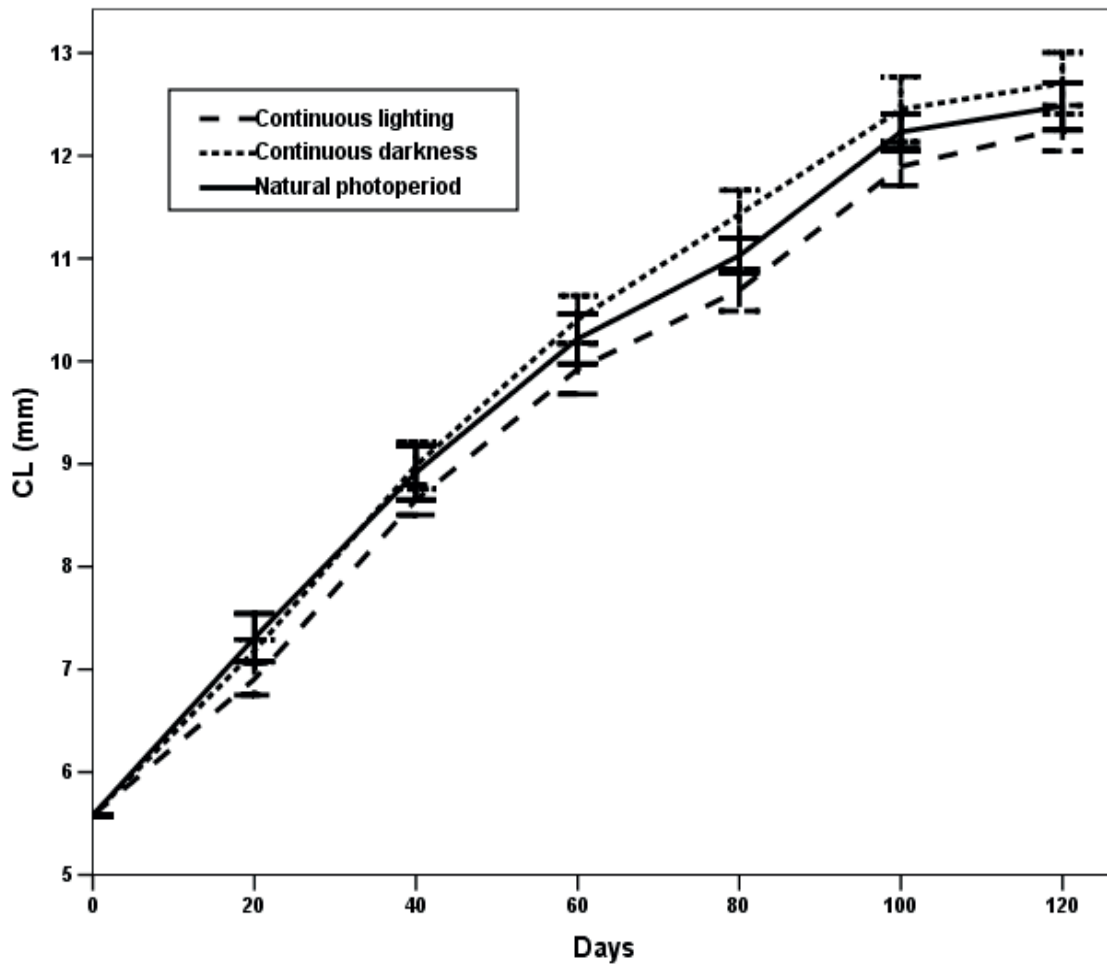


Figure 5. Average carapace length at various periods of juvenile crayfish breeding under three lighting conditions during 120 days. Error bars represent standard errors of the means

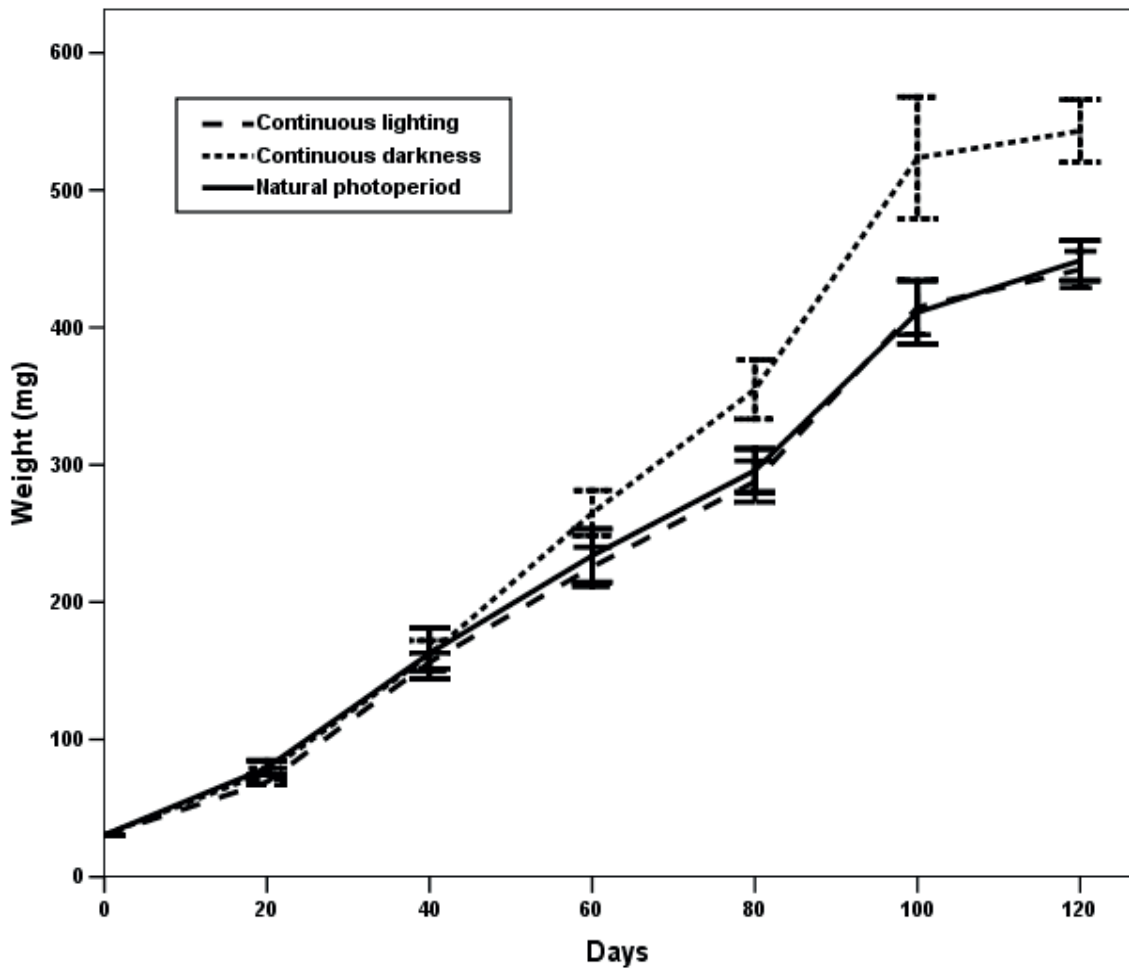
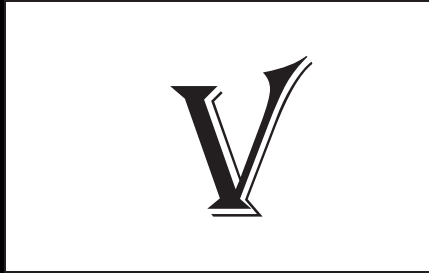


