



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Carrera de Ciencias Biológicas

Departamento de Biodiversidad y Biología experimental

Tesis de Licenciatura

**Evaluación de la factibilidad de dos dietas de producción nacional, con y sin ensilado de pescado, para el cultivo de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*: análisis de la supervivencia, crecimiento y nutrición en juveniles.**

**Santiago Timpanaro**

Directora: Dra. Liane Stumpf

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología de la Reproducción y el Crecimiento de Crustáceos Decápodos, DBBE, FCEN-UBA e IBBEA, CONICET-UBA

Buenos Aires, diciembre de 2022

Dra. Liane Stumpf

Santiago Timpanaro

## **0 Agradecimientos:**

Esta tesis representa el fin de un ciclo, es el cierre de mi carrera para ser Licenciado en Ciencias Biológicas, la cual me llevó realizarla más de 7 años... Pero la carrera no la hice yo solo, hay muchas (muchísimas) personas detrás de todo esto a las cuales quiero dedicarles esta sección para agradecerles por tanto.

### **0.1 Factibilidad**

Antes que nada quiero agradecer a la Universidad de Buenos Aires por permitirme el acceso a una educación de alta calidad y de forma gratuita durante tantos años. Además, quiero agradecerle por otorgarme la Beca Estímulo y el financiamiento mediante el proyecto UBACYT 2018-2021 (nro. 20020170100021BA -Cs Agropecuarias y salud animal) que fueron importantísimos para el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a todas las personas, docentes y no docentes, que la conforman. Gracias por proporcionar un lugar de trabajo y de estudio tan placentero.

Al CONICET que mediante los proyectos (PIP 2015-2017 NRO 11220150100544) y PIP 2021-2023 NRO 11220200100605CO y PICT 2016-0759, dirigidos por la Dra. Laura López Greco, que también contribuyeron con el financiamiento de esta tesis.

### **0.2 Familia**

Primero y principal a mi familia, sin ellos nada de esto sería posible. Siempre estuvieron acompañándome, apoyándome en todo, dando ese empujoncito que te ayuda a seguir adelante. Tuve la suerte de que mis padres contaran con la posibilidad decirme que mientras yo estudiase ellos me iban a brindar todos los recursos necesarios que pudieran (ojalá todo el mundo pudiera hacer esto...). Por suerte pude contar siempre con un plato de comida listo al llegar a casa, a cualquier hora, luego de cursar todo el día, y con comida de sobra para poderme preparar un “tupper” para el almuerzo de los otros días. Por suerte nunca hizo falta que yo aporte a la casa económicamente, y eso reconozco que es una gran ventaja, un privilegio, tuve mucha suerte. Y más allá de esas cosas, el amor recibido, el cariño de toda la familia apoyándote en lo que hacés es el mayor impulso para seguir adelante y no bajar los brazos. Les estoy infinitamente agradecido. Gracias mamá, papá, Caro, Agus, tíos, tías, primas, Elena, a todos. Y en especial también a mi abuelo, que aunque hoy ya no esté con nosotros fue clave en muchísimos momentos para mí, esta tesis va para vos también abuelo Jorge.

### **0.3 Laboratorio**

En segundo lugar, quiero agradecerles a aquellas personas que me ofrecieron un lugar para poder hacer esta tesis posible. Me siento muy afortunado por el laboratorio que me aceptó desde el primer segundo con mucho cariño. La gente del “Labo 50” es increíble, todos allí me pudieron aportar algo para que yo aprenda y siga creciendo, formándome.

Eternamente agradecido a Laura por abrirme las puertas del laboratorio, por tenerme tanta fe y paciencia, por confiar en mí, y tenerme siempre en cuenta. Ella fue mi docente muy tempranamente en la carrera, luego de la clase que ella dio de crustáceos yo quedé fascinado y al final repartió un folleto que nos explicaba con lo que ella trabaja. Ese folleto lo guardé hasta que un día decidí hablarle, nos pusimos en

contacto, me mostró el laboratorio y al poco tiempo me invitó a formar parte. Sin dudas una excelente persona. Siempre recibí un excelente trato tanto como directora del laboratorio como con temas personales. Me hizo sentir querido en este lugar desde el primer día y voy a estarle por siempre agradecido.

La siguiente en la lista es una persona que se ganó un lugar en mi corazón para siempre, mi “LIDER ESPIRITUAL” (y directora de esta tesis), Lía. Ella es la persona que me acompañó desde el minuto 0 en todo. Que a pesar de ser mi directora trabajamos siempre a la par, jamás me sentí incómodo al trabajar con ella. Me enseñó de todo dentro del laboratorio, me vió fracasar y siempre me incentivó a seguir adelante. Me tuvo muchísima paciencia con miles de cosas. Siempre recibí un muy buen trato de ella, hasta en los momentos que yo mismo me mataría. Excelente persona le queda chico, ella merece mucho más que un monumento. Con el tiempo me di cuenta que no solo contaba con una directora, tenía una amiga. Ella siempre estuvo presente, apoyándome en todo, hasta me ha hecho de psicóloga. No hay palabras que alcancen para describir todo lo que hizo por mí y las sensaciones que me genera. Sin ella no sería la persona que soy hoy. Gracias Lichi, te adoro.

Dentro del laboratorio podemos encontrar muchas más personas, y todas son sumamente importantes, siempre sacándome sonrisas, enseñándome, compartiendo charlas, aportándome muchísimas cosas que sin ellas nada de esto sería como lo es. Les quiero dedicar esta sección a Caro, Agus, Amir, Emily y por supuesto, mi hermano colombiano de otra madre, mi querido Paul. Gracias chiques!

Pero en el laboratorio hubo muchas personas más, y aunque ya no estén todos allí porque decidieron seguir sus carreras en otros lados también son parte de que todo esto se posible. Gracias Dani, Pipi, Leo, Abi y Mati. Les quiero mucho. Por último están aquellas personas que no son del Labo 50, pero están en la vereda de enfrente, compartiendo el espacio del 101, también ellos me aportaron muchísimo. Sobretodo quiero agradecerle a Mede, quien supo ser mi tutor, profesor, compañero, colega en FAC, y amigo.

#### **0.4 Amigos**

Y como si fueran pocas personas a las que les agradecí, quienes me conocen saben que tengo muchísimos amigues. No voy a mencionarlas una por una porque no terminaría más y tengo miedo de olvidarme de alguien. Pero si quiero agradecerles aunque sea por grupitos (y algunas que no pertenecen a grupitos).

La primer persona que quiero agradecerle, es alguien muy especial para mí que no solo me acompañó y apoyó durante la carrera, sino que lo viene haciendo desde que nos conocimos en el jardín a los 5 años. Ailu. La que estuvo en todas, la que está en todas. Gracias amiga por tanto.

El segundo lugar en esta sección se lo llevan 2 personas que en estos momentos se encuentran muy lejos de mí y los extraño montones. Esta dedicatoria se toma un avión y se va hasta Israel, donde en estos momentos están Daiu y Martín. Ella me banca desde que comenzamos el secundario. Siempre recordaremos que las primeras semanas no se aprendía mi nombre, ella me decía “eh vos, biólogo marino”, ese fue el comienzo de una hermosa amistad. Martín se sumó unos años después, pero se volvió igual de importante en para mí. Gracias chicos, ojalá reencontrarnos pronto.

El siguiente agradecimiento quiero que sea recibido en “el nuevo gasómetro”, el templo donde formé una amistad inigualable. Si bien la conocí en la secundaria a mi amiga Angie, fue en este lugar, la cancha de San Lorenzo, donde nos conocimos realmente. ¿Qué hubiera sido de mi carrera sin esas 2 horas por fin de semana con ella en donde me olvidaba de toda preocupación? Ella es mi compañera de momentos felices, tristes, suspenso, ansiedad, ira, amor, y todas las emociones juntas. Y al igual que con San Lorenzo, voy a estar con ella en las buenas y en las malas hasta el fin. Te quiero un montón amiga, gracias por todo.

Desde los 2 años que hago natación en el mismo lugar, y aunque la mayoría solo van a piletas a tomar sol, de allí me llevé la amistad de muchas personas que siempre estuvieron conmigo. Debe ser uno de los grupos más variados que existen, dentro de él podemos encontrar guardavidas, profe de educación física, psicopedagoga, seño, económicos, nutricionista, psicólogo, traductora, músico, diseñadora, entre otras profesiones. Así y todo siempre encontramos un huequito para volver a vernos y ponernos al día con la vida de cada uno. Elles me ayudan a comprender la vida desde muchos puntos de vista. No los cambio por nada. ¡Gracias chicos!

Siguiendo el orden en que los fui conociendo, quiero agradecerles al grupo que mi madre denomina “los mosqueteros”. Con ellos terminé el secundario, y aunque también seguimos cosas muy diferentes, sé que siempre vamos a estar apoyándonos en todas. ¡Gracias!

A partir de este punto la escritura se me vuelve muy difícil, porque comienza el momento de agradecerles a aquellas personas que conocí durante la carrera, y el gran problema aquí es que somos como una gran familia. Con muchas personas comparto más de un grupo, y varias se conocen entre sí, es todo muy complicado. No quiero olvidarme de nadie y por eso no nombro de a uno, son todos muy especiales y en mayor o menor medida todos aportaron a que yo me recibiera. Desde pasar momentos de estudio en la biblioteca o por zoom, ratos en el pastito, cursar cuatrimestres enteros, mates, juntadas por fuera de la facultad, deportes, etc. Algunas se dieron cuenta que en esta facultad no estaba su lugar y migraron a otros lados, y sin embargo es el día de hoy que sus palabras me siguen haciendo muy bien y me dan fuerzas para seguir creciendo. Alguno de los grupos de la facultad que quiero destacar son: quienes me hablaron desde el CBC porque “la cuchara es una fase sólida más”, el grupito de “Limonana”, el grupo de “Polenta”, los chicos de mi equipo “Citrato de Meterla” con los que jugamos el torneo de la facultad de futsal, el equipo de mis amigos “La Selección Natural” que siempre los alentaré, el equipo de vóley, a quienes conocí en Tecnópolis en este último tiempo, a las chicas de “Sacachispas” .....

Hay personas que no forman parte de esos grupos, llegaron a mi vida a través de la facultad, y se quedaron para mucho más que lo académico. Quiero destacarlas porque sin ellas nada sería lo mismo. Un agradecimiento especial para Jule G., Belu L., Ju G., Abi otra vez, Wendy, Emi K., Frani, Lucas P., Majo, Lupa, Nicky, Marta.

Hay un grupo que durante este último tiempo fueron mi cable a tierra durante la semana, que me dieron ese ratito para desconectar de todo. Con este grupo jugamos al fútbol mixto por las noches (al momento de escribir esto los martes a las 22). Algunas personas son de la facultad y otras no. Elles también se merecen su reconocimiento, mi salud mental para poder seguir adelante con esta escritura no hubiera sido la misma sin esos ratos de ocio.

El último agradecimiento de esta sección va para aquellas personas que capaz hoy en día tengo poco o nulo contacto, pero que fueron súper importantes para preparar algún parcial, alguna tarde de estudio en la facultad, alguna charla motivadora. Quiero agradecerles a esas personas que aunque hayan tenido un paso fugaz por mi vida, aportaron aunque sea un granito de arena a que yo pueda completar mis estudios.

Espero no haberme olvidado de nadie, que todes sientan que fueron nombrados, aunque sea en un grupito. Realmente soy la persona que soy gracias a ustedes. Logré llegar hasta acá por ustedes.

#### **0.5 Debi**

Llegando al final, y no por eso menos importante, esta sección va dedicada a ella. Nos conocimos en Química Orgánica, allá por el año 2018, pero solo fuimos compañeros en el laboratorio. El tiempo pasó e intercambiábamos algunas palabras en encuentros ocasionales en los pasillos o en la biblioteca. Ella sabía que yo quería cursar la materia “Invertebrados 2” y me dijo que había posibilidades de que dicha materia se separase en 2, por lo que ya no podría cursarla como tal, me aconsejó hacerla en el mismo cuatrimestre que ella. Allí nos conocimos más. Y en una charla bajo las estrellas en la salida de campo de la materia decidimos irnos de vacaciones juntos, como amigos, ya que ninguno tenía con quien irse. Luego de ese viaje nada volvió a ser igual.

Realmente estos últimos años habrían sido imposibles para mí sin su sostén emocional. Atravesamos una pandemia que nos encerró en nuestras casas por un tiempo largo, y yo, con lo sociable que soy, de no haber tenido su contención me hubiese vuelto loco. Ella me brindó tranquilidad y ánimos para seguir estudiando y para escribir esta tesis en momentos que fueron muy duros para todes. Y hoy, con todo bastante más normalizado, sigue estando a mi lado y disfrutando de la compañía mutua que nos brindamos. Gracias Debi, me hacés mucho muy feliz. Te amo.

#### **0.6 San Lorenzo**

¿Acaso este agradecimiento no va dirigido a una persona? Así es. El último de los agradecimientos va dirigido al club del cual soy hincha, el club de mis amores, el Club Atlético San Lorenzo de Almagro. Y sí, tengo mis motivos para dedicarle esta sección a un club, y si no les gusta saludos. Uno de los principales motivos es que gracias a esta institución es que conocí a muchas de las personas nombradas anteriormente. Fue en este lugar, en donde en 1999 con apenas 2 años y unos meses que me inicié en el mundo de la natación, y es el día de hoy que con casi 26 años sigo yendo a la misma pileta a entrenar. Además en mi adolescencia allí aprendí a jugar al vóley, y pude realizar este deporte por 6 años, sin los cuales hoy no formaría parte del equipo de la facultad. Como bien dije, allí conocí a muchas de las personas sin las cuales hoy todo sería diferente, y que sin el apoyo de ellos no hubiese llegado hasta acá.

Además hay que sumarle los ratos de entretenimiento que este club me brindó, con alegrías y tristezas, momentos de euforia y ansiedad. No solamente hablando del fútbol masculino de 11, como la mayoría de la gente que sigue a un equipo. Yo sigo a todas las disciplinas (que tengo la posibilidad) de San Lorenzo, masculinas y femeninas. Incluso he llegado a compartir presencialmente partidos de vóley femenino de San Lorenzo con mi tutor, Mede.

Por esto y mucho más, quiero decirte, gracias San Lorenzo!

“... *San Lorenzo, es un sentimiento*

*No se explica, se lleva bien adentro*

*Y por eso, te sigo a donde sea*

*Yo soy cuervo hasta que me muera ..."*

Gracias a todes, esta tesis es de ustedes también!

## Índice

1. Resumen: .....	7
2. Título y resumen en inglés: .....	9
3. Introducción:.....	11
4. Objetivos e hipótesis:.....	14
5. Materiales y métodos: .....	15
5.1. <i>Dietas experimentales</i> :.....	15
5.2. <i>Condiciones de mantenimiento del plantel de reproductores para la obtención de los juveniles</i> :.....	18
5.3. <i>Crecimiento de los juveniles en condición pre-experimental</i> : .....	19
5.4. <i>Condiciones experimentales generales</i> : .....	20
5.5. <i>Registro y cálculos de las variables</i> : .....	21
5.5.1. <i>Selección de las muestras liofilizadas y análisis bioquímico</i> :.....	22
5.5.1.1. Cuantificación de proteínas: .....	23
5.5.1.2. Cuantificación de lípidos:.....	24
5.5.1.3. Cuantificación de glucógeno:.....	24
5.5.2. <i>Análisis histológico del hepatopáncreas</i> : .....	25
5.6. <i>Ánalisis estadístico</i> : .....	25
6. Resultados:.....	26
6.1. <i>Parámetros zootécnicos</i> : .....	26
6.1.1. <i>Supervivencia</i> :.....	26
6.1.2. <i>Periodo de intermuda</i> : .....	27
6.1.3. <i>Crecimiento (masa corporal y ganancia en masa)</i> : .....	28
6.1.4. <i>Eficiencia alimenticia</i> : .....	29
6.1.5. <i>Índices somáticos</i> :.....	30
6.1.6. <i>Análisis bioquímico</i> : .....	30
6.1.6.1. <i>Proteínas solubles</i> .....	30
6.1.6.2. <i>Lípidos</i> .....	31
6.1.6.3. <i>Glucógeno</i> .....	31
6.1.7. <i>Análisis histológico</i> : .....	33
7. Discusión: .....	33
8. Conclusión:.....	38
9. Referencias bibliográficas: .....	39

## 1. Resumen:

La producción de crustáceos mediante la acuicultura ha ido ganando año a año un mayor peso dentro de lo que es la producción animal a nivel mundial. Contrariamente a este crecimiento, en nuestro país no se han registrado datos de producción de crustáceos decápodos en los últimos 16 años. La langosta de agua dulce, *Cherax quadricarinatus*, la cual fue el modelo experimental de la presente tesis, fue precisamente la última especie de crustáceo registrada en la producción acuícola nacional. Esta langosta, conocida como *redclaw*, actualmente es cultivada en muchos países, entre los que se encuentran Australia, China, Estados Unidos, y México. Posee numerosos atributos que la hacen tener un gran potencial para ser cultivada, entre otros: tolerancia a un amplio rango de condiciones ambientales, crecimiento rápido, tolerancia a altas densidades de cultivo, ciclo de vida con desarrollo directo, y hábito alimenticio de tipo omnívoro aceptando una amplia variedad de alimentos en su dieta. El alimento en acuicultura es uno de los factores que pueden limitar el desarrollo de un cultivo dado que representa hasta un 70% del costo total, dependiendo del sistema de producción. La harina de pescado es el principal ingrediente que encarece el alimento dado que hay mucha demanda en el mercado y su sustentabilidad está ampliamente discutida. Sin embargo, existen evidencias que este ingrediente puede ser reemplazado parcial o totalmente por harinas de origen vegetal y por ensilado de pescado (procesamiento acido o fermentado de los residuos pesqueros/acuícolas) con buenos resultados de crecimiento en otros crustáceos. En este sentido, el objetivo de esta tesis fue evaluar la factibilidad en la utilización de dos dietas en la alimentación de juveniles de *C. quadricarinatus* ambas formuladas con ingredientes locales y compuestos mayormente con fuentes de proteína vegetal (harina de soja, afrecho de arroz y harina de maíz), con la diferencia de que una de las dietas tuvo en su composición el ensilado de pescado (D1), y la otra no (D2). Las fuentes proteicas de origen animal para D1 y D2 también fueron provistas por la harina de pescado y la harina de carne. La D1 fue más proteica (44%) y lipídica (13,5%) que la D2 (38% de proteína cruda y 11,5% de lípidos).

