

# El Isótopo $^{15}\text{N}$ como Indicador de la Asimilación del Nitrógeno de la Dieta en Rotíferos y Copépodos Utilizados como Alimento vivo en la Acuicultura

José Cristóbal Román Reyes, Gustavo Alejandro Rodríguez Montes de Oca

Cuerpo Académico: Desarrollo sustentable en sistemas acuáticos

Laboratorio de reproducción y cultivo de peces. Facultad de Ciencias del Mar - Universidad Autónoma de Sinaloa. Paseo Claussen S/N, Colonia los Pinos. Mazatlán, Sinaloa, México. C.P.

82000. Tel./Fax 01 669 9828656. E-mail: jocrore@gmail.com

---

## Resumen

Los requerimientos nutricionales de rotíferos y copépodos cultivados en condiciones controladas aún no son bien entendidos, debido a la incertidumbre en la cuantificación del consumo y la asimilación del alimento, utilizando métodos indirectos. La adopción de la técnica de isótopos estables enriquecidos, como una medida directa de la asimilación de nutrientes en rotíferos y copépodos, ha demostrado ser viable para determinar la asimilación de nutrientes de diferentes tipos de alimento. El objetivo del presente trabajo es determinar la asimilación de nitrógeno en el rotífero *Brachionus plicatilis* y el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*, alimentados con las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Isochrysis* sp. y *Thalassiosira weissflogii*, utilizando el  $^{15}\text{N}$  enriquecido como trazador.

Los rotíferos y copépodos fueron obtenidos del CIAD-Mazatlán, mientras que las cepas de microalgas provienen del laboratorio de cultivos de apoyo de la FACIMAR-UAS-Mazatlán. Las microalgas fueron enriquecidas, reemplazando el 20% del  $\text{Na}^{14}\text{NO}_3$  de la formulación F, por  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  enriquecido con el 98% de átomos de  $^{15}\text{N}$  (Sigma Aldrich Co. USA). Durante los experimentos, los rotíferos y copépodos se aclimataron al tipo y concentración de la microalga sin enriquecer, por al menos una hora, en volúmenes de 12 L y concentraciones de 200 rotíferos y cuatro copépodos por mL, respectivamente. Posteriormente, los rotíferos o copépodos se transfirieron a recipientes de 12 L con la microalga enriquecida con  $^{15}\text{N}$ , previamente tamizados y lavados con agua filtrada a 0.2  $\mu\text{m}$ . A continuación, se procedió a tomar muestras con volúmenes de 300 mL, a intervalos de tiempo consecutivos, durante cuatro horas en el caso de los rotíferos, y 13 horas para los copépodos. Durante cada extracción, los organismos experimentales fueron inactivados con agua carbonatada y consecuentemente concentrados y conservados a  $-80^\circ\text{C}$ , para su posterior liofilización. Una vez liofilizadas, las muestras fueron homogenizadas y empacadas (1 mg) en cápsulas de estaño, y enviadas al

laboratorio de isótopos estables de la Universidad de California, Davis, USA, para su análisis. Para cada tratamiento experimental con tres repeticiones, la tasa de asimilación de nitrógeno (%N corporal por hora); se determinó mediante el producto de la pendiente de la regresión lineal (de la relación entre el incremento del  $^{15}\text{N}$  átom% con respecto al tiempo) con el recíproco del  $^{15}\text{N}$  átom % de la microalga marcada, y el resultado multiplicado por cien.

Los resultados indicaron que los rotíferos tuvieron tasas de asimilación de nitrógeno con valores de 2.57, 3.42 y 1.41 %N corporal·hora<sup>-1</sup>, cuando fueron alimentados con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., respectivamente. En este mismo orden, los copépodos en los estadios nauplios+copepoditos combinados registraron tasas de asimilación de 2.06, 3.37 y 1.79 %N corporal·hora<sup>-1</sup>, mientras que en los copépodos adultos fueron de 0.81, 1.84 y 1.64 %N corporal·hora<sup>-1</sup>, para cada microalga respectivamente. Las fluctuaciones en los valores de la tasa de asimilación de nitrógeno en rotíferos y copépodos fueron atribuidas a las características estructurales y bioquímicas de las dietas, así como a la historia de alimentación y el estado nutricional de los animales experimentales. La técnica del  $^{15}\text{N}$  enriquecido mostró ser reproducible y eficaz para definir la significancia de la asimilación del nitrógeno de la dieta, por rotíferos y copépodos. Los valores mayores de la asimilación de nitrógeno con periodos cortos de asimilación, obtenidos con la microalga *Nannochloropsis* sp., confirman los buenos resultados que se tienen al utilizarla como alimento en los cultivos de rotíferos y copépodos.

