

# Isótopos estables como trazadores nutricionales naturales en larvas y juveniles de *Litopenaeus vannamei* y *Solea senegalensis*

Julián Gamboa-Delgado

School of Ocean Sciences, College of Natural Sciences, Bangor University

Menai Bridge, Anglesey, Wales LL59 5AB, United Kingdom

Dirección actual: Laboratorio de Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León, A.P. F-67. San Nicolás de los Garza, Nuevo  
León 66451, México. Tel/Fax: +52 81 8352-6380 E-mail: julian.gamboat@uanl.mx

---

## Resumen

Los isótopos estables han sido ampliamente utilizados como marcadores nutricionales no-peligrosos para estimar flujos de nutrientes y energía en ecosistemas acuáticos. Los sistemas acuícolas son altamente viables para realizar evaluaciones isotópicas debido a que en su mayoría representan cadenas alimenticias cortas y controladas. El presente trabajo muestra una breve revisión de estudios que se han enfocado en utilizar las diferencias naturales en la composición isotópica de diversos ingredientes, dietas y organismos consumidores para determinar contribuciones nutricionales al crecimiento. Adicionalmente se presenta una serie de aplicaciones actuales en las cuales camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) y lenguado de Senegal (*S. senegalensis*) fueron utilizados como organismos modelo. La contribución nutricional de harina de pescado y proteína de soya al crecimiento del camarón blanco fue evaluada al formular dietas con proporciones variables de nitrógeno suministrado por ambos ingredientes. Las contribuciones de nitrógeno al crecimiento fueron mayores a partir de la harina de pescado. En dos experimentos adicionales, se cuantificó la incorporación de carbono dietario proveniente de alimento vivo (*Artemia*) e inerte consumido por larvas y postlarvas de camarón y lenguado cultivados bajo diferentes regímenes de co-alimentación. Los aportes nutricionales provenientes del alimento vivo fueron mayores que los suministrados por el alimento inerte. La estimación de cambios isotópicos en tejido a diferentes tiempos permitió distinguir la dilución isotópica debida solo a crecimiento y la causada por las tasas metabólicas de recambio de nutrientes en tejido.

Palabras clave: Trazadores nutricionales, isótopos estables, carbono, nitrógeno dietario, *Litopenaeus vannamei*, *Solea senegalensis*

## Introducción

El uso de isótopos estables como trazadores nutricionales representa una poderosa herramienta para estimar procesos, conexiones y flujos de energía dentro de los sistemas acuáticos (Michener & Schell 1994). La firma isotópica de un organismo consumidor refleja el perfil isotópico del material dietario asimilado y por lo tanto, es posible determinar los aportes dietarios al crecimiento en un período de tiempo (Peterson & Fry 1987). Debido a su abundancia natural en los diversos tejidos, carbono (C) y nitrógeno (N) son los elementos más frecuentemente analizados para determinar sus proporciones isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ). Los isótopos estables también han sido utilizados para determinar dinámicas de nutrientes en estanques de producción acuícola (Schroeder 1983; Bombeo-Tuburan, Guanzon & Schroeder 1993; Epp, Ziemann & Schell 2002) y en áreas impactadas por la actividad acuícola mediante el trazado de nutrientes desde los alimentos hasta el sedimento (Yokoyama, Abo & Ishihi 2006). En operaciones de cultivo de camarón, isótopos estables han sido aplicados mediante la formulación de dietas enriquecidas con N pesado ( $^{15}\text{N}$ ) con el fin de generar productos metabólicos trazables (Burford, Preston, Glibert & Dennison 2002). D'Avanzo, Alber & Valiela (1991) marcaron agregados detritales con  $^{15}\text{N}$  para trazar nutrientes consumidos por camarón *Palaemonetes pugio*, mientras que Preston, Smith, Kellaway & Bunn (1996) utilizaron  $\text{KNO}_3$  enriquecido con  $^{15}\text{N}$  para manipular isotópicamente diatomeas y *Artemia* y posteriormente determinar su asimilación en camarón *Penaeus monodon*.

## Cuantificación de la contribución nutricional de diversas fuentes dietarias

Diversos componentes dietarios pueden exhibir firmas isotópicas naturalmente distintas, de tal forma que es posible establecer una relación “organismo consumidor-dieta”. Estos valores pueden integrarse en modelos de mezclado isotópico (e.g. Phillips & Gregg 2001, 2003; Fry 2006) para cuantificar la contribución relativa de múltiples fuentes nutritivas al crecimiento. Por lo tanto, en estudios nutricionales es posible estimar la contribución dietaria de diversos elementos presentes en el ambiente natural o en dietas y regímenes de alimentación experimentales. La utilización relativa de diversas fuentes dietarias (proteína, lípidos) en alimentos vivos y formulados también puede ser

cuantificada. Por ejemplo, Schlechtriem, Focken & Becker (2004) manipularon las firmas isotópicas de nematodos al alimentarlos con harinas de plantas con vías fotosintéticas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. Los nematodos fueron a su vez ofrecidos como alimento a carpas (*Cyprinus carpio*) para determinar la asimilación de lípidos y material libre de lípidos. El uso de modelos de mezclado isotópico requiere que ciertas asunciones y condiciones sean satisfechas en el diseño experimental (ver revisión de Martínez del Río, Wolf, Carleton & Gannes 2009). Una de estas asunciones indica que el consumidor debe de estar en equilibrio isotópico con su dieta. Por otro lado, en la dinámica de transferencias isotópicas, existe un efecto fisiológico llamado enrutamiento isotópico (Gannes, O'Brien & Martínez del Río 1997) en el cual los elementos dietarios y sus isótopos no son homogéneamente mezclados y dirigidos a los tejidos, sino que son selectivamente metabolizados e incorporados. En el caso de la nutrición larval, este efecto es comúnmente evitado porque debido al tamaño limitado, se utilizan organismos completos para análisis. Alternativamente, es posible trazar un elemento específico dietario (*e.g.* N) hacia un tejido-reservorio específico (músculo). Los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  presentes a niveles de abundancia natural en los organismos son frecuentemente contrastantes (Tabla 1) y permiten el diseño de experimentos para determinar la incorporación de nutrientes. Adicionalmente, la facilidad de manipular los valores isotópicos por medio de nutrientes y medios de cultivo específicos, amplía el alcance de futuros estudios sobre la fisiología y ecología nutricional de organismos acuáticos.

Tabla 1. Valores isotópicos ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) presentes a niveles de abundancia natural en diferentes tipos de alimentos vivos e inertes frecuentemente utilizados en operaciones de larvicultivo.

Organismo/alimento	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	C:N	Referencia
<b>Fitoplancton</b>				
<i>Skeletonema costatum</i>	-23.5 ± 1.1	-	-	Hinga <i>et al.</i> 1994
<i>Chaetoceros gracilis</i> <sup>a</sup>	-14.8 ± 0.0	-1.9 ± 0.1	7.8	Gamboa-Delgado 2009
<i>Tetraselmis chuii</i> <sup>a</sup>	-9.8 ± 0.1	5.7 ± 0.2	6.0	Gamboa-Delgado, no publicado
<i>Rhinomonas reticulata</i> <sup>a</sup>	-14.8 ± 0.1	6.4 ± 0.1	5.0	Gamboa-Delgado, no publicado
<i>Isochrysis galbana</i> <sup>b</sup> (T-ISO)				
Solamente aire	-21.0 ± 0.3	14.9 ± 0.4	7.1	Gamboa-Delgado <i>et al.</i> 2008
Aire + inyección CO <sub>2</sub>	-43.3 ± 0.1	16.2 ± 0.1	7.7	
<b>Zooplancton</b>				
<b>Rotíferos</b>				
<i>Brachionus calyciflorus</i> <sup>c</sup>	-27.0 ± 3.0	8.5 ± 1.2	-	Yoshioka <i>et al.</i> 1994
<i>Brachionus plicatilis</i>				
Cultivados con levadura	-23.9 ± 0.1	3.3 ± 0.2	4.2	Gamboa-Delgado <i>et al.</i> 2008
Enriquecidos (T-ISO)	-22.2 ± 0.0	4.2 ± 0.0	3.9	
<b>Artemia</b>				
Cepa Vinh-Chau, Viet Nam				
Nauplios	-16.0 ± 0.1	8.2 ± 0.0	5.3	Gamboa-Delgado <i>et al.</i> 2008
INVE-07332				
Nauplios	-19.9 ± 0.1	11.7 ± 0.1	5.5	Gamboa-Delgado 2009
Metanauplios (T-ISO)	-23.3 ± 0.2	12.5 ± 0.1	4.7	
GSL, UTAH, USA (1178) <sup>d</sup>	-15.0 ± 0.3	5.4	-	Spero <i>et al.</i> 1993
San Fco. Bay, USA (1157)	-21.4 ± 0.3	4.8	-	Spero <i>et al.</i> 1993
Cepa Macau, Brazil (1128)	-13.6 ± 0.1	9.4	-	Spero <i>et al.</i> 1993
<b>Copépodos</b>				
<i>Temora longicornis</i>	-19.1 ± 0.0	14.9 ± 0.1	-	Gentsch <i>et al.</i> 2009
<i>Calanus finmarchicus</i>	-23.4 ± 1.0	8.3 ± 1.1	-	Sato <i>et al.</i> 2002
<b>Cladóceros</b>				
<i>Daphnia magna</i> (alim. inerte)	-19.6 ± 0.5	13.6 ± 0.6	-	Power <i>et al.</i> 2003
<i>Moina micrura</i>	-30.1 ± 3.0	5.1 ± 1.0	-	Lindholm & Hessen 2007
<b>Nemátodos</b>				
<i>Panagrellus redivivus</i> <sup>e</sup>				
(harina de maíz)	-10.8	-	-	Schlechtriem <i>et al.</i> 2004
(harina de trigo)	-22.9	-	-	
<i>Metachromadora remanei</i>	-15.8	15.7	-	Moens <i>et al.</i> 2005
<b>Alimentos inertes</b>				
AgloNorse (EWOS)	-22.4 ± 0.4	8.5 ± 0.5	4.8	Gamboa-Delgado 2009
Frippak 2CD, 3CD (INVE)	-20.1 ± 0.2	9.4 ± 0.3	4.7	Gamboa-Delgado 2009
MeM (Bernaqua)	-21.4 ± 0.1	10.5 ± 0.2	3.9	Gamboa-Delgado, no publicado
Harina de pescado (Provimi 77)	-22.0 ± 0.3	10.3 ± 0.2	3.8	Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a
Proteína de soya (Supro)	-25.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1	3.5	
<b>Consumidores experimentales</b>				
<i>Solea senegalensis</i> <sup>f</sup>	-19.4 ± 0.0	14.2 ± 0.1	5.3	Gamboa-Delgado <i>et al.</i> 2008
<i>Litopenaeus vannamei</i> <sup>f</sup>	-19.7 ± 0.1	12.6 ± 0.1	5.4	Gamboa-Delgado & Le Vay 2009b

<sup>a</sup> Cultivadas con Cell-hi W (Varicon aqua). <sup>b</sup> Cultivadas con medio F/2. <sup>c</sup> Muestras en presencia de zooplancton. <sup>d</sup> Código del Artemia Reference Centre. <sup>e</sup> Valores en muestras libres de lípidos. <sup>f</sup> Recién eclosionados. Tomado de Le Vay & Gamboa-Delgado (2010).

Tabla 2. Porcentajes promedio de carbono y nitrógeno incorporados en tejido de crustáceos y peces a partir de diversas fuentes nutricionales. Valores generados por modelos de mezclado isotópico después de integrar las firmas isotópicas de organismos consumidores y sus dietas.

Estadio/ Especie	Fuente nutricional / Isótopo determinado	Contribuciones relativas al crecimiento	Referencia
Postlarvas <i>Penaeus esculentus</i>	Alimento inerte y perifiton creciendo sobre diversos sustratos artificiales, $\delta^{13}\text{C}$	47-61% Alimento inerte 39-53% Perifiton	Burford, Sellars, Arnold, Keys, Crocos & Preston 2004
Postlarvas y juveniles <i>L. vannamei</i>	Dieta formulada (50:50 N, harina de pescado: proteína de soya), $\delta^{15}\text{N}$	69-73% Harina de pescado 27-31% Proteína de soya	Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a
Filosomas <i>Panulirus japonicus</i>	<i>Artemia</i> y gónada de mejillón, $\delta^{15}\text{N}$	66% <i>Artemia</i> 34% Gónada de mejillón	Matsuda, Takenouchi, Tanaka & Watanabe 2009
Larvas y PL <i>L. vannamei</i>	Nauplios de <i>Artemia</i> y alimento inerte (50:50 C), $\delta^{13}\text{C}$	73-87% <i>Artemia</i> 13-27% Alimento inerte	Gamboa-Delgado & Le Vay 2009b
Larvas <i>Cyprinus carpio</i>	Materia libre de lípidos de nematodos, $\delta^{13}\text{C}$	35-45% del material libre de lípidos inicial fue asimilado*	Schlechtriem, Focken & Becker 2004
Larvas <i>Awaous guamensis</i>	Material vegetal fluvial, microalgas y fuentes nutricionales marinas, Dual: $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$	50% Fuentes nutricionales marinas 34% Microalgas fluviales 16% Material vegetal fluvial	Hobson, Smith & Sorensen 2006
Larvas <i>Piaractus mesopotamicus</i>	Nauplios de <i>Artemia</i> y alimento inerte, $\delta^{15}\text{N}$	60% <i>Artemia</i> 40% A. inerte (36 DPE**) 15% <i>Artemia</i> 85% A. inerte (42 DPE)	Jomori, Ducatti, Carneiro & Portella 2008
Postlarvas <i>Solea senegalensis</i>	Nauplios de <i>Artemia</i> y alimento inerte (70:30 en peso seco), $\delta^{13}\text{C}$	85-90 % <i>Artemia</i> 10-15 % Alimento inerte (23 DPE)	Gamboa-Delgado, Cañavate, Zerolo & Le Vay 2008

\* 6 días después de alimentar. Factor de discriminación isotópica asumido = 2

\*\* Días posteriores a eclosión. Tomado de Le Vay & Gamboa-Delgado (2010).