Se conformaron 2 grupos de juveniles de langostas *C. quadricarinatus* con 20 individuos cada uno de aproximadamente 1 gramo, los cuales fueron mantenidos en condiciones individuales y óptimas para el crecimiento. A cada grupo le fue asignado una de las dietas, y se alimentó a los animales diariamente hasta alcanzar la cuarta muda. Luego de cada muda fue registrado el peso y el tiempo de intermuda. Una vez cumplido este plazo se las sacrificó para realizar mediciones de variables zootécnicas (masa corporal, supervivencia, eficiencia alimenticia e índices somáticos), bioquímicas (concentraciones y retenciones proteicas, lipídicas y del glucógeno en distintos tejidos) e histológicas (estructura del hepatopáncreas). De las 20 variables respuestas analizadas solo se encontraron diferencias significativas que manifiesten un efecto diferencial entre dietas en 4 de ellas. La eficiencia proteica, eficiencia lipídica y la retención de glucógeno fueron menores en los juveniles alimentados con la D1, mientras que el índice del cefalotórax

fue mayor en estos juveniles. En líneas generales se puede inferir que ambas dietas, D1 (con ensilado) y D2 (sin ensilado), aportaron suficientes nutrientes para que los juveniles de la langosta logren una alta supervivencia (mayor a 80%), un adecuado crecimiento (400 % de ganancia en masa total) y mantengan un buen estado nutricional (sin cambios estructurales en el hepatopáncreas y su dinámica energética). Por lo tanto, estos resultados indican la potencial factibilidad en el uso de ambas dietas en cultivo, al menos por un periodo de 3 meses aproximadamente. Por otra parte, al no observarse un mejor aprovechamiento de los nutrientes de la dieta con ensilado (D1) esto podría estar indicando que el nivel proteico de esta dieta fue mayor que el requerimiento de la langosta, por ello se sugiere una reducción en la cantidad de harina de pescado utilizada en la D1 (ocasionando una reducción proteica) para que el uso del ensilado de pescado sea ventajoso.

El trabajo presentó resultados de crecimiento, supervivencia y estado nutricional muy prometedores y puede ser utilizado como una guía para una adecuada formulación de alimentos para el cultivo de la especie en nuestro país. Finalmente, este estudio se enmarca en el concepto de acuicultura más sustentable porque busca estudiar otras fuentes alternativas de proteína para una futura reducción del uso de la harina de pescado en las dietas de la langosta.

Palabras clave: Crustáceos, dietas, crecimiento, nutrición

## 2. Título y resumen en inglés:

Title: Evaluation of the feasibility of two locally produced diets, with and without fish silage, for the culture of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*: analysis of survival, growth and nutrition in juveniles.

### Abstract:

The production of aquaculture crustaceans has been gaining more weight year after year within what is animal worldwide production. Contrary to this growth, no production data for decapod crustaceans have been recorded in our country in the last 16 years. The freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, which was the experimental model of this thesis, was precisely the last crustacean recorded species in national aquaculture production. This crayfish, known as *redclaw*, is currently farmed in many countries, including Australia, China, the United States, and Mexico. It has numerous attributes that makes it have great potential to be cultivated, among others: tolerance to a wide range of environmental conditions, rapid growth, tolerance to high culture densities, life cycle with direct development, and omnivorous eating habit, accepting a variety wide range of foods in your diet. Feed in aquaculture is one of the factors that can limit the development of a culture since it represents up to 70% of the total cost, depending on the production system. Fishmeal is the main ingredient that makes food more expensive since there is a lot of demand in the market and its sustainability is widely discussed. However, there is evidence that this ingredient can be partially or totally replaced by meals of vegetable origin and by fish silage (acid processing or fermentation of fishery/aquaculture waste) with good growth results in other crustaceans. In this sense, the objective of this thesis was to evaluate the feasibility of using two diets to feed *C. quadricarinatus* juveniles, both formulated with local ingredients and composed mainly of vegetable protein sources (soybean meal, rice bran and cornmeal), with the difference that one of the diets had fish silage in its composition (D1), and the other did not (D2). Animal protein sources for D1 and D2 were also provided by fish meal and meat meal. D1 was more protein (44%) and lipid (13.5%) than D2 (38% crude protein and 11.5% lipid).

Two groups of juvenile *C. quadricarinatus* crayfishes were formed with 20 individuals each of approximately 1 gram, which were kept in individual and optimal conditions for growth. Each group was assigned one of the diets, and the animals were fed daily until reaching the fourth molt. After each molt, the weight and intermolting time were recorded. Once this period finished, they were sacrificed to measure zootechnical variables (body mass, survival, feed efficiency and somatic indices), biochemical (protein, lipid and glycogen concentrations and retention in different tissues) and histological (hepatopancreas structure). Out of the 20 response variables analysed, only were found that 4 of them shown a significant differential effect between diets. Protein efficiency, lipid efficiency and glycogen retention were lower in juveniles fed with D1, while the cephalothorax index was higher in those juveniles.

In general terms, it can be inferred that both diets, D1 (with silage) and D2 (without silage), provided enough nutrients for crayfish juveniles to achieve high survival (greater than 80%), adequate growth (400 % of total mass gain) and maintain a good nutritional status (without structural changes in the hepatopancreas and its energetic dynamics). Therefore, these results indicate the potential feasibility in the use of both diets in culture, at least for a period of approximately 3 months. On the other hand, since a better use of the nutrients of the diet with silage (D1) was not observed, this could be indicating that the protein level of this diet was higher than the requirement of the crayfish, for this reason, a reduction in the amount of fishmeal used in D1 is suggested (causing a protein reduction) so that the use of fish silage is advantageous.

The work presented very promising growth, survival and nutritional status results and can be used as a guide for an adequate formulation of feeds for the cultivation of the species in our country. Finally, this study is part of the concept of more sustainable aquaculture because it seeks to study other alternative sources of protein for a future reduction in the use of fishmeal in lobster diets.

Key words: Crustaceans, diets, growth, nutrition

### 3. Introducción:

El consumo de organismos acuáticos (principalmente peces, moluscos y crustáceos) representan una alternativa más saludable al consumo de la proteína animal de origen terrestre dado que sus productos cárnicos son altamente proteicos, presentan un menor contenido de grasas saturadas y son ricos en ácidos grasos poliinsaturadas como los omega-3, siendo todas estas propiedades beneficiosas para la salud (Tacon, 2022). En este sentido, su producción mediante la acuicultura puede proporcionar una mayor disponibilidad de alimentos de mayor calidad nutricional mejorando la alimentación de la población en muchos países en desarrollo y desarrollados (Sankhla & Kumar, 2020). En 2020, la acuicultura aportó el 49% del valor total de la producción mundial de animales acuáticos con la mayor representatividad de este número por parte de los peces (66%), seguido de los moluscos (19,5%) y por último de los crustáceos (13%) (FAO, 2022). Con respecto a la producción de crustáceos registrada en 2020, los decápodos de agua dulce representaron el 60% del total de esta producción destacándose la langosta *Procambarus clarkii*, el cangrejo *Eriocheir sinensis*, y los camarones *Macrobrachium rosenbergii* y *M. nipponense*, que fueron los más cultivados (FAO, 2022). Actualmente en Argentina los datos sobre la producción acuícola muestran la inexistencia de cultivos de crustáceos decápodos ([https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/Informes/\\_archivos//000001\\_Analisis%20del%20Sector%20Acu%C3%ADcola%20Argentino.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/Informes/_archivos//000001_Analisis%20del%20Sector%20Acu%C3%ADcola%20Argentino.pdf)). De hecho, el último registro oficial fue en el año 2006 para la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* mostrando un pequeño aporte de carne (unas pocas toneladas) (Luchini & Panné Huidobro, 2008; Wicki et al., 2008). Desafortunadamente, esta “falta” va en contra de la tendencia mundial de incremento en cantidad y en variedad en la producción de crustáceos y en contra de la diversificación agraria que tanto se busca en el país.

*Cherax quadricarinatus* es conocida como langosta de “pinzas rojas” (*redclaw*) y es un crustáceo decápodo continental cultivado en muchos países como Australia (donde es endémica de los cuerpos de agua dulce), China, Estados Unidos, México, entre otros (Hernández-Llamas et al., 2020; Jones & Valverde, 2020; Shun et al., 2020a; Shun et al., 2020b). Es considerada una especie robusta, resistente y de fácil adaptabilidad a las zonas sub-tropicales y tropicales. Además, sus atributos físicos, biológicos y comerciales tales como el ciclo de vida directo, la baja vulnerabilidad nutricional, el crecimiento rápido, el comportamiento no agresivo y no excavador, la tolerancia a las altas densidades de cultivo, y la posibilidad de inclusión de una amplia variedad de ingredientes de origen animal y vegetal en la formulación de alimentos para su dieta, hacen que su tecnología de cultivo sea básica y de relativamente bajo costo (Cortés-Jacinto et al., 2003; Calvo et al., 2012; Saoud et al., 2012; Zhu et al., 2013; Rigg et al., 2020; Haubrock et al., 2021). Asimismo, *C. quadricarinatus* ha sido objeto de numerosos estudios sobre su crecimiento y su nutrición (Meade & Watts, 1995; Villarreal-Colmenares, 2002; Cortés-Jacinto et al., 2003,

2004a, b, 2005; Hernández Vergara et al., 2003; Thompson et al., 2006; Campaña-Torres et al., 2008; Stumpf et al., 2014; Stumpf & López Greco, 2015; Stumpf et al., 2019) y los resultados fueron un importante aporte para mejorar su tecnología de cultivo y sus valores productivos. Sin embargo, la producción de esta especie aún se ve obstaculizada por la falta de tecnología que intensifique su producción. En este sentido, aún falta desarrollar manejos alimenticios eficientes y confiables y alimentos balanceados de bajo costo que cumplan con los requisitos nutricionales especie-específicos (Saoud et al., 2012; Saoud et al., 2013; Rigg et al., 2020).

El alimento acuícola puede constituir hasta el 70% del costo operativo en un sistema de producción y es considerado como un factor crítico para el fomento y el desarrollo del cultivo de cualquier especie. Al mismo tiempo, el aumento del costo del principal ingrediente utilizado (harina de pescado) en la formulación conjuntamente con que su producción mundial fluctúa en función de los cambios en las capturas de determinadas especies, han promovido el encarecimiento del alimento (FAO, 2022). En consecuencia, numerosos estudios con la langosta de agua dulce *redclaw* (principalmente en los estadios iniciales de su desarrollo) han sido realizados con el objetivo de encontrar harinas alternativas más económicas y sostenibles para el reemplazo parcial o total de la harina de pescado en su dieta (Rigg et al., 2020). De acuerdo a los resultados publicados, se logró un adecuado crecimiento y supervivencia en juveniles de la langosta *redclaw* cuando la harina de pescado fue reemplazada parcial o totalmente por la harina de sorgo, harina de arveja, harina de trigo, harina de subproductos avícolas, harina de levadura, harina de semilla de algodón, harina de soja, entre otros (Cortés-Jacinto et al., 2005; Thompson et al., 2005; Garza de Yta et al., 2012; Huang et al., 2017; Hulefeld et al., 2018; Nguyen et al., 2019; Yang et al., 2020; Wang et al., 2020; Qian et al., 2021, entre otros).

Otro potencial ingrediente “candidato” para reemplazar la harina de pescado en las dietas para crustáceos (y de otros organismos acuáticos) es el ensilado de pescado. El ensilado se obtiene de un procesamiento ácido o fermentado de los residuos pesqueros o acuáticos (Olsen & Toppe, 2017; Samaddar, 2018; Afreen & Ucak, 2020) y utilizarlo como ingrediente posibilitaría dar uso a los residuos generados por la pesca y acuicultura y así disminuir el impacto ambiental generado por ambos sectores (Herrero, 2021). Los estudios realizados en crustáceos como el camarón marino *Litopenaeus vannamei* y el camarón de agua dulce *M. rosenbergii* (Bijoy et al., 2018; Rodríguez-González et al., 2018; Visto et al., 2018; Shao et al., 2019, 2020) mostraron buenos resultados de crecimiento y supervivencia cuando este ingrediente reemplazó parcialmente de la harina de pescado, aunque el nivel de este reemplazo parece depender de la calidad de la materia prima utilizada para el procesamiento del ensilado y de las diferentes combinaciones con otros ingredientes de origen vegetal y animal (Huang et al., 2017; Biswas et al., 2019).

La calidad de la dieta primaria tiene un gran impacto en la supervivencia y el crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* (Chen et al., 2020). En particular, una vez independizados de las hembras (~0,015g-0,020g de masa corporal) (Levi et al., 1999) los juveniles aceptan la alimentación exógena (alimento inerte/balanceado o alimento vivo) y crecen rápidamente exhibiendo una alta frecuencia de muda (Stumpf et al., 2010; Tropea et al., 2010; Calvo et al., 2011; Stumpf et al., 2011, 2014, 2019; Chen et al., 2020), la cual demanda mucha energía. La muda (ecdysis) implica el desprendimiento periódico y la posterior reconstrucción del exoesqueleto calcificado (cutícula) de los crustáceos, siendo éste un evento desencadenado por factores endocrinos. El desprendimiento del exoesqueleto exige una activa absorción de agua que aumenta el volumen corporal para romper la “vieja” cutícula parcialmente desmineralizada. La desmineralización del exoesqueleto y la digestión de la cutícula, que consiste en la degradación de la quitina y proteínas, es conocida como la etapa de pre-muda. A partir de la pre-muda, la mayoría de los crustáceos reducen la ingesta de alimento hasta dejar de alimentarse (momento cercano a la muda) y empiezan a consumir los nutrientes almacenados en el hepatopáncreas (principalmente glucógeno y lípidos) como fuente de energía primaria. Una vez ocurrida la muda, empieza la etapa de post-muda que se caracteriza por la formación de la nueva cutícula, con un gradual reemplazo del agua absorbida por los tejidos y una movilización de calcio para el endurecimiento del “nuevo” exoesqueleto. En esta etapa la ingesta de alimento sigue reducida y el organismo continúa dependiente de sus reservas energéticas. La intermuda es la etapa siguiente y más extensa del ciclo y se caracteriza por la rigidez del exoesqueleto, la activa alimentación, el crecimiento tisular y el almacenamiento de reservas energéticas en el hepatopáncreas (Yudkovski et al., 2007; Mykles & Chang, 2020; Qin et al., 2021). Por lo tanto, es fundamental que los juveniles de *C. quadricarinatus* consuman dietas con un alto valor nutricional y energético para garantizar el máximo crecimiento somático (a través de una alta frecuencia de mudas y elevado incremento en masa), una alta supervivencia y un buen estado nutricional (Saoud et al., 2012).

Acerca del requerimiento energético para un adecuado crecimiento y supervivencia de los juveniles tempranos (~0,015g - 1g) de esta especie, diversos estudios indicaron que dietas altamente proteicas (entre 31% y 50% de proteína cruda) y compuestas por diversos ingredientes de origen animal y vegetal (Cortés-Jacinto et al., 2003; Thompson et al., 2005; Gutierrez & Rodríguez, 2010; Stumpf et al., 2010, 2011, 2014; Stumpf & López Greco, 2015; Qian et al., 2021) pueden ser utilizadas para su alimentación. Asimismo, estos estudios indicaron que un rango lipídico para un adecuado desempeño estuvo entre el 6% y 20% (Cortés- Jacinto et al., 2005; Stumpf et al., 2011, 2014; Chen et al., 2020). Los buenos resultados en la *performance* del juvenil de *C. quadricarinatus* alimentándose con amplios rangos de proteínas y lípidos dietarios probablemente sea por el hábito alimenticio de la especie que es omnívoro/detritívoro, lo que

permite una amplia incorporación de ingredientes, y a su vez por una alta capacidad de adaptación digestiva (cambios en secreción de enzimas digestivas) (Figueiredo & Anderson, 2003; Saoud et al., 2012).

Con respecto al buen estado nutricional que se busca con una adecuada alimentación, el efecto de diferentes dietas puede ser evaluado a través de los índices somáticos, de la histología de la glándula digestiva (hepatopáncreas) y de la dinámica energética (concentración de biomoléculas en diferentes tejidos). En los crustáceos, el sitio de almacenamiento de los productos del catabolismo de los compuestos de la dieta (proteínas, lípidos y carbohidratos) como reservas de energía es el hepatopáncreas (Anger, 2001). Además, también es el sitio de la síntesis y secreción de enzimas digestivas (proteasas, lipasas y carbohidrasas) (Gibson & Barker, 1979). Luego, la capacidad de absorción, la digestión intracelular y el almacenamiento en el hepatopáncreas se correlacionan con su tamaño y estructura celular (Secor et al., 2000; Gao et al., 2006; Jones & Obst, 2000). Esto significa que los cambios en los índices somáticos y en la histología pueden reflejar una respuesta fisiológica a diferentes condiciones nutricionales (Le Moullac et al., 1997; Jones & Obst, 2000; Sánchez-Paz et al., 2007). Por último, la ultra estructura de las células del hepatopáncreas está directamente relacionada con sus funciones y entre ellas podemos identificar a las células “B” y “R”. Las células B sintetizan las enzimas digestivas y son responsables de la digestión intracelular, concentrando los materiales absorbidos en grandes vacuolas. El contenido vacuolar se secreta en la luz tubular para su reabsorción al final del proceso digestivo. A su vez, las células R son las más abundantes dado su papel en la absorción de los nutrientes y en el almacenamiento de lípidos y glucógeno (Sousa et al., 2005; Hu & Leung, 2007; Franceschini-Vicentini et al., 2009; Ribeiro et al., 2016; Cervellione et al., 2017a; Cervellione et al., 2017b; Vogt, 2019).