Palabras clave:  $^{15}\text{N}$ , isótopos, asimilación, rotíferos, copépodos.

Roman, C. 2013. El Isótopo  $^{15}\text{N}$  como Indicador de la Asimilación del Nitrógeno de la Dieta en Rotíferos y Copépodos Utilizados como Alimento vivo en la Acuicultura. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 599-632.

## Introducción

El éxito del cultivo larvario de peces marinos está condicionado a la producción de alimento vivo para la primera alimentación, lo cual constituye uno de los principales obstáculos para el escalamiento productivo comercial de varias especies con potencial acuícola. Los nauplios de *Artemia*, los rotíferos *Brachionus plicatilis* y *Brachionus rotundiformis*, y los copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* y *Tizbe monozota* son los tipos de alimento vivo del zooplancton más utilizados en el noroeste de México para alimentar larvas de peces marinos (Puello-Cruz *et al.*, 2006). Son organismos marinos predominantemente herbívoros, que durante los cultivos se alimentan generalmente de las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Isochrysis* sp., *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp., *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp. y *Rhodomonas* sp. (Wikfors y Ohno, 2001), las cuales transfieren, a través del alimento vivo zooplanctónico, los nutrientes necesarios para obtener mayores supervivencias y mejorar el desarrollo de las larvas; en consecuencia, es necesario conocer las características bioquímicas de los rotíferos y copépodos cultivados con distintas fuentes de alimento y cuantificar la transferencia de nutrientes para entender su función fisiológica, el metabolismo y su valor nutritivo, los cuales son relevantes para la transferencia de energía y la producción secundaria.

Sin embargo, los requerimientos nutricionales de rotíferos y copépodos cultivados en condiciones controladas aún no son bien entendidos, debido a la incertidumbre en la cuantificación del consumo, la asimilación y la transferencia de nutrientes de distintas dietas, utilizando métodos indirectos. Los métodos comunes cuantifican, mediante el balance de masas, la diferencia entre el total de nutrientes ingeridos en la dieta y los que son expulsados posteriormente como desecho metabólicos (Abou Debs, 1984; Nagata, 1989; Tanaka, 1991) y la utilización de partículas inertes para medir la selectividad y la digestibilidad de la dieta (Vadstein *et al.*, 1993; Ronneberger, 1998; Baer *et al.*, 2008). Peters (1984) revisa y discute algunos métodos indirectos utilizados en la época para determinar la ingestión y la asimilación de las dietas por especies del zooplancton, mientras que Verschoor *et al.* (2005) refiere los métodos directos desarrollados recientemente para estudiar la alimentación del zooplancton, incluyendo la técnica de los isótopos estables. La

adopción de la técnica de isótopos estables constituye una medida directa de la asimilación de nutrientes en rotíferos y copépodos, y ha demostrado ser viable para determinar la incorporación de nutrientes de diferentes tipos de alimento (Aoki *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2004; Verschoor *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2007; Loick-Wilde *et al.*, 2012).

En particular, el valor nutricional de las proteínas de la dieta de los animales está relacionado con su habilidad para obtener los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos para el crecimiento y mantenimiento (Rennie *et al.*, 1994). Esta habilidad está relacionada con la digestibilidad de las proteínas y con el metabolismo subsecuente de los aminoácidos absorbidos. La calidad de las proteínas de la dieta es clásicamente investigada llevando a cabo estudios de largo plazo del balance de nitrógeno de los animales, proporcionando diferentes niveles de proteínas en la dieta (Braude *et al.*, 1970; Alm, 1981). Una técnica reciente para estimar la retención de nitrógeno, es el uso de dietas marcadas con  $^{15}\text{N}$ , lo cual hace posible seguir el destino metabólico del nitrógeno de la dieta en el corto plazo.