Figure 6. Average weight at various periods of juvenile crayfish breeding under three lighting conditions during 120 days. Error bars represent standard errors of the means



Intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) during the first six months: Effects of size grading

R. González*, J.D. Celada, J.M. Carral, V. García, M. Sáez-Royuela, Á. González

Dpto. Producción Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain.

*Corresponding author. Fax: +34-987-291187, e-mail address: rgonl@unileon.es

Abstract Recent advances on feeding in intensive rearing of juvenile astacid crayfish have made possible a good performance during the first months, which enables the development of studies searching for adequate periods of size grading from the start of first-feeding. A 180-day experiment aimed to the intensive rearing of *Pacifastacus leniusculus* in improved conditions of feeding was carried out under controlled conditions, evaluating effects of size grading at two different periods from the onset of exogenous feeding on survival, growth and feeding efficiency. Juvenile stage 2 were stocked in fiberglass tanks at a density of 100 m², and fed a dry diet for salmonids combined with restricted amounts of *Artemia* cysts. According to the time of size grading, five groups were tested: no grading, grading at 60 days (large and small size) and grading at 100 days (large and small size). After six months, survival ranged from 71.67% to 74.83% with no significant differences among groups. The highest final growth (average of upper and lower classes: 17.39 mm carapace length, 1.43 g weight) was reached by the crayfish sorted at 60 days, showing significant differences from the no grading group. Smaller crayfish graded at 60 days grew significantly faster than smaller crayfish graded at 100 days. Food conversion ratio was lower in the grading groups (mean 2.64), showing significant differences from the no grading group (3.23). As crayfish grew, specific growth rate was decreasing from a mean of 4.37 % day⁻¹ during the first 60 days up to a mean of 0.81% day⁻¹ during the last period (100-180 days). On the contrary, food conversion ratio was increasing from a mean of 0.92 during the first 60 days up to a mean of 3.23 during the last period (100-180 days). This study provides valuable information about the response of juvenile crayfish during six months of intensive rearing from the onset of exogenous feeding and shows that size grading allows a better performance and an improved feeding efficiency.

Keywords: Astacid crayfish; *Pacifastacus leniusculus*; juvenile; intensive rearing; size grading

1. Introduction

Size grading is a general practice in the culture of commercial fish species because of its benefits on survival, growth and improvement of feeding efficiency. Positive effects of grading on survival and growth are related to the absence of resource competition because of larger animals, which allows smaller individuals to avoid the negative effects of a dominance hierarchy (Barki et al., 2000; Southgate, 1993). Also when fish are of a nearly even size, the amount of food can be more accurately computed and feeding effi-

ciency improved (Coche and Muir, 1998; Leitritz and Lewis, 1976). In the overall, size grading seems to be especially recommended in aggressive species in which competition for food and even cannibalism are common, such as in the case of crustaceans, but effects on their culture are not well-known. Possible benefits of grading in the freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) have been reported by Daniels and D'Abramo (1994), Daniels et al. (1995), New (2002) and Tidwell et al. (2003, 2004). According to these authors, size grading results in increased average harvest size and total pond

production as well as improved food conversion ratios, although it is not generalized in culture. In the research for the intensive rearing of juvenile astacid crayfish, the low survival and growth rates obtained during three decades (see review by González et al., 2009a) have not allowed acceptable results after the first months from the onset of exogenous feeding, which hindered the development of size grading studies. Recent advances on feeding under controlled conditions (González et al., 2008; González et al., 2009a, 2009b; Sáez-Royuela et al., 2007) have made possible a good performance of crayfish from the start of first-feeding. Thus, the aim of this study was to evaluate effects of size grading at two different periods from the onset of exogenous feeding on survival, growth and feeding efficiency under conditions of improved feeding in the intensive rearing of juvenile crayfish during the first six months.