De acuerdo a estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó la posibilidad del uso de dos dietas, con y sin inclusión de ensilado de pescado en su composición, formuladas mayoritariamente con fuentes de proteína vegetal. Para determinar su viabilidad en cultivo de la langosta *redclaw* se evaluaron distintos parámetros zootécnicos, bioquímicos e histológicos en los juveniles luego de transcurridas 4 mudas. La importancia de este estudio radica en buscar que las dietas proporcionen una nutrición adecuada al menor costo posible para un buen desempeño de los juveniles de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

#### **4. Objetivos e hipótesis:**

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la factibilidad en la utilización de dos dietas en la alimentación de juveniles de *C. quadricarinatus*. Ambas dietas fueron formuladas con ingredientes locales y compuestos mayormente con fuentes de proteína vegetal, con la diferencia de que una de las dietas tuvo

como ingrediente proteico el ensilado de pescado y la otra no lo tuvo en su composición. De acuerdo a nuestro objetivo general las hipótesis planteadas son dos:

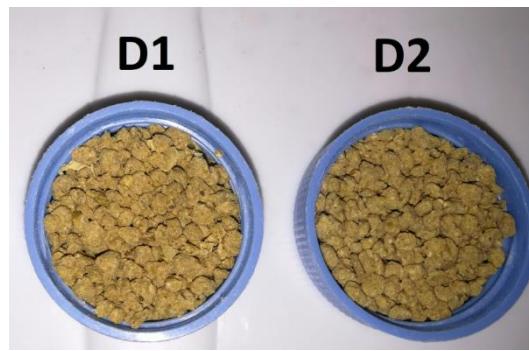
**(1)** Ambas dietas son factibles para su utilización en la producción de juveniles de *C. quadricarinatus*. Por lo tanto se espera que con ambas dietas se obtengan resultados de alta supervivencia, ganancia en masa elevada durante todo el experimento y que no muestren signos de deterioro a nivel nutricional ni histológico.

**(2)** Con la dieta que contiene ensilado de pescado se obtienen mejores resultados en el crecimiento de los juveniles. Por lo tanto se espera que los juveniles de la dieta con ensilado obtengan un crecimiento más rápido (menores tiempos para alcanzar las mudas), mayor ganancia en masa, mejor conversión alimenticia, mayores eficiencias proteica, lipídica y energética, y mayor retención de nutrientes, y una menor alteración a nivel histológico (si la hubiera) en comparación a la dieta sin ensilado.

## 5. Materiales y métodos:

### **5.1. Dietas experimentales:**

Las dos dietas (Dieta 1-D1 y Dieta 2-D2, Figura 1) fueron formuladas con ingredientes que son subproductos de la producción agropecuaria local y fueron diseñadas para la langosta de agua dulce por el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola-CENADAC (perteneciente al área de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, y ubicado en la provincia de Corrientes). Los ingredientes, la composición proximal y la composición aminoacídica de ambas dietas se muestran en las Tablas 1, 2 y 3, respectivamente. El 45 % de los ingredientes de la D1 fue de origen animal y el 53% fue de origen vegetal. A su vez, el 25% de los ingredientes de la D2 fue de origen animal y el 73% fue de origen vegetal. La D1 fue el alimento con el ensilado de pescado en su composición y la dieta control (D2) fue el alimento sin el ensilado de pescado en su composición. En cuanto a su composición proximal, la D1 fue la dieta más proteica (44 %) y más lipídica (13,5 %) que D2 (38 % y 11,5 %, respectivamente). La D1 presentó mayor cantidad de aminoácidos esenciales y no esenciales que la D2, aunque la diversidad aminoacídica fue la misma en ambas dietas.



**Figura 1:** Imagen de las dos dietas utilizadas en el presente experimento. D1: dieta con ensilado. D2: dieta sin ensilado.

**Tabla 1:** Ingredientes de las dietas.

Ingredientes	Dietas experimentales (g/kg de dieta)	
	Dieta con ensilado (D1)	Dieta sin ensilado (D2)
Harina de pescado	100	100
<b>Ensilado de pescado</b>	<b>200</b>	-
Harina de soja	350	350
<b>Afrecho de arroz</b>	<b>180</b>	<b>250</b>
Harina de carne	150	150
<b>Harina de maíz</b>	-	<b>130</b>
Premezcla de vitaminas	20	20
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

**Tabla 2:** Composición proximal de las dietas\*.

Materia seca total (g)	Dietas experimentales (g/kg de materia seca)	
	Dieta con ensilado (D1)	Dieta sin ensilado (D2)
Proteínas crudas	440	380
Lípidos crudos	135	115
Carbohidratos solubles	144	280
Fibras	146	114
Cenizas	135	109
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

<b>Energía bruta (Kj/g)</b>	<b>19,05</b>	<b>20,00</b>
-----------------------------	--------------	--------------

\*Las proteínas se determinaron por el método Kjeldahl, para la transformación del nitrógeno en proteína cruda se utilizó el factor conversión N\*6,25 (AOAC, 1990). Los lípidos crudos fueron cuantificados por el método de Bligh & Dyer (1959). Los carbohidratos solubles fueron determinados según el método colorimétrico de Clegg-Anthrone (Clegg, 1956). Las cenizas se determinaron por calcinación en mufla a 550 °C hasta la obtención de cenizas blancas y peso constante (AOAC, 1990). Todos estos procesos fueron realizados en el Laboratorio de Tecnología de los Productos Pesqueros del INIDEP, en Mar del Plata.

**Tabla 3:** Composición de aminoácidos esenciales y no esenciales de las dietas\*.

Aminoácidos	g/100g de alimento	
Esenciales (AE)	Dieta con ensilado (D1)	Dieta sin ensilado (D2)
Arginina	3,8	3,2
Leucina	2,9	2,8
Lisina	3,0	2,5
Fenilalanina	1,8	1,7
Treonina	1,8	1,5
Valina	1,4	1,2
Histidina	1,2	1,0
Isoleucina	1,2	1,0
Metionina	0,2	0,1
Triptofano	0,1	0,1
<b>Sumatoria de AE</b>	<b>17,4</b>	<b>15,1</b>
No esenciales (ANE)	Dieta con ensilado (D1)	Dieta sin ensilado (D2)
Ácido glutámico + glutamina	9,0	6,2
Ácido aspártico + asparagina	5,7	4,0
Glicina	4,5	3,6
Prolina	4,2	2,9
Alanina	3,6	2,6
Serina	2,7	1,9
Tirosina	1,5	1,1
Hidroxiprolina	1,3	1,1
Cisteína + cistina	0,8	0,6

<b>Sumatoria ANE</b>	<b>33,2</b>	<b>23,7</b>
<b>Total aminoácidos</b>	<b>50,6</b>	<b>38,8</b>

\*Las determinaciones fueron realizadas por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), en el laboratorio Dr. Rapela, en CABA.

### **5.2. Condiciones de mantenimiento del plantel de reproductores para la obtención de los juveniles:**

El plantel de animales reproductores para la obtención de los juveniles provino del Centro Nacional de Desarrollo Acuícola-CENADAC, en el año 2017. Las langostas adultas fueron aclimatadas en acuarios de 60 cm (largo) x 40 cm (ancho) x 30 cm (alto) conteniendo aproximadamente 30 L de agua declorada y se mantuvo la temperatura del agua en  $27 \pm 1$  °C con un calefactor de agua (ATMAN de 75 o 100 W). La aireación fue constante mediante aireadores (Atman), la dureza del agua estuvo entre 50 y 200 mg/L CaCO<sub>3</sub>, y el pH se mantuvo entre 7,5 y 7,8. Se armaron grupos de 5 langostas por acuario, con 5 tubos PVC de 10 cm de diámetro x 25 cm de largo que fueron utilizados como refugio (Jones 1995a; Jones 1995b; Vázquez y López Greco 2007). El fotoperiodo fue de 14 h luz: 10 h oscuridad y se alimentó a las langostas diariamente *ad libitum* con alimento balanceado para peces tropicales en formato de gránulos (TETRA®), cuya composición es de 47 % proteína bruta, 6,5 % lípidos, 2,0 % fibra, 6 % humedad, 1,5 % fósforo, 0,01 % vitamina C y 0,8 % de ácidos grasos omega-3. Este alimento es utilizado habitualmente en el laboratorio con excelentes resultados en el crecimiento, supervivencia y reproducción de los animales (Vazquez et al., 2008; Tropea et al., 2010; Castillo Díaz et al., 2017; Stumpf et al., 2019). La alimentación fue complementada con la planta acuática *Elodea sp.* (1 vez por semana) y el recambio de agua se realizó al 100 % semanalmente.

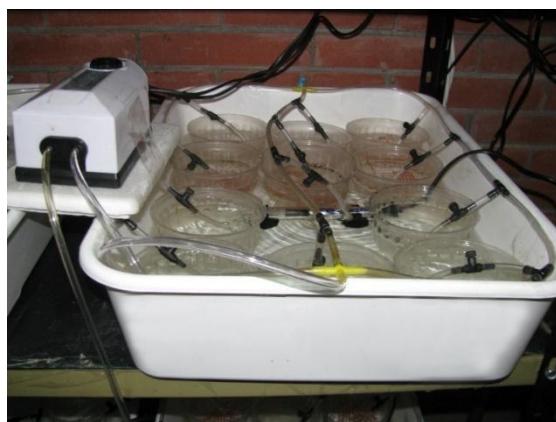
Una vez finalizada la etapa de aclimatación, las langostas fueron redistribuidas asignando por cada acuario a 4 hembras (40-50 g) y 1 macho (> 50 g), manteniendo las condiciones de temperatura, calidad del agua, fotoperiodo y alimentación descriptos con anterioridad. Al ser detectada una hembra ovígera, la misma fue retirada y colocada individualmente en un acuario de las mismas proporciones, con un único tubo de PVC, y en las mismas condiciones experimentales en las que estuvieron hasta entonces. Después de la eclosión de los juveniles, éstos fueron separados de la hembra una vez independizados, aproximadamente 15 días después de la eclosión, (Levi et al., 1999; Figura 2) y mantenidos en grupo (en las mismas condiciones de mantenimiento de calidad de agua y alimentación que las hembras ovígeras) hasta empezar la condición pre-experimental.



**Figura 2:** Imagen de los juveniles independizados.

### **5.3. Crecimiento de los juveniles en condición pre-experimental:**

Fueron seleccionados un total de 80 juveniles (0,4-0,8 g de masa corporal) correspondientes a 5 diferentes hembras. Fueron individualizados en recipientes plásticos (6,5 cm de altura x 11,5 cm de diámetro) y los cuales fueron colocados dentro de recipientes rectangulares de mayor volumen (53 cm de largo x 40 cm de ancho x 12 de altura) (Figura 3). En cada recipiente rectangular, fueron puestos 12 recipientes plásticos perforados y de esta forma el agua fue compartida entre las langostas de un mismo recipiente rectangular (temperatura de  $27 \pm 1$  °C y aireación constante). Para cada langosta fue provisto un tubo PVC (5 cm de largo x 2 cm de diámetro) utilizado como refugio.



**Figura 3:** Imagen de los recipientes utilizados para la condición pre-experimental.

Las langostas del pre-experimento fueron alimentadas diariamente (excepto en los fines de semana) con el alimento balanceado TETRA® (descripto anteriormente) y el ofrecimiento fue *ad libitum*, con una frecuencia de 2 veces al día (por la mañana y por la tarde). Además, 1 vez a la semana fueron alimentadas con *Elodea sp.* (descripto anteriormente). Las condiciones pre-experimentales fueron mantenidas hasta la muda. Al día siguiente de cada muda se realizó un registro de la masa corporal (en una

balanza de precisión Ohaus® de  $\pm 0,001$  g) y los juveniles en postmuda con su masa corporal entre los 0,7 g y los 1,0 g ingresaron al experimento.

#### **5.4. Condiciones experimentales generales:**

Una vez ingresados al experimento, los juveniles fueron distribuidos individualmente en recipientes de vidrio (13,5 cm de altura x 13 cm de diámetro) conteniendo un volumen de 1,35 L de agua dulce (Figura 4). Los mismos contaban con una red protectora en la parte superior, la cual impedía el escape de cada langosta, así como permitía el intercambio de gases con el exterior. Los recipientes de vidrio fueron ubicados dentro de recipientes rectangulares de mayor volumen (53 cm de largo x 40 cm de ancho x 12 de altura) con la temperatura agua mantenida a  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . En cada recipiente rectangular, fueron colocados 6 recipientes de vidrio con aireación individual (Figura 4).



**Figura 4:** Diseño experimental. Distribución de los recipientes rectangulares (izquierda); distribución de recipientes de vidrio por cada recipiente rectangular, con aireación y calefacción (medio); interior de un recipiente de vidrio con un refugio para el juvenil (derecha).

Para cada langosta fue provisto un tubo PVC cumpliendo la función de refugio. El tamaño del tubo fue modificado acorde al tamaño de las langostas a lo largo del experimento: inicialmente los tubos fueron de 5 cm de largo x 2 cm de diámetro y luego de la segunda muda se los reemplazó por tubos de 7,5 cm x 2,5 cm. El fotoperíodo fue de 14 h luz: 10 h oscuridad. La alimentación fue diaria (1 por día) durante todo el experimento (excepto en los fines de semana) a una tasa inicial del 4 % de su masa corporal y el recambio de agua al 100% fue semanal. A partir de la muda 1, la tasa de alimentación fue reducida al 3 % de la masa corporal y el recambio de agua incrementado a 3 veces en la semana, garantizando de este modo una completa ingestión del alimento ofrecido y una mejor calidad del agua. Por estos mismos motivos las tasas de alimentación fueron reducidas al 2,5 % y 1,5 % de la masa corporal a partir de las mudas 2 y 3, respectivamente. La cantidad de alimento suministrada fue registrada diariamente.

Fueron utilizados 40 juveniles en total (de 5 hembras diferentes). La distribución fue aleatoria dentro de cada dieta (20 langostas/dieta) manteniendo balanceada la cantidad de langostas provenientes

de cada hembra en cada dieta (4 juveniles de cada hembra/dieta). El tiempo experimental fue el necesario para que las langostas alcancen 4 mudas.

### **5.5. Registro y cálculos de las variables:**

Diariamente las langostas fueron revisadas para el registro de mudas y posibles muertes. Una vez detectado el viejo exoesqueleto o restos de ello, fue registrada la fecha del evento de muda y al día siguiente, se llevó a cabo el registro de la masa corporal (balanza de precisión Ohaus® de  $\pm 0,001$  g). Con estos registros fueron calculadas las siguientes variables:

- (1) Supervivencia (S, %) =  $100 \times (\text{cantidad final de langostas} / \text{cantidad inicial de langostas})$ .
- (2) Periodo de intermuda total (PIT, días) = día de la muda 4 – día de inicio del experimento.
- (3) Periodo de intermuda<sub>n</sub> (PI<sub>n</sub>, días) = día de la muda n – día de la muda (n - 1). Donde n es el número de muda, el día de la muda 0 es el día de inicio del experimento.
- (4) Masa corporal (g).
- (5) Ganancia en masa corporal<sub>n</sub> (GM, %, base húmeda) =  $100 \times [(\text{masa muda n} - \text{masa muda (n-1)}) / \text{muda (n-1)}]$ .
- (6) Conversión alimenticia (CA, base húmeda) = alimento total suministrado / ganancia en masa total.
- (7) Eficiencia proteica (EP, base húmeda) = ganancia total en masa / cantidad total de proteínas ingeridas.
- (8) Eficiencia lipídica (EL, base húmeda) = ganancia total en masa / cantidad total de lípidos ingeridos.
- (9) Eficiencia energética (EE, base húmeda) = ganancia total en masa / (cantidad total de proteínas + lípidos + carbohidratos ingeridos).
- (10) Humedad corporal (%) = HC =  $100 \times [(\text{masa corporal final húmeda} - \text{masa corporal final seca}) / \text{masa corporal final húmeda}]$ .

Al finalizar el experimento, todas las langostas fueron sacrificadas. El sacrificio ocurrió después de la anestesia con frío (adicionando lentamente hielo en el agua) e inmediatamente, se realizó una disección del pleon y del hepatopáncreas en la mitad de las réplicas de cada dieta y se registraron sus masas correspondientes para los siguientes cálculos:

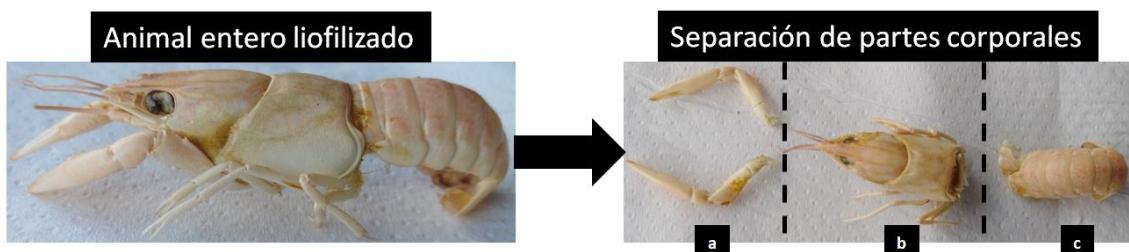
- (11) Índice hepatosomático (IHS, %) =  $100 \times (\text{masa del hepatopáncreas} / \text{masa corporal final})$ .
- (12) Índice del pleon (IP, %) =  $100 \times (\text{masa del pleon} / \text{masa corporal final})$ .