Dentro de la nutrición larval, existe un esfuerzo constante para desarrollar y mejorar alimentos inertes que puedan ser usados a mayores niveles de reemplazo del alimento vivo, y a pesar de que este último presenta claras ventajas como buena disponibilidad en la columna de agua, alta digestibilidad y viabilidad de bioenriquecimiento, su producción es onerosa y provee un vector para la introducción de organismos patógenos hacia los sistemas de cultivo (Southgate & Partridge, 1998). En este contexto, se prevé

un aumento en la aplicación de tales técnicas en estudios de nutrición larval debido a la alta sensibilidad del uso de los isótopos estables, con los cuales ha sido posible estimar tasas de ingestión y asimilación tan bajas como 2.5 ng de C por individuo por hora en organismos zoopláctónicos (Verschoor, Boonstra & Meijer, 2005).

### **Crecimiento y tasas de recambio de nutrientes**

Los isótopos estables pueden ser utilizados para estimar la tasa de recambio metabólica de diversos elementos. En el caso del N, estos pueden ser aplicados como indicadores confiables de la tasa de recambio de la proteína, en particular en tejido muscular. El metabolismo de las proteínas ha sido ampliamente estudiado como un medio para entender y mejorar el proceso de crecimiento en animales acuáticos (Carter Owen, He, Watt, Scrimgeour, Houlihan & Rennie 1994). La tasa de recambio proteico ha sido determinada en varias especies de peces y crustáceos (ver revisiones de Houlihan, Carter & McCarthy 1995; Fraser & Rogers 2007). Tales determinaciones se efectúan frecuentemente mediante el método de la dosis inundante utilizando isótopos radioactivos (lisina marcada con  $^{14}\text{C}$  o fenilalanina marcada con  $^3\text{H}$ ) los cuales son incorporados a través de inyecciones o infusión constante (Garlick, McNurlan & Preedy 1980; Houlihan, Hall, Gray & Noble 1988). Ambos métodos tienen como objetivo el envío de trazadores radio-marcados hacia la reserva fisiológica de aminoácidos libres para posteriormente trazar su destino. El metabolismo de las proteínas también ha sido evaluado utilizando trazadores a base de isótopos estables como una alternativa a los isótopos radioactivos. Estudios sobre síntesis proteica realizados en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) han demostrado que los resultados obtenidos utilizando compuestos enriquecidos con isótopos estables son similares a aquellos generados mediante el uso de aminoácidos radio-marcados (Houlihan *et al.* 1995). Conceição, Skjermo, Skjåk-Bræk & Verreth (2001) extendieron las técnicas isotópicas a larvas de rodaballo (*Psetta maxima*) utilizando rotíferos marcados con  $^{15}\text{N}$  para determinar los efectos de un inmunoestimulante sobre la tasa de síntesis proteica. La tasa de incorporación de un nutriente (en un tejido específico u organismo completo) también puede ser estimada mediante la medición de cambios en los perfiles isotópicos que ocurren después de aplicar un cambio dietario al consumidor y durante periodos de

tiempo mayores (Pearson, Levey, Greenberg & Martínez del Rio 2003). De esta forma, se obtiene un indicador adicional del desempeño nutricional debido a que los tejidos de animales que exhiben crecimiento rápido muestran tiempos medios cortos de permanencia en tejido ( $t_{50}$ ) para C y N al compararlos con animales de crecimiento lento (MacAvoy, Macko & Arneson 2005). Utilizando isótopos estables se ha determinado que los valores  $t_{50}$  para C y N en tejido son comúnmente cortos para los estadios de vida tempranos en peces (2.8 a 5.2 d) (Van der Zanden, Hulshof, Ridgway & Rasmussen 1998; Herzka & Holt 2000; Bosley, Witting, Chambers & Wainright 2002; Gamboa-Delgado *et al.* 2008) y crustáceos (1.2 a 4.9 d) (Fry & Arnold 1982; Al-Maslamani 2006; Gamboa-Delgado & Le Vay 2009b). Esto es consecuencia de las altas tasas de crecimiento características de las etapas de vida tempranas y, por lo tanto, los rápidos cambios observados en los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  se deben principalmente al crecimiento tisular y no a las tasas de recambio metabólico en tejido. Tal observación es la opuesta en organismos adultos o en aquellos que exhiben crecimiento limitado o nulo. Modelos exponenciales que integran cambios isotópicos con tiempo (o incrementos de biomasa) son frecuentemente usados para estimar las tasas de recambio metabólicas (Fry & Arnold 1982; Hesslein, Hallard & Ramlal 1993). El modelo inicialmente aplicado por Hesslein *et al.* (1993) para determinar cambios isotópicos en tejido larval de pez blanco (*Coregonus nasus*) ofrece la ventaja de distinguir el cambio isotópico que es debido a la tasa de recambio metabólico ( $m$ ) de aquel que es debido al efecto de dilución isotópica por crecimiento ( $k$ ). Las tasas de recambio metabólico son fuertemente influenciadas por diversas condiciones nutricionales. Por lo tanto, la estimación de las tasas metabólicas de recambio en los tejidos, puede proveer un indicador adicional del desempeño nutricional de una dieta o régimen de alimentación específico.

### **Factores de discriminación isotópica**

Los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los animales reflejan las firmas isotópicas de sus respectivas dietas más un factor de enriquecimiento trófico (factor de discriminación isotópica,  $\Delta = \delta_{\text{tejido}} - \delta_{\text{dieta}}$ ) causado por los diferentes isótopos de un mismo elemento siendo incorporados en los tejidos a diferentes tasas (Martínez del Rio & Wolf 2005). Tales factores de discriminación varían de acuerdo al tejido o elemento estudiado. Los

isótopos de C muestran discriminación isotópica debido a la pérdida de  $^{12}\text{CO}_2$  durante la respiración, mientras que los isótopos pesados ( $^{13}\text{C}$ ) tienden a ser retenidos durante la biosíntesis de los diversos tejidos (DeNiro & Epstein 1981; Tieszen, Boutton, Tesdahl & Slade 1983). En el caso del N, los valores  $\Delta^{15}\text{N}$  aparentemente son el resultado de una excreción selectiva de  $^{14}\text{N}$ , mientras que el  $^{15}\text{N}$  es retenido en cada paso metabólico (Minagawa & Wada 1984). En nutrición animal, las relaciones entre la discriminación isotópica del N y otros factores (suministro y calidad de la proteína dietaria) aún permanecen poco entendidas (Robbins, Felicetti & Sponheimer 2005). A pesar de que existen promedios aceptados de enriquecimiento isotópico en cada eslabón trófico (+1 y +3‰ para  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , respectivamente) existe una creciente cantidad de estudios evidenciando que los factores de discriminación isotópica son específicos para diversas especies y tejidos (DeNiro & Epstein 1981; Yokoyama, Tamaki, Harada, Shimoda, Koyama & Ishihi 2005; Stenroth, Holmqvist, Nyström, Berglund, Larsson & Granéli 2006) y estos pueden también variar durante la ontogenia de los organismos acuáticos debido a cambios metabólicos (Hentschel 1998; Rossi, Herman & Middelburg 2004), que incluso pueden causar factores de discriminación negativos. Estas considerables variaciones en los valores de enriquecimiento isotópico, muestran que debe realizarse una validación cuidadosa de las asunciones asociadas a la interpretación de datos generados a partir de estudios nutricionales (Cabana & Rasmussen 1996; Crawley, Hyndes & Vanderklift 2007).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  presentes a niveles de abundancia natural en diferentes alimentos vivos e inertes para posteriormente trazar nutrientes contribuidos durante el crecimiento de larvas y postlarvas de lenguado de Senegal (*Solea senegalensis*) y camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Adicionalmente, se estimó la contribución nutricional de aislado de proteína de soya al utilizarlo en el reemplazo de harina de pescado en dietas prácticas suministradas a postlarvas tardías y juveniles de camarón. Las tasas de recambio metabólico elemental fueron estimadas a partir de un modelo de cambio isotópico. Se presenta una discusión sobre las aplicaciones actuales de las técnicas isotópicas en nutrición acuícola, así como su potencial futuro en la determinación del origen y destino de nutrientes específicos y de sus respectivas unidades monoméricas.



## Material y métodos

### Animales experimentales

Reproductores de camarón blanco (*L. vannamei*) fueron obtenidos de granjas comerciales y acondicionados en la Escuela de Ciencias Oceánicas de la Universidad de Bangor (Gales, GB). Los animales se mantuvieron en un tanque de fibra de vidrio de 4 m de diámetro y 1 m de profundidad conectado a un sistema de recirculación conformado por filtros mecánicos (50 y 5  $\mu\text{m}$ ), biológicos de vórtice, UV y un fraccionador de proteína. Los camarones fueron nutricionalmente acondicionados mediante 3 a 4 raciones diarias de diversos alimentos marinos frescos y las hembras fueron unilateralmente ablacionadas y marcadas con anillos de identificación para aves. Nauplios eclosionados fueron foto-tácticamente seleccionados. Un protocolo estándar de larvicultivo incluyó microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis* spp y *Rhinomonas* spp (100-120 cel  $\mu\text{l}^{-1}$ ). Las fases mysis se alimentaron con nauplios de *Artemia* (1-8 ind  $\text{ml}^{-1}$ ) y tres dietas larvales que fueron suministradas en tres diferentes tamaños de partícula [Frippak 1CAR (5-30  $\mu\text{m}$ ), 2CD (30-90  $\mu\text{m}$ ) y 3CD (80-150  $\mu\text{m}$ ), INVE Technologies, Bélgica]. Este protocolo fue modificado para realizar un experimento larval de co-alimentación descrito adelante. Postlarvas tempranas fueron gradualmente transferidas desde las dietas larvales a una sola dieta inerte (Bernaqua MeM) suministrada como alimento único para establecer valores  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  basales antes del inicio de los respectivos experimentos. Un lote de 40 reproductores de lenguado de Senegal (*Solea senegalensis*) de origen silvestre fue mantenido bajo condiciones naturales de iluminación y temperatura en el Centro de Investigación Pesquera y Agraria “El Toruño” (Cádiz, España). Los reproductores fueron alimentados con dietas naturales de origen marino y los huevecillos desovados se colectaron por flujo suave para ser incubados en tanques cilindro-cónicos de 300 l con 50% de recambio de agua filtrada  $\text{h}^{-1}$ . 2 días después de la eclosión (DPE), las larvas fueron transferidas a tanques experimentales de cultivo (300 l) a una densidad inicial de 50 ind  $\text{l}^{-1}$ .

## Diseño experimental

Antes del desarrollo de los experimentos, los valores isotópicos de C y N de diversos alimentos vivos e inertes fueron analizados (Fig. 1) con el objetivo de diseñar experimentos en los cuales los elementos nutricionales mostraran valores isotópicos contrastantes. Los bioensayos fueron realizados en acuarios conectados a sistemas de recirculación, con la excepción del experimento larval en camarón, el cual se realizó en matraces redondos sumergidos en un baño temperado. Unidades triplicadas se asignaron por cada tratamiento nutricional aplicado. Las raciones alimenticias se suplieron de 3 a 5 veces por día. Cada 3 o 5 días (dependiendo del tamaño corporal y la tasa de crecimiento), individuos fueron aleatoriamente muestreados y ayunados por 24 h (6 h para larvas de camarón) para reducir el alimento presente en el tracto digestivo.

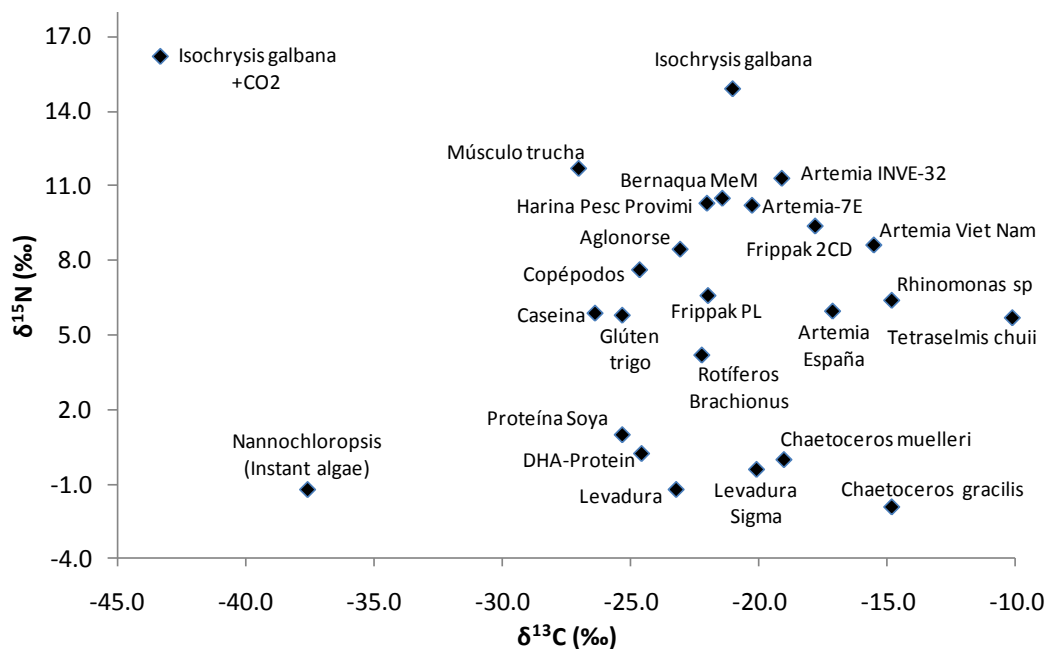


Fig. 1. Valores isotópicos de carbono y nitrógeno ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) determinados en diversos ingredientes, alimentos larvales inertes, fitoplancton y zooplancton producidos bajo diferentes métodos. (Gamboa-Delgado 2009).

Los animales fueron sacrificados en una mezcla de agua-hielo y la longitud total y peso húmedo determinados. Muestras de ingredientes dietarios y tejido muscular u organismos completos fueron enjuagadas con agua destilada y congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se efectuó el pre-tratamiento. El experimento 1 (Tabla 3) fue diseñado para

investigar el uso potencial de diferentes valores isotópicos ( $\delta^{15}\text{N}$ ) presentes en componentes dietarios de origen vegetal y marino, los cuales fueron incluidos en dietas formuladas para posteriormente utilizarlos en la estimación de la utilización biológica relativa de la proteína. *L. vannamei* fue usado como organismo modelo en dos experimentos: etapa postlarval ( $2.0 \pm 0.6$  mg) y juvenil ( $414 \pm 11$  mg).