2. Material and Methods

2.1. Crayfish, facilities and experimental procedure

A 180-day experiment was carried out in indoor facilities with 1500 stage 2 juveniles *P. leniusculus* (mean: 5.58 ± 0.03 mm carapace length and 30.4 ± 0.3 mg weight) hatched in the laboratory by means of artificial incubation according to Melendre et al. (2006). Juveniles were placed in 15 fiberglass tanks (1 m² bottom area, 200 l water) provided with a 200 µm mesh filter outlet to avoid escape of feed. The stocking density was 100 crayfish m⁻². Three corrugated fibrecement sheets (54 x 20.5 cm) and six groups of four jointed sections of PVC pipes (4 cm long x 20 mm diameter) were provided as shelters in each tank. Aerated artesian well water was supplied in open system, and each tank had its own water inlet (flow rate 1.5 l min⁻¹) and outlet. Quality parameters of the incoming water were pH 7.7, hardness 10 °dH (calcium 72 mg l⁻¹), total dissolved solids 208.2 mg l⁻¹ and total suspended solids 14.4 mg l⁻¹. Throughout the trial, oxygen content was measured in the tanks with a Sension6 dissolved Oxygen Meter of Hatch Company (values around 7 mg l⁻¹, minimum 5.7

mg l⁻¹, maximum 7.8 mg l⁻¹). Ammonia and nitrites were measured with a Pocket-Photometer Lasa Aqua from water samples taken inside the tanks (values were always ammonia <0.02 mg l⁻¹ and nitrites <0.05 mg l⁻¹). Water temperature was maintained at 22 ± 1 °C and photoperiod was natural (ca. 14 h light:10 h dark). Tanks were cleaned twice a week.

2.2. Diet and feeding

Crayfish were fed a dry diet for salmonids (T-NUTRA-0, Skretting, Trouw España SA. Cojobar, E-09620, Burgos, Spain, composition data provided by the manufacturer: crude protein 54%, crude lipid 18%, crude cellulose 0.08%, crude ashes 12%, total phosphorus 1.8%, Vitamin A 10000 UI kg⁻¹, D₃ 1500 UI kg⁻¹, E 150 mg kg⁻¹, pellet diameter 0.9-1.5 mm) supplied by hand moderately in excess (2.5% body weight per day) in such a manner that a small remainder of uneaten food could be always seen in the bottom. This dry diet was combined with decapsulated *Artemia* cysts (cysts of INVE Aquaculture Nutrition, High HUFA 430 µm, Hoogveld 91, B-9200 Dendermonde, Belgium), according to González et al. (2009b). The initial amount was 500 cysts per crayfish per day (later increasing 15% every 20 days). Cysts were decapsulated according to the method described by Van Stappen (1996) and fresh stocks were prepared every three days and stored at 4 °C. *Artemia* cyst assessment was performed from the number of cysts g⁻¹ provided by the manufacturer. Food was supplied once a day, an adequate frequency for the diet used (González et al., 2009b).

2.3. Size grading

Crayfish were reared under the same conditions in 15 tanks from the onset of exogenous feeding until the time of size grading. At day 60, the crayfish from six tanks were mixed, weighed individually and selectively separated into two groups: large and small size. Each group was distributed randomly into three replicates (tanks) in such a way that the number of crayfish per tank was the same (± 1 crayfish). At day 100, the process was repeated using crayfish from other

six tanks no graded previously. Thus, five groups (three tanks per group) were compared:

- No grading.
- Size grading at 60 days: large size (>405 mg).
- Size grading at 60 days: small size (<405 mg).
- Size grading at 100 days: large size (>581 mg).
- Size grading at 100 days: small size (<581 mg).

2.4. Data collection and analysis

Every twenty days the percentage of survivors was calculated and a sample of 20 juveniles from each replicate (60 per treatment) was collected for recording carapace length (CL) and wet body weight (BW) individually. Carapace length was measured with digimatic calliper (to the nearest 0.01 mm). Excess water was removed with tissue paper and crayfish were weighed using a precision balance (to the nearest 0.001 g). Subsequently, animals were gently returned to their respective tanks. At the end of the experiment (180 days), survival rates were calculated and all surviving crayfish were measured and individually weighed. Specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) were expressed as $(\ln W_t - \ln W_i)100/T$ and $(W_t - W_i)100/W_i$, respectively, where W_t is the mean final weight (g), W_i is the mean initial weight (g), and T is the period in days. Food conversion ratio (FCR) was calculated as $D_t/W_t - W_o$, where D_t is the total amount of cysts (g of their commercial form) and dry diet used, and $W_t - W_o$ is the weight gain (g) over a specified period of time. Coefficient of variation of carapace length and body weight were expressed as $(\sigma/\mu)100$, where σ is the standard deviation and μ is the mean of carapace length or body weight values. Final biomass (g m^{-2}) in each tank was also recorded.

In all checks and at the end of the exper-

iment, percentages of crayfish lacking one or two chelae were determined.

All data were examined by analysis of variance (ANOVA) using the computer programme SPSS 16.0 (SPSS Inc. Chicago, Ill., USA). Duncan test was applied to compare means at $P < 0.05$ level of significance. Percentages were arcsine-transformed prior to statistical analysis.

3. Results

Final survival, growth values and food conversion ratio (180 days) in the no grading and grading groups (average of upper and lower classes) are presented in Table 1. Survival ranged from 71.67% to 74.83% with no significant differences among groups. Figure 1 shows the survival rates in the checks throughout the experimental period. All checks from day 20 up to the end of the trial (day 180) showed no significant differences in the percentage of survivors. At day 60 (first grading), mean survival was 84%, whereas it was 83% at the time of the second grading (100 days).

Regarding growth, the highest final carapace length (17.39 mm), weight (1.43 g), specific growth rate (2.06%) and weight gain (4575.84%) were reached by the crayfish sorted at 60 days, showing significant differences from the ungraded group in carapace length, body weight and specific growth rate. No significant differences were found among grading at 100 days and the rest. The highest biomass (103.11 g m^{-2}) was achieved by the crayfish graded at 100 days, with no significant differences from the other groups. Food conversion ratio (FCR) was lower in the grading groups (mean 2.64), showing significant differences from the no grading group (3.23).