De cada hepatopáncreas se trajeron 2 fragmentos de los extremos distales de distintos lóbulos para ser fijados en una solución de *Bouin* y en una solución de *Baker* para los análisis histológicos (ver sección 3.5.2) de la estructura del órgano..En la otra mitad de las réplicas de cada dieta, las langostas fueron mantenidas enteras para su liofilización y posterior registro de la masa seca. Una vez liofilizadas se

realizó la disección de las siguientes partes corporales (Figura 5): ambas quelas, elcefalotórax y el pleon. El material liofilizado fue utilizado para los siguientes análisis bioquímicos:

- (13) Índice de las quelas (IQ, %) =  $100 \times (\text{masa de las quelas} / \text{masa corporal final})$ .
- (14) Índice delcefalotórax (IC, %) =  $100 \times (\text{masa delcefalotórax} / \text{masa corporal final})$ .
- (15) Proteínas solubles totales (mg/g) de acuerdo a Bradford (1976) (ver sección 3.5.1.1).
- (16) Lípidos solubles totales (mg/g) de acuerdo a Folch et al. (1957) y Frings et al. (1972) (ver sección 3.5.1.1).
- (17) Glucógeno (mg/g) de acuerdo a Van Handel (1965) (ver sección 3.5.1.1).
- (18) Retención de proteínas (RP, %) =  $100 \times [(\text{contenido proteico final en cada parte corporal} - \text{contenido proteico inicial en cada parte corporal}) / \text{proteínas ingeridas}]$ .
- (19) Retención de lípidos (RL, %) =  $100 \times [(\text{contenido lipídico final en cada parte corporal} - \text{contenido lipídico inicial en cada parte corporal}) / \text{lípidos ingeridos}]$ .
- (20) Retención de glucógeno (RG, %) =  $100 \times [(\text{contenido glucógeno final en cada parte corporal} - \text{contenido glucógeno inicial en cada parte corporal}) / \text{carbohidratos ingeridos}]$ .

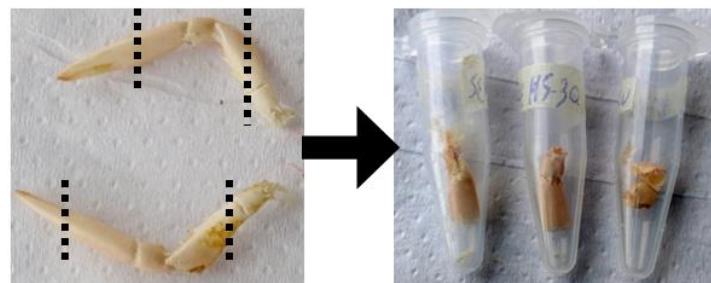
Para el cálculo de la retención de nutrientes también se sacrificó un grupo de 50 langostas (10 langostas/madre) a tiempo inicial (peso entre 0,7 y 1,0 g).



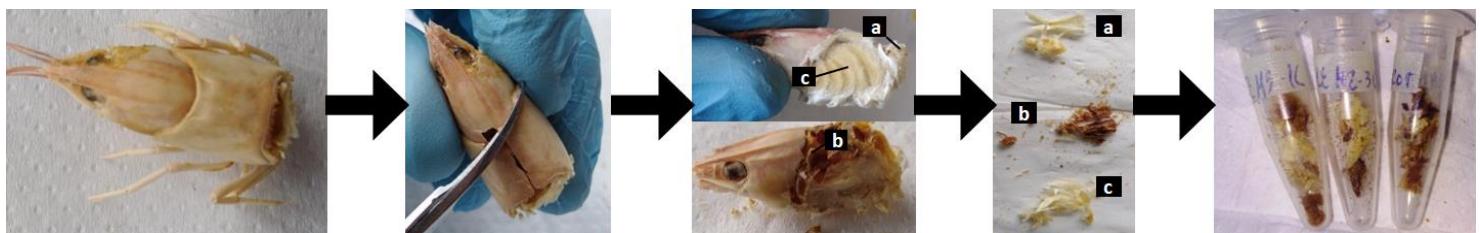
**Figura 5:** Juvenil de la langosta *Cherax quadricarinatus* liofilizada y separación de sus partes corporales. a) Quelas. b) Cefalotórax. c) Pleon.

### **5.5.1. Selección de las muestras liofilizadas y análisis bioquímico:**

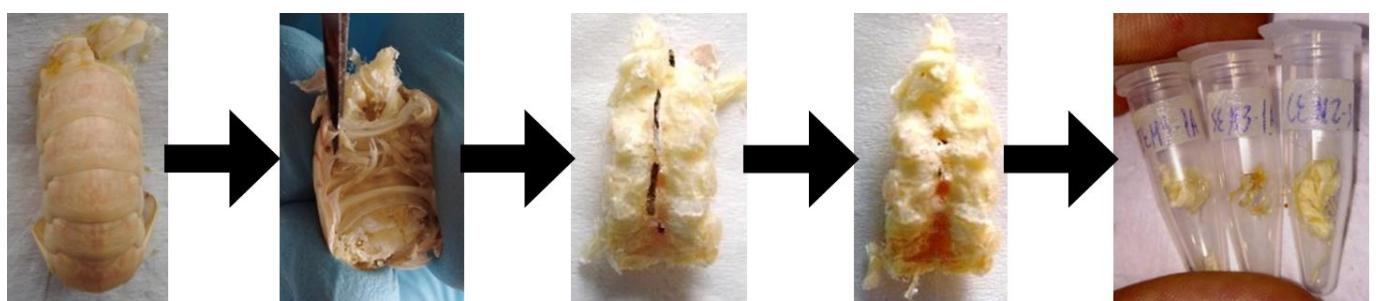
De las quelas se seleccionaron muestras de la porción media del *propodus* y del *merus* (con exoesqueleto incluido), ya que en estas secciones se encuentra la mayor cantidad de músculo (Figura 6). Delcefalotórax se extrajo el exoesqueleto por completo y se seleccionó una porción de cada uno de sus componentes internos: el 50% de la porción estuvo compuesta por el hepatopáncreas y el otro 50% por las branquias y músculo (terminación del músculo abdominal inserto en elcefalotórax), y una pequeña porción del estómago (Figura 7). La muestra correspondiente al pleon se compuso del músculo abdominal (sin el exoesqueleto y el intestino) (Figura 8).



**Figura 6:** Disección de las quelas de las langostas liofilizadas. Las líneas punteadas indican las secciones de donde se tomaron las muestras. En los tubos se observan las muestras destinadas a análisis de proteínas (izquierda), lípidos (medio) y glucógeno (derecha).



**Figura 7:** Disección delcefalotórax de las langostas liofilizadas. a) Músculo. b) Hepatopáncreas. c) Branquias. En los tubos se observan las muestras destinadas a análisis de proteínas (izquierda), lípidos (medio) y glucógeno (derecha).



**Figura 8:** Disección del pleon de las langostas liofilizadas. En los tubos se observan las muestras destinadas a análisis de proteínas (izquierda), lípidos (medio) y glucógeno (derecha).

#### 5.5.1.1. Cuantificación de proteínas:

Para determinar las proteínas solubles se utilizó el protocolo de Bradford (1976), con algunas modificaciones dado que se trabajó con material liofilizado. Se utilizaron muestras de 50 mg de cada parte corporal, las cuales fueron pulverizadas mediante un mortero hasta obtener un polvo homogéneo e inmediatamente, fue agregado un volumen de 0,8 ml del Buffer Tris HCL 0,05 M y pH = 7,5 para su homogeneización (16  $\mu$ l /mg de muestra). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas en frío (10000 rpm a 4 °C x 30 minutos) y se traspasó el sobrenadante a nuevos tubos. Las muestras fueron diluidas con agua destilada en una relación de 1:5 (v:v). Para la determinación colorimétrica, se realizó una

nueva dilución 1:20 (v:v), se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l (cada muestra por triplicado) y fueron adicionadas 1 ml del reactivo de Bradford (*Coomassie Brilliant Blue G250*, etanol 95 %, ácido fosfórico 85 %, agua destilada). La lectura se realizó a 595 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV 1800) dentro de los 60 minutos siguientes. Se utilizó albúmina bovina (1 mg/ml) para construir la curva estándar.

#### **5.5.1.2. Cuantificación de lípidos:**

Para determinar los lípidos totales se utilizó el protocolo de Folch et. al (1957) y Frings et al. (1972) adaptado a las muestras liofilizadas. Se utilizaron muestras de 50 mg de cada parte corporal y después de la pulverización de cada muestra, fueron agregados 1 ml de cloroformo-metanol-agua en una relación de 8:4:3 (v:v:v) (20  $\mu$ l/mg de muestra) para su homogeneización durante 3 minutos. Se filtró la muestra con papel filtro y se registró el volumen filtrado e inmediatamente, fue agregada una solución fisiológica fría (NaCl 0,9 %) a un 20% del volumen filtrado y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos para la obtención de 2 fases. La fase superior (con proteínas y carbohidratos) fue retirada mediante una pipeta Pasteur, conservando la fase del cloroformo conteniendo los lípidos. Para la determinación lipídica, fueron tomadas alícuotas de 20  $\mu$ L del cloroformo (cada muestra por triplicado), inmediatamente fue agregado 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y fueron puestas en un baño termostático en ebullición durante 10 minutos. Luego, al alcanzar la temperatura ambiente se agregaron 2,5 ml del reactivo de Sulfo-fosfo-vainillina (ácido fosfórico, vainillina, agua destilada) y la lectura se realizó a 530 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV 1800) dentro de los 60 minutos siguientes. Se utilizó aceite de oliva (5 mg/ml) para construir la curva estándar.

#### **5.5.1.3. Cuantificación de glucógeno:**

Para la determinación de glucógeno se utilizó el protocolo de Van Handel (1965) adaptado a las muestras liofilizadas. Se utilizaron muestras de 30 mg de cada parte corporal y en cada muestra fue agregado 0.48 ml de KOH 30 % (16  $\mu$ l/mg de muestra) para la digestión por ebullición en un baño termostático durante 1 hora. Una vez que las muestras estuvieron a temperatura ambiente, se les agregó 75  $\mu$ l de solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1825  $\mu$ l de etanol 100 %, y se las llevó al baño termostático a 40°C para la precipitación del glucógeno (formación de un pellet blanco). Luego, fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue descartado. El pellet fue disuelto con 1 ml de agua destilada. Para la reacción colorimétrica fueron tomadas alícuotas de 50  $\mu$ L (cada muestra por triplicado), fueron agregados 1,5 ml del Reactivo de Antrona (Antrona, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puro), y fueron puestas en un baño termostático en ebullición durante 10 minutos. Finalmente, la lectura se realizó a 620 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV 1800) dentro de los 15 minutos siguientes. Se utilizó el glucógeno de hígado de conejo (1 mg/ml) para construir la curva estándar.

### **5.5.2. Análisis histológico del hepatopáncreas:**

Las muestras que se fijaron en solución de *Bouin* luego de 24 horas fueron mantenidas en alcohol 70 %. Las fijadas en solución de *Baker* fueron conservadas en esta solución hasta el siguiente paso. En el caso de las muestras fijadas en *Bouin*, fueron desafanizadas (una deshidratación con alcoholes de concentraciones crecientes hasta llegar a alcohol 100 % y después por el xileno) para su posterior inclusión en parafina (Paraplast®). Los cortes fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina para visualizar la estructura del hepatopáncreas (López Greco et al., 2007). Por otra parte, las muestras fijadas en *Baker* fueron embebidas en Crioplast®, para luego ser coloreadas con Sudan III con la finalidad de detectar inclusiones lipídicas (Calvo et al., 2018). Los cortes fueron observados con microscopio (Axio, Image A1; Carl Zeiss) y fotografiados (Power Shot G-10; Cannon).

### **5.6. Análisis estadístico:**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa R Studio versión 3.5.1. Las variables explicatorias, dependiendo de la variable respuesta, fueron: **dietas** (factor fijo con dos niveles: dieta 1-D1 y dieta 2-D2), **mudas** (factor fijo con 4 niveles: muda 1-M1, muda 2-M2, muda 3-M3 y muda 4-M4) y **partes corporales** (factor fijo con 3 niveles: quelas,cefalotórax y pleon). La **camada de juveniles** de cada hembra ovígera fue considerada un factor aleatorio (con 5 niveles: camadas 1, 2, 3, 4 y 5). El nivel de significancia utilizado fue del 5% y de ser necesarias las comparaciones *a posteriori* fueron realizadas mediante el Test de Tukey. El análisis detallado (distribución de las variables respuestas, cumplimiento de los supuestos y análisis realizado) para cada variable analizada fue el siguiente:

- (1) Supervivencia: Distribución de probabilidades Binomial. Cumplimiento de los supuestos de dispersión y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el Test de Chi-Cuadrado.
- (2) Periodo de intermuda total y periodo de intermuda<sub>n</sub>: Distribución de probabilidades Poisson. Cumplimiento de los supuestos de dispersión y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el Test de Chi-Cuadrado.
- (3) Masa corporal: Distribución de probabilidades Normal. Modelado de la varianza con *VarPower* para el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el ANOVA.
- (4) Ganancia en masa corporal<sub>n</sub> y ganancia en masa corporal total: Distribución de probabilidades Normal. Cumplimiento de supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el ANOVA.
- (5) Humedad corporal: Distribución de probabilidades Normal. Modelado de la varianza con *VarPower* para el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el ANOVA.

- (6) Conversión alimenticia: Distribución de probabilidades Normal. Modelado de la varianza con *Varldent* para el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el ANOVA.
- (7) Eficiencia proteica, eficiencia lipídica y eficiencia energética: Distribución de probabilidades Normal. Cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el de ANOVA.
- (8) Índice hepatosomático, Índice del pleon, Índice de las quelas e Índice del céfalo-tórax: Distribución de probabilidades Normal. Cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el ANOVA.
- (9) Proteínas solubles y lípidos solubles totales: Distribución de probabilidades Normal. Modelado de la varianza con *Varldent* para el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el ANOVA.
- (10) Glucógeno: Distribución de probabilidades Normal. Cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el ANOVA.
- (11) Retención de proteínas, lípidos y glucógeno: Distribución de probabilidades Normal. Modelado de la varianza con *Varldent* para el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis utilizado fue el ANOVA.

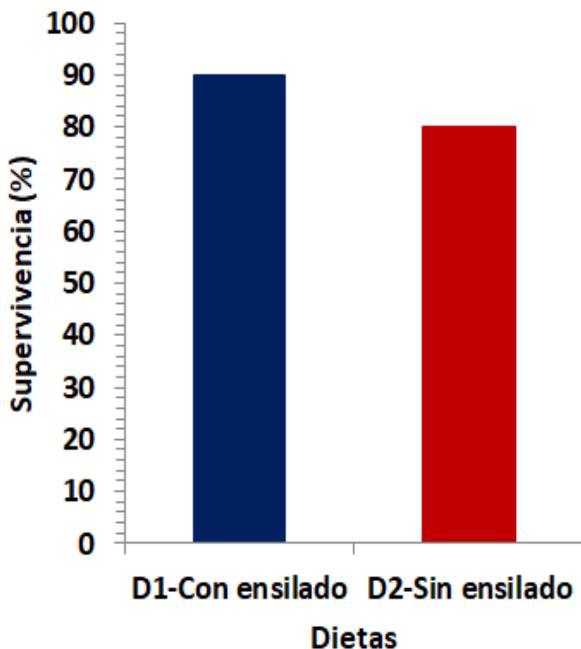
En todos los casos se cumplieron los supuestos de muestras aleatorias y observaciones independientes. El análisis histológico e histoquímico se realizó de forma cuantitativa.

## **6. Resultados:**

### **6.1. Parámetros zootécnicos:**

#### **6.1.1. Supervivencia:**

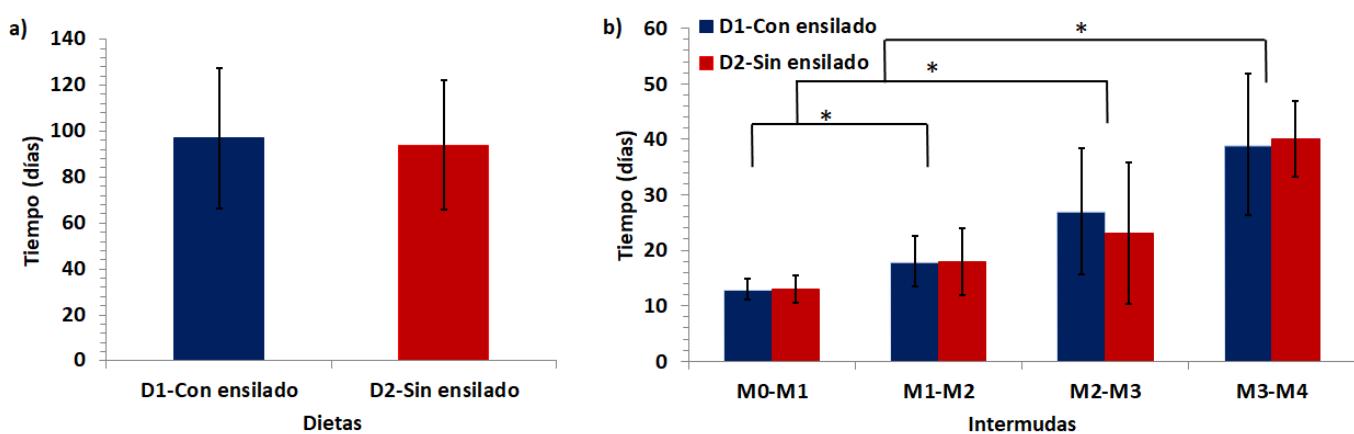
Al finalizar el experimento, la supervivencia promedio fue del 86 % siendo similar entre los juveniles alimentados con ambas dietas ( $\chi^2 = 0,797$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,3719$ ; Figura 9).



**Figura 9:** Supervivencia final (promedio) de los juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* alimentados con las distintas dietas. No se observaron diferencias significativas ( $P = 0,3719$ ).

#### **6.1.2. Periodo de intermuda:**

El período promedio total necesario para que los juveniles muden 4 veces fue de aproximadamente 93 días con ambas dietas (Figura 10a;  $F = 0,326$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,568$ ). Por otra parte, al analizar el período parcial para alcanzar cada una de las 4 mudas (Figura 10b) se observó que la interacción entre período de intermuda y dieta fue no significativa ( $\chi^2 = 5,704$ ;  $df = 3$ ;  $P = 0,126$ ) y tampoco se observaron diferencias significativas entre las dietas ( $\chi^2 = 0,089$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,765$ ). Sin embargo, diferencias significativas entre los distintos intervalos de intermuda fueron observadas (Figura 10b;  $\chi^2 = 297,9$ ;  $df = 3$ ;  $P < 2e-16$ ).