Lo anterior es especialmente relevante debido a que es importante comprender el ciclo del nitrógeno en los sistemas acuícolas, puesto que éstos están diseñados para mantener una capacidad de carga biológica alta en espacios relativamente pequeños (Twarowska *et al.*, 1997), lo cual ocasiona el rápido deterioro de la calidad del agua, debido a la acumulación de alimento no consumido y a que los organismos cultivados liberan una gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos a través de las heces y la excreción; entonces, el rendimiento y la eficiencia de un sistema acuícola puede ser evaluado a través del análisis de la conversión de nitrógeno a biomasa animal. Existe información limitada sobre la eficiencia con que los rotíferos y copépodos retienen nitrógeno, así como el efecto de los niveles de nitrógeno de la dieta sobre la calidad del agua de los cultivos. El nitrógeno (proteína) de la dieta que no es retenida por los rotíferos o copépodos, es excretado como desechos sólidos (material fecal y alimento no consumido) o como nitrógeno inorgánico, principalmente en forma de amonio. Ambas formas son agregadas a la descarga total en el sistema de cultivo, causando el detrimento del ambiente de cultivo.

En consecuencia, el presente trabajo hace una revisión del estado del arte y se aportan resultados relevantes de nuestras investigaciones en el tema, con énfasis en el potencial de los isótopos estables de nitrógeno enriquecidos para evaluar la asimilación de nitrógeno en dos especies del zooplancton, utilizados ampliamente como alimento vivo en la larvicultura marina del noroeste de México, el rotífero *Brachionus plicatilis* y el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*, alimentados con las microalgas *Nannochloropsis* sp., *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis* sp., enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ .

## Estado del arte

Los átomos de un mismo elemento que difieren en su masa atómica son llamados isótopos y las diferencias en la masa de los isótopos es debido a que poseen diferente número de neutrones en sus núcleos. Los isótopos estables de carbono ( $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ ) son los más utilizados en los estudios biológicos, y como en la mayoría de los elementos, tienen isótopos estables naturales donde generalmente los más abundantes son los más livianos ( $^{12}\text{C}$ : 98.89% y  $^{14}\text{N}$ : 99.63 %), de tal manera que el porcentaje de abundancia natural de los más pesados,  $^{13}\text{C}$  y el  $^{15}\text{N}$ , es de 1.11 y 0.37 % respectivamente.

La composición de los isótopos estables de una muestra son determinados en un espectrómetro de masas y los resultados de los estudios biológicos utilizando trazadores isotópicamente enriquecidos son reportados en unidades de porcentaje de átomos (átom %), lo cual indica el número absoluto de átomos de un determinado isótopo en 100 átomos totales en el elemento; mientras los estudios que analizan los isótopos estables cercanos a sus niveles de abundancia natural son reportados en unidades delta ( $\delta$ ), un valor dado en partes por mil (‰) que indica una medida relativa de la desviación de la razón absoluta (ejem.  $\delta^{15}\text{N} = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$ ) de los isótopos estables de la muestra y de un estándar de referencia, que en el caso del carbono es una piedra caliza del cretácico llamada Peedee Belemnita (VPDB) u otros equivalentes, mientras que para el nitrógeno es el nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) (Owen, 1987). La transformación de los valores absolutos (átom %) a valores delta relativos (con respecto a un estándar de referencia) se realiza porque las diferencias absolutas de la abundancia natural de las razones isotópicas entre el estándar y la muestra son muy pequeñas, y aparecen valores en la tercera o cuarta posición decimal si se reportan en unidades de átom %.

Durante los procesos enzimáticos de las reacciones biológicas se presenta la discriminación diferencial de los isótopos pesados (fraccionación isotópica) debido a que los isótopos livianos de un elemento reaccionan a una tasa mayor que los isótopos pesados, de tal manera que el producto de la reacción esta disminuido en el isótopo pesado en relación al

reactante (Peterson y Fry, 1987). Por ejemplo, durante las funciones metabólicas el  $^{14}\text{N}$  es excretado a una mayor tasa que  $^{15}\text{N}$ , lo cual incrementa el  $^{15}\text{N}$  en las proteínas contenidas en los tejidos, debido a la excreción preferencial de  $^{14}\text{N}$ , cuando el animal está en el proceso de degradación de las proteínas. Considerando éstas propiedades, junto con la posibilidad de que los átomos pueden ser enriquecidos con isótopos estables pesados, los cuales pueden ser incorporados en las moléculas para ser utilizados como trazadores, la técnica ha resultado excepcionalmente útil para estudiar los flujos de nutrientes en los sistemas biológicos (Boschker y Middelburg, 2002).