Table 2 shows final survival, growth values and food conversion ratio (180 days) in the upper class of both grading groups. No significant differences were found in survival or growth values, averaging 74.5% survival, 19.11 mm CL, 1.84 g BW, 2.23 \% day^{-1} SGR, 5948.29% WG

and 137.03 g m⁻² biomass. Food conversion ratio did not differ significantly between groups (mean 2.36.).

Table 3 shows final survival, growth values and food conversion ratio (180 days) in the lower class of both grading groups. No significant differences were found in survival, averaging 72%. The highest carapace length (15.72 mm), weight (1.03 g), SGR (1.89 % day⁻¹), WG (3255.42%) and biomass (72.76 g m⁻²) were achieved by the crayfish graded at 60 days, showing significant differences from those graded at 100 days. Food conversion ratio did not differ significantly between groups (mean 2.93).

Figures 2 and 3 show mean carapace length and weight, respectively, in the checks throughout 180 days. In the no grading group, the values were always significantly lower than those obtained in the upper classes and significantly higher than those of the lower classes. No significant differences were found between both upper classes from day 100 up to day 180. For the same period, carapace length and weight in the lower class of grading at 60 days were significantly higher than those of the lower class of grading at 100 days.

Specific growth rate, weight gain and food conversion ratio in the no grading and grading groups at different periods (0-60, 0-100, 60-180 and 100-180 days) are presented in Table 4. Improved values were found in both grading groups, although differences were not significant. As crayfish grew, specific growth rate was decreasing from a mean of 4.37% day⁻¹ during the first 60 days up to a mean of 0.81% day⁻¹ during the last period (100-180 days). On the contrary, food conversion ratio was increasing from a mean of 0.92 during the first 60 days up to a mean of 3.19 during the last period (100-180 days).

Table 5 summarizes percentages of juveniles lacking one or two chelae throughout the 180 days. At the end of the trial, values were from 5.33% to 9.33%, whereas in previous con-

trols the range was between 2.33% and 9.67%. No significant differences were found among groups for the experimental period.

Table 6 presents final coefficients of variation of carapace length (CVCL) and weight (CVBW). Values in the no grading group (18.29% in carapace length, 62.75% in weight) were significantly higher than those recorded in grading at 60 days (around 13% in carapace length and 46% in weight) and at 100 days (around 13% in carapace length and 44% in weight).

4. Discussion

In astacid crayfish, grading studies starting from the onset of exogenous feeding have not been conducted so far. Previously, it was necessary to overcome the drawbacks of low survival and growth rates during the first months of rearing under controlled conditions. However, a study (Ahvenharju et al., 2005) was possible by using older animals (3.5 to 6 months) surviving to the initial phase. In parastacid crayfish, Qin et al. (2001) began the trial with *Cherax tenuimanus* whose weights ranged between 10 and 160 g. These experiments started at the time of grading, without considering the previous period, which involves breeding the animals from the start of first-feeding until their different growth allows a size grading. Therefore, a complete study on grading should include growth and loss data throughout the whole process, prior to and after grading.

The present study was conducted from the onset of exogenous feeding, comparing the effects of grading at different periods. Results showed that both gradings at 60 or 100 days improved growth values (Table 1). Moreover, the higher final growth of the smaller crayfish graded at 60 days compared with that of the smaller crayfish graded at 100 days (Table 3) proves the convenience of separating the bigger crayfish from the smaller individuals after the shortest period. This was probably because the smaller animals have benefited from the absence of the more dominant larger crayfish for longer. How-

ever, grading involves handling of animals that, according to Farrell and Leonard (2000) and Ahvenharju et al. (2005), could have harmful effects on growth and cheliped losses. In our study, grading management neither increased cheliped injuries nor affected negatively the crayfish performance. Considering that the initial density was 100 m⁻² and that the harmful effects of aggressive behaviour and cannibalism rise with increasing stocking density (González et al., 2009a), it could be expected that the higher the density the more evident the beneficial effects of grading.

As regards food conversion ratio, grading resulted in significant improvements in feeding efficiency. Compared with the ungraded group, graded crayfish converted feed more efficiently to body mass, as it has been reported in fish (Coche and Muir, 1998; Leitritz and Lewis, 1976) and in the crustacean *M. rosenbergii* (New, 2002). Separation of smaller individuals from the larger crayfish could have led to a reduction in levels of stress and dominance, which would allow them to feed optimally and use the maximum scope for growth (Ahvenharju et al., 2005; Martins et al., 2006; Strand et al., 2007), because when reducing energy needed for fighting, animals can utilize a higher proportion of consumed energy toward growth process (Davis, 2006; Martínez-Porchas et al., 2009).

The upper classes included the crayfish whose growth rate was higher during the period before grading. Later on, those crayfish kept growing faster than those of the lower classes. These facts suggest an intrinsic capacity for faster growth. Thus, grading could be useful with a view to the possibilities of development of programs in order to obtain a growth improvement within the shortest space of time, since this practice would allow the selection of the fastest growing animals to be used as breeders.

Considering as a whole the results of this study under improved feeding conditions, intensive rearing of juvenile crayfish for the first six months has been successfully carried out. This has made possible size grading with cray-

fish reared from the start of first-feeding, obtaining information throughout the whole process, prior to and after grading. With view to application possibilities in culture, grading may be recommendable once differences in growth appear, since it allowed an improved feeding efficiency and a better crayfish performance.

5. Acknowledgements

Funding of this study was the Plan Nacional de I+D+i, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, Research Project AGL2005-01127. We thank the financing of a grant for Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, reference AP2005-4860. We should also like to thank the Quiñón S.A. crayfish farm for their collaboration.