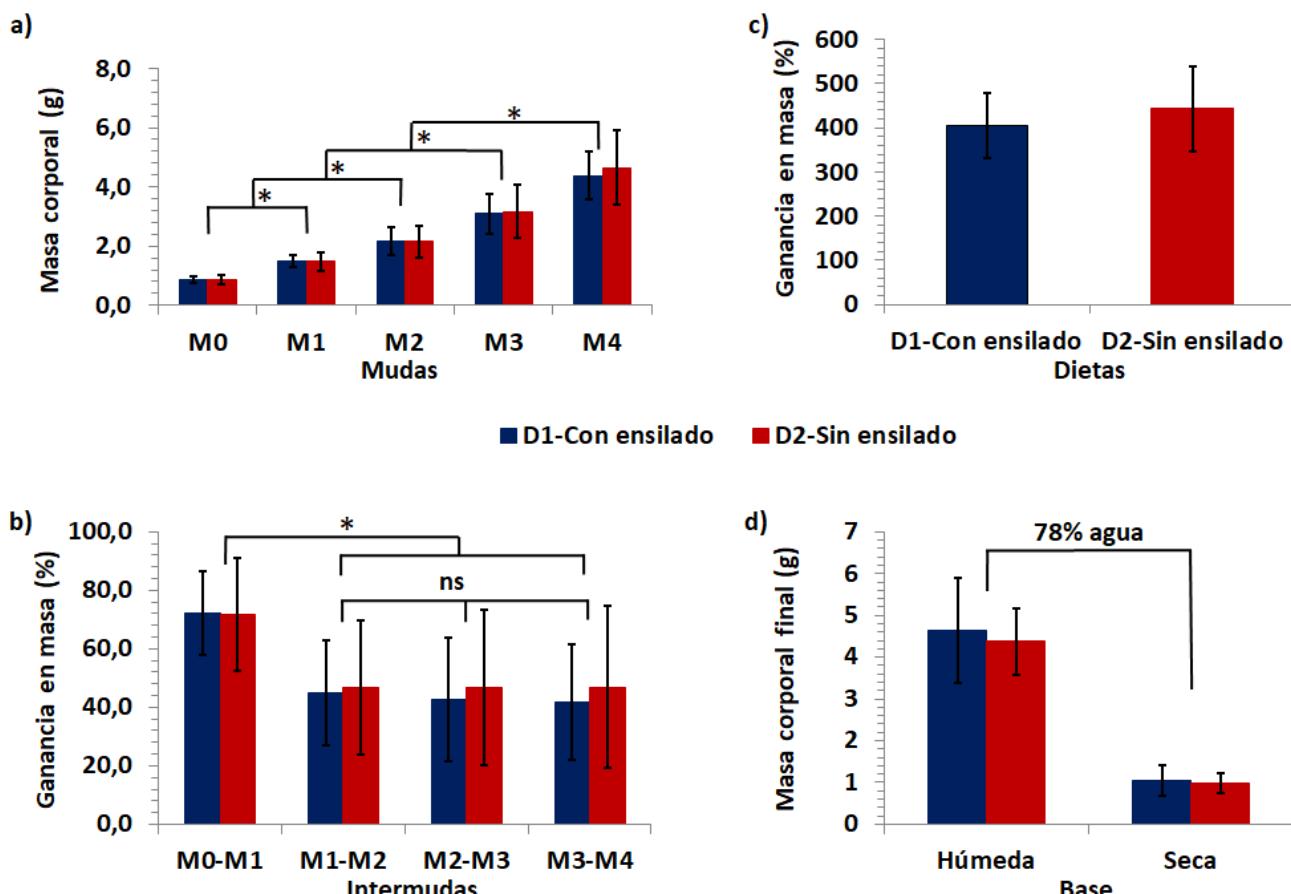
**Figura 10:** Período de intermuda (promedio y desvío estándar) durante el experimento en los juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* alimentados con las distintas dietas. a) Período de intermuda total: tiempo necesario para alcanzar la cuarta muda desde el inicio del experimento. b) Período de intermuda parcial: tiempo necesario para alcanzar cada una de las mudas (muda inicial-muda 1, muda 1-muda 2, muda 2-muda 3 y muda 3-muda 4). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre períodos: a)  $P = 0,568$ . b)  $P < 2e-16$

### 6.1.3. Crecimiento (masa corporal y ganancia en masa):

Al analizar la masa corporal de las langostas durante el experimento (Figura 11a) se observó que la interacción entre el periodo de intermuda y la dieta fue no significativa ( $F = 0,287$ ;  $df = 4,145$ ;  $P = 0,886$ ) y tampoco se observaron diferencias significativas entre las dietas ( $F = 0,030$ ;  $df = 1,34$ ;  $P = 0,8634$ ). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la masa corporal luego de cada muda ( $F = 0,287$ ;  $df = 4,145$ ;  $P < ,0001$ ).

La ganancia en masa corporal (Figura 11b) no fue afectada por la interacción entre el periodo de intermuda y la dieta ( $F = 0,393$ ;  $df = 3,107$ ;  $P = 0,758$ ). Los valores de ganancia en masa corporal fueron similares entre dietas ( $F = 1,127$ ;  $df = 1,34$ ;  $P = 0,296$ ) pero presentaron diferencias significativas entre los distintos intervalos de muda ( $F = 52,233$ ;  $df = 3,107$ ;  $P < ,0001$ ). La ganancia en masa fue mayor ( $\sim 70\%$ ,  $P < ,0001$  en todas las comparaciones) entre M0-M1 (inicio del experimento y muda 1) que la ganancia en masa en las consecutivas mudas ( $\sim 45\%$  para los intervalos de M1-M2, M2-M3 y M3-M4). Se obtuvieron valores superiores a 400 % de ganancia en masa total (M1-M4, Figura 11c) siendo similar en ambas dietas ( $F = 2,575$ ;  $df = 1,28$ ;  $P = 0,1198$ ).

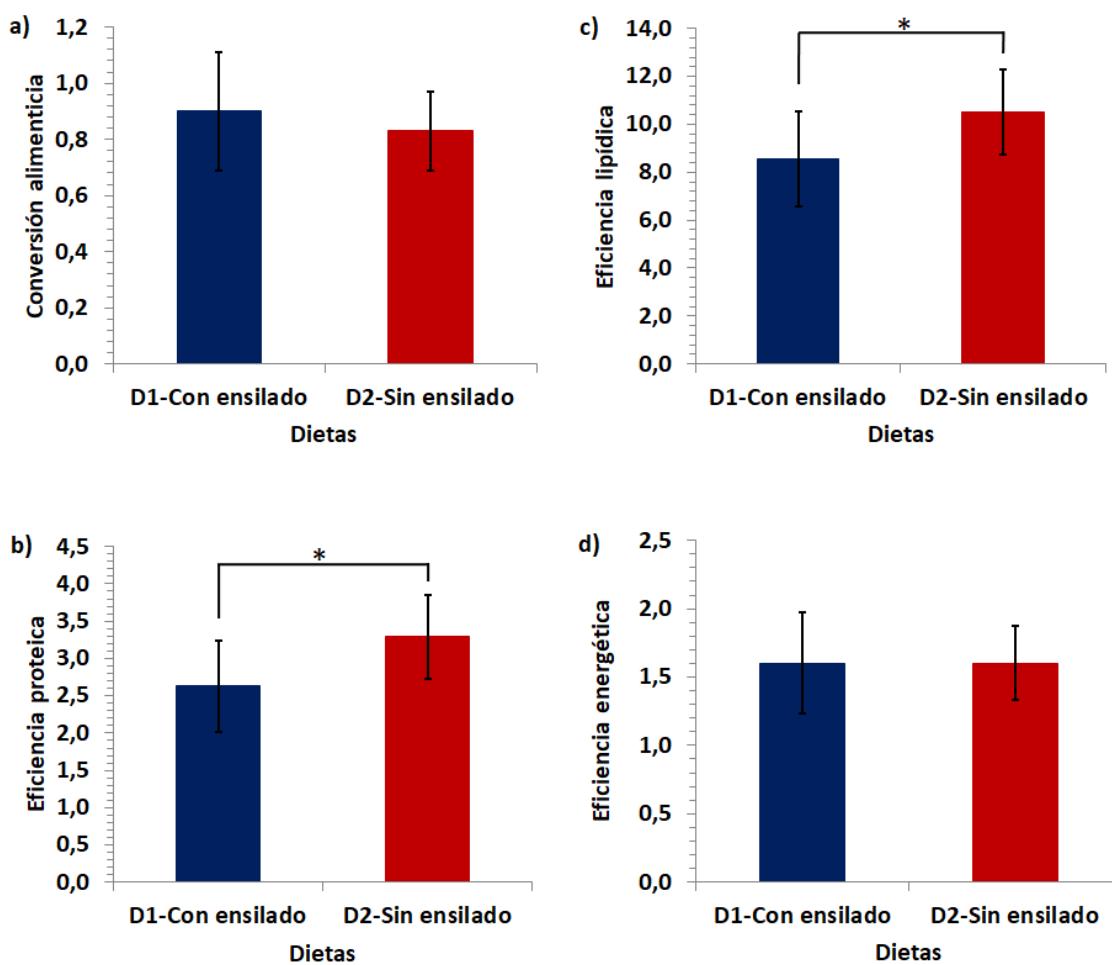
En cuanto a la masa corporal final en base seca, no se observaron diferencias significativas entre las dietas ( $F = 2,433$ ;  $df = 1,5$ ;  $P = 0,180$ ) y el contenido de humedad corporal observado fue de  $\sim 78\%$  ( $F = 401,01$ ;  $df = 1,5$ ;  $P < ,0001$ ).



**Figura 11:** Crecimiento (promedio y desvío estándar) de los juveniles de la langosta *Cherax quadricarinatus* alimentados con las distintas dietas. a) Masa corporal luego de la muda inicial (M0), muda 1 (M1), muda 2 (M2), muda 3 (M3) y muda 4 (M4). b) Ganancia en masa corporal entre cada muda. c) Ganancia en masa corporal total (M0-M4). d) Masa corporal final húmeda y seca (se indica el porcentaje de humedad corporal). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre mudas: a)  $P < ,0001$ . b) Entre dietas  $P = 0,296$ , entre mudas  $P < ,0001$ . c)  $P = 0,1198$ . d) Entre dietas  $P = 0,180$ , entre mudas  $P < ,0001$ .

#### **6.1.4. Eficiencia alimenticia:**

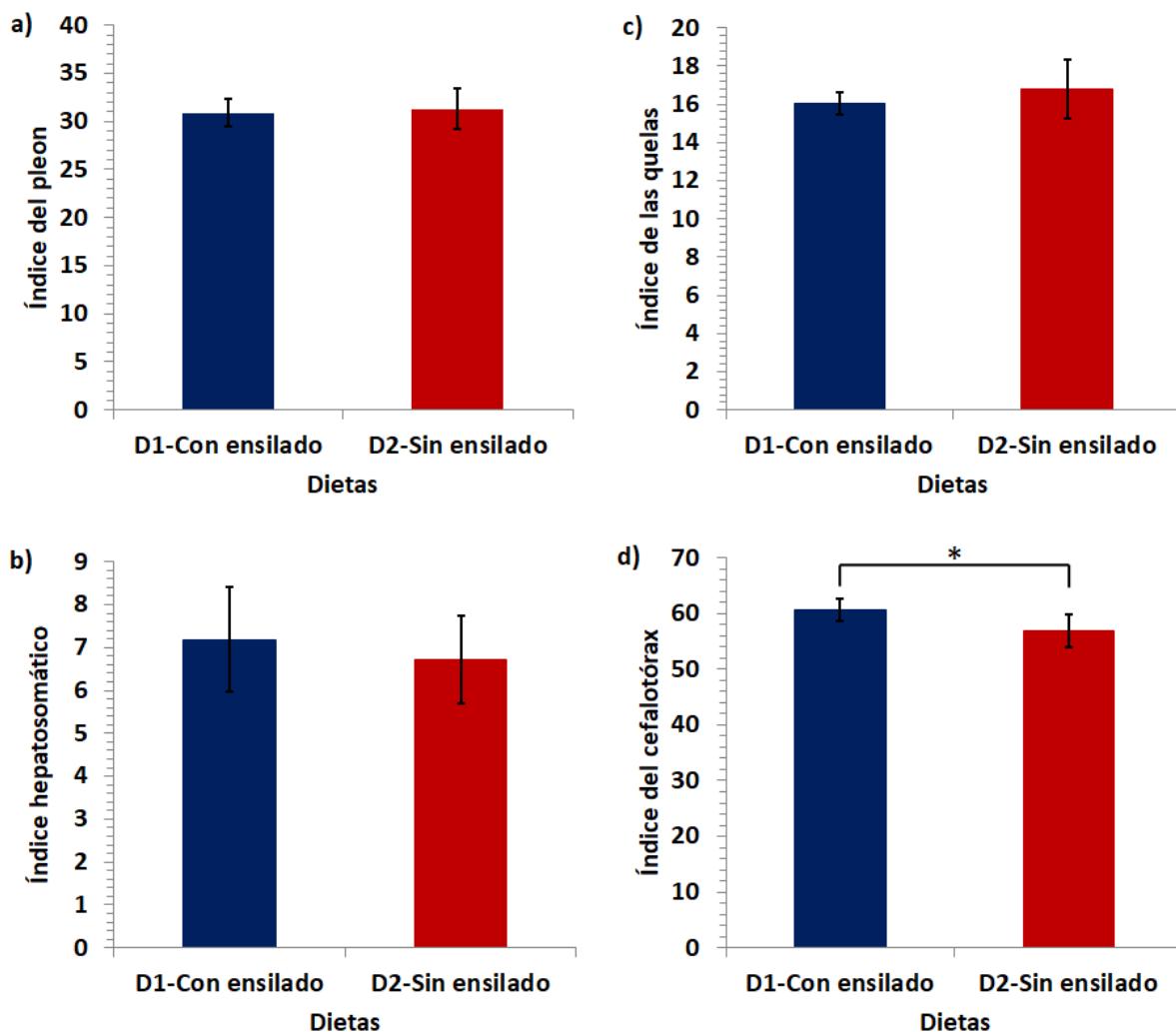
La conversión alimenticia fue similar entre las langostas alimentadas con las distintas dietas ( $F = 1,579$ ;  $df = 1,28$ ;  $P = 0,219$ ) obteniéndose valores promedio cercanos a 1 (Figura 12a). La eficiencia proteica y la eficiencia lipídica fueron los primeros parámetros en donde se observaron diferencias significativas entre las dietas (Figura 12b;  $F = 10,37$ ;  $df = 1,27$ ;  $P = 0,003$  y Figura 12c;  $F = 11,42$ ;  $df = 1,27$ ;  $P = 0,002$ , respectivamente). En ambos casos las langostas alimentadas con D1 fueron  $\sim 20\%$  menos eficiente que las langostas alimentadas con D2. Al analizar la eficiencia energética no se observaron diferencias entre las langostas alimentadas con las diferentes dietas ( $F = 1,182$ ;  $df = 1,28$ ;  $P = 0,286$ ; Figura 12d).



**Figura 12:** Eficiencia alimenticia (promedio y desvío estándar) de los juveniles de la langosta *Cherax quadricarinatus* alimentados con las distintas dietas. a) Conversión alimenticia. b) Eficiencia proteica. c) Eficiencia lipídica. d) Eficiencia energética. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre las dietas. a)  $P = 0,219$ . b)  $P = 0,003$ . c)  $P = 0,002$ . d)  $P = 0,286$ .

### **6.1.5. Índices somáticos:**

Para los índices del pleon, hepatosomático y quelas (Figura 13a, b, c, respectivamente) no se observaron diferencias significativas entre las dietas ( $F = 0,329$ ;  $df = 1,12$ ;  $P = 0,577$ ,  $F = 1,265$ ;  $df = 1,12$ ;  $P = 0,283$ ,  $F = 2,314$ ;  $df = 1,10$ ;  $P = 0,159$ , respectivamente). Por otra parte, para el índice delcefalotórax se observaron diferencias significativas entre las dietas ( $F = 8,263$ ;  $df = 1,10$ ;  $P = 0,017$ ), las cuales mostraron un índice levemente mayor (~ 6 %) para las langostas alimentadas con la D1 (Figura 13d).



**Figura 13:** Índices somáticos (promedio y desvío estándar) de los juveniles de la langosta *Cherax quadricarinatus* alimentados con las distintas dietas. a) Índice del pleon. b) Índice hepatosomático. c) Índice de las quelas. d) Índice delcefalotórax. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas. a)  $P = 0,577$ . b)  $P = 0,283$ . c)  $P = 0,159$ . d)  $P=0,017$ .

### **6.1.6. Análisis bioquímico:**

#### **6.1.6.1. Proteínas solubles**

En las proteínas solubles (Figura 14a) se observó una interacción significativa entre las dietas y las partes corporales ( $F = 4,313$ ;  $df = 2,28$ ;  $P = 0,023$ ). Si bien la interacción fue significativa, no se observaron diferencias significativas entre dietas dentro de ninguna parte corporal al realizar las comparaciones a

*posteriori* de Tukey (quelas D1 vs D2:  $P = 0,990$ ;cefalotórax D1 vs D2:  $P = 0,093$ ; pleon D1 vs D2:  $P = 0,999$ ). Por otra parte, la concentración de proteínas en las quelas fue significativamente menor en todos los casos frente a otras partes corporales ( $P < ,0001$ ).