Tabla 3. Composición nutricional ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$  dieta en peso seco) e isotópica ( $\delta^{15}\text{N}$ ) de ocho dietas prácticas experimentales suministradas a camarón *L. vannamei*.

Ingrediente/Dieta	Nivel de Proteína 46 %				Nivel de Proteína 23 %			
	100F	50F:50S	10F:90S	100S	100F	50F:50S	10F:90S	100S
Harina pescado (F)	65	33	6	0	33	17	3	0
Proteína soya (S)	0	22	41	44	0	11	21	22
Almidón de trigo	12	21	28	30	41	45	49	49
Kaolina	0	0	0	0	0	1	1	2
Aceite pescado	8	9	10	10	11	11	11	11
Mezcla mineral <sup>a</sup>	8	8	8	8	8	8	8	8
Mezcla vit. <sup>b</sup>	2	2	2	2	2	2	2	2
Lecitina	1	1	1	1	1	1	1	1
Colesterol	1	1	1	1	1	1	1	1
Oxido crómico	1	1	1	1	1	1	1	1
Hidrolizado pesc.	0	0	0	1	0	0	0	1
CMC <sup>c</sup>	2	2	2	2	2	2	2	2
Proteína (%)	46.9	46.3	46.4	45.2	24.2	23.3	23.2	23.0
E (KJ/gr)	15.4	15.5	15.6	15.8	15.1	14.8	14.8	14.6
Valor isotópico								
$\delta^{15}\text{N}$ (‰) <sup>d</sup>	11.4	7.3	2.5	0.8	11.0	6.7	1.7	0.3
N suministrado por								
F : S (%) <sup>e</sup>	100:0	51:49	11:89	0:100	100:0	50:50	9:91	0:100

<sup>a</sup> Mezcla mineral (g/kg): Monofosfato de potasio, 20; fosfato dicálcico, 25; sulfato de magnesio, 25; monofosfato de sodio, 10.

<sup>b</sup> Mezcla Vitamínica (mg/kg): Niacina, 200; ácido p-aminobenzoico, 100; ácido fólico, 10; biotina, 1; inositol, 400; ácido nicotínico, 400; Ca-pantotenato, 75; piridoxina-HCl, 50; riboflavina, 40; tiamina-HCl, 60; cloruro de colina, 500; cianocobalamina, 0.2; ascorbil palmitato, 1000; alfa tocoferol, 200; vitamina A, 2; calciferol, 0.1; menadiona, 100.

<sup>c</sup> Carboximetil celulosa. <sup>d</sup> Después de la extracción de lípidos.

<sup>e</sup> FM: Harina de pescado (Provimi 77), SPI: Aislado de proteína de soya (SUPRO).

Tomado de Gamboa-Delgado & Le Vay (2009a).

Ocho dietas experimentales isoenergéticas e isonitrogénicas a cada uno de dos niveles de proteína (46 y 23%) fueron otorgadas. Las dietas fueron formuladas solamente con harina de pescado o aislado de soya como únicas fuentes de proteína y también en proporciones respectivas 50:50 y 10:90 en base al contenido de N. En el experimento 2, se evaluó la contribución de dos fuentes nutricionales al crecimiento de larvas y

postlarvas de camarón *L. vannamei* mediante análisis isotópicos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) realizados a los camarones, nauplios de *Artemia* y dietas inertes suministradas en regímenes de co-alimentación. Los nauplios de *Artemia* y las dietas inertes presentaron valores  $\delta^{13}\text{C}$  significativamente diferentes y contenidos elementales de C similares (Tabla 4). Ambos elementos fueron suministrados como dietas individuales y también en regímenes de co-alimentación para reemplazar 25, 50 y 75% de la *Artemia* con una dieta inerte y en una base de C orgánico disponible, de tal manera que todos los regímenes alimenticios suministraron cantidades diarias similares de C dietario.

Tabla 4. Regímenes experimentales de alimentación larval utilizados para estimar contribuciones nutricionales a partir de dietas inertes y nauplios de *Artemia* co-alimentados a estadios mysis y postlarvas tempranas de *L. vannamei*.

Estadio/Alimento	100A	75A-25I	50A-50I	25A-75I	100I
Zoea 1-3					
<i>C. gracilis</i> (cel ul <sup>-1</sup> )	130-150	130-150	130-150	130-150	130-150
M 1					
<i>Artemia</i> (ind ml <sup>-1</sup> )	4.0(6.0)	3.0(4.5)	2.0(3.0)	1.0(1.5)	-
Dieta inerte <sup>a</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	-	2.0(1.7)	4.0(3.4)	6.0(5.1)	8.0(6.9)
M 2					
<i>Artemia</i>	6.0(9.0)	4.5(6.8)	3.0(4.5)	1.5(2.3)	-
Dieta inerte <sup>a</sup>	-	3.0(2.6)	6.0(5.1)	9.0(7.7)	12.0(10.3)
M 3					
<i>Artemia</i>	8.0(12.0)	6.0(9.0)	4.0(6.0)	2.0(3.0)	-
Dieta inerte <sup>a</sup>	-	4.0(3.4)	8.0(6.9)	12.0(10.3)	16.0(13.7)
PL 1-3					
<i>Artemia</i>	10.0(15.0)	7.5(11.3)	5.0(7.5)	2.5(3.8)	-
Dieta inerte <sup>b</sup>	-	5.0(4.3)	10.0(8.6)	14.0(12.0)	18.0(15.4)
PL 4-5					
<i>Artemia</i>	11.0(16.5)	8.5(12.8)	5.5(8.3)	2.7(4.1)	-
Dieta inerte <sup>b</sup>	-	5.5(4.7)	11.0(9.4)	15.4(13.2)	19.8(17.0)

El suministro total de carbono dietario estimado a partir de ambas fuentes nutricionales se indica en paréntesis (mg C d<sup>-1</sup>). <sup>a</sup>Frippak 2CD, <sup>b</sup>Frippak 3CD (INVE Technologies). Tomado de Gamboa-Delgado & Le Vay (2009b).

La influencia isotópica de los nutrientes de origen materno fue monitoreada en larvas recientemente eclosionadas. El experimento 3 fue efectuado en larvas y postlarvas de lenguado de Senegal (*Solea senegalensis*) y tuvo el mismo objetivo que el experimento realizado en larvas de camarón (estimación de las contribuciones nutricionales usando valores  $\delta^{13}\text{C}$ ). Las larvas fueron cultivadas con cuatro diferentes regímenes de

alimentación larval (Tabla 5): 100% alimento vivo (rotíferos y *Artemia*), 100% alimento inerte y dos regímenes de co-alimentación utilizando ambas fuentes nutricionales en proporciones respectivas de peso seco de 70:30 y 30:70.

Tabla 5. Regímenes de alimentación experimentales usados en el cultivo larvario de *Solea senegalensis* para estimar contribuciones nutricionales a partir de *Artemia* (A) y una dieta inerte (DI). T-ISO= *Isochrysis galbana* cepa Tahitiana.

DPE	T-ISO (cels ul <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Rotíferos (ind ml <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	<i>Artemia</i> (ind ml <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Dieta inerte (mg l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
<i>Artemia</i>				
2-6	100	10	-	-
7-9	100	15	1.8	-
10-12	-	-	4.5	-
13-17	-	-	6.5	-
18-23	-	-	7.5	-
70A-30DI				
2-6	100	10	-	-
7-9	100	15	1	1.5
10-12	-	-	3	3
13-17	-	-	4	5
18-23	-	-	5	5
30A-70DI				
2-6	100	10	-	-
7-9	100	9.7	0.7	5.1
10-12	-	-	0.7	7.8
13-17	-	-	1.4	9.3
18-23	-	-	2.2	9.3
Dieta Inerte*				
2-6	100	10	-	-
7-9	-	-	-	8.4
10-12	-	-	-	9.4
13-17	-	-	-	13.4
18-23	-	-	-	13.4

DPE= Días posteriores a la eclosión.

### Análisis elementales e isotópicos

Muestras de los diversos componentes nutricionales, dietas y organismos consumidores (completos y/o tejido muscular) fueron molidas y secadas (60 °C, 24 h). Sub-muestras

de 0.9 a 1.1 mg fueron empacadas en micro-contenedores de estaño para su posterior análisis elemental e isotópico dual ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) a niveles de abundancia natural. Las muestras se analizaron en el Departamento de Ciencias de las Plantas de la Universidad de California (Davis, CA, USA) y se procesaron utilizando un analizador elemental PDZ Europa Scientific Roboprep acoplado a un espectrómetro de masas de proporciones isotópicas PDZ Europa Hydra 20/20 (Crewe, GB). Los valores isotópicos de las muestras experimentales fueron expresados en notación delta ( $\delta$ ), la cual está definida como desviaciones a partir de valores isotópicos establecidos por dos materiales estándares de referencia (Belemnita Pee Dee y N atmosférico). La notación delta se establece como:  $\delta^{\text{H}}\text{X} = (\text{R}_{\text{muestra}}/\text{R}_{\text{estandar}} - 1) * 1000$  donde X es C ó N, el superíndice H indica la masa del isótopo pesado para ese elemento y  $\text{R} = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$  ó  ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ . Cada 12 mediciones, dos muestras de validación fueron analizadas para asegurar consistencia y precisión. En el presente estudio, el término “factor de discriminación isotópica” ( $\Delta^{\text{H}}\text{X}$ ) fue utilizado de acuerdo a Pearson *et al.* (2003) y Cherel, Hobson & Hassani (2005) para definir las diferencias en valores isotópicos observadas entre consumidores (o sus tejidos específicos) y sus dietas respectivas después de alcanzar equilibrio isotópico.

### **Estimación de las contribuciones nutricionales al crecimiento**

Las contribuciones proporcionales de C y N dietario al crecimiento (corporal y muscular) de *L. vannamei* y *S. senegalensis* fueron estimadas utilizando un modelo de mezclado isotópico para dos fuentes nutricionales y un isótopo (Phillips & Gregg 2001). El modelo considera las diferencias isotópicas entre las fuentes dietarias y el

consumidor (en este estudio, peces completos, larvas de camarón completas o tejido muscular), el tamaño de las muestras y la variabilidad isotópica. Los valores isotópicos finales observados entre dietas y animales alimentados exclusivamente con dietas puras (incluyendo un solo ingrediente principal, i.e. solo harina de pescado, solo *Artemia* o dieta inerte) fueron tomados como valores isotópicos de referencia y usados como controles positivos y negativos para corregir los factores de discriminación isotópica en el modelo de mezclado. Los valores isotópicos determinados en animales alimentados con dietas o regímenes combinados fueron introducidos en el modelo de mezclado isotópico a fin de estimar la incorporación relativa de nutrientes y sus intervalos de confianza al 95% (truncados). Los contenidos de C y N en los diferentes componentes dietarios pueden variar significativamente, por lo tanto, en caso necesario y con el objetivo de corregir la cantidad total de C o N contribuida por cada elemento dietario, la ecuación para ajuste de contribución elemental propuesta por Fry (2006) fue utilizada.

### **Tasas de recambio de carbono y nitrógeno en tejido muscular**

Los cambios de valores isotópicos observados en tejido animal pueden deberse al crecimiento y/o a la tasa de recambio metabólica. A fin de discernir estos dos factores y obtener un valor estimado de la tasa de recambio de nutrientes, las tasas de recambio de C y N y su efecto sobre los cambios isotópicos fueron evaluadas por medio de la determinación de los valores isotópicos en tejido a diferentes tiempos y después de un cambio dietario controlado. Los valores isotópicos obtenidos fueron incorporados en un modelo exponencial (Hesslein *et al.* 1993) que integra los factores crecimiento y cambio isotópico en el tiempo. Los coeficientes de la ecuación del modelo indican la magnitud

del cambio isotópico en relación al crecimiento y la tasa de recambio metabólica. Estos dos parámetros pueden ser utilizados para obtener una estimación del tiempo medio necesario para que un organismo alcance equilibrio isotópico después de consumir una nueva dieta (tiempo medio para reemplazo elemental en tejido,  $t_{50}$ ) (MacAvoy, Arneson & Bassett 2006).

### **Análisis estadístico**

Los contenidos elementales de C y N y los valores isotópicos presentes en los elementos dietarios experimentales fueron comparados utilizando pruebas  $t$  de Student antes de su inclusión en los modelos de mezclado isotópico. Los datos expresados en porcentaje fueron transformados mediante conversiones arco-seno. Crecimiento, valores isotópicos en tejido y factores de discriminación isotópica fueron analizados mediante pruebas ANOVA de una vía. Pruebas de Levene y Lilliefors fueron empleadas para verificar homoscedasticidad y distribución normal de datos, respectivamente. En caso de detección de diferencias significativas, se aplicaron comparaciones múltiples Tukey para detectar tratamientos con diferencias significativas. Pruebas de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ) fueron aplicadas con el objetivo de determinar diferencias significativas entre las proporciones de C y N esperadas (en base a las proporciones conocidas de ingredientes en las dietas y alimentos incluidos en regímenes de alimentación) y las observadas en los tejidos de los consumidores. Las pruebas fueron efectuadas usando el paquete computacional SPSS 12.0 (SPSS Inc., USA) a un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .



## Resultados y discusión

### Experimento 1: Contribución nutricional de harina de pescado y proteína de soya al crecimiento de postlarvas y juveniles de *L. vannamei*

No se detectaron diferencias significativas en la supervivencia, mientras que el crecimiento fue menor en camarones alimentados con dietas formuladas solo con aislado de proteína. Las dietas mezcladas conteniendo proporciones altas de soya promovieron un crecimiento equivalente al alcanzado en animales alimentados con una dieta control comercial y con las dietas experimentales conteniendo 100% harina de pescado (Tabla 6). Los contrastantes valores isotópicos ( $\delta^{15}\text{N}$ ) determinados en la harina de pescado y en el aislado de proteína de soya (Tabla 3), así como una rápida influencia isotópica de las dietas sobre el tejido muscular de los animales (Fig. 2) permitieron integrar los valores isotópicos dietarios y tisulares finales en un modelo de mezclado isotópico.