La literatura señala la proliferación de estudios que utilizan a los isótopos estables enriquecidos como marcadores para estudiar el consumo de alimento, la digestión, absorción y la utilización de nutrientes de especies importantes en la acuicultura (Aoki *et al.*, 1995; Kreeger *et al.*, 1996; Preston *et al.*, 1996; Schlechtriem *et al.*, 2004, Saavedra *et al.*, 2007; Comtet y Riera, 2006). En particular, Aoki *et al.* (1995); Hino *et al.* (1997); Hasegawa *et al.* (2001); Cheng *et al.* (2004), Vincent *et al.* (2007) y Loick-Wilde *et al.* (2012) ya han utilizado el isótopo estable de nitrógeno ( $^{15}\text{N}$ ) enriquecido para estudiar el destino del nitrógeno en algunas especies del zooplancton marino. Aoki *et al.* (1995), Bakonyi (1998), Verschoor *et al.* (2005) y Vincent *et al.* (2007) han desarrollado métodos de cálculo para la determinación de las tasas de ingestión, asimilación y producción con isótopos estables como marcadores, mientras que Otsuki *et al.* (1987) propusieron un método basado solamente en la determinación de la razón isotópica de la muestra para estimar la tasa de crecimiento relativo de anfípodos. En general, esta técnica ha sido de gran ayuda para mejorar el conocimiento de la fisiología nutricional de varios grupos taxonómicos con potencial acuícola (Conceição *et al.*, 2007).

La asimilación y el flujo de nitrógeno de algunas especies de copépodos fueron estudiados por Abou Debs (1984), Hasegawa *et al.* (2001), Vincent *et al.* (2007) y Loick-Wilde *et al.* (2012). Hasegawa *et al.* (2001) utilizaron el  $^{15}\text{N}$  para evaluar la eficiencia en la acumulación de nitrógeno por los copépodos *Acartia* sp., *Pseudocalanus* sp. y *Paracalanus* sp., alimentados con plancton natural para estimar el nitrógeno liberado al medio como nitrógeno disuelto. Dichos autores señalaron que en muchas ocasiones los copépodos

transfirieron al ambiente una gran cantidad de nitrógeno disuelto (entre el 25 y 91% del nitrógeno ingerido), a través de la excreción y la ruptura de las células algales por las piezas bucales de los copépodos (sloppy feeding), mientras que muy poco nitrógeno fue acumulado, indicando la presencia de dietas (microalgas) de mala calidad que disminuyeron la producción de huevos y la tasa de eclosión de los copépodos.

Vincent *et al.* (2007) también utilizaron el  $^{15}\text{N}$  para estimar la cantidad de nitrógeno de la dieta que es incorporado en los copépodos para propósitos de crecimiento, mantenimiento y reproducción (incorporación neta) y la cantidad total de nitrógeno ingerido y la fracción que se pierde al medio (incorporación bruta). Utilizando las especies de copépodos *Acartia discaudata* y *Calanus helgolandicus*, encontraron que sólo 1/3 del nitrógeno ingerido se incorporó en el nitrógeno corporal de los copépodos y ambas especies contribuyeron altamente en la producción total de nitrógeno orgánico disuelto a través de la excreción de amonio (con el 79 y 64% respectivamente) y la alimentación sloppy (20.9 y 35.7% respectivamente). Las diferencias en el patrón de utilización del nitrógeno entre ambas especies, también fueron explicadas en términos de la calidad de las dietas suministradas durante los experimentos, así como al tamaño diferencial en ambas especies de copépodos. Similarmente, Loick-Wilde *et al.* (2012) estudiaron la incorporación de nitrógeno en el copépodo *Eurytemora affinis* alimentado con la microalga *Rhodomonas salina* y una cianobacteria enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ , reportando resultados de la tasa de incorporación de nitrógeno similares a los obtenidos por Hasegawa *et al.* (2001) y Vincent *et al.* (2007).

La asimilación y el flujo de nitrógeno de rotíferos fue estudiado por Nagata (1989), Tanaka (1991) y Aoki *et al.* (1995) utilizando distintas técnicas. Los dos primeros trabajos fueron realizados para explicar los repentinos colapsos durante los cultivos de rotíferos utilizando el balance de masas del nitrógeno, mientras que Aoki *et al.* (1995) fue realizado para probar el uso del  $^{15}\text{N}$  como trazador para medir el balance de nitrógeno de rotífero. Nagata (1989) encontró que el rotífero alimentado con *Chlorella* asimiló el 83% del nitrógeno ingerido, mostrando que el 66.3% de nitrógeno asimilado fue utilizado para el crecimiento y la reproducción. También señala que mientras el nitrógeno particulado no puede ser