En cuanto a la retención de proteínas (Figura 14b), se observó que la interacción entre dietas y las partes corporales no fue significativa ( $F = 2,749$ ;  $df = 2,28$ ;  $P = 0,081$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas ocasionadas por la dieta ( $F = 0,005$ ;  $df = 1,10$ ;  $P = 0,946$ ). Por otra parte, se observó una retención proteica diferente dependiendo de la parte corporal ( $F = 195,51$ ;  $df = 2,28$ ;  $P < 0,0001$ ), siendo elcefalotórax la sección que se observó una mayor retención, seguida por el pleon y por las quelas.

#### **6.1.6.2. Lípidos**

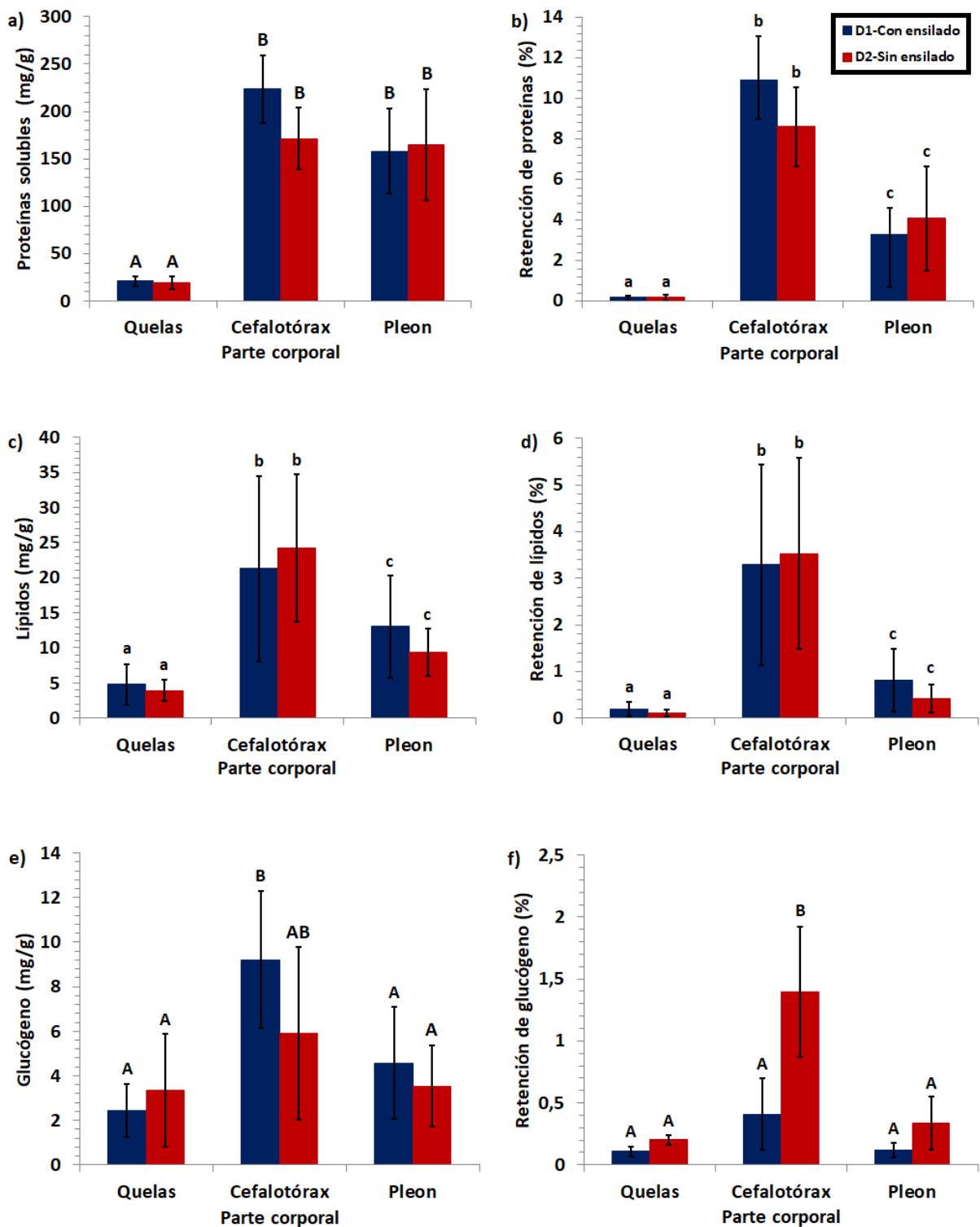
En cuanto a la concentración de lípidos (Figura 14c), la interacción entre dietas y partes corporales fue no significativa ( $F = 0,670$ ;  $df = 2,26$ ;  $P = 0,520$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las dietas ( $F = 0,662$ ;  $df = 1,9$ ;  $P = 0,437$ ). Fueron observadas diferencias significativas entre las partes corporales ( $F = 27,83$ ;  $df = 2,26$ ;  $P < 0,0001$ ), siendo elcefalotórax la sección que se observó una mayor retención, seguida por el pleon y por las quelas.

En cuanto a la retención de lípidos (Figura 14d), no se observó una interacción significativa ( $F = 0,844$ ;  $df = 2,26$ ;  $P = 0,442$ ) y tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a las dietas ( $F = 1,157$ ;  $df = 1,9$ ;  $P = 0,310$ ). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas para las distintas partes corporales ( $F = 25,07$ ;  $df = 2,26$ ;  $P < 0,0001$ ) con una mayor retención en elcefalotórax, seguido del pleon y en una menor retención en las quelas.

#### **6.1.6.3. Glucógeno**

En la concentración de glucógeno se observó una interacción significativa entre las dietas y las partes corporales ( $F = 4,304$ ;  $df = 2,28$ ;  $P = 0,024$ : Figura 14e), pero en las comparaciones a *posteriori* de Tukey mostraron concentraciones similares de glucógeno entre las dietas para las distintas partes corporales (quelas D1 vs D2:  $P = 0,980$ ; pleon D1 vs D2:  $P = 0,964$ ;cefalotórax D1 vs D2:  $P = 0,208$ ). Por otra parte, estas comparaciones mostraron únicamente diferencias en la concentración de glucógeno para elcefalotórax cuando comparado con otras partes corporales dentro de la D1 (D1: [quelas vscefalotórax:  $P < 0,0001$ ; quelas vs pleon  $P = 0,316$ ;cefalotórax vs pleon  $P = 0,001$ ], D2: [quelas vscefalotórax:  $P = 0,156$ ; quelas vs pleon  $P = 1,00$ ;cefalotórax vs pleon  $P = 0,222$ ]).

En la retención de glucógeno (Figura 14f) también se observó una interacción significativa ( $F = 8,50$ ;  $df = 2,28$ ;  $P = 0,001$ ). En este caso fueron únicamente significativas las diferencias entre dietas en elcefalotórax, siendo para D2 aproximadamente 3,4 veces mayor que la retención con D1 para esta parte corporal (D1cefalotórax vs D1cefalotórax  $P = 0,0087$ ).

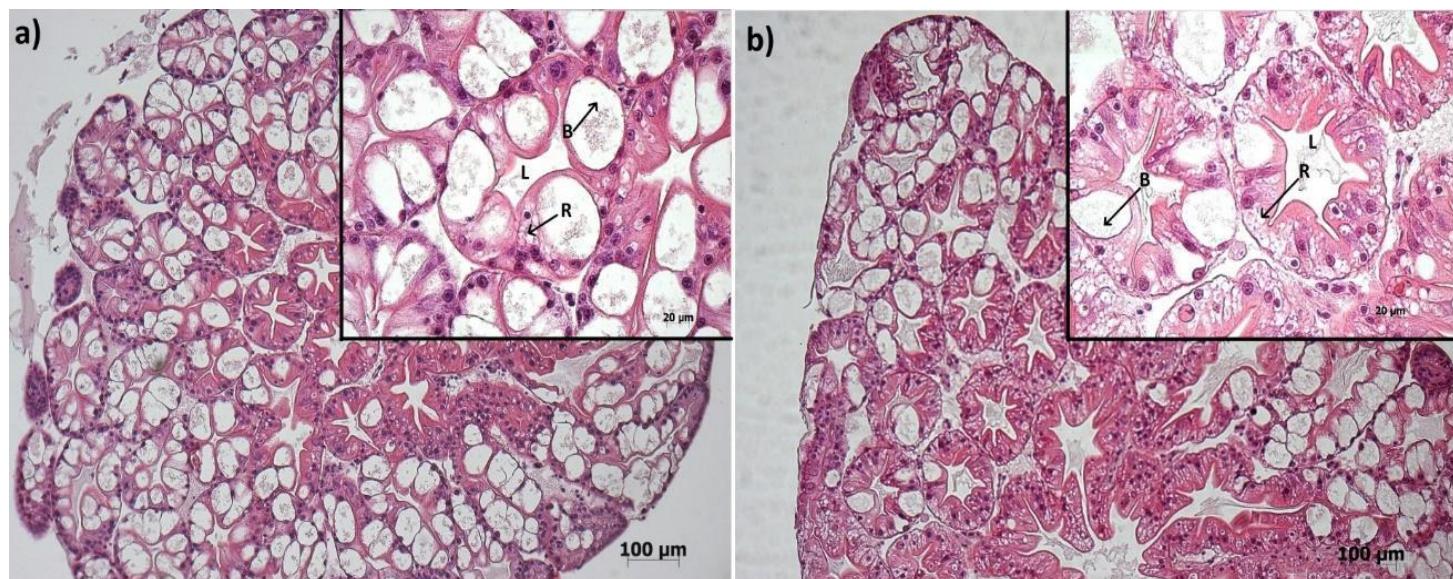


**Figura 14:** Concentración y retención de nutrientes (promedio y desvío estándar) en las distintas partes de los juveniles de la langosta *Cherax quadricarinatus* alimentados con las distintas dietas. a) y b) Proteínas solubles y su retención. c) y d) Lípidos y su retención. e) y f) Glucógeno y su retención. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre dietas y partes corporales. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las partes corporales. a) Entre dietas: quelas P = 0,990, cefalotórax P = 0,093, pleon P = 0,999; Entre partes corporales: quelas vs otras partes P < ,0001. b) Entre dietas P = 0,946; entre partes corporales P <

0,0001. c) Entre dietas  $P = 0,437$ ; entre partes corporales  $P < 0,0001$ . d) Entre dietas  $P = 0,310$ ; entre partes corporales  $P < 0,0001$ . e) Entre dietas: quelas  $P = 0,980$ ; pleon  $P = 0,964$ ;cefalotórax  $P = 0,208$ ; entre partes corporales D1 (D1: [quelas vscefalotórax:  $P < 0,0001$ ; quelas vspleon  $P = 0,316$ ;cefalotórax vspleon  $P = 0,001$ ], D2: [quelas vscefalotórax:  $P = 0,156$ ; quelas vspleon  $P = 1,00$ ;cefalotórax vspleon  $P = 0,222$ ]). f) interacción significativa  $P = 0,001$ , D1cefalotórax vs D1cefalotórax  $P = 0,0087$ .

### **6.1.7. Análisis histológico:**

Los cortes histológicos de los lóbulos del hepatopáncreas no mostraron diferencias estructurales entre las distintas dietas (**Figura 15**). No se observó ningún grado de mayor de desorganización de los túbulos, tampoco en ningún caso se observó (cualitativamente) un aumento o disminución excesiva de la cantidad de células “R” o de las células “B”. Por último, se mantuvo la luz estrellada de los túbulos, indicando que con ambas dietas el órgano se mantuvo funcionando normalmente.



**Figura 15:** Imágenes representativas de los cortes histológicos del hepatopáncreas de juveniles de la langosta *Cherax quadricarinatus* alimentadas con distintas dietas. a) Hepatopáncreas de juveniles alimentados con D1-Con ensilado. b) Hepatopáncreas de juveniles alimentados con D2-Sin ensilado. Los recuadros muestran en detalle los túbulos donde se marcan células B (B), células R (R), y luz estrellada de los túbulos (L).

## **7. Discusión:**

La integración de todos los resultados indica el uso potencial de ambas dietas en la alimentación de los juveniles de la langosta *C. quadricarinatus*, dado que no se vieron afectados los parámetros de supervivencia, crecimiento y estado nutricional de la langosta. De acuerdo a estos resultados **no se rechaza la hipótesis 1 planteada**. Ambas dietas además de ser funcionales serían también más económicas dado que tendrían un bajo costo (USD 0,56-0,6/kg según los precios locales de la materia prima) porque están compuestas principalmente de fuentes vegetales (53% de la composición total para D1 y 73% de la composición total para D2), sumando otra ventaja para un potencial uso en un emprendimiento acuícola. La búsqueda de dietas económicas y compuestas por harinas de origen vegetales que sean

nutricionalmente apropiadas (harinas digestibles y que no perjudiquen la fisiología, el crecimiento y el estado de salud) para las especies cultivadas es el desafío global de la acuicultura para lograr una reducción del aporte de proteínas animales en las dietas y para garantizar la sostenibilidad de la actividad (FAO, 2022).

Los valores de supervivencia registrados en el presente trabajo fueron considerablemente altos en ambas dietas ( $D1 = 90\%$  y  $D2 = 80\%$ ) en comparación con la supervivencia generalmente observada (entre el 65% y 70%) en los distintos trabajos realizados con esta especie de langosta (Saoud et al., 2013). En este caso, es importante mencionar que en la revisión de Saoud et al. (2013) fueron citadas supervivencias en langostas expuestas a distintas condiciones de cultivo, alimentación y talla, y estos factores pueden afectar considerablemente esta variable. Por otro lado, al ser más delimitados en la comparación, la supervivencia del actual trabajo fue similar a la registrada por Calvo et al. (2012) y por Stumpf & López Greco (2015) en juveniles de 1 g, creciendo en condiciones individuales durante 90 días y recibiendo una dieta considerada de alta calidad nutricional (compuesta mayoritariamente por harinas de origen animal y conteniendo 48% proteína y 6,5% lípidos).

Los valores del incremento en masa registrados en el presente trabajo también fueron considerablemente altos con ambas dietas después de 90 días ( $D1 = 402\%$  y  $D2 = 453\%$ ) en comparación con los incrementos observados en los trabajos mencionados anteriormente (Calvo et al., 2012; Stumpf & López Greco, 2015), siendo que en el primero se registró un incremento en masa de ~210% y en el segundo un incremento de ~105%. En ambos trabajos, el recipiente utilizado para individualizar a los juveniles contenía el volumen de 500 ml de agua dulce mientras que el recipiente utilizado en el actual trabajo contuvo 1,35 L de agua dulce; quizás el mayor espacio disponible para crecer también haya impactado en su magnitud. Finalmente, ambos datos de supervivencia y de incremento en masa refuerzan el indicio de que las dietas  $D1$  y  $D2$  podrían ser adecuadas para el uso acuícola.

La eficiencia alimenticia observada en el actual trabajo fue otro indicador de que las dietas  $D1$  y  $D2$  podrían ser adecuadas para alimentar a langostas juveniles, al menos durante la etapa de desarrollo estudiada y en las condiciones experimentales descriptas en la metodología. En este sentido, la conversión alimenticia observada fue altamente satisfactoria, alcanzando valores menores a 1 ( $D1 = 0,90$  y  $D2 = 0,83$ ). Esto significa que las langostas fueron eficientes porque necesitaron en promedio 0,86 g de alimento para convertirlo en 1 g de masa corporal (peso húmedo). Este resultado fue menor que la conversión obtenida (entre 3,0 y 5,7) por Thompson et al. (2005) en juveniles de *C. quaricarinatus* (1 g), cultivados individualmente, alimentadas 3 veces al día (controlando el excedente de alimento) durante 8 semanas y con distintos niveles de proteína en la dieta (30 %, 35 % y 40 %, con o sin inclusión de harina de pescado).

También fue menor que la conversión observada (entre 1,1 y 1,6) por Cortés-Jacinto et al. (2005) en juveniles de la langosta (~0,7 g), cultivados bajo densidad de 0,375 langostas/L, alimentados diariamente durante 8 semanas (a razón del 5 % y distribuidos en 3 momentos al día), con diferentes niveles de proteína (26 %, 31 % y 36 %) y lípidos (4 %, 8 % y 12 %) en la dieta. Por otro lado, la conversión alimenticia del presente trabajo fue mayor que la registrada (entre 0,5 y 0,8) por Stumpf et al. (2014) para juveniles de la langosta (0,9 g), cultivados bajo densidad de 21/m<sup>2</sup>, alimentadas 1 vez al día (razón del 2%), durante 20 semanas con dos dietas de distintas concentraciones proteicas (48 % y 37 %) y lipídicas (4% y 6%, respectivamente). De acuerdo a Chaikaew et al. (2019), la conversión alimenticia es un indicador indirecto para medir la eficiencia de la producción acuícola y para indicar el desempeño económico y ambiental. Además, sugiere que una conversión alimenticia menor a 2 puede proporcionar una buena indicación de cuán eficiente es una estrategia de alimentación y cuánto se puede mejorar la gestión.

La inclusión del ensilado de pescado en la dieta D1 (20% de la dieta total) probablemente proporcionó los mayores contenidos de proteína (44%) y mayores contenidos de aminoácidos (~15% y ~30% para esenciales y no esenciales), en comparación con la dieta D2-sin ensilado de pescado. Sin embargo, la D1 no parece haber ocasionado ningún beneficio adicional al crecimiento, eficiencia alimenticia y condición nutricional de los juveniles de la langosta, en comparación con los juveniles alimentados con D2. A razón de estos resultados, **se rechaza la hipótesis 2 planteada**. La menor eficiencia (en un ~20%) en la utilización de la proteína y de los lípidos dietarios observada en las langostas alimentadas con D1, pudo corresponder a una mayor demanda de energía para satisfacer un posible aumento en la secreción de enzimas para digestión de las proteínas, a un mayor catabolismo de estas proteínas o a un mayor proceso de desaminación en estos juveniles (McCue, 2006). En consecuencia, si ocurrió una alta demanda energética para atender a cualquier uno de estos procesos, la energía que fue ingerida en D1 no fue utilizada solamente para el crecimiento somático (Claybrook, 1983; González-Pena & Soares-Moreira, 2003; McCue, 2006). Vale resaltar que este “excedente proteico” no perjudicó a los juveniles de D1 en comparación con los juveniles de D2 (al menos en las condiciones experimentales ya descriptas), sin embargo, esta energía proteica como ya fue discutido anteriormente, posiblemente fue “desperdiaciada” en otros procesos metabólicos. En este sentido y de acuerdo a Wang et al. (2021), al comparar el costo energético en la ingestión, absorción y procesamiento metabólico de sustratos energéticos entre dos dietas con 60% y 50% de proteína cruda ofrecidas a la langosta espinosa *Sagmariasus verreauxi*, este costo fue mayor con la dieta más proteica, con una mayor contribución de la oxidación de la proteína (aminoácidos) para este aumento del metabolismo energético.