Tabla 6. Supervivencia, peso seco individual y longitud total de postlarvas de *L. vannamei* alimentadas con dietas experimentales basadas en harina de pescado (FM) y aislado de proteína de soya (SPI). (Promedios  $\pm$  DE).

Dieta	Supervivencia (%)	Peso seco final (mg)	Longitud total (mm)	Ganancia peso (%)
46 % proteína				
100 FM	95.5 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	14.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	12.6 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	4187 <sup>a</sup>
50:50 FM-SPI	84.7 $\pm$ 15.0 <sup>a</sup>	12.7 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	12.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	3557 <sup>ab</sup>
10:90 FM-SPI	91.0 $\pm$ 9.1 <sup>a</sup>	13.3 $\pm$ 4.5 <sup>ab</sup>	12.2 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	3730 <sup>ab</sup>
100 SPI	93.8 $\pm$ 6.6 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 1.2 <sup>cd</sup>	10.4 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	1858 <sup>cd</sup>
23 % proteína				
100 FM	95.0 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>	9.6 $\pm$ 1.0 <sup>bcd</sup>	11.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	2707 <sup>bcd</sup>
50:50 FM-SPI	86.2 $\pm$ 23.1 <sup>a</sup>	14.3 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	11.5 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	4024 <sup>ab</sup>
10:90 FM-SPI	90.8 $\pm$ 13.7 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 1.0 <sup>abc</sup>	11.1 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	3127 <sup>abc</sup>
100 SPI	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	6.1 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>	10.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	1708 <sup>d</sup>
Dieta control	87.7 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	14.5 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	11.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	4070 <sup>ab</sup>

\* Superíndices diferentes indican diferencias significativas a un nivel de  $P < 0.05$

<sup>s</sup> FM: Harina de pescado, SPI: Aislado de proteína de soya  
Tomado de Gamboa-Delgado & Le Vay (2009a).

s).

Los camarones alimentados con dietas isotópicamente similares a la dieta basal se equilibraron isotópicamente en tan solo 9 días, mientras que 14 días fueron necesarios para que los camarones alimentados con dietas formuladas solo con proteína de soya (la cual mostró valores más contrastantes a aquellos de la dieta basal) obtuvieran un equilibrio isotópico. Cambios isotópicos rápidos en tejido de camarones peneidos han sido previamente reportados (Fry & Arnold 1982; Al Maslamani 2006) y tal efecto promueve rápidos equilibrios isotópicos entre las dietas y los camarones (15 a 20 días). La estimación de las contribuciones nutricionales de ambos elementos al crecimiento de postlarvas y juveniles de camarón *L. vannamei* fue posteriormente calculada (Tabla 7). El aporte de N desde el aislado de proteína de soya al tejido muscular en las dietas conteniendo 90 y 50% de N de esta fuente, fue significativamente menor al indicado por las proporciones dietarias iniciales, en contraste, el suministro de N a partir de la harina de pescado fue significativamente mayor. Tales diferencias no pueden ser atribuidas a diferentes coeficientes de digestibilidad, ya que para los camarones el aislado de proteína de soya presenta una digestibilidad mayor (96%) que la harina de soya (81%) (Akiyama 1989). La baja retención de N dietario proveído por el aislado de soya posiblemente refleja un desbalance nutricional en aminoácidos, en particular metionina y lisina, los cuales son considerados limitantes para camarones alimentados con dietas conteniendo altos niveles de derivados de soya (Shewbart, Meis & Ludwig 1972; Forster, Dominy & Tacon 2002; Alam, Teshima, Koshio, Ishikawa, Hernández, Uyan & Michael 2005). En el presente experimento, el crecimiento y la supervivencia en camarones postlarvales y juveniles alimentados con las dietas conteniendo 90% de aislado de proteína de soya y 10% de harina de pescado, fueron equivalentes a los valores alcanzados con la dieta comercial de referencia y con aquellas con mayor

contenido de harina de pescado. Este efecto se mantuvo incluso al nivel de 23% de proteína cruda. Tales resultados enfatizan el uso potencial de las proteínas vegetales en dietas para camarón formuladas con niveles muy bajos de harina de pescado, la cual puede contribuir de una forma desproporcionada (en relación a las formulaciones dietarias) al tejido muscular, soportando de esta forma un crecimiento normal. Las tasas de recambio metabólico para el N, así como sus tiempos medios de permanencia en tejido muscular también fueron evaluados y se mantuvieron en un rango de 2.8 a 4.8 días, observándose diferencias significativas entre tratamientos. Las contribuciones nutricionales de la harina de pescado al crecimiento del camarón en ambas edades/tamaños y a ambos niveles de proteína (Tabla 7) fueron significativamente mayores que las proporciones establecidas en las dietas formuladas (Tabla 3).

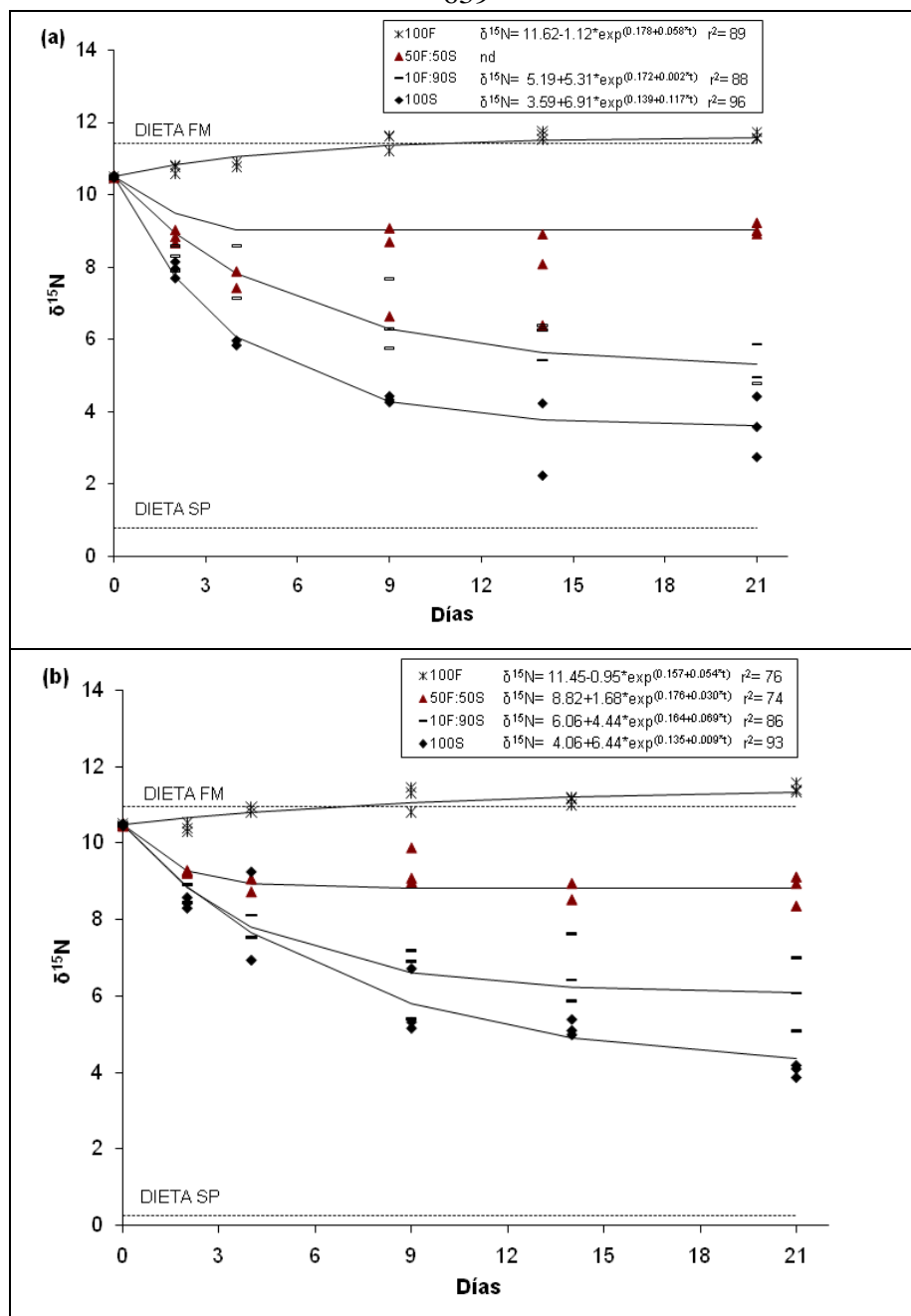


Fig. 2. Influencia dietaria sobre los valores isotópicos de nitrógeno ( $\delta^{15}N$ , ‰) en tejido de camarones postlarvales alimentados con diversas dietas formuladas a base de harina de pescado (FM) y/o aislado de proteína de soya (SPI) a niveles de proteína cruda de 46% (a) y 23% (b).

Las ecuaciones representan valores predichos por el modelo de Hesslein *et al.* (1993) y muestran el mejor ajuste a datos observados (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a).

Tabla 7. Proporciones estimadas de nitrógeno dietario derivado de harina de pescado (FM) y/o aislado de proteína de soya (SPI) e incorporadas al tejido muscular de *L. vannamei* (Promedio  $\pm$ Intervalos de confianza, n= 9).

Dieta/Ingrediente	Contribución de nitrógeno dietario			
	Esperada	Observada		
Postlarvas		min.	promedio	max.
<b>46 % Proteína</b>				
50-50 FM	50.6 <sup>a</sup>	61.0	69.2 <sup>b</sup>	77.4
SPI	49.4	22.6	30.8	39.0
10-90 FM	10.5 <sup>a</sup>	25.2	31.6 <sup>b</sup>	38.0
SPI	89.5	62.0	68.4	74.8
<b>23 % Proteína</b>				
50-50 FM	49.9 <sup>a</sup>	62.7	70.8 <sup>b</sup>	78.9
SPI	50.1	21.1	29.2	37.3
10-90 FM	9.2 <sup>a</sup>	11.6	18.6 <sup>b</sup>	25.6
SPI	90.8	74.4	81.4	88.4
<b>Juveniles</b>				
<b>46 % Proteína</b>				
50-50 FM	50.6 <sup>a</sup>	57.0	72.7 <sup>b</sup>	88.4
SPI	49.4	11.6	27.3	43.0
10-90 FM	10.5		nd	
SPI	89.5			
<b>23 % Proteína</b>				
50-50 FM	49.9 <sup>a</sup>	67.8	82.0 <sup>b</sup>	96.2
SPI	50.1	3.8	18.0	32.2
10-90 FM	9.2 <sup>a</sup>	1.4	17.9 <sup>b</sup>	34.4
SPI	90.8	65.6	82.1	98.6

\*Superíndices indican diferencias significativas entre valores promedio Postlarvas alimentadas con las dietas conteniendo un nivel de proteína del 46% y con una proporción 50:50 de N ambos ingredientes, incorporaron 69% de N a partir de la harina de pescado, mientras que en animales alimentados con la dieta conteniendo 10% de N de harina de pescado, la incorporación de este ingrediente fue de 32%. Los camarones juveniles alimentados con la dieta 50:50, incorporaron 73% de N a partir de la harina de pescado y 27% de N a partir de la harina de soya. Los resultados obtenidos sugieren una desproporcionada contribución de la harina de pescado al crecimiento, lo

cual resalta la alta calidad nutricional de la harina de pescado para los camarones peneidos. Sin embargo, las contribuciones nutricionales del aislado de proteína de soya al crecimiento también fueron altas, indicando la aptitud nutricional de este ingrediente para sustituir niveles altos de harina de pescado en dietas para camarón.

La creciente demanda por alimentos acuícolas, sumada a los elevados costos de los ingredientes de origen marino, ha acentuado la necesidad de evaluar ingredientes alternativos y preferentemente de origen local. Avances recientes en diversas tecnologías de procesado han suministrado una serie de ingredientes con una calidad nutricional mejorada para organismos marinos (Gouveia & Davies, 2000). Las nuevas tecnologías de procesado y la adición de suplementos nutricionales permiten anticipar un aumento en el uso de proteínas vegetales como ingredientes acuícolas. Estos nuevos ingredientes de origen vegetal (harinas, aceites y aislados de proteína) muestran valores  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  notablemente contrastantes al ser comparados con ingredientes de origen marino. Adicionalmente, existe un patrón isotópico de variación consistente entre aminoácidos derivados de plantas y que son esenciales para animales, lo cual sugiere que estos aminoácidos pueden ser utilizados como biomarcadores para trazar proteína de origen vegetal (O'Brien, Boggs & Fogel 2005). Tales características no solamente resaltan el potencial de las proteínas de origen vegetal para reemplazar las harinas de pescado, sino que también indican una sobresaliente aptitud para realizar evaluaciones nutricionales utilizando sus valores isotópicos a niveles de abundancia natural.

**Experimento 2: Contribución nutricional de *Artemia* y dietas inertes al crecimiento de mysis y postlarvas de *L. vannamei***

La tasa de supervivencia fue significativamente mayor en camarones co-alimentados que en aquellos alimentados exclusivamente con *Artemia* o alimento inerte. No hubo diferencias significativas en el crecimiento entre animales alimentados solo con *Artemia* y aquellos co-alimentados, aunque la variabilidad en ganancia de peso fue alta (Tabla 8). Crecimiento y supervivencia fueron menores en camarones alimentados solo con alimento inerte, alcanzando solamente el estadio postlarval 1 (PL-1) al final del experimento (8 d). En contraste, los camarones en el resto de tratamientos alcanzaron estadios PL 4-5. La mayor supervivencia observada en mysis y postlarvas co-alimentadas, al compararla con animales alimentados solo a base de *Artemia*, es consistente con observaciones que reportan beneficios nutricionales al complementar el

Tabla 8. Supervivencia, peso promedio individual final ( $\mu\text{g C}$ ) y metamorfosis de *L. vannamei* cultivado con cinco regímenes de alimentación desde estadio M1 hasta PL 1-5 (n= 15, promedio  $\pm$ DE).