6. References

- Ahvenharju, T., Savolainen, R., Tulonen, J., Ruohonen, K., 2005. Effects of size grading on growth, survival and cheliped injuries of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) summerlings (age 0+). *Aquac. Res.* 36, 857-867.
- Barki, A., Harpaz, S., Hulata, G., Karplus, I., 2000. Effects of larger fish and size-grading on growth and size variation in fingerling silver perch. *Aquacult. Int.* 8, 391-401.
- Coche, A.G., Muir, J.F., 1998. Management for freshwater fish culture: fish stocks and farm management. F.A.O. training series 21/2, Rome.
- Daniels, W.H., D'Abramo, L.R., 1994. Pond production characteristics of freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* as influenced by the stocking of size-graded populations of juveniles. *Aquaculture* 122, 33-45.
- Daniels, W.H., D'Abramo, L.R., Fondren, M.W., Durant, M.D., 1995. Effects of stocking density and feed on pond production characteristics and revenue of harvested freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* stocked as size-graded juveniles. *J. World Aquacult. Soc.* 26, 38-47.
- Davis, K.B., 2006. Management of physiological stress in finfish aquaculture. *N. Am. J. Aquacult.* 68, 116-121.
- Farrell, P., Leonard, B., 2000. Frequent handling adversely affects the growth of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *J. Appl. Aquacult.* 10, 29-36.
- 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 under controlled conditions. *Aquaculture* 281, 83-86.
- González, R., Celada, J.D., González, A., García, V., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., 2009a. 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.* doi: 10.1007/s10499-009-9250-x.
- González, R., Celada, J.D., Carral, J.M., González, A., Sáez-Royuela, M., García, V., 2009b. Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different food supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. *Aquaculture*. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.07.009.
- Leitritz, E., Lewis, R.C., 1976. Trout and salmon culture: hatchery methods. California Department of Fish and Game. *Fish Bulletin* 164, 197 p.
- Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L.R., Ramos-Enríquez, R., 2009. Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. *Revista electrónica de veterinaria* 10(10), 16 p.
- Martins, C.I.M., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2006. The relationship between individual differences in feed efficiency and stress response in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 256, 588-595.
- 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.
- New, M.B., 2002. Farming freshwater prawns. A manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). FAO Fisheries Technical Paper 428. FAO, Rome.
- Qin, J.G., Ingerson, T., Geddes, M.C., Kumar,

- M., Clarke, S., 2001. Size grading did not enhance growth, survival and production of maron (*Cherax tenuimanus*) in experimental cages. *Aquaculture* 195, 239-251.
- Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Pérez, J.R., González, A., 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.
- Southgate, P., 1993. Disease in Aquaculture, in: Brown, L. (Ed.), *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. Pergamon Press Ltd, Headington Hill Hall, Oxford, pp. 91-129.
- Strand, Å., Alanärä, A., Magnhagen, C., 2007. Effect of group size on feed intake, growth and feed efficiency of juvenile perch. *J. Fish Biol.* 71(2), 615-619. 107-136.
- Tidwell, J.H., Coyle, S.D., Bright, L.A., VanArnum, A., Weibel, C., 2003. The effects of size grading and length of nursery period on growth and population structure of freshwater prawns stocked in temperate zone ponds with added substrates. *Aquaculture* 218, 209-218.
- Tidwell, J.H., Coyle, S.D., Dasgupta, S., 2004. Effects of stocking different fractions of size graded juvenile prawns on production and population structure during a temperature-limited growout period. *Aquaculture* 231, 123-134.
- Van Stappen, G., 1996. Use of cysts, in: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome, pp. 107-136.

Table 1 Final survival, growth values and food conversion ratio (180 days) of juvenile crayfish in the no grading and grading groups (average of upper and lower classes)

	No grading	Grading at 60 d	Grading at 100 d
Survival (%)	72.67 ± 2.19 ^a	71.67 ± 1.09 ^a	74.83 ± 1.70 ^a
CL (mm)	16.78 ± 0.21 ^a	17.39 ± 0.15 ^b	17.18 ± 0.14 ^{a,b}
BW (g)	1.30 ± 0.06 ^a	1.43 ± 0.03 ^b	1.38 ± 0.02 ^{a,b}
SGR (% day⁻¹)	1.99 ± 0.02 ^a	2.06 ± 0.01 ^b	2.03 ± 0.01 ^{a,b}
WG (%)	4182.71 ± 184.00 ^a	4575.84 ± 130.05 ^a	4432.51 ± 126.88 ^a
Biomass (g m⁻²)	94.61 ± 6.19 ^a	101.87 ± 13.72 ^a	103.11 ± 17.97 ^a
FCR	3.23 ± 0.13 ^a	2.67 ± 0.06 ^b	2.61 ± 0.06 ^b

Values are mean ± standard error. Data derived from all survivors of 3 replicates in the no grading group (n= 218) and of 6 replicates in the groups graded at 60 days (n= 430) and at 100 days (n= 449)
 Values in the same row having the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$)

Table 2 Final survival, growth values and food conversion ratio (180 days) of juvenile crayfish in the upper class of both grading groups

	Grading at 60 d	Grading at 100 d
Survival (%)	72.00 ± 1.58	77.00 ± 2.53
CL (mm)	19.04 ± 0.19	19.17 ± 0.16
BW (g)	1.82 ± 0.06	1.86 ± 0.05
SGR (% day⁻¹)	2.22 ± 0.02	2.24 ± 0.01
WG (%)	5884.04 ± 197.85	6012.54 ± 180.34
Biomass (g m⁻²)	130.98 ± 6.92	143.08 ± 1.20
FCR	2.40 ± 0.08	2.31 ± 0.06

Values are mean ± standard error. Data derived from all survivors of 3 replicates (n= 216 in grading at 60 days and n= 231 in grading at 100 days)
Means are not significantly different ($P < 0.05$)

Table 3 Final survival, growth values and food conversion ratio (180 days) of juvenile crayfish in the lower class of both grading groups

	Grading at 60 d	Grading at 100 d
Survival (%)	71.33 ± 2.33 ^a	72.67 ± 2.73 ^a
CL (mm)	15.72 ± 0.15 ^a	15.06 ± 0.14 ^b
BW (g)	1.03 ± 0.03 ^a	0.87 ± 0.03 ^b
SGR (% day⁻¹)	1.89 ± 0.02 ^a	1.81 ± 0.02 ^b
WG (%)	3255.42 ± 110.74 ^a	2758.25 ± 82.59 ^b
Biomass (g m⁻²)	72.76 ± 6.81 ^a	63.14 ± 4.04 ^a
FCR	2.93 ± 0.09 ^a	2.92 ± 0.09 ^a