reutilizado, el nitrógeno disuelto fue remineralizado totalmente por la microalga *Chlorella*. Contrariamente, Tanaka (1991) reportó que un gran porcentaje (76.5%) del nitrógeno ingerido por los rotíferos es transferido al agua, lo cual puede ser causa de su deterioro, y consecuentemente puede influenciar directa o indirectamente el crecimiento de la población de rotíferos durante los cultivos. Aoki *et al.* (1995) señalaron que el 77.2% del nitrógeno ingerido por los rotíferos fue transferidos al agua de cultivo a través de las heces. El 23.5% del nitrógeno asimilado fue utilizado por la excreción, mientras que el 76.5% fue utilizado para el crecimiento y la reproducción. Sugieren que la técnica del  $^{15}\text{N}$  como trazador puede ser utilizada para medir los requerimientos de nitrógeno por especies del zooplancton.

## **Materiales y métodos**

### ***Origen y producción de los organismos experimentales***

Los rotíferos y copépodos fueron obtenidos del CIAD-Mazatlán, mientras que las cepas de microalgas provienen del laboratorio de cultivos de apoyo de la FACIMAR-UAS-Mazatlán. Las microalgas *Isochrysis sp.*, *Thalassiosira weissflogii* y *Nannochloropsis sp.* fueron cultivadas con la técnica semicontinua en garrafones de plástico transparentes con 16 litros de medio de cultivo. Diariamente se realizaron diluciones del 50 % en todos los casos, reponiendo el volumen cosechado con medio fresco. Los cultivos de microalgas se realizaron con agua de mar a 25 °C, con iluminación continua y con aireación profusa para la agitación de los cultivos. Se realizaron conteos de las mezclas obtenidas de las cosechas diarias de microalgas con la ayuda de un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad equipado con reglilla de Neubauer, que fue utilizado para verificar la estabilidad de los cultivos y para calcular el volumen de cada mezcla a emplearse para la alimentación de los rotíferos.

Para la producción de rotíferos se utilizaron seis recipientes transparentes con volumen de 12 litros. La temperatura y salinidad se mantuvieron constantes a 29 °C y 35 ups, respectivamente y el pH se mantuvo entre 7.8 y 8.4 para evitar el estrés causado por este factor durante los cultivos. Las raciones de alimentación durante los cultivos de

mantenimiento y durante los experimentos fueron las recomendadas por (Hino *et al.*, 1997) para *Nannochloropsis* sp. ( $6 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> y no menor de  $3 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>) para una concentración de 200 rot·mL<sup>-1</sup>. Se determinó el contenido orgánico unitario de *Nannochloropsis* sp. y del resto de las especies de microalgas; posteriormente se obtuvieron las equivalencias en biomasa orgánica ( $33.9 \times 10^6$  pg·mL<sup>-1</sup>) para las cuatro microalgas, relativas a la microalga *Nannochloropsis* sp., de esta manera los rotíferos recibieron en su alimentación las mismas raciones en términos de biomasa orgánica. Se verificó la concentración de rotíferos presentes en cada recipiente, realizando conteos diarios con la ayuda de una cámara de Sedgwick-Rafter.

Los cultivos de copépodos se realizaron en las mismas condiciones que para los rotíferos, sólo que las raciones de alimentación fueron las recomendadas por Teixeira *et al.* (2010) y consistieron en agregar una concentración diaria de 20,000 y 320,000 cél·mL<sup>-1</sup> de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis* sp., respectivamente, mientras que la ración de alimentación de la microalga *Nannochloropsis* sp., fue de 1,170,000 cél·mL<sup>-1</sup> y se determinó en función de la equivalencia en biomasa orgánica (PO) de las microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis* sp. La biomasa orgánica de *T. weissflogii*, *Isochrysis* sp., y *Nannochloropsis* sp., fueron de 327.24, 20.77 y 5.65 pg·cél<sup>-1</sup>, de tal manera que los copépodos recibieron en su alimentación un equivalente de 6.6 µgPO·mL<sup>-1</sup> correspondiente a cada una de las concentraciones señaladas para cada especie de microalga.

### ***Determinación de la biomasa seca y orgánica de rotíferos y copépodos***

La biomasa seca y orgánica de rotíferos y copépodos se determinó utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 47 mm de diámetro, previamente secados a 450 °C y calibrados en una balanza analítica semimicro con precisión de lectura de 0.01 mg. Las muestras filtradas con una concentración conocida, fue lavada con formiato de amonio para eliminar las sales. La muestra secada a 60 °C en una estufa fue llevada a biomasa seca constante, posteriormente fueron incineradas por 12 horas en una mufla a 450 °C para obtener la cantidad de cenizas y finalmente por diferencia entre la biomasa seca total y de cenizas se calculó el contenido orgánico de cada muestra de acuerdo a Sorokin (1973).