Régimen alimenticio	Supervivencia (%)	Peso final ( $\mu\text{g C}$ )	Metamorfosis a PL 1 (%)	Incremento de peso (%)
100A	69.2 $\pm$ 9.6 <sup>c</sup>	101 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1118
75A/25I	99.3 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	93 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	918
50A/50I	89.4 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>	86 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	97 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	951
25A/75I	87.3 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>	72 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	43 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	799
100I	35.1 $\pm$ 6.2 <sup>d</sup>	14 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	4 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	64

Peso seco inicial de mysis = 9  $\pm$  3  $\mu\text{g C}$ . Superíndices diferentes indican diferencias significativas a un nivel  $P < 0.05$ . Tomado de Gamboa-Delgado & Le Vay (2009b).

alimento vivo con dietas inertes y/o mediante la adición de aditivos para manipular la composición nutricional del alimento vivo, lo cual mejora la respuesta general de los camarones respecto al uso exclusivo del alimento vivo (Coutteau, Geurden, Camara &

Sorgeloos 1997; Calderon, Imai, Argue & Moss 2004). La influencia de los nutrientes de origen materno y las fuentes exógenas sobre el tejido larval también fue monitoreada con el objetivo de elucidar su efecto nutricional e isotópico sobre el tejido de larvas tempranas. El tejido lipídico es isotópicamente más ligero en relación a los valores  $\delta^{13}\text{C}$  presente en otros tejidos (DeNiro & Epstein 1978); en consecuencia, el rápido consumo de las reservas vitelinas durante los subestadios naupliares (N) se reflejó en un incremento casi lineal en los valores  $\delta^{13}\text{C}$ , mismo que persistió hasta los estadios de zoea (Z) cuando las larvas comenzaron a alimentarse con microalgas (Fig. 3).

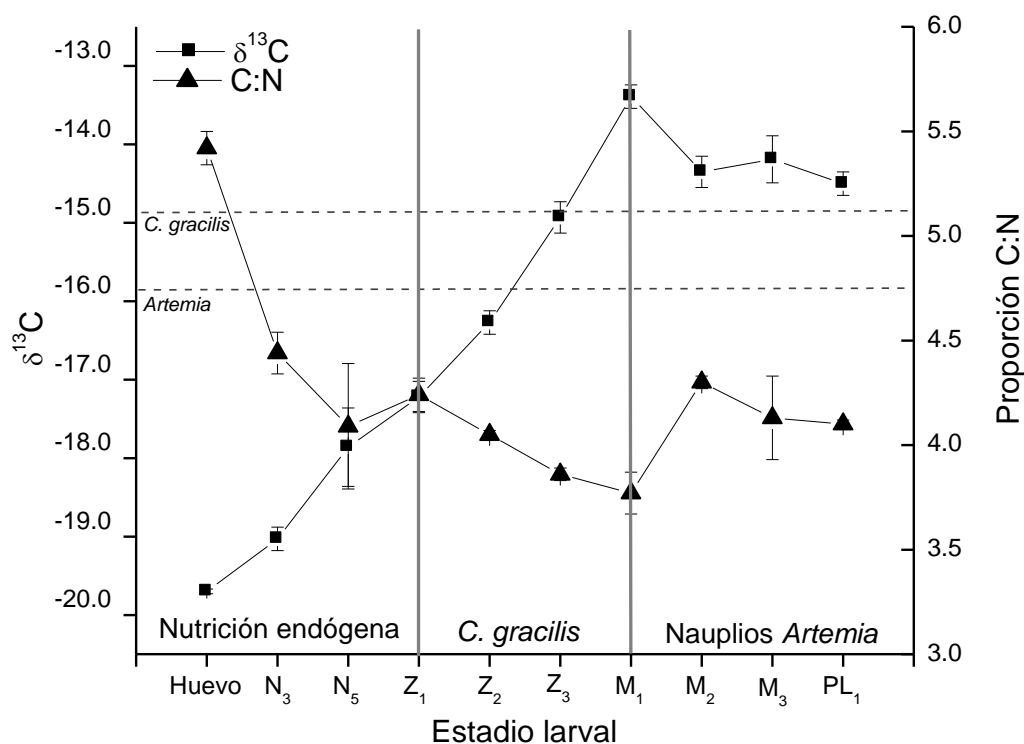


Fig. 3. Cambios en los valores  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) y en las proporciones C:N en tejido de *L. vannamei* durante el desarrollo desde huevecillo a PL-1. Las larvas fueron exclusivamente alimentadas con *C. gracilis* (zoea) y con nauplios de *Artemia* (mysis). Promedio de 3-5 muestras de animales combinados  $\pm$ DE indicada por barras verticales. Las líneas punteadas horizontales representan valores  $\delta^{13}\text{C}$  de los alimentos vivos (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009b).

Un equilibrio isotópico fue finalmente alcanzado después del inicio del consumo de *Artemia* durante el estadio mysis (M). La proporción C:N en los huevos fertilizados



disminuyó muy rápidamente después de la eclosión, lo cual indicó una rápida utilización de las reservas endógenas durante la etapa naupliar. Una vez que los tratamientos alimenticios experimentales fueron diferenciados a partir del estadio larval M1, los valores  $\delta^{13}\text{C}$  en larvas y PL tempranas de camarón fueron rápida y significativamente influenciados por los diversos regímenes dietarios, alcanzando equilibrio isotópico con sus respectivas dietas en tan solo 5 días (Fig. 4). Los resultados generados a partir de un modelo de mezclado isotópico indicaron que las contribuciones

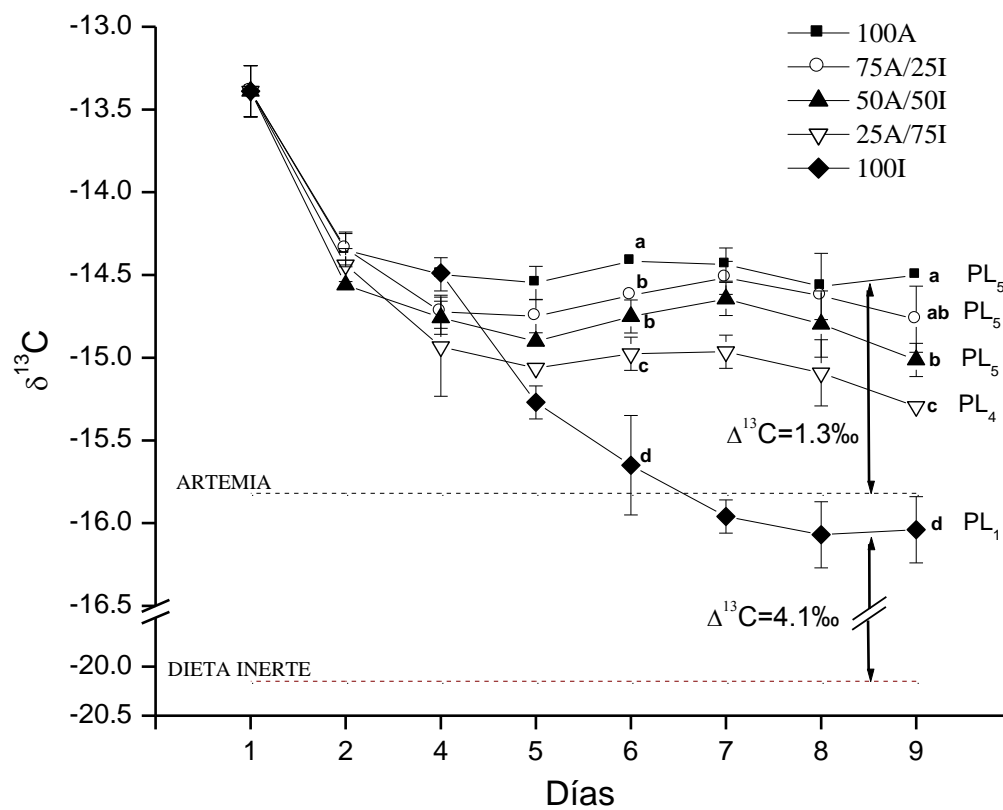


Fig. 4. Cambios en los valores  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) en tejido de larvas mysis y postlarvas de *L. vannamei* después de un cambio dietario desde *C. gracilis* a cinco regímenes alimenticios consistentes en diferentes proporciones de *Artemia* y alimento inerte. Las flechas verticales se refieren a valores  $\Delta^{13}\text{C}$  entre dietas (100A y 100I) y camarones. Superíndices indican diferencias isotópicas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Promedios de 3 a 6 muestras de 10-30 animales combinados  $\pm$ DE (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009b).

nutricionales a partir de nauplios de *Artemia* fueron significativamente mayores (Tabla 9) que las contribuciones esperadas indicadas por las proporciones nutricionales establecidas en los regímenes de co-alimentación (Tabla 4). A partir del estadio M3 y hasta PL5, las contribuciones nutricionales al crecimiento en el régimen alimenticio que suministró cantidades similares de C de cada elemento, se establecieron en el rango de 73 a 87% para *Artemia* y 13 a 27% para la dieta inerte. Los camarones alimentados con el régimen de 25% de sustitución de *Artemia* exhibieron una mayor retención de C dietario a partir de las dietas inertes al compararlos con camarones alimentados solamente con dietas inertes. Esto pudo haber sido el resultado de una mayor ingestión y/o asimilación de la dieta inerte en presencia de *Artemia*, en combinación con las mayores tasas de crecimiento fomentadas por la co-alimentación. Resultados generados en el presente experimento indican que las contribuciones de C dietario proveniente de *Artemia*, contribuyeron al crecimiento de mysis y postlarvas tempranas de forma significativamente mayor respecto a los valores esperados definidos por las proporciones de alimento diseñadas en los regímenes de co-alimentación. La mayor incorporación de nutrientes a partir de los nauplios de *Artemia* puede ser atribuida parcialmente a la alta digestibilidad que estos presentan para las larvas de camarón en comparación con las dietas inertes. Los resultados también indican que desde M3 a PL-5 ocurrió una contribución de la dieta inerte al crecimiento de 3 a 15% en el régimen larval 75A/25I, aumentando de 13 a 27% en el régimen 50A/50I, mientras que en el régimen 25A/75I, del 28 al 48% del C dietario incorporado en tejido se derivó de la dieta inerte. Villamar & Langdon (1993) enfatizan que una excesiva lixiviación de las dietas inertes, sumada a composiciones nutricionales sub-óptimas y baja digestibilidad, han evitado el reemplazo completo del alimento vivo. Por otro lado, la mayor

supervivencia observada en camarones alimentados con regímenes de co-alimentación, en comparación a aquellos alimentados solo con *Artemia*, indica que el alimento inerte suministró nutrientes esenciales no disponibles en *Artemia*. En el presente experimento, la *Artemia* fue suministrada sin enriquecer, por lo tanto indicando que en los regímenes de co-alimentación, la dieta inerte pudo haber suministrado nutrientes que están ausentes o en un nivel bajo en *Artemia* no enriquecida (e.g. ácidos grasos altamente insaturados, HUFA), de esta forma promoviendo una mayor supervivencia y crecimiento. Por ejemplo, los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA) en nauplios de *A. franciscana* son generalmente muy bajos o indetectables (Barclay & Zeller, 1996; Han, Geurden & Sorgeloos 2001), tal como es el caso de la cepa de *Artemia* usada en el presente experimento (1.5% de HUFA totales; Nghia, Wille, Vandendriessche, Vinh & Sorgeloos 2007). En contraste, el perfil de ácidos grasos de la dieta inerte usada en el presente experimento, contiene niveles de DHA significativamente mayores (42.5% de HUFA totales; Liu, Kelly, Cook, Black, Orr, Zhu & Dong 2007) que los reportados para *Artemia*. Los resultados indican que un nivel de reemplazo de *Artemia* del 50% (en peso seco) con alimento inerte en regímenes de co-alimentación durante las fases mysis y postlarvales tempranas, representa una buena estrategia ya que la supervivencia promedio fue de 89%, mientras que el crecimiento y la tasa de metamorfosis fueron estadísticamente similares a los observados en el régimen de 25% de reemplazo de *Artemia*. Los resultados también demuestran que las dietas inertes pueden proveer nutrientes específicos que promueven mayor crecimiento y supervivencia, mientras que la digestibilidad de tales dietas puede limitar su contribución al crecimiento tisular. Los valores  $\delta^{13}\text{C}$  en tejido de PL 4-5 alimentadas con los regímenes de co-alimentación mostraron una ligera desviación isotópica hacia el valor de la dieta inerte, evidenciando

una mayor ingestión/asimilación del alimento inerte asociada al desarrollo digestivo característico de los estadios postlarvales posteriores.

Tabla 9. Contribuciones nutricionales estimadas (%) de *Artemia* y dieta inerte al crecimiento de mysis (M) y postlarvas (PL) de *L. vannamei* cultivadas bajo tres diferentes regímenes de co-alimentación. Resultados generados a partir de valores  $\delta^{13}\text{C}$  dietarios y tisulares integrados en un modelo de mezclado isotópico (n = 10-30 animales combinados).

Estadio/ Alimento	75A/25I <sup>a</sup>			50A/50I			25A/75I		
	min.	promedio	max.	min.	promedio	max.	min.	promedio	max.
M3 <sup>b</sup>	69.0	85.4	100	67.1	83.2	99.3	55.8	72.1	88.5
<i>Artemia</i>	0.0	14.6	31.0	0.7	16.8	32.9	11.5	27.9	44.2
Dieta inerte									
PL1	69.3	86.3	100	59.5	76.5	93.4	49.1	66.0	82.9
<i>Artemia</i>	0.0	13.7	30.7	6.6	23.5	40.5	17.1	34.0	50.9
Dieta inerte									
PL2	71.7	87.3	100	61.4	78.0	94.8	50.7	66.3	81.8
<i>Artemia</i>	0.0	12.7	28.3	5.2	22.0	38.6	18.2	33.7	49.3
Dieta inerte									
PL3	77.8	94.7	100	69.3	86.3	100	48.5	65.4	82.2
<i>Artemia</i>	0.0	5.3	22.2	0.0	13.7	30.7	17.8	34.6	51.5
Dieta inerte									
PL4	79.3	96.7	100	69.4	86.7	100	48.1	65.3	82.5
<i>Artemia</i>	0.0	3.3	20.7	0.0	13.3	30.6	17.5	34.7	51.9
Dieta inerte									
PL5	70.0	87.3	100	55.4	72.7	89.9	34.8	52.0	69.2
<i>Artemia</i>	0.0	12.7	30.0	10.1	27.3	44.6	30.8	48.0	65.2
Dieta inerte									

<sup>a</sup> El régimen alimenticio 75A/25I consistió en 75% de nauplios de *Artemia* y 25% de dieta inerte en base al carbono dietario. El tratamiento 25A/75I se diseñó con las proporciones opuestas. En todos los casos, la incorporación estimada de carbono fue significativamente mayor a las proporciones esperadas en la tabla 4. <sup>b</sup> Las contribuciones nutricionales en los estadios M3 a PL2 fueron calculadas utilizando los valores  $\Delta^{13}\text{C}$  para PL3-5 alimentadas solo con dieta inerte. Tomado de Gamboa-Delgado & Le Vay (2009b).

Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 620-667.

**Experimento 3: Contribución nutricional del carbono dietario presente en *Artemia* y dieta inerte al crecimiento de *S senegalensis***

Larvas de peces en los regímenes 100A, 70A:30DI y 30A:70DI incrementaron su peso seco entre 700 y 1100% desde 10 DPE (41-49  $\mu\text{g}$ ) y hasta 23 DPE (322-598  $\mu\text{g}$ ), período en el cual recibieron solamente metanauplios de *Artemia* y dieta inerte. Los valores isotópicos en tejido fueron rápidamente influenciados por los respectivos regímenes alimenticios a partir de 10 DPE. A partir de 12 DPE, las larvas de peces en todos los regímenes mostraron diferencias significativas en sus valores  $\delta^{13}\text{C}$ , los cuales finalmente se estabilizaron en valores asintóticos de -15.1, -15.6 y -16.3‰ en el régimen de alimento vivo, 70A:30DI y 30A:70DI, respectivamente (Fig. 5).

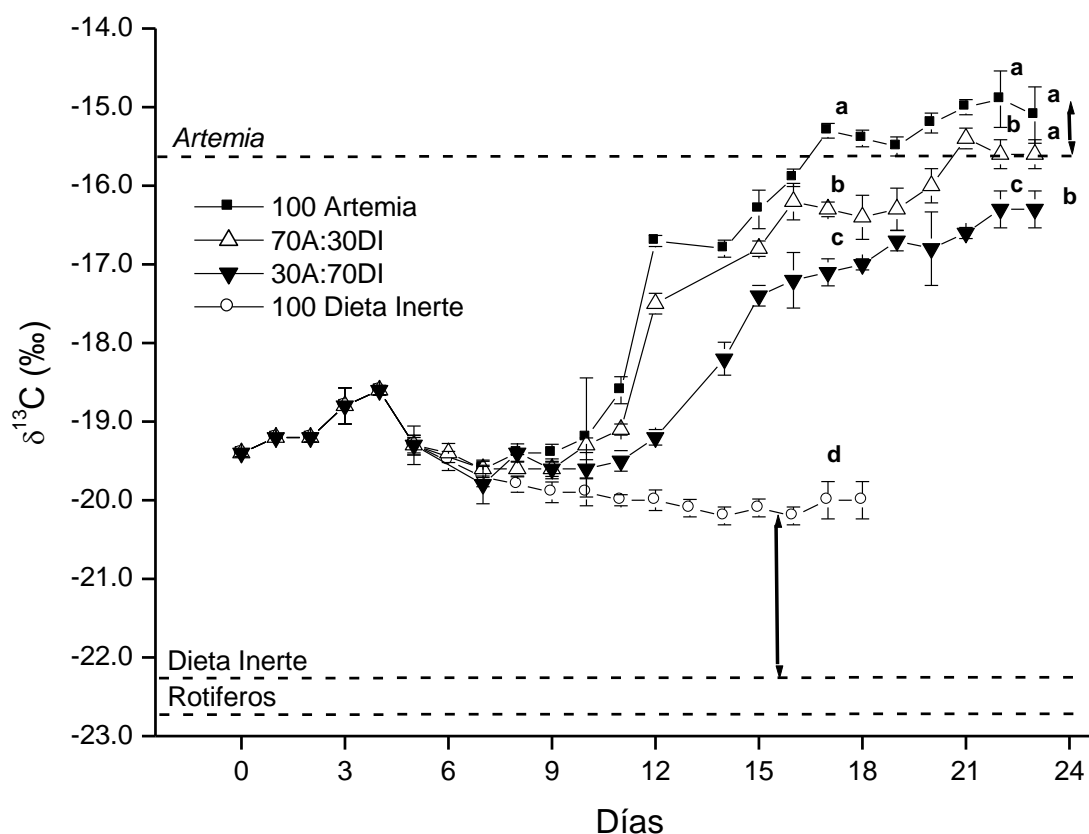


Fig. 5. Cambios en las firmas isotópicas del carbono en larvas de *S. senegalensis* cultivadas con diferentes regímenes de alimentación. Promedio de 6-9 muestras  $\pm$ DE. Las flechas verticales se refieren al grado de discriminación isotópica entre dietas y consumidores (100A y 100DI). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos.

(Gamboa-Delgado *et al.* 2008).

Las tasas metabólicas de recambio del C en tejido fueron relativamente altas en larvas alimentadas solo con alimento vivo y con los dos regímenes de co-alimentación (0.071 a 0.116 d<sup>-1</sup>); sin embargo, más del 90% del cambio isotópico observado en tejido fue debido a la retención de C estructural en tejido nuevo. Varios estudios han reportado que un incremento de peso de 300 a 400% es necesario para que un organismo consumidor alcance equilibrio isotópico con su dieta (Fry & Arnold 1982; Van der Zanden *et al.* 1998; Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a, 2009b). El tiempo requerido para que ocurra una completa integración de valores isotópicos en tejido depende entonces de la acreción tisular, pero también de la tasa metabólica del organismo o tejido examinado (Hobson & Clark 1992; Hesslein *et al.* 1993). El modelo de mezclado isotópico indicó que a los 23 DPE, la contribución relativa de *Artemia* y alimento inerte al crecimiento en el régimen de co-alimentación 70A:30DI fue de 87 y 12%, respectivamente, y de 73 y 27% para el régimen 30A:70DI (Tabla 10). Resultados del presente experimento confirman que la dieta inerte suministrada en regímenes de co-alimentación es fisiológicamente mejor utilizada durante periodos específicos del desarrollo larval. Tales regímenes larvales pueden ser optimizados mediante un diseño que considere su administración durante picos de máxima ingestión/asimilación, para así adecuarse a los cambios ontogenéticos responsables de la capacidad nutricional larvaria para utilizar dietas inertes. Co-alimentar dietas inertes a larvas tempranas tiene efectos positivos en la transición al alimento inerte. Cañavate & Fernández-Díaz (1999) observaron que larvas tempranas de *S. senegalensis* están más dispuestas a aceptar partículas inertes que las larvas tardías o postlarvas. De forma similar, Barnabe & Guissi (1994) notaron que larvas de lobina marina europea aparentemente aceptan alimento inerte durante periodos específicos de su desarrollo, concluyendo que esto se

asocia posiblemente a cambios ontogenéticos en su fisiología digestiva y comportamiento. En el presente experimento, los resultados generados por el modelo de mezclado isotópico sugieren que al suministrar regímenes de co-alimentación, las proporciones estimadas de C retenido a partir de la dieta inerte fue mayor durante las etapas larvales tempranas, indicando también un incremento en la utilización de *Artemia* relacionado al desarrollo larvario. Esta misma tendencia fue observada en el régimen 30A:70DI, donde el suministro de metanauplios de *Artemia* estuvo restringido. El consumo de alimento inerte fue verificado por medio de observaciones microscópicas, sin embargo, peces alimentados con los regímenes de co-alimentación mostraron una fuerte desviación isotópica hacia el valor de la *Artemia*. Esto sugiere que (1) aún con un suministro bajo de *Artemia*, esta fue selectivamente ingerida y bien asimilada y (2) una proporción de alimento inerte no fue consumida durante las etapas larvales tempranas debido a que, a pesar de la aereación, parte de la dieta inerte suministrada se precipita al fondo y está menos disponible para las larvas pre-metamorfizadas.

Tabla 10. Contribución nutricional del alimento vivo e inerte al crecimiento de larvas y postlarvas de *S. senegalensis* cultivadas con dos regímenes de co-alimentación.

Tiempo	70LA/30DI*			30A/70DI*		
	min.	promedio	max.	min.	promedio	max.
17 DPE						
<i>Artemia</i>	72.2	76.6	80.9	45.6	61.6	77.7
Dieta inerte	19.0	23.4	27.7	22.3	38.4	54.4
20 DPE						
<i>Artemia</i>	70.0	82.2	94.3	61.3	67.3	73.3
Dieta inerte	5.7	17.8	30.0	26.7	32.7	38.7
23 DPE						
<i>Artemia</i>	84.8	87.6	90.4	69.1	72.9	76.7
Dieta inerte	9.6	12.4	15.2	23.3	27.1	30.9

\* El régimen 70A/30DI tuvo un porcentaje de 70% de alimento vivo y 30% de dieta inerte en base seca. El tratamiento 30A/70DI fue diseñado con los porcentajes opuestos. DPE= Días post eclosión. Tomado de Gamboa-Delgado *et al.* (2008).



## **Aplicaciones adicionales de las técnicas isotópicas en nutrición animal**

### **Estimación de las tasas metabólicas de recambio de nutrientes**

La disponibilidad de las técnicas isotópicas en combinación con equipo de laboratorio altamente sensible ha permitido evaluar la dinámica trófica en diversos organismos. Estas nuevas metodologías han permitido estimar la ingestión, la asimilación y las tasas de recambio metabólico elemental por medio de métodos directos (*e.g.* Verschoor *et al.* 2005) en lugar de los tradicionalmente indirectos. Las tasas de recambio de nutrientes pueden estimarse por medio del monitoreo de cambios isotópicos en diversos tejidos y son importantes para determinar que tan rápido el perfil isotópico de una dieta es incorporado en tejido animal (Pearson *et al.* 2003). Frecuentemente, los tejidos de animales que presentan crecimiento rápido exhiben valores  $t_{50}$  cortos para C y N en relación a los valores observados en tejidos de animales que presentan lento crecimiento (MacAvoy *et al.* 2005). La resolución al estimar tasas de recambio metabólico se incrementa cuando las diferencias isotópicas entre tejido animal inicial y dieta son contrastantes (Fry & Arnold 1982; Gamboa-Delgado 2009). Los valores  $\delta^{15}\text{N}$  pueden ser utilizados para estimar la tasa de recambio del N, y dado que las proteínas contienen aproximadamente 16% de este elemento, los valores  $\delta^{15}\text{N}$  pueden ser usados como un indicador confiable de la tasa de recambio de la proteína. La nutrición relacionada a las proteínas representa el área con mayor número de estudios hechos dentro de la nutrición acuícola (Guillaume, Kaushik, Bergot & Metailler 2001) y en consecuencia, el metabolismo proteico ha sido estudiado extensivamente como un medio para entender y mejorar el proceso de crecimiento en los animales acuáticos.

Las altas tasas metabólicas de recambio observadas en larvas y postlarvas de camarón blanco (experimento 2) no fueron significativamente diferentes entre animales que recibieron los diferentes tratamientos, sin embargo, una vez que estos valores fueron integrados junto con las tasas de crecimiento en la ecuación para determinar valores  $t_{50}$ , se detectaron tiempos medios de residencia del C en tejido significativamente mayores en camarones alimentados solamente con dieta inerte ( $2.5 \pm 0.3$  días). El reducido crecimiento observado en estos camarones indica que estos alcanzaron equilibrio isotópico con sus dietas por medio de recambio metabólico de C en tejido y no mediante acreción tisular. Los animales en los otros regímenes de alimentación mostraron un crecimiento mayor, exhibiendo valores  $t_{50}$  para C oscilando entre 1.2 a 1.6 días (Tabla 11). El valor  $t_{50}$  decrece en función de altas tasas de crecimiento como resultado de la dilución isotópica promovida por la adición de nuevo tejido. Los nutrientes recientemente asimilados son utilizados para sintetizar tejido orgánico y/o para reemplazar moléculas degradadas, lo cual resulta en crecimiento y reemplazo metabólico tisular, respectivamente. Esto afecta a los valores isotópicos tisulares establecidos por la dieta previa, por lo tanto, el tiempo medio de permanencia de C puede ser utilizado como un indicador adicional de desempeño dietario.

Tabla 11. Tasas de crecimiento ( $k$ ), tasas metabólicas de recambio ( $m$ ) y tiempo medio de recambio para carbono ( $t_{50}$ ) en tejido de *L. vannamei* cultivados de mysis 1 a PL5 a base de cinco regímenes de alimentación conformados por proporciones variables de reemplazo de *Artemia* con alimento inerte.

Régimen alimenticio	$k$ (d <sup>-1</sup> )	$m$ (d <sup>-1</sup> )	$t_{50}$ (d)	$\Delta^{13}\text{C}$ (‰)
100A	$0.239 \pm 0.005^a$	$0.261 \pm 0.103^a$	$1.4 \pm 0.2^a$	1.3
75A/25I	$0.218 \pm 0.014^a$	$0.381 \pm 0.178^a$	$1.2 \pm 0.2^a$	-
50A/50I	$0.225 \pm 0.037^a$	$0.334 \pm 0.095^a$	$1.2 \pm 0.1^a$	-
25A/75I	$0.204 \pm 0.024^a$	$0.239 \pm 0.063^a$	$1.6 \pm 0.2^a$	-
100I	$0.040 \pm 0.019^b$	$0.241 \pm 0.033^a$	$2.5 \pm 0.3^b$	4.1

Superíndices diferentes indican diferencias significativas a un nivel de significancia  $P < 0.05$   
Tomado de Gamboa-Delgado *et al.* (2008).