Values are mean ± standard error. Data derived from all survivors of 3 replicates (n= 214 in grading at 60 days and n= 218 in grading at 100 days)
Values in the same row having the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$)

Table 4 Specific Growth Rate (% day⁻¹), Weight Gain (%) and Food Conversion Ratio in the no grading and grading groups at various periods throughout the 180 days

Days	No grading	Grading at 60 d	Grading at 100 d
0-60ⁱ			
SGR (% day ⁻¹)	4.29 ± 0.09	4.40 ± 0.08	4.41 ± 0.04
WG (%)	1215.13 ± 76.27	1310.99 ± 63.76	1310.39 ± 32.43
FCR	0.96 ± 0.06	0.91 ± 0.04	0.89 ± 0.02
0-100ⁱⁱ			
SGR (% day ⁻¹)	3.13 ± 0.06	3.14 ± 0.15	3.16 ± 0.07
WG (%)	2198.85 ± 135.44	2351.75 ± 361.61	2258.11 ± 69.44
FCR	1.44 ± 0.09	1.53 ± 0.23	1.51 ± 0.05
60-180			
SGR (% day ⁻¹)	0.98 ± 0.03	0.99 ± 0.04	0.98 ± 0.14
WG (%)	226.09 ± 13.54	228.41 ± 17.71	227.42 ± 51.63
FCR	2.82 ± 0.19	3.03 ± 0.42	3.01 ± 0.82
100-180			
SGR (% day ⁻¹)	0.78 ± 0.01	0.82 ± 0.04	0.83 ± 0.02
WG (%)	86.31 ± 1.51	92.90 ± 6.56	94.32 ± 3.86
FCR	3.20 ± 0.18	3.19 ± 0.49	3.17 ± 0.51

Values are mean ± standard error. Data derived from pooled samples of 3 replicates in the no grading group (n=60) and of 6 replicates in the grading groups (n=120) for the intermediate checks and from all survivors at day 180
Means are not significantly different ($P < 0.05$)

ⁱ Values calculated before grading (similar conditions)

ⁱⁱ Values in the no grading and grading at 100 day groups were calculated before grading (similar conditions)

Table 5 Percentages (%) of juvenile crayfish lacking chelae in the checks throughout the experimental period

Days	No grading	Grading at 60 d (>405 mg)	Grading at 60 d (<405 mg)	Grading at 100 d (>581 mg)	Grading at 100 d (<581 mg)
20	3.33 ± 0.67	6.33 ± 2.33	5.00 ± 1.00	5.67 ± 1.67	6.33 ± 1.20
40	8.33 ± 1.86	7.33 ± 2.33	7.33 ± 0.88	7.67 ± 1.67	9.00 ± 2.65
60	8.00 ± 3.06	3.33 ± 2.33	6.33 ± 0.33	6.33 ± 0.67	4.33 ± 1.45
80	5.00 ± 2.08	6.67 ± 1.45	3.00 ± 0.58	3.00 ± 0.58	6.00 ± 1.53
100	4.33 ± 0.67	4.67 ± 0.67	2.33 ± 0.88	3.00 ± 0.58	4.00 ± 1.00
120	4.67 ± 1.45	7.33 ± 0.19	3.67 ± 0.88	4.00 ± 0.58	5.33 ± 0.33
140	3.33 ± 1.45	5.67 ± 1.67	5.33 ± 1.20 ^a	5.00 ± 1.53	3.67 ± 1.76
160	9.67 ± 1.20	7.01 ± 1.00	7.00 ± 1.15	8.33 ± 1.45	7.67 ± 0.33
180	9.33 ± 2.33	6.67 ± 1.86	5.33 ± 0.33	6.00 ± 2.31	6.67 ± 2.03

Values are mean ± standard error
Means are not significantly different ($P < 0.05$)

Table 6 Final coefficients of variation (%) of carapace length and weight in the no grading and grading groups

	No grading	Size grading at 60 days (> 405 mg)	Size grading at 60 days (< 405 mg)	Size grading at 100 days (> 581 mg)	Size grading at 100 days (< 581 mg)
CVCL (%)	18.29 ± 0.98 ^a	14.25 ± 0.43 ^b	13.62 ± 0.36 ^b	12.86 ± 0.69 ^b	13.24 ± 0.61 ^b
CVBW (%)	62.75 ± 4.36 ^a	47.41 ± 2.34 ^b	46.12 ± 2.46 ^b	44.40 ± 3.09 ^b	42.46 ± 2.51 ^b

Values are mean ± standard error
Values in the same row having the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$)