Con respecto a los aminoácidos esenciales, la arginina, leucina, lisina y metionina son los aminoácidos considerados claves para el crecimiento animal (Li et al., 2009; Hoseini et al., 2020). En este

sentido, los valores de arginina informados en ambas dietas (D1=3,8% y D2=3,2%) fueron superiores a los sugeridos por Muzinic et al. (2004) y Thompson et al. (2005) (2,0% y 2,4%, respectivamente), para satisfacer los requerimientos de juveniles de *C. quadricarinatus*. En esta línea, también fueron superiores los valores de lisina reportados en ambas dietas (D1=3,0% y D2=2,5%) a lo sugerido por Muzinic et al. (2004) y Thompson et al. (2005) (1,8% y 2,3%, respectivamente). En consecuencia, una mayor cantidad de arginina y de lisina pudo conducir a un gasto extra de energía por el proceso de desaminación y excreción, aumentando el costo energético del catabolismo (Walton, 1985; Niu et al., 2017) en los juveniles alimentados con D1 y esta energía ya no se utilizó para la síntesis de proteínas.

En cuanto al nivel de leucina reportado en la dieta (D1=2,9% y D2= 2,8%) estos valores estuvieron dentro del rango para un mejor crecimiento de los juveniles de *C. quadricarinatus* (2,5% y 3,1%) según Muzinic et al. (2004) y Thompson et al. (2005), respectivamente. En cuanto a la metionina, el valor en ambas dietas fue bajo (D1=0,2% y D2=0,1%) en contraste con los datos reportados como satisfactorios para un buen crecimiento de los juveniles (0,5% a 0,7%) por Muzinic et al. (2004). La deficiencia de metionina en la dieta induce un aumento en la acumulación de lípidos en el hepatopáncreas (Song et al., 2018) y una menor disponibilidad de este aminoácido se observa cuando las dietas contienen una gran cantidad de harina de origen vegetal (Nunes et al., 2014). Por lo tanto, el bajo valor registrado en las dietas D1 y D2 pudo ser debido a la inclusión de las harinas de origen vegetal (53% del total en D1 y 73% del total en D2) en comparación con la harina de pescado (10% del total y fuente de metionina). Curiosamente, el ensilado de pescado (20% del total) proporcionó muy poca metionina para la dieta y quizás fue la calidad del ensilado de pescado utilizada en D1, es decir, la materia prima utilizada (especies de peces y parte/s de el/los mismos utilizadas, además del método de producción) lo que haya afectado este valor (Herrero, 2021).

Con respecto al uso del ensilado de pescado en una dieta para la alimentación de los crustáceos, hay diversos trabajos que mostraron una mejora o similar *performance* en el crecimiento cuando fueron comparados con dietas sin ensilado. Por ejemplo, Bijoy et al. (2018) observó que ocurrió una mejora en el crecimiento de los juveniles del camarón de agua dulce *M. rosenbergii* (~0,3 g) cuando fueron alimentados con una dieta compuesta por 38% de ensilado de crustáceo (*Squilla* sp.) y 7,5% de harina de pescado (además de la inclusión de harinas vegetales), en comparación con una dieta sin el ensilado. Por otro lado, Shao et al. (2020) observó similar crecimiento en los juveniles del camarón marino *L. vannamei* (~0,3 g) cuando fueron alimentados con una dieta compuesta por 10% de ensilado de pescado y 24% de harina de pescado (además de harinas vegetales), en comparación con una dieta sin el ensilado. El mismo resultado fue observado en el trabajo de Rodríguez-González et al. (2018) en juveniles (2 g) de la misma especie de camarón cuando fueron alimentados con una dieta conteniendo 19% de ensilado de pescado y sin harina

de pescado, en comparación con una dieta sin el ensilado y con harina de pescado. Visto y considerando estos datos, sería interesante estudiar qué sucedería con una dieta que mantuviese la proporción de ensilado de pescado como en la D1 (20%) pero que presentase una reducción en su contenido de harina de pescado (<10%) evitando así el desperdicio de proteínas que pueden estar en exceso y logrando una dieta que pueda adaptarse mejor a los requerimientos de la langosta *C. quadricarinatus* para un crecimiento óptimo.

Entre las dietas con (D1) y sin ensilado (D2) de pescado los indicies somáticos fueron por lo general similares lo cual indica una similar condición nutricional de los juveniles, excepto para el índice delcefalotórax que fue menor en aquellos juveniles alimentados con D2. Conjuntamente, también se observó una menor concentración del glucógeno en elcefalotórax de estos juveniles. A su vez y dado que el 50% de la muestra delcefalotórax provino delhepatopáncreas, se supone que fue utilizado elglucógeno hepatopancreático para cubrir alguna deficiencia energética por la falta de algún otro nutriente (aminoácido o ácido graso). El glucógeno almacenado enhepatopáncreas es una fuente de energía de emergencia que puede ser fácilmente movilizada para diversas adaptaciones ante la escasez o deficiencia de alimento (Johnston et al., 2004; Sánchez-Paz et al., 2007). Por otro lado, la D2 fue la dieta con mayor cantidad de carbohidratos solubles (28%) en comparación con la D1 (14%) y si este macronutriente no es utilizado para energía será acumulado en elhepatopáncreas, ya sea en forma de lípidos o glucógeno (Hutchins et al., 1998; Gumus & Ikiz, 2009). De este modo, la razón de un menor almacenamiento del glucógeno por parte de los juveniles de D2 es incierta y requiere estudios posteriores.

En el presente estudio, los niveles de lípidos en las dietas (13,5% en D1 y 11,5% en D2) estuvieron dentro del rango para un buen crecimiento de los juveniles, de acuerdo a Hernández-Vergara et al. (2003) y Qian et al. (2020), aunque un poco más elevado que el 8% informado por Cortes-Jacinto et al. (2005). En todo caso, el nivel lipídico “extra” de D1 comparado con D2 no produjo un mejor crecimiento de los juveniles, pero tampoco ocasionó una mayor acumulación de lípidos en las quelas,cefalotórax o en el pleon. Además, en la estructura delhepatopancreas se observó (cualitativamente) un similar número de células R, que son las células responsables por el almacenamiento del material de bajo peso molecular como los ácidos grasos, monosacáridos,disacáridos y aminoácidos (Vogt, 2019) y un similar número de células B que son las células responsables por la absorción de material del lumen tubular (que es distinto del material absorbido por las células R), por la acumulación de material en la vacuola central y posterior descarga (Vogt, 2019). Vistos estos datos, se podría sugerir una disminución de los niveles de lípidos en ambas dietas, sobre todo en la D1, dado que no sería perjudicial por los altos niveles proteicos que tienen las dietas.

Finalmente, los valores de retención de las proteínas mostraron que los juveniles de *C. quadricarinatus* fueron capaces de retener ~16% (sumando las retenciones en las quelas, cefalotórax y pleon). Este valor es similar a lo observado en el camarón de agua dulce *M. rosenbergii* (~ 15%; Fry et al., 2018) y en el camarón marino *Penaeus monodon* (Rombenso et al., 2020). A su vez, la retención proteica de la langosta de agua dulce fue menor a la observada en el camarón marino *L. vannamei* (~21%; Fry et al., 2018) y en el cangrejo y *Eriocheir sinensis* (~30 %; Chowdhury et al., 2017). En este sentido, una optimización del uso de una dieta acuícola conjuntamente con una adecuada relación entre proteína y energía permitiría la eficiente utilización de la proteína dietaria, generando una mayor retención proteica en el organismo y una reducción de los nutrientes en los efluentes (Cho & Bureau, 2001; Estefanell et al., 2011; Elvy et al., 2022). Por lo tanto, los valores de retención de los nutrientes observados en los juveniles de *C. quadricarinatus* alimentados con D1 y D2 (dietas que indicaron ser factibles para un posible uso en acuicultura), nos indicaron también que sería importante buscar un mejor balance energético en las dietas para que el uso de los aminoácidos ingeridos sea más eficiente. Tal vez, la aplicación de una estrategia alimenticia más eficiente, como podría ser la de crecimiento compensatorio (Stumpf et al., 2014; Stumpf et al., 2019) también pueda mejorar considerablemente la retención de proteínas.

## **8. Conclusión:**

Las variables zootécnicas y nutricionales analizadas en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* indicaron una factibilidad en el uso de ambas dietas (al menos para los juveniles de 1 a 4 gramos y durante 3 meses). Además, no hubo diferencias entre las dietas conteniendo (D1) o sin (D2) ensilado de pescado, indicando que se podría ajustar la cantidad de la harina de pescado en la D1 para que sea más ventajosa. En este sentido y de acuerdo con los resultados, el uso del ensilado de pescado podría ser potenciado si hubiese una reducción de la concentración proteica de la dieta (hasta 38%, nivel de la D2). Finalmente, el trabajo presentó resultados muy prometedores y puede ser utilizado como una guía para una adecuada formulación de alimentos para la especie en nuestro país. Asimismo, es importante resaltar, que una recomendación para el uso de ambas dietas en la alimentación de la langosta de agua dulce en un sistema de producción debe ser cauta, dado que este trabajo fue realizado en condiciones de cultivo individual y controlado de laboratorio.

## 9. Referencias bibliográficas:

- [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aciucultura/Informes/\\_archivos//000001\\_Analisis%20del%20Sector%20Acu%C3%ADcola%20Argentino.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aciucultura/Informes/_archivos//000001_Analisis%20del%20Sector%20Acu%C3%ADcola%20Argentino.pdf)
- Afreem, M., & Ucak, I. (2020). Fish processing wastes used as feed ingredient for animal feed and aquaculture feed. *Survey in Fisheries Sciences*, 6(2), 55-64. <https://doi:10.18331/SFS2020.6.2.7>
- Anger, K., (2001). The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean Issues, 14. A.A. Balkema, Lisse, The Netherlands. 420 pp.
- A.O.A.C. Official method of analysis. Association of Official Analytical Chemistry. 16<sup>th</sup> edición, Ed. By Hoorwitz, N., P. Chialo, y H. Reynold, Washington, USA (1990).
- Bijoy, V. M., Sabu, S., & Harikrishnan, M. (2018). Fish meal replacement with squilla (*Oratosquilla nepa*, Latreille) silage in a practical diet for the juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de man, 1879. *Aquaculture International*, 26(5), 1229- 1245. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0280-0>
- Biswas, A., Araki, H., Sakata, T., Nakamori, T., & Takii, K. (2019). Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phytase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 506, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.023>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bradford, N. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes. *Analytical Biochemistry*, 72(248), e254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Calvo, N. S., Stumpf, L., Pietrokovsky, S., & Greco, L. S. L. (2011). Early and late effects of feed restriction on survival, growth and hepatopancreas structure in juveniles of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 319(3-4), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.033>
- Calvo, N. S., Tropea, C., Anger, K., & Greco, L. S. L. (2012). Starvation resistance in juvenile freshwater crayfish. *Aquat Biol* 16:287-297. <https://doi.org/10.3354/ab00451>
- Calvo, N. S., Stumpf, L., Cortés-Jacinto, E., Castillo Díaz, F., & López Greco, L. S. (2018). Mobilization of energetic reserves during starvation in juveniles of different size of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition*, 24(3), 952-960. <https://doi.org/10.1111/anu.12631>
- Campaña-Torres, A., Martínez-Córdova, L.R., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., (2008). Carbohydrate and lipid digestibility of animal and vegetal ingredients and diets for the pre-adult redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquac. Res.* 39, 1115–1121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00388.x>
- Castillo Díaz, F., Tropea, C., Stumpf, L., & López Greco, L. S. (2017). Effect of food restriction on female reproductive performance in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae, Decapoda). *Aquaculture Research*, 48(8), 4228-4237. <https://doi.org/10.1111/are.13244>

Cervellione, F., McGurk, C., & Van den Broeck, W. (2017). "Perigastric organ": a replacement name for the "hepatopancreas" of Decapoda. *Journal of Crustacean Biology*, 37(3), 353–355. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/rux020>

Cervellione, F., McGurk, C., Berger Eriksen, T., & Van den Broeck, W. (2017). Effect of starvation and refeeding on the hepatopancreas of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) using computer-assisted image analysis. *Journal of Fish Diseases*, 40(11), 1707–1715. <https://doi.org/10.1111/jfd.12639>

Chaikaew, P., Rugkarn, N., Pongpipatwattana, V., & Kanokkantapong, V. (2019). Enhancing ecological-economic efficiency of intensive shrimp farm through in-out nutrient budget and feed conversion ratio. *Sustainable Environment Research*, 29(1). <https://doi.org/10.1186/s42834-019-0029-0>

Chen, Q., Lv, W., Jiao, Y., Liu, Z., Li, Y., Cai, M., ... Zhao, Y. (2020). Effects of exposure to waterborne polystyrene microspheres on lipid metabolism in the hepatopancreas of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquatic Toxicology*, 224, 105497. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105497>

Cho, C. Y., & Bureau, D. P. (2001). A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research*, 32, 349–360. <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00027.x>

Chowdhury, M. A. K., Zhu, J., Cai, C., Ye, Y., & He, J. (2017). Dietary protease modulates nutrient retention efficiency and hepatopancreatic protease activity in juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture Nutrition*, 24(2), 911–917. <https://doi.org/10.1111/anu.12627>

Claybrook, D. L. (1983). Nitrogen metabolism. *Biology of crustacea*, 163-213. [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=FOUar4vjSa0C&oi=fnd&pg=PA163&dq=Claybrook,+D.+L.+\(1983\).+Nitrogen+metabolism.+Biology+of+crustacea,+163-213.&ots=Ojw0hx9ejy&sig=aSz2meMVCTY94WNlIBaoEYf10c#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=FOUar4vjSa0C&oi=fnd&pg=PA163&dq=Claybrook,+D.+L.+(1983).+Nitrogen+metabolism.+Biology+of+crustacea,+163-213.&ots=Ojw0hx9ejy&sig=aSz2meMVCTY94WNlIBaoEYf10c#v=onepage&q&f=false)

Clegg, K. M. (1956). The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7(1), 40-44. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740070108>

Cortes-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., & Martinez-Cordova, R. (2003). Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture Nutrition*, 9(4), 207–213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00241.x>

Cortés-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., Naranjo-Páramo, J., (2004a). Effect of dietary protein level on the growth and survival of pre-adult freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) in monosex culture. *Aquac. Int.* 35, 71–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.00988.x>

Cortés-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., Cruz-Suárez, L.E., (2004b). Studies on the nutrition of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens): effect of the dietary protein level on growth of juveniles and preadults. *Freshw. Crayfish* 14, 70–80. [https://d1wqxts1xzle7.cloudfront.net/46650862/Studies on the nutrition of the freshwater crayfish Cherax quadricarinatus \(von Martens\).pdf](https://d1wqxts1xzle7.cloudfront.net/46650862/Studies%20on%20the%20nutrition%20of%20the%20freshwater%20crayfish%20Cherax%20quadricarinatus%20(von%20Martens).pdf)

[20-26023-331nbj-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1668612092&Signature=IMa8kgPX5AMlwvB~6Wti3wj1NLBeA0neQu7s6yxewyxU0UVJxRBQE8Gjsnc4OOEB1hm5ukV417B72FbeYCZ1DT4UALwy1YZEnOQCjoFU1grDjGik4YjPtnfphxDAXd0uAzgBKeDBY6fFbhX1c0wQSA~Di9vmAruuGFFM-lpPUh6ylzb-9zFs0ITBuB7VzpF3iNOx1~U40mZAa8ucLHyLOmNSut5VDwUg3Tp0Fiyv0GAH-rCycjYspZOPTSuzmvj3GjduAGDYs7euGRA2ARn4~XDtV8Vtexe83QjKNCnWxHF68VGmyX2iUtnF2l-Qr3pKwaUQklj24zLlclGyHbtwgA&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2602331/pdf/20-26023-331nbj-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1668612092&Signature=IMa8kgPX5AMlwvB~6Wti3wj1NLBeA0neQu7s6yxewyxU0UVJxRBQE8Gjsnc4OOEB1hm5ukV417B72FbeYCZ1DT4UALwy1YZEnOQCjoFU1grDjGik4YjPtnfphxDAXd0uAzgBKeDBY6fFbhX1c0wQSA~Di9vmAruuGFFM-lpPUh6ylzb-9zFs0ITBuB7VzpF3iNOx1~U40mZAa8ucLHyLOmNSut5VDwUg3Tp0Fiyv0GAH-rCycjYspZOPTSuzmvj3GjduAGDYs7euGRA2ARn4~XDtV8Vtexe83QjKNCnWxHF68VGmyX2iUtnF2l-Qr3pKwaUQklj24zLlclGyHbtwgA&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

Cortés-Jacinto, E., Villarreal-Colmenares, H., Cruz-Suárez, L. E., Civera-Cerecedo, R., Nolasco-Soria, H., & Hernandez-Llamas, A. (2005). Effect of different dietary protein and lipid levels on growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Nutrition*, 11(4), 283-291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00353.x>

Elvy, J. E., Symonds, J. E., Hilton, Z., Walker, S. P., Tremblay, L. A., Casanovas, P., & Herbert, N. A. (2022). The relationship of feed intake, growth, nutrient retention, and oxygen consumption to feed conversion ratio of farmed saltwater Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 554, 738184. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738184>

Estefanell, J., Socorro, J., Tuya, F., Izquierdo, M., & Roo, J. (2011). Growth, protein retention and biochemical composition in *Octopus vulgaris* fed on different diets based on crustaceans and aquaculture by-products. *Aquaculture*, 322, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.027>

FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.