Tejidos de animales que exhiben crecimiento rápido muestran también altas tasas metabólicas y por lo tanto tiempos medios cortos en la permanencia del C y N en tejido (MacAvoy *et al.* 2005), esto puede variar en las diferentes etapas del desarrollo de un organismo. Por ejemplo, las tasas de recambio metabólico para el C observadas en el experimento 3 realizado en larvas de *S. senegalensis* fueron mayores ( $0.071$  a  $0.116$   $d^{-1}$ ) que las reportadas para juveniles de *Salmo salar* ( $0.008$ – $0.022$   $d^{-1}$ , Jardine, MacLatchy, Fairchild, Cunjak & Brown 2004). Bosley *et al.* (2002) reportaron un  $t_{50}$  para C de  $2.2 \pm 0.3$  d para larvas recién metamorfozadas de lenguado *Pseudopleuronectes americanus* después de un cambio dietario de rotíferos a *Artemia*. En el experimento 3, larvas de *S. senegalensis* bajo un régimen de alimentación similar (Fig. 6) exhibieron un  $t_{50}$  para C de  $2.5 \pm 0.2$  d.

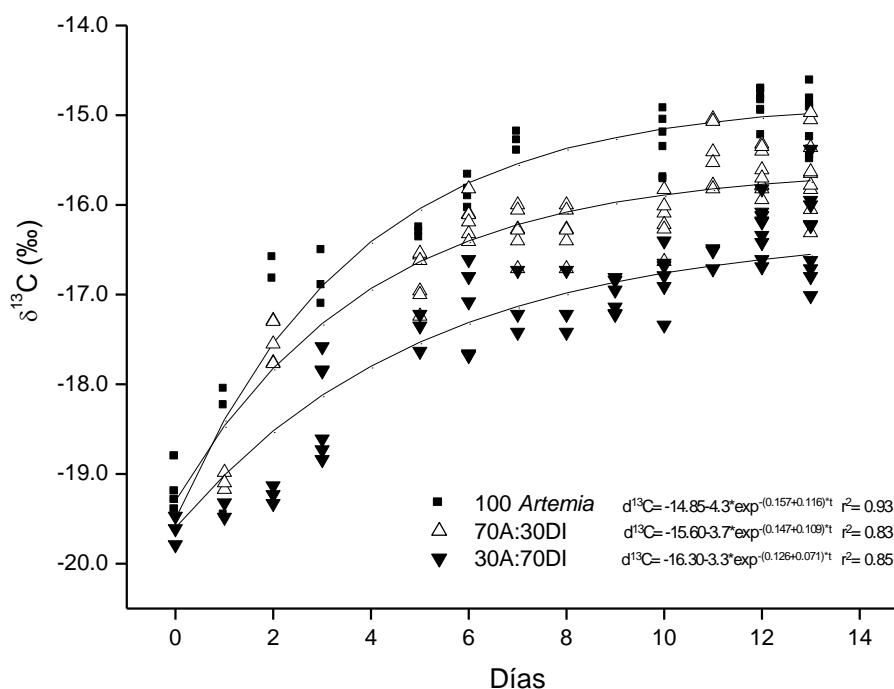


Fig. 6. Cambios en los valores isotópicos ( $\delta^{13}C$ ) de *S. senegalensis* después de un cambio dietario (10 DPE) de rotíferos a *Artemia* y dos regímenes de co-alimentación incluyendo *Artemia* y alimento inerte. Valores predichos por el modelo de Hesslein fueron ajustados a valores observados usando regresión no-lineal iterativa. (Gamboa-Delgado *et al.* 2008).

## Factores de discriminación isotópica

Altos factores de discriminación isotópica ( $\Delta^{13}\text{C}$  y/o  $\Delta^{15}\text{N}$ ) están probablemente relacionados a una carencia o escasez de nutrientes específicos necesarios para un estadio de vida en particular. Cualquiera de estos factores puede promover incrementos en las tasas de alimentación de los animales como una estrategia para balancear un déficit nutricional. En consecuencia, se genera un mayor reciclaje metabólico de nutrientes no esenciales y se incrementan los valores  $\Delta^{13}\text{C}$  y  $\Delta^{15}\text{N}$  entre dieta y tejido animal (Martínez del Río & Wolf 2005). Por ejemplo, en relación al metabolismo de proteínas, Roth & Hobson (2000) apoyan la hipótesis que indica que los valores  $\Delta^{15}\text{N}$  entre un organismo y su dieta disminuyen en función de un incremento en el valor biológico de la proteína consumida. Tal premisa ha sido recientemente reafirmada por Robbins *et al.* (2005) mediante un análisis de datos publicados en el cual se encontró una correlación negativa ( $r = -0.72$ ) entre el valor  $\Delta^{15}\text{N}$  de mamíferos y aves y el valor biológico de sus proteínas dietarias. En el caso de los experimentos presentados aquí, los altos valores  $\Delta^{13}\text{C}$  observados entre las dietas inertes y los consumidores (peces y camarones), así como los altos valores  $\Delta^{15}\text{N}$  registrados entre camarones y dietas formuladas solo con proteína de soya, también apoyan la asunción que indica un mayor factor de discriminación isotópica relacionado a la escasez de nutrientes específicos (inadecuada asimilación y/o un perfil nutricional no balanceado). Experimentos adicionales controlados indicarán si los factores de discriminación isotópica son consistentes y confiables para utilizarse como indicadores nutricionales, en particular aplicando análisis isotópicos de compuestos específicos.

### Análisis isotópico de compuestos específicos (CSIA)

La estimación de los valores isotópicos en una muestra dada provee un valor promedio de la firma isotópica del C y/o N presente en los diversos compuestos que la conforman. La separación de las sub-unidades de moléculas orgánicas complejas antes del análisis isotópico permite analizarlas mediante CSIA para posteriormente determinar el origen y destino de aminoácidos, ácidos grasos y otros componentes individuales presentes en las dietas (Evans, Evershed, Black & Ineson 2003; O'Brien *et al.* 2005). El acoplamiento de cromatógrafos a espectrómetros de masas para proporciones isotópicas también permite determinar las vías metabólicas implicadas en la síntesis de compuestos específicos a partir de precursores isotópicamente marcados (Bell, Dick, Anderson & Pond 2007). Análisis isotópicos de compuestos específicos han sido aplicados en un amplio rango de especies marinas en experimentos que en su mayoría son directamente relevantes a estudios de nutrición larval. Entre ellos se encuentran estudios ecológicos en cangrejos azules juveniles *Callinectes sapidus* (Fantle, Dittel, Schwalm, Epifanio & Fogel 1999) y rotíferos marinos *Brachionus plicatilis* (McClelland & Montoya 2002), en los cuales se diseñaron experimentos controlados en laboratorio para obtener datos que asistieron en la interpretación de observaciones de campo. En general, estos estudios demuestran consistentemente en sus resultados que existe un amplio rango de valores isotópicos en diversas especies marinas. Por ejemplo, los valores isotópicos  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en aminoácidos en grupos animales tales como rotíferos, crustáceos, gastrópodos y peces, oscilan a través de 20 unidades (‰) (Fantle *et al.* 1999; McClelland & Montoya 2002; Chikaraishi, Kashiyama, Ogawa, Kitazato & Ohkouchi 2007; McCullagh, Gaye-Siessegger & Focken 2008). En el caso de los valores  $\delta^{13}\text{C}$ , la transferencia de esqueletos de C isotópicamente intactos desde los

Gamboa-Delgado, J. 2010. Isótopos estables como trazadores nutricionales naturales en larvas y juveniles de *Litopenaeus vannamei* y *Solea senegalensis*. En: Cruz-Suarez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, ., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 620-667.

elementos dietarios y hasta los tejidos del consumidor parece reflejar una muy limitada tasa de fraccionamiento isotópico en los aminoácidos esenciales (Fantle *et al.* 1999; O'Brien *et al.* 2003). En cambio, los aminoácidos no esenciales presentes en el tejido de los consumidores pueden incluir esqueletos de C derivados de una variedad de componentes (e.g. intermediarios metabólicos producidos en glucólisis y ciclo de Krebs) y muestran un fraccionamiento isotópico significativo en cada uno de los pasos de las vías metabólicas implicadas en la síntesis de aminoácidos. Esto resulta en una alta variabilidad en los valores  $\delta^{13}\text{C}$  de los aminoácidos no esenciales, en particular en los niveles tróficos mayores. Aquellos aminoácidos que se conservan (i.e.  $\Delta^{13}\text{C}$  bajo) indican un uso fisiológico directo (transferencia de aminoácidos dietarios intactos) y conllevan un potencial para usarse como bio-marcadores en experimentos nutricionales diseñados para este fin. En contraste, un comportamiento isotópicamente no conservativo (i.e.  $\Delta^{13}\text{C}$  alto) indica una síntesis *de novo* de aminoácidos, en la cual se utilizan fuentes de C derivadas de otros compuestos dietarios. En este contexto, el diseño de experimentos que tienen por objetivo la investigación sobre nutrición en especies acuáticas, podría tomar ejemplo de resultados obtenidos en estudios sobre especies terrestres. Experimentos realizados en insectos han demostrado que los valores  $\Delta^{13}\text{C}$  pueden ser utilizados para indicar fuentes nutricionales de C y para identificar requerimientos dietarios de aminoácidos (O'Brien *et al.* 2003, 2005).

## Conclusiones

Los valores isotópicos presentes a niveles de abundancia natural en diversos consumidores y en sus dietas pueden proveer información relevante para elucidar el

flujo y la incorporación de nutrientes que contribuyen al crecimiento, definiendo a la vez periodos en los cuales los organismos se encuentran fisiológicamente mejor preparados para ingerir y asimilar nutrientes. Las evaluaciones nutricionales usando isótopos estables proveen una útil herramienta analítica para interpretar la fisiología digestiva de organismos acuáticos, siendo de particular asistencia en estudios de nutrición larval debido al limitado tamaño de estas fases de vida. Sin embargo, en experimentos enfocados al estudio de contribuciones nutricionales se debe poner atención al cumplimiento de las asunciones asociadas a los modelos de mezclado isotópico y a las condiciones experimentales requeridas en este tipo de estudios. El uso de modelos de mezclado isotópico está restringido cuando las fuentes nutricionales presentan valores isotópicos similares o cercanos. La posibilidad de manipular los perfiles isotópicos de ingredientes, dietas inertes y alimento vivo, presenta una oportunidad adicional para incrementar la resolución en tales estudios. Los regímenes de alimentación larval utilizados para cultivar varias especies marinas se conforman un número mucho menor de elementos tróficos que aquellos encontrados en el ambiente natural. Por lo tanto, la estimación de los valores isotópicos en las fuentes nutricionales resulta menos compleja, permitiendo generar información relevante sobre el desempeño de nuevas dietas y regímenes de alimentación enfocados a la sustitución del alimento vivo en el larvicultivo de especies marinas.

En el caso de la sustitución parcial o total de la harina de pescado en dietas acuícolas, una variedad de ingredientes de origen vegetal, microbiano y animal muestran un alto potencial para ser evaluados nutricionalmente usando isótopos estables debido a los contrastantes valores isotópicos que estas fuentes presentan de forma natural. Las

determinaciones isotópicas realizadas en un organismo consumidor representan la firma isotópica promedio de la historia nutricional resultante de los efectos combinados de disponibilidad dietaria, ingestión, digestión e incorporación a los tejidos. Por lo tanto, investigación adicional es necesaria para elucidar preguntas e hipótesis específicas acerca de componentes nutricionales particulares. La creciente adopción del uso de análisis isotópicos de compuestos específicos, particularmente para aminoácidos, representa una oportunidad para incrementar el conocimiento actual de la utilización de nutrientes particulares durante el desarrollo de diferentes especies. La disponibilidad comercial de sustratos (aminoácidos, ácidos grasos, colesterol, vitaminas, etc.) pre-marcados hasta con tres diferentes isótopos pesados, aumenta las posibilidades de aplicación en estudios sobre fisiología nutricional. Las técnicas que acoplan cromatógrafos a espectrómetros de masas para proporciones isotópicas para el análisis de isótopos estables de C en aminoácidos, tienen el potencial de convertirse en una herramienta estándar en la nutrición animal. Estudios realizados en especies terrestres han demostrado el uso exitoso de los análisis isotópicos de compuestos específicos para evaluar la transferencia de C y N dietario a partir de diversas fracciones nutricionales, bajo condiciones de crecimiento normales y no limitadas a cortos períodos de tiempo ni a espacios restringidos como ocurre en el caso de la aplicación de isótopos radioactivos.



## Agradecimientos

Se agradece ampliamente el soporte financiero y logístico de las siguientes entidades para la realización del presente estudio: The Alβan Programme (The European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, Project E05D056486MX), El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT, Beca Doctoral 178649), The Atlantic Arc Aquaculture Group (Project 091, European Comission), The University of Wales (Bangor, UK) y el Instituto de Formación Agraria y Pesquera de la Junta de Andalucía (IFAPA-“El Toruño”, Cádiz, España).

## Referencias

- Akiyama D.M. (1989) Soybean meal utilization by marine shrimp. In: *Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human food and animal feedstuffs* (ed. by T.H. Applewhite). Singapore, Oct. 1988 pp. 252–265. American Oil Chemists Society, Champaign, IL.
- Alam M.S., Teshima S., Koshio S., Ishikawa M., Hernandez L.H.H., Uyan O. Michael, F.R. (2005) Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture* **248**, 13–19.
- Al-Maslmani I.A.M.J. (2006) Feeding and nutrition in the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. PhD Thesis. 179 pp. University of Wales, UK.
- Barclay W., Zeller S. (1996) Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *Journal of the World Aquaculture Society* **27**, 314–322.
- Barnabe G., Guissi A. (1994) Adaptations of the feeding behaviour of larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), to an alternating live-food/compound-food feeding regime. *Aquaculture and Fisheries Management* **25**, 537–546.
- Bell M.V., Dick J.R., Anderson T.R., Pond D.W. (2007) Application of liposome and stable isotope tracer techniques to study polyunsaturated fatty acid biosynthesis in marine zooplankton. *Journal of Plankton Research* **29**, 417–422.
- Bombeo-Tuburan I., Guanzon N.G., Schroeder, G.L. (1993) Production of *Penaeus monodon* (Fabricius) using four natural food types in an extensive system. *Aquaculture* **112**, 57–65.
- Bosley K.L., Witting D.A. Chambers R.C., Wainright S.C. (2002) Estimating turnover rates of carbon and nitrogen in recently metamorphosed winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* with stable isotopes. *Marine Ecology Progress Series* **236**, 233–240.
- Burford M.A., Sellars M.J., Arnold S.J. Keys S.J, Crocos P.J., Preston N.P. (2004) Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional requirements of post-larval shrimp (*Penaeus esculentus*) in high-density rearing systems. *Aquaculture Research* **35**, 508–515.
- Burford M.A., Preston N.P., Glibert P.M., Dennison W.C. (2002) Tracing the fate of <sup>15</sup>N-enriched feed in an intensive shrimp system. *Aquaculture* **206**, 199–216.
- Cabana G., Rasmussen, J.B. (1996) Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **93**, 10844–10847.
- Calderon F.R.O., Imai D.M., Arce S.M., Argue B.J., Moss, S.M. (2004) Performance of larval and postlarval Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed two commercial liquid diet supplements. *Journal of Applied Aquaculture* **15**, 21–36.
- Carter C.G., Owen S.F., He Z.Y., Watt P.W., Scrimgeour C., Houlihan D.F., Rennie M.J. (1994) Determination of protein synthesis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, using a stable isotope. *Journal of Experimental Biology* **189**, 279–284.