### **Enriquecimiento de microalgas con $^{15}\text{N}$**

En la preparación del medio de cultivo se utilizó la formulación F (Guillard y Ryther, 1962) reemplazando el 20% de  $\text{Na}^{14}\text{NO}_3$  por  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  (enriquecido con el 98 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ , Sigma Aldrich Co. USA) para lograr la señal más fuerte posible en un tiempo de cultivo de 48 horas, después del inicio del enriquecimiento, la cual es el tiempo de cosecha programada en base a experimentos preliminares que indicaron que es el tiempo que se ajusta para obtener la cantidad de biomasa necesaria para alimentar a rotíferos y copépodos durante los experimentos. Los cultivos de microalgas enriquecidas se realizaron en contenedores plásticos de tereftalato de polietileno (PET) transparentes con volumen de tres litros.

### **Enriquecimiento de rotíferos y copépodos con $^{15}\text{N}$**

Durante los experimentos, los rotíferos primeramente se aclimataron al tipo y concentración de la microalga sin marcar por al menos una hora, en volúmenes de 12 litros y concentraciones de 200 rotíferos por mililitro. Posteriormente, los rotíferos se transfirieron al alimento enriquecido con  $^{15}\text{N}$ , previamente tamizados y lavados con agua filtrada a 0.2  $\mu\text{M}$  para eliminar cualquier remanente de la microalga sin marcar.

Con respecto a los copépodos, antes de iniciar los experimentos, éstos fueron separados mediante el tamizado con luz de malla de 300 micras para separar los estadios adultos de la combinación de los estadios de nauplios+copepoditos. La separación se argumenta en el hecho de que a diferencia de los copépodos menores de 300  $\mu\text{m}$ , los copépodos mayores de 300  $\mu\text{m}$  se encuentran en periodo de reproducción y en la formación de sacos ovígeros por las hembras (Flores Santana, 2008), por lo que se pretende separar este efecto para observar las diferencias en la asimilación de nitrógeno debido a la producción de huevos ( $>300 \mu\text{m}$ ) y al crecimiento somático ( $<300 \mu\text{m}$ ) (Vincent *et al.*, 2007). Posteriormente, los copépodos se aclimataron al tipo y concentración de la microalga experimental sin marcar por al menos una hora, en volúmenes de 12 litros y concentraciones de 4 copépodos por mililitro. Inmediatamente después, los copépodos se transfirieron a la microalga enriquecida con  $^{15}\text{N}$ , previamente tamizados y lavados con agua filtrada a 0.2  $\mu\text{M}$  para eliminar cualquier remanente de la microalga sin marcar.

Para rotíferos y copépodos, se realizaron tres repeticiones por tratamiento manteniendo la salinidad en 35‰ y la temperatura a 29°C utilizando calentadores termorregulados en los recipientes experimentales. Las raciones de alimentación para ambas especies fueron las descritas previamente.

### **Obtención de muestras para determinar de la tasa de asimilación de nitrógeno**

Los rotíferos transferidos a la microalga enriquecida con  $^{15}\text{N}$ , fueron muestreados consecutivamente por 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 horas, mientras que para los copépodos se realizaron muestreos cada hora, durante 13 horas, después de su transferencia a la microalga enriquecida con  $^{15}\text{N}$ . Para ambas especies se tomaron volúmenes de 300 mL, permitiendo evacuar el contenido estomacal por 30 minutos en una suspensión de agua filtrada a 0.2  $\mu\text{M}$ . El tiempo cero corresponde al  $^{15}\text{N}$  átomo % de los rotíferos alimentados con la microalga sin marcar. Posteriormente, los organismos se concentraron, se inactivaron con agua carbonatada y se almacenaron en frascos de vidrio de 5 ml y se colocaron en un ultra congelador a -80°C.