Figueiredo, M. S. R. B., & Anderson, A. J. (2003). Ontogenetic changes in digestive proteases and carbohydrases from the Australian freshwater crayfish, redclaw *Cherax quadricarinatus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Aquaculture Research*, 34(13), 1235-1239. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00929.x>

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Franceschini-Vicentini, I. B., Ribeiro, K., Papa, L. P., Marques Junior, J., Vicentini, C. A., & Valenti, P. M. C. M. (2009). Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *International Journal of Morphology*, 27(1), 121-128. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022009000100022>

Frings, C. S., Fendley, T. W., Dunn, R. T., & Queen, C. A. (1972). Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry*, 18, 673- 674. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.7.673>

Fry, J. P., Mailloux, N. A., Love, D. C., Milli, M. C., & Cao, L. (2018). Feed conversion efficiency in aquaculture: do we measure it correctly?. *Environmental Research Letters*, 13(2), 024017. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aaa273>

Gao, M., Luo, Y.P., Cao, Z.D., (2006). Effect of dietary carbohydrate on digestive enzyme activities in southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) juveniles. *Journal of Southwest China Normal University* (Natural Science Edition) 31, 119–123.

Garza de Yta, A., Davis, D. A., Rouse, D. B., Ghanawi, J., & Saoud, I. P. (2012). Evaluation of practical diets containing various terrestrial protein sources on survival and growth parameters of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research*, 43(1), 84-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02806.x>

Gibson, R., and P. L. Barker. (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 17: 285-346. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573950399008413696>

González-Peña, M. D. C., & Moreira, M. D. G. B. S. (2003). Effect of dietary cellulose level on specific dynamic action and ammonia excretion of the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879). *Aquaculture Research*, 34(10), 821-827. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00887.x>

Gümüş, E., & İkiz, R. (2009). Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, chemical contents and digestibility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792. *Pakistan Veterinary Journal*, 29(2). [http://www.pvj.com.pk/pdf-files/29\\_2/59-63.pdf](http://www.pvj.com.pk/pdf-files/29_2/59-63.pdf)

Haubrock, P. J., Oficialdegui, F. J., Zeng, Y., Patoka, J., Yeo, D. C., & Kouba, A. (2021). The redclaw crayfish: A prominent aquaculture species with invasive potential in tropical and subtropical biodiversity hotspots. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1488-1530. <https://doi.org/10.1111/raq.12531>

Hernández-Llamas, A., Núñez-Amao, L., Naranjo-Páramo, J., Vargas-Mendieta, M., & Villarreal, H. (2020). A review of alternative pond harvesting schedules for male and female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*, reared in intensive monosex commercial conditions: a stochastic bioeconomic approach. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 626-639. <https://doi.org/10.1111/raq.12343>

Hernández-Vergara, M. P., Rouse, D. B., Olvera-Novoa, M. A., & Davis, D. A. (2003). Effects of dietary lipid level and source on growth and proximate composition of juvenile redclaw (*Cherax quadricarinatus*) reared under semi-intensive culture conditions. *Aquaculture*, 223(1-4), 107-115. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00135-2)

Herrero, A. F. (2021). Ensilados químicos y biológicos. Una alternativa de aprovechamiento integral y sustentable de los residuos pesqueros en Argentina. *Marine and Fishery Sciences*, 34(2). <https://doi.org/10.47193/mafis.3422021010603>

Hoseini, S. M., Ahmad Khan, M., Yousefi, M., & Costas, B. (2020). Roles of arginine in fish nutrition and health: insights for future researches. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2091-2108. <https://doi.org/10.1111/raq.12424>

Hu, K. J., & Leung, P. C. (2007). Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(1), 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.09.010>

Huang, F., Wang, L., Zhang, C. X., & Song, K. (2017). Replacement of fishmeal with soybean meal and mineral supplements in diets of *Litopenaeus vannamei* reared in low- salinity water. *Aquaculture*, 473, 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.011>

Hulefeld, R., Habte-Tsion, H. M., Lalgudi, R. S., McGraw, B., Cain, R., Allen, K., ... & Kumar, V. (2018). Nutritional evaluation of an improved soybean meal as a fishmeal replacer in the diet of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 49(4), 1414-1422. <https://doi.org/10.1111/are.13593>

Hutchins, C. G., Rawles, S. D., & Gatlin III, D. M. (1998). Effects of dietary carbohydrate kind and level on growth, body composition and glycemic response of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂). *Aquaculture*, 161(1-4), 187-199. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00269-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00269-X)

Johnston, D. J., Ritar, A. J., & Thomas, C. W. (2004). Digestive enzyme profiles reveal digestive capacity and potential energy sources in fed and starved spiny lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosoma larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 138(2), 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.02.013>

Jones, C. M. (1995a). Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens)(Decapoda, Parastacidae) I. Development of hatchery and nursery procedures. *Aquaculture*, 138(1-4), 221-248. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00068-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00068-2)

Jones, C. M. (1995b). Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda, Parastacidae) II. Juvenile nutrition and habitat. *Aquaculture*, 138(1-4), 239-245. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00069-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00069-0)

Jones, P. L., & Obst, J. H. (2000). Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 20(3), 431-441. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990057>

Jones, C. M., & Valverde, C. (2020). Development of mass production hatchery technology for the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Freshwater Crayfish*, 25, 1-6. <https://doi.org/10.5869/fc.2020.v25-1.001>

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., & Van Wormhoudt, A. (1997). Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208(1-2), 107-125. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02671-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02671-8)

Levi, T., Barki, A., Hulata, G., & Karplus, I. (1999). Mother-offspring relationships in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Crustacean Biology*, 19(3), 477-484. <https://doi.org/10.2307/1549256>

Li, P., Mai, K., Trushenski, J., & Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino acids*, 37(1), 43-53. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0171-1>

Lopez Greco, L. S., Vazquez, F., & Rodríguez, E. M. (2007). Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater 'red claw' crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Acta Zoologica*, 88(3), 223-229. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2007.00269.x>

Luchini, L., & Panné-Huidobro, S. (2008). Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. *Dirección de Acuicultura, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, SAGPyA, Buenos Aires.* [https://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_peces/piscicultura/113-perspectivas.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/113-perspectivas.pdf)

McCue, M. D. (2006). Specific dynamic action: a century of investigation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(4), 381-394. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.011>

Meade, M. E., & Watts, S. A. (1995). Weight gain and survival of juvenile Australian crayfish *Cherax quadricarinatus* fed formulated feeds. *Journal of the world aquaculture society*, 26(4), 469-474. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1995.tb00845.x>

Muzinic, L. A., Thompson, K. R., Morris, A., Webster, C. D., Rouse, D. B., & Manomaitis, L. (2004). Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and brewer's grains with yeast in practical diets for Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 230(1-4), 359-376. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00420-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00420-4)

Mykles, D. L., & Chang, E. S. (2020). Hormonal control of the crustacean molting gland: Insights from transcriptomics and proteomics. *General and Comparative Endocrinology*, 294, 113493. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113493>

Nguyen, N. H., Trinh, L. T., Chau, D. T., Baruah, K., Lundh, T., & Kiessling, A. (2019). Spent brewer's yeast as a replacement for fishmeal in diets for giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), reared in either clear water or a biofloc environment. *Aquaculture Nutrition*, 25(4), 970-979. <https://doi.org/10.1111/anu.12915>

Niu, J., Chen, X., Lin, H. Z., Li, C. H., Wu, K. C., Liu, Y. J., & Tian, L. X. (2017). Comparison of L-lysine· HC l and L-lysine sulphate in the feed of *Penaeus monodon* and re-evaluation of dietary lysine requirement for *P. monodon*. *Aquaculture Research*, 48(1), 134-148. <https://doi.org/10.1111/are.12868>

Nunes, A. J., Sá, M. V., Browdy, C. L., & Vazquez-Anon, M. (2014). Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture*, 431, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.003>

Olsen, R. L., & Toppe, J. (2017). Fish silage hydrolysates: Not only a feed nutrient, but also a useful feed additive. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.003>

Qian, D., Yang, X., Xu, C., Chen, C., Jia, Y., Gu, Z., & Li, E. (2021). Growth and health status of the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, fed diets with four typical plant protein sources as a replacement for fish meal. *Aquaculture Nutrition*, 27(3), 795-806. <https://doi.org/10.1111/anu.13224>

Qin, G., Chen, H., Liu, F., Chu, T., Wang, M., Lou, B., ... & Yao, Z. (2022). Changes of lipid composition and fatty acid content in the hepatopancreas and expression of FABP before and after molting in red claw

crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(5), 1062-1075. <https://doi.org/10.1111/jwas.12862>

Ribeiro, K., Papa, L. P., Vicentini, C. A., & Franceschini-Vicentini, I. B. (2016). The ultrastructural evaluation of digestive cells in the hepatopancreas of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture research*, 47(4), 1251-1259. <https://doi.org/10.1111/are.12582>

Rigg, D., Seymour, J. E., Courtney, R. L., & Jones, C. M. (2020). A Review of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) aquaculture: global production practices and innovation. *Freshwater Crayfish*, 25, 13-30. <https://doi.org/10.5869/fc.2020.v25-1.013>

Rodríguez-González, H., López-Aguilar, M. R., Fonseca-Madrigal, J., Martínez-Palacios, C. A., & García-Ulloa, M. (2018). Use of a mixture of vegetal (*Jatropha curcas*) and animal (fish silage) byproducts as protein source in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47. <https://doi.org/10.1590/rbz4720170165>

Rombenso, A. N., Truong, H., & Simon, C. (2020). Dietary butyrate alone or in combination with succinate and fumarate improved survival, feed intake, growth and nutrient retention efficiency of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 528, 735492. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735492>

Samaddar, A. (2018). A review of fish meal replacement with fermented biodegradable organic wastes in aquaculture. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6, 203-208.

Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., & Yepiz-Plascencia, G. (2007). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340(2), 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.09.006>

Sankhla, M. S., & Kumar, R. (2020). *New and Advanced Technologies in Aquaculture to Support Environmentally Sustainable Development*. In *Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications* (pp. 249-263). Springer, Singapore.

Saoud, I. P., Garza De Yta, A., & Ghanawi, J. (2012). A review of nutritional biology and dietary requirements of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Aquaculture Nutrition*, 18(4), 349-368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00925.x>

Saoud, I. P., Garza De Yta, A., & Ghanawi, J. (2012). A review of nutritional biology and dietary requirements of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Aquaculture Nutrition*, 18(4), 349-368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00925.x>

Saoud, I. P., Ghanawi, J., Thompson, K. R., & Webster, C. D. (2013). A review of the culture and diseases of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(1), 1-29. <https://doi.org/10.1111/jwas.12011>

Secor, S. M., Whang, E. E., Lane, J. S., Ashley, S. W., & Diamond, J. (2000). Luminal and systemic signals trigger intestinal adaptation in the juvenile python (*Python molurus*). *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(6), G1177-G1187. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.6.G1177>

Shao, J., Jiang, K., & Wang, L. (2019). *Litopenaeus vannamei* fed diets with different replacement levels of fish meal by fish silage: A molecular approach on intestinal microbiota. *Aquaculture Nutrition*, 25(3), 721-728. <https://doi.org/10.1111/anu.12900>

Shao, J., Wang, L., Shao, X., & Liu, M. (2020). Dietary Different Replacement Levels of Fishmeal by Fish Silage Could Influence Growth of *Litopenaeus vannamei* by Regulating mTOR at Transcriptional Level. *Frontiers in Physiology*, 11, 359. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00359>

Shun, C., Yong-yi, J., Mei-li, C., Jian-bo, Z., Shi-li, L., & Zhi-min, G. (2020). Culture model of *Cherax quadricarinatus*: Temporary shelter in shed and pond culture. *Aquaculture*, 526, 735359. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735359>

Shun, C., Yong-Yi, J., Mei-Li, C., Shi-Li, L., Jian-Bo, Z., Dan-Li, W., & Zhi-Min, G. (2020). The exploration of artificial incubation of *Cherax quadricarinatus* eggs. *Aquaculture*, 529, 735576. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735576>

Song, Y. F., Gao, Y., Hogstrand, C., Li, D. D., Pan, Y. X., & Luo, Z. (2018). Upstream regulators of apoptosis mediates methionine-induced changes of lipid metabolism. *Cellular Signalling*, 51, 176-190. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.08.005>

Sousa, L. G., Cuartas, E. I., & Petriella, A. M. (2005). Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermoult. *Biocell*, 29(1), 25-31. <http://www.scielo.org.ar/pdf/biocell/v29n1/v29n1a04.pdf>

Stumpf, L., Calvo, N. S., Pietrokovsky, S., & Greco, L. S. L. (2010). Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 304(1-4), 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.011>

Stumpf, L., Calvo, N. S., Díaz, F. C., Valenti, W. C., & Greco, L. S. L. (2011). Effect of intermittent feeding on growth in early juveniles of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 319(1-2), 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.029>

Stumpf, L., Tropea, C., & Greco, L. S. L. (2014). Recovery growth of *Cherax quadricarinatus* juveniles fed on two high-protein diets: Effect of daily feeding following a cyclic feeding period on growth, biochemical composition and activity of digestive enzymes. *Aquaculture*, 433, 404-410. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.037>

Stumpf, L., Cárdenas, P. N. S., Timpanaro, S., & Greco, L. L. (2019). Feasibility of compensatory growth in early juveniles of “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus* under high density conditions. *Aquaculture*, 510, 302-310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.053>

Stumpf, L., & López Greco, L. S. (2015). Compensatory growth in juveniles of freshwater redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* reared at three different temperatures: hyperphagia and food efficiency as primary mechanisms. *PLoS One*, 10(9), e0139372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139372>

Tacon, A. G. (2022). Contribution of Fish and Seafood to Global Food and Feed Supply: An Analysis of the FAO Food Balance Sheet for 2019. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2022.2124364>

Thompson, K. R., Muzinic, L. A., Engler, L. S., & Webster, C. D. (2005). Evaluation of practical diets containing different protein levels, with or without fish meal, for juvenile Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture*, 244(1-4), 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.018>

Thompson, K. R., Metts, L. S., Muzinic, L. A., Dasgupta, S., & Webster, C. D. (2006). Effects of feeding practical diets containing different protein levels, with or without fish meal, on growth, survival, body composition and processing traits of male and female Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) grown in ponds. *Aquaculture Nutrition*, 12(3), 227-238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00407.x>

Tropea, C., Piazza, Y., & Greco, L. S. L. (2010). Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the “redclaw” crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 302(1-2), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.027>

Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical biochemistry*, 11(2), 256-265. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90013-8)

Vazquez, F. J., Tropea, C., & Lopez Greco, L. S. (2008). Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Invertebrate Biology*, 127(4), 433-443. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2008.00148.x>

Vazquez, F. J., & López Greco, L. S. (2007). Sexual differentiation in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Revista de Biología Tropical*, 55(SUPPL 1), 33-37.

Colmenares, H. V. (2002). Avances en la Nutricion de *Cherax quadricarinatus*. *Avances en Nutrición Acuicola*. Recuperado a partir de <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/232>

Visto, R. V., Tumbokon, B. L. M., Caigoy, J. C. C., & Serrano, A. E. (2018). Optimum Replacement Value of Fish Silage for Protein Source in Pacific White Shrimp Diets. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 70.

Vogt, G. (2019). Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of Morphology*, 280(9), 1405-1444. <https://doi.org/10.1002/jmor.21040>

Walton, M. J. (1985). Aspects of amino acid metabolism in teleost fish. *Nutrition and Feeding in Fish*, 47-67.

Wang, X. X., Yuan, Y., Li, C. C., Zhou, F., Jin, M., Sun, P., ... & Zhou, Q. C. (2020). Partial substitution of fish meal with soy protein concentrate in commercial diets for juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Animal Feed Science and Technology*, 259, 114290. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114290>

Wang, S., Carter, C. G., Fitzgibbon, Q. P., Codabaccus, B. M., & Smith, G. G. (2021). Effect of dietary protein on energy metabolism including protein synthesis in the spiny lobster *Sagmariasus verreauxi*. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91304-1>

Wicki, G., Rossi, F., Merino, O., & Luchini, L. (2008). Engorde de la langosta de pinzas rojas (*Cherax quadricarinatus*), en el subtrópico argentino: primeros resultados. [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aciicultura/cultivos/\\_archivos/000000\\_Especies/000003-](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aciicultura/cultivos/_archivos/000000_Especies/000003-)

[Langosta/100331\\_Primeros%20resultados%20obtenidos%20en%20langosta%20de%20agua%20dulce.pdf](Langosta/100331_Primeros%20resultados%20obtenidos%20en%20langosta%20de%20agua%20dulce.pdf)

Yang, X., Chi, S., Tan, B., Nie, Q., Hu, J., Dong, X., ... & Zhang, S. (2020). Yeast hydrolysate helping the complex plant proteins to improve the growth performance and feed utilization of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 17, 100375. <https://doi.org/10.1016/j.agrep.2020.100375>

Shechter, A., Tom, M., Yudkovski, Y., Weil, S., Chang, S. A., Chang, E. S., ... & Sagi, A. (2007). Search for hepatopancreatic ecdysteroid-responsive genes during the crayfish molt cycle: from a single gene to multigenicity. *Journal of Experimental Biology*, 210(20), 3525-3537. <https://doi.org/10.1242/jeb.006791>

Zhu, H., Jiang, Q., Wang, Q., Yang, J., Dong, S., & Yang, J. (2013). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, hepatic enzyme activities, and digestive enzyme activities of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(2), 173-186. <https://doi.org/10.1111/jwas.12024>

Zhu, H., Jiang, Q., Wang, Q., Yang, J., Dong, S., & Yang, J. (2013). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, hepatic enzyme activities, and digestive enzyme activities of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(2), 173-186. <https://doi.org/10.1111/jwas.12024>