- Cherel Y., Hobson K.A., Hassani S. (2005) Isotopic discrimination between food and blood and feathers of captive penguins: implications for dietary studies in the wild. *Physiological and Biochemical Zoology* **78**, 106–115.
- Cañavate J.P., Fernández-Díaz C. (1999) Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* **174**, 255–263.
- Chikaraishi Y., Kashiyama Y., Ogawa N.O., Kitazato H., Ohkouchi N. (2007) Metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Marine Ecology Progress Series* **342**, 85-90.
- Conceição L.E.C., Skjermo J., Skjåk-Bræk G., Verreth J.A.J. (2001) Effect of an immunostimulating alginate on protein turnover of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **24**, 207-212.
- Coutteau P., Geurden I., Camara M.R., Bergot P., Sorgeloos P. (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* **155**, 149–164.
- Crawley K.R., Hyndes G.A., Vanderklift M.A. (2007) Variation among diets in discrimination of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  in the amphipod *Allorchestes compressa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **349**, 370-377.
- D'Avanzo C., Alber M., Valiela I. (1991) Nitrogen assimilation from amorphous detritus by two coastal consumers. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **33**, 203–209.
- DeNiro M.J., Epstein S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**, 341–351.
- DeNiro M.J., Epstein S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotope ratios in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**, 495–506.
- Epp M.A., Ziemann D.A., Schell D.M. (2002) Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture Research* **33**, 839-846.
- Evans C.J., Evershed R.P., Black H.I.J., Ineson P. (2003) Compound-specific stable isotope analysis of soil mesofauna using thermally assisted hydrolysis and methylation for ecological investigations. *Analytical Chemistry* **75**, 6056–6062.
- Fantle M.S., Dittel A.I., Schwalm S., Epifanio C.E., Fogel M.L. (1999) A foodweb analysis of the juvenile crab *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia* **120**, 416-426
- Forster I.P., Dominy W., Tacon A.G.J. (2002) Use of soy protein concentrates in shrimp feeds. *International Aqua Feed* **5**, 17–19.
- Fraser K.P.P., Rogers A.D. (2007) Protein metabolism in marine animals: the underlying mechanism of growth. *Advances in Marine Biology* **52**, 267–362.
- Fry, B. (2006) *Stable Isotope Ecology*. Springer Science. NY, USA. 390 pp.
- Fry B., Arnold C. (1982) Rapid  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia* **54**, 200–204.
- Gamboa-Delgado J. (2009) Application of natural stable isotopes in aquaculture nutrition. PhD Thesis. University of Wales-Bangor, UK. 180 pp.

[http://www.programalban.org/listGrantees/teses/t\\_E05D056486MX.pdf](http://www.programalban.org/listGrantees/teses/t_E05D056486MX.pdf)

- Gamboa-Delgado J., Le Vay L. (2009a) Nitrogen stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture* **291**, 115-123.
- Gamboa-Delgado J., Le Vay L. (2009b) *Artemia* replacement in co-feeding regimes for mysis and postlarval stages of *Litopenaeus vannamei*: Nutritional contribution of inert diets to tissue growth as indicated by natural carbon stable isotopes. *Aquaculture* **297**, 128-135.
- Gamboa-Delgado J., Cañavate J.P., Zero R., Le Vay L. (2008) Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **280**, 190-197.
- Gannes L.Z., O'Brien D.M., Martinez del Rio C. (1997) Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* **78**, 1271-1276.
- Garlick P.J., McNurlan M.A., Preedy V.R. (1980) A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of <sup>3</sup>H-phenylalanine. *Biochemical Journal* **192**, 719-723.
- Gentsch E., Kreibich T., Hagen W., Niehoff B. (2009) Dietary shifts in the copepod *Temora longicornis* during spring: evidence from stable isotope signatures, fatty acid biomarkers and feeding experiments. *Journal of Plankton Research* **31**, 45-60.
- Gouveia A., Davies S.J. (2000) Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **182**, 183-193.
- Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Metailler R. (Eds) (2001) Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. Springer Verlag, Heidelberg, Germany. 408 pp.
- Han K., Geurden I., Sorgeloos P. (2001) Fatty acid changes in enriched and subsequently starved *Artemia franciscana* nauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture* **199**, 93-105.
- Hentschel B.T. (1998) Intraspecific variations in  $\delta^{13}\text{C}$  indicate ontogenetic diet changes in deposit-feeding polychaetes. *Ecology* **79**, 1357-1370.
- Hesslein R.H., Hallard K.A., Ramlal P. (1993) Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by <sup>34</sup>S, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 2071-2076
- Herzka S.Z., Holt G.J. (2000) Changes in isotopic composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae in response to dietary shifts: potential applications to settlement studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**, 137-147.
- Hinga K.R., Arthur M.A., Pilson M.E.Q., Whitaker D. (1994) Carbon isotope fractionation by marine phytoplankton in culture: The effects of CO<sub>2</sub> concentration, pH, temperature, and species. *Global Biogeochemical Cycles*, **8**, 91-102.
- Hobson K.A., Smith R.J.F., Sorensen P.W. (2006) Applications of stable isotope analysis to tracing nutrient sources of Hawaiian gobioid fishes and other stream organisms. In: Evenhuis, N.L. &

- Fitzsimons, J.M. (eds.), *Biology of Hawaiian Streams and Estuaries*. Bishop Museum Bulletin in Cultural and Environmental Studies, Honolulu, Hawaii.
- Hobson K.A., Clark R.G. (1992) Assessing avian diets using stable isotopes 1: turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. *Condor* **94**, 181–188.
- Houlihan D.F., Carter C.G., McCarthy I.D. (1995) Protein turnover in animals. Chapter 1. In: *Nitrogen metabolism and excretion*. (ed. by Walsh, P.J. and Wright, P.). CRC Press. Boca Raton, FL, USA. pp. 1-31.
- Houlihan D.F., Hall S.J., Gray C., Noble B.S. (1988) Growth rates and protein turnover in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **45**, 951-964.
- Jardine T.D., MacLatchy D.L., Fairchild W.L., Cunjak, R.A., Brown, S.B. (2004) Rapid carbon turnover during growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in seawater, and evidence of food consumption by growth-stunts. *Hydrobiologia* **527**, 63–75.
- Jomori R.K., Ducatti C., Carneiro D.J., Portella M.C. (2008) Stable carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquaculture Research* **39**, 370–381.
- Le Vay L., Gamboa-Delgado J. (2010) Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture*. *In press*. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.03.033
- Lindholm M., Hessen D.O. (2007) Zooplankton succession on seasonal floodplains: surfing on a wave of food. *Hydrobiologia* **592**, 95-104.
- Liu H., Kelly M.S., Cook E.J., Black K.D., Orr H., Zhu J.X., Dong S.L. (2007) The effect of diet type on growth and fatty acid composition of sea urchin larvae, I. *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Aquaculture* **265**, 247–262.
- MacAvoy S.E., Arneson L.S., Bassett E. (2006) Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia* **150**, 190 – 201.
- MacAvoy S.E., Macko S.A., Arneson L.S. (2005) Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Zoology* **83**, 631–641.
- McClelland J.W., Montoya J.P. (2002) Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology* **83**, 2173-2180.
- McCullagh J., Gaye-Siessegger J., Focken U. (2008) Determination of underivatized amino acid  $\delta^{13}\text{C}$  by liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry for nutritional studies: the effect of dietary non-essential amino acid profile on the isotopic signature of individual amino acids in fish. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 1817-1822.
- Martínez del Río C., Wolf N., Carleton S.A., Gannes, L.Z. (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biology Reviews* **84**, 91-111.
- Martínez del Río C., Wolf B.O. (2005) Mass-balance models for animal isotopic ecology. In: *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*. (ed. by Starck, J.M., Wang, T.). Science Publishers, Enfield, NH, pp. 141-174.

- Matsuda H., Takenouchi T., Tanaka S., Watanabe S. (2009) Relative contribution of *Artemia* and mussel as food for cultured middle-stage *Panulirus japonicus* phyllosomata as determined by stable nitrogen isotope analysis. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **43**, 217–224.
- Michener R.H., Schell D.M. (1994) Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs In: *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Chapter 7. Vol 1 (ed. by Lajtha, K. and Michener, R.H.) Blackwell scientific publications. Oxford, UK. 138-157 pp.
- Minagawa M., Wada E. (1984) Stepwise enrichment of  $\delta^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**, 1135–1140.
- Moens T., Bouillon S., Gallucci F. (2005) Dual stable isotope abundances unravel trophic position of estuarine nematodes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **85**, 1401–1407.
- Nghia T.T., Wille M., Vandendriessche S., Vinh Q.T., Sorgeloos P. (2007) Influence of highly unsaturated fatty acids in the live food on larviculture of mud crab *Scylla paramamosain*. *Aquaculture Research* **38**, 1512–1528.
- O'Brien D.M., Boggs C.L., Fogel M.L. (2005) The amino acids used in reproduction by butterflies: A comparative study of dietary sources using compound-specific stable isotope analysis. *Physiological and Biochemical Zoology* **78**, 819-827.
- O'Brien D.M., Boggs C.L., Fogel M.L. (2003) Pollen feeding in the butterfly *Heliconius charitonia* isotopic evidence for essential amino acid transfer from pollen to eggs. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **270**, 2631–2636.
- Pearson D.F., Levey D.J., Greenberg C.H., Martinez del Rio C. (2003) Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia* **135**, 516–523.
- Peterson B.J., Fry B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 293-320.
- Phillips D.L., Gregg J.W. (2003) Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia* **136**, 261-269
- Phillips D.L., Gregg J.W. (2001) Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* **127**, 171–179. (see also erratum, *Oecologia* **128**, 204).
- Power M., Guiguer K.R.R.A., Barton D.R. (2003) Effects of temperature on isotopic enrichment in *Daphnia magna*: implications for aquatic food-web studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 1619-1625.
- Preston N.P., Smith D.M., Kellaway D.M., Bunn S.E. (1996) The use of enriched  $^{15}\text{N}$  as an indicator of the assimilation of individual protein sources from compound diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **147**, 249–259.
- Robbins C.T., Felicetti L.A., Sponheimer M. (2005) The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* **144**, 534–540.

- Rossi F., Herman P.M.J., Middelburg J.J. (2004) Interspecific and intraspecific variation of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  in deposit- and suspension-feeding bivalves (*Macoma balthica* and *Cerastoderma edule*): evidence of ontogenetic changes in feeding mode of *Macoma balthica*. *Limnology and Oceanography* **49**, 408–414.
- Roth J.D., Hobson K.A. (2000) Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of Zoology* **78**, 848–852.
- Sato M., Sasaki H., Fukuchi M. (2002) Stable isotopic compositions of over-wintering copepods in the arctic and subarctic waters and implications for the feeding history. *Journal of Marine Systems* **38**, 165–174.
- Schlechtriem C., Focken U., Becker K. (2004) Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. *Aquatic Ecology* **38**, 93–100.
- Schroeder G.L. (1983) Sources of fish and prawn growth in polyculture ponds as indicated by  $\delta^{13}\text{C}$  analysis. *Aquaculture* **35**, 29–42.
- Shewbart K.L., Meis W.L., Ludwig P.D. (1972) Identification and quantitative analysis of the amino acids present in protein of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Marine Biology* **16**, 64–67.
- Southgate P.C., Partridge G.J. (1998) Development of artificial diets for marine finfish larvae: problems and prospects. In: De Silva, S.S. (Ed), *Tropical Mariculture*. Academic Press, London, U.K., pp. 151–170.
- Spero H.J., Andreasen D.J., Sorgeloos E. (1993) Carbon and nitrogen isotopic composition of different strains of *Artemia* sp. *International Journal of Salt Lake Research* **2**, 133–139.
- Stenroth P., Holmqvist N., Nyström P., Berglund O., Larsson P., Granéli W. (2006) Stable isotopes as an indicator of diet in omnivorous crayfish (*Pacifastacus leniusculus*): the influence of tissue, sample treatment and season. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **63**, 821–831.
- Tieszen L.L., Boutton T.W., Tesdahl K.G., Slade N.A. (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oecologia* **57**, 32–37.
- Van der Zanden M.J., Hulshof M., Ridgway M.S., Rasmussen J.B. (1998) Application of stable isotope techniques to trophic studies of age-0 smallmouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society* **127**, 729–739
- Verschoor A.M., Boonstra H., Meijer T. (2005) Application of stable isotope tracers to studies of zooplankton feeding, using the rotifer *Brachionus calyciflorus* as an example. *Hydrobiologia*, **546**, 535–549.
- Villamar D.E., Langdon C.J. (1993) Delivery of dietary components to larval shrimp (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. *Marine Biology* **115**, 635–642.
- Yokoyama H., Abo K., Ishihi Y. (2006) Quantifying aquaculture-derived organic matter in the sediment in and around a coastal fish farm using stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Aquaculture* **254**, 411–425.
- Yokoyama H., Tamaki A., Harada K., Shimoda K., Koyama K., Ishihi Y. (2005) Variability of diet tissue isotopic fractionation in estuarine macrobenthos. *Marine Ecology Progress Series* **296**, 115–128.

Yoshioka T. Wada E., Hayashi H. (1994) A stable isotope study on seasonal food web dynamics in a eutrophic lake. *Ecology* **75**, 835-846.