## Preparación de las muestras y determinación de los Isótopos estables de nitrógeno.

El procedimiento de preparación de la muestra se realizó en el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo para la Acuicultura, de la Facultad de Ciencias del Mar. Inicialmente, las muestras colectadas fueron colocadas en frascos de 5 mL, posteriormente ultra congeladas (-80°C) y liofilizadas (-46°C a -50°C y 55 MBR de presión durante 24 horas). A continuación fueron sometidas al proceso de homogeneización en morteros de ágata. Las muestras homogeneizadas se pesaron (aprox. 1 mg) en una balanza analítica Denver Instrument con precisión de  $\pm 0.01$  mg, se empacaron en cápsulas de estaño y se almacenaron en cajas de plástico de 96 pocillos con identificación bidimensional y posteriormente fueron enviadas para su análisis al laboratorio de isótopos estables de la Universidad de California, Davis, U.S.A.

La razón de isótopos estables de nitrógeno fueron determinados utilizando un espectrómetro de masas de flujo continuo Europa 20-20 (PDZ Europa Ltd. Sandbach, UK), después de la combustión (a 1000°C) y transformación de la muestra a N<sub>2</sub> en el analizador elemental C-N (PDZ Europa, ANCA-GSL) conectado al espectrómetro de masas. Los gases fueron separados en una columna (Carbosieve Gas Column, Supelco, Bellefonte, PA, USA) antes de ser inyectados al espectrómetro de masas. Los valores isotópicos fueron expresados en porcentaje de átomos de <sup>15</sup>N, mediante la ecuación:

$$^{15}\text{N átom \%} = \frac{^{15}\text{N}_2}{^{15}\text{N}_2 + ^{14}\text{N}_2}$$

Donde <sup>15</sup>N y <sup>14</sup>N son el número de átomos de <sup>15</sup>N y <sup>14</sup>N en el gas de nitrógeno generado por combustión de la muestra en el espectrómetro de masas. Adicionalmente, junto con los valores de <sup>15</sup>N también se obtuvo el contenido de nitrógeno y de carbono de las muestras, los cuales fueron medidos en el analizador elemental acoplado al espectrómetro de masas, y fueron utilizados para evaluar los cambios en la composición de nitrógeno dentro del periodo de incubación experimental

## Determinación de la tasa de asimilación de nitrógeno por rotíferos y copépodos

El nitrógeno asimilado por el rotífero fue calculado mediante la ecuación empleada por Aoki *et al.* (1995).

$$\frac{A}{W_b} = \left( \frac{I_t - I_o}{t} \right) \left( \frac{1}{I_f} \right) * 100$$

El primer miembro de la igualdad denota el nitrógeno asimilado (% N corporal por hora); el primer término del segundo miembro proporciona la tasa de incremento de la razón  $^{15}\text{N}$  átom % con respecto al tiempo  $t$ , la cual es obtenida por la pendiente ( $b$ ) de la regresión lineal simple  $^{15}\text{N} = a - bt$ .  $I_t$ ,  $I_o$ , e  $I_f$  son  $^{15}\text{N}$  átom % del rotífero alimentado con la microalga marcada por  $t$  horas,  $^{15}\text{N}$  átom % de los rotíferos al tiempo cero y  $^{15}\text{N}$  átom % de la microalga marcada respectivamente. La tasa de asimilación de nitrógeno se obtiene mediante el producto de la pendiente ( $b$ ) de la regresión lineal simple x el recíproco de la microalga marcada con  $^{15}\text{N} \times 100$ .

## Procesamiento y análisis estadístico de los datos.

Los datos fueron procesados mediante las técnicas de análisis de regresión lineal y las tasas de asimilación fueron comparadas utilizando el análisis de varianza de un factor (Zar, 1999). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Descripción de la biomasa seca y orgánica unitaria, contenido de nitrógeno y carbono de las microalgas experimentales y la ración diaria de nitrógeno en la alimentación de rotíferos y copépodos.