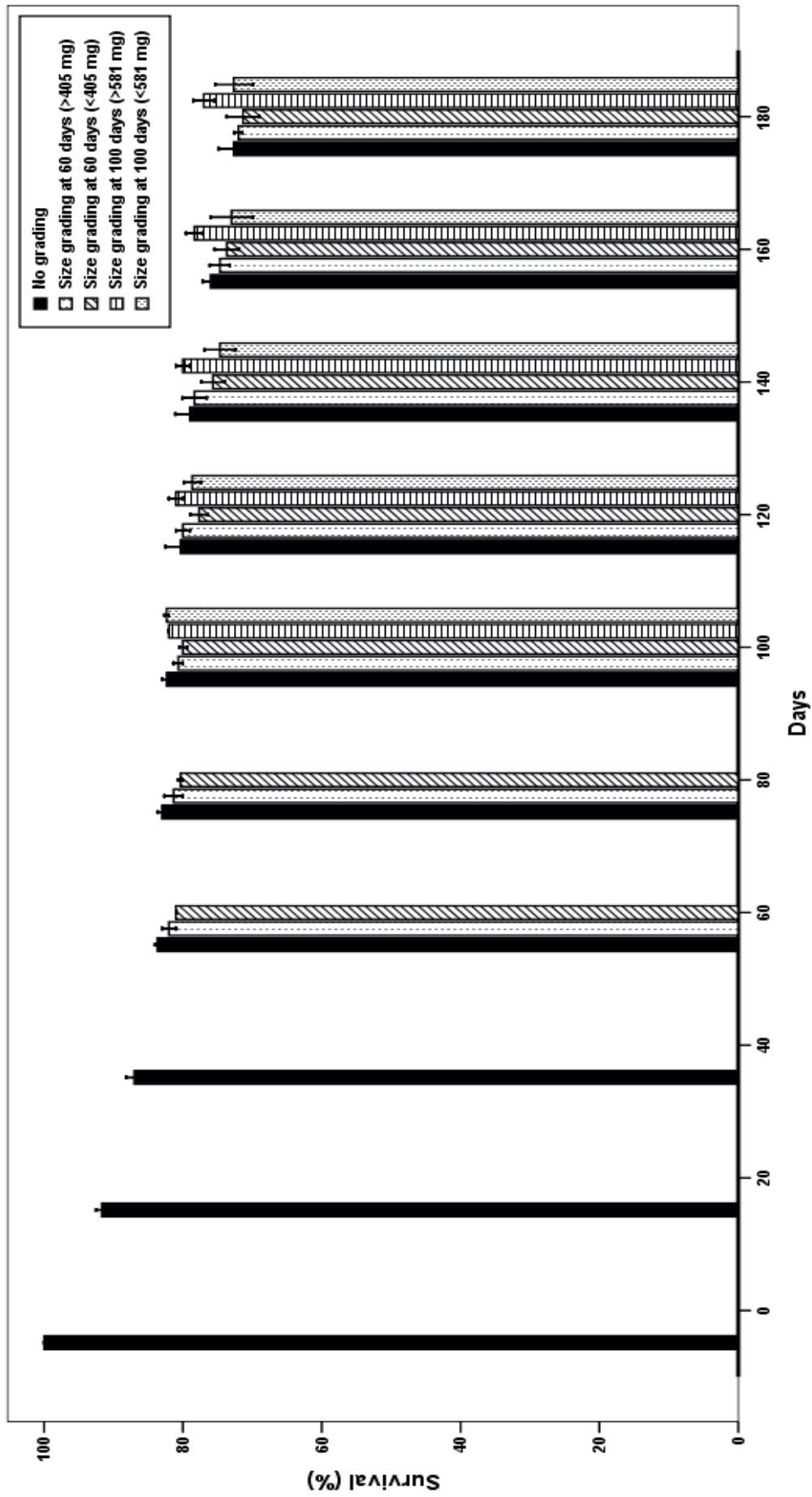


Figure 1 Survival rates of juvenile crayfish in the no grading and grading groups throughout 180 days

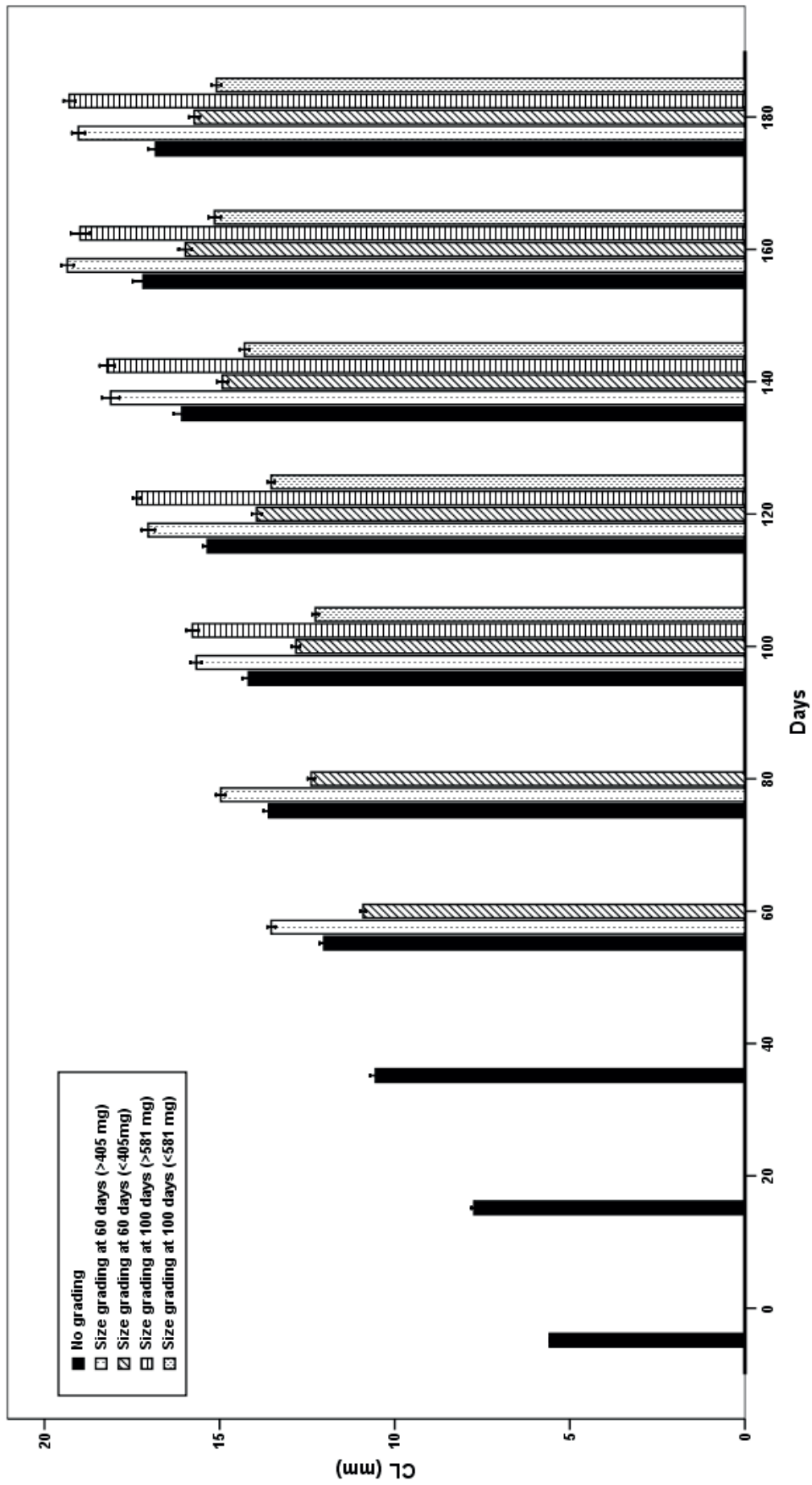


Figure 2 Changes in carapace length of juvenile crayfish in the no grading and grading groups throughout 180 days

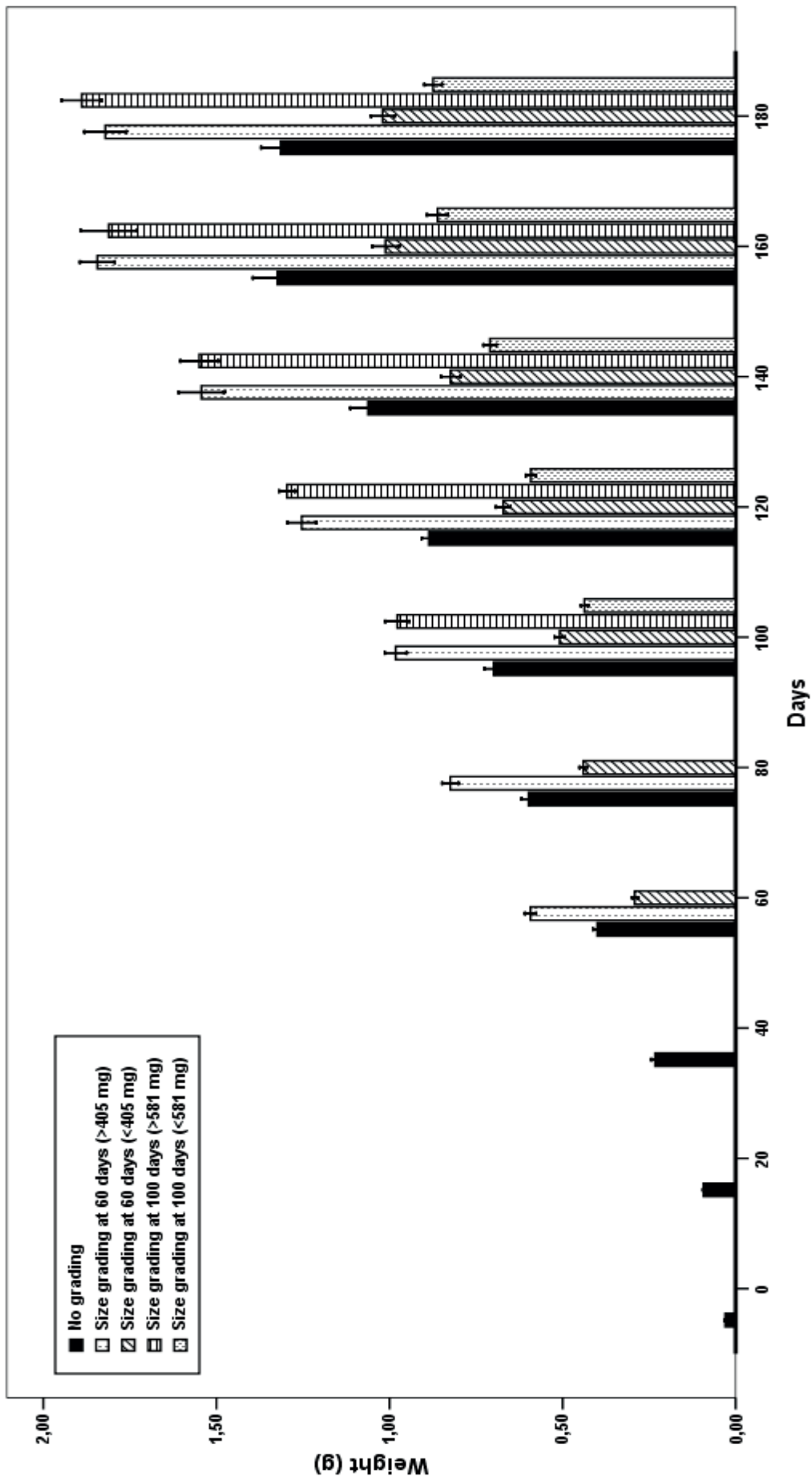


Figure 3 Changes in weight of juvenile crayfish in the no grading and grading groups throughout 180 days

González R, Celada JD, García V, Carral JM, González A, Sáez-Royuela M (2009). The artificial incubation of crayfish eggs: review and report from an experimental study concerning the effects of offspring origin (maternal or artificial incubation) on the survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries** **19**, 167-176.

González R, Celada JD, González A, García V, Carral JM, Sáez-Royuela M (2009). 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 R, Celada JD, Carral JM, González A, Sáez-Royuela M, García V (2009). Decapsulated *Artemia* cysts as dietary supplement for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) at different food supply frequencies from the onset of exogenous feeding under controlled conditions. **Aquaculture** **295**, 200-204.

González R, Celada JD, García V, González A, Carral JM, Sáez-Royuela M (2009). Shelter and lighting in the intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae), from the onset of exogenous feeding. **Aquaculture Research**. En revisión.

González R, Celada JD, Carral JM, García V, Sáez-Royuela M, González A (2010). Intensive rearing of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) during the first six months: Effects of size grading. **Aquaculture**. En revision.