Los datos describen diferencias importantes en los promedios de la biomasa seca (PSU) y orgánica (POU) unitaria de las tres especies de microalgas utilizadas como alimento (Tabla 1). *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. presentaron un PSU promedio de 535.21, 10.16 y 39.23  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ , respectivamente; mientras que el POU para *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. fue de 327.24, 5.65 y 20.77  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ , respectivamente. En lo que respecta al contenido elemental promedio de las microalgas, los datos mostraron que el contenido de nitrógeno en la biomasa seca de *T. weissflogii* fue de 20.16  $\text{pgN}\cdot\text{cél}^{-1}$ , mientras que las microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. mostraron valores de 0.31 y 1.24  $\text{pgN}\cdot\text{cél}^{-1}$ , respectivamente. El contenido de carbono también presentó una tendencia similar a la del nitrógeno, debido probablemente a las diferencias en el tamaño (en términos de peso seco) de las microalgas experimentales. El valor registrado por la microalga *T. weissflogii* fue de 173.63  $\text{pgC}\cdot\text{cél}^{-1}$ , mientras que la microalga *Nannochloropsis* sp. registró un valor de 2.43  $\text{pgC}\cdot\text{cél}^{-1}$ . En la microalga *Isochrysis* sp. el contenido de C registró un valor de 9.56  $\text{pgC}\cdot\text{cél}^{-1}$ . Los datos de la tabla 1 también muestran que, aunque las raciones de alimentación de las microalgas experimentales se estandarizaron en términos de la biomasa orgánica, el contenido de nitrógeno en las raciones de alimentación de copépodos y rotíferos fue muy similar, por lo que también pueden considerarse equivalentes en términos de nitrógeno dietético.

La figura 1 muestra la razón carbono:nitrógeno (C:N) de las microalga experimentales. Los valores fueron de 7.71, 7.84 y 8.61 para las microalgas *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp. y *T. weissflogii*, respectivamente. La falta de diferencias entre las microalgas, indica que la razón C:N se mantuvo estable durante el proceso experimental.

### Enriquecimiento de las microalgas experimentales con $^{15}\text{N}$ .

La figura 2 muestra que el enriquecimiento de las microalgas después de 48 horas de cultivo fue de gran magnitud, con valores que fueron de 0.37 a 21.50  $^{15}\text{N}$  átom% en la microalga *T. weissflogii*, mientras que los valores registrados para la microalga *Isochrysis* sp., fueron desde 0.37 a 21.23  $^{15}\text{N}$  átom%. En *Nannochloropsis* sp., éstos valores fueron desde 0.38  $^{15}\text{N}$  átom% a 17.53  $^{15}\text{N}$  átom%. La magnitud del enriquecimiento isotópico registrado, sustentan el supuesto básico en la utilización de la técnica para determinar la incorporación directa de nutrientes en los organismos, la cual indica que para que esta sea efectiva las dietas deben ser isotópicamente distintas.

Tabla 1. Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa orgánica unitaria (POU), composición química elemental y la ración de alimentación diaria suministrada a rotíferos y copépodos, en términos de concentración celular y nitrógeno total, de las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

	Microalga		
	Thala	Nanno	Isoch
PSU (pg.cél <sup>-1</sup> )	535.21±69.34	10.16±3.69	39.23±3.69
POU (pg.cél <sup>-1</sup> )	327.24±47.29	5.65±1.32	20.77±1.32
C (pg.cél <sup>-1</sup> )	173.63±3.17	2.43±0.31	9.56±3.03
N (pg.cél <sup>-1</sup> )	20.16±3.17	0.31±0.09	1.24±0.42
Rotífer: Ración diaria (cél.mL <sup>-1</sup> )	103,500	6,000,000	1,630,000
Rotífer: Ración de N (µg.mL <sup>-1</sup> )	2.09	1.86	2.02

Cópepod: Ración diaria (cél.mL <sup>-1</sup> )	20,000	1,170,000	320,000
Cópepod: Ración de N (μg.mL <sup>-1</sup> )	0.40	0.36	0.40

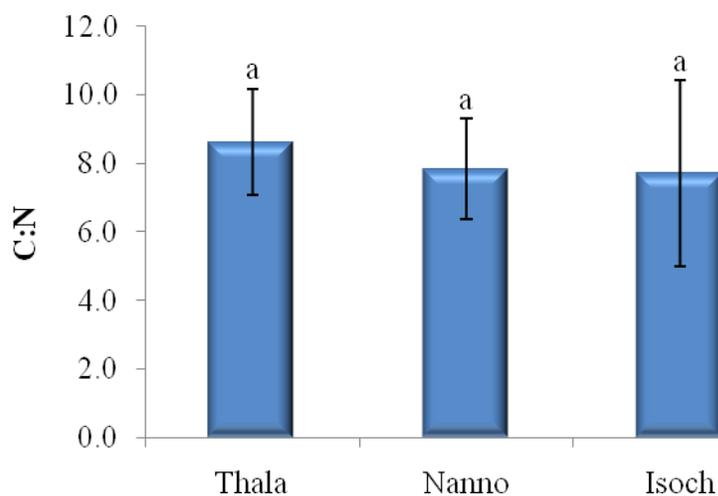


Figura 1. Valores promedio de la razón C:N de las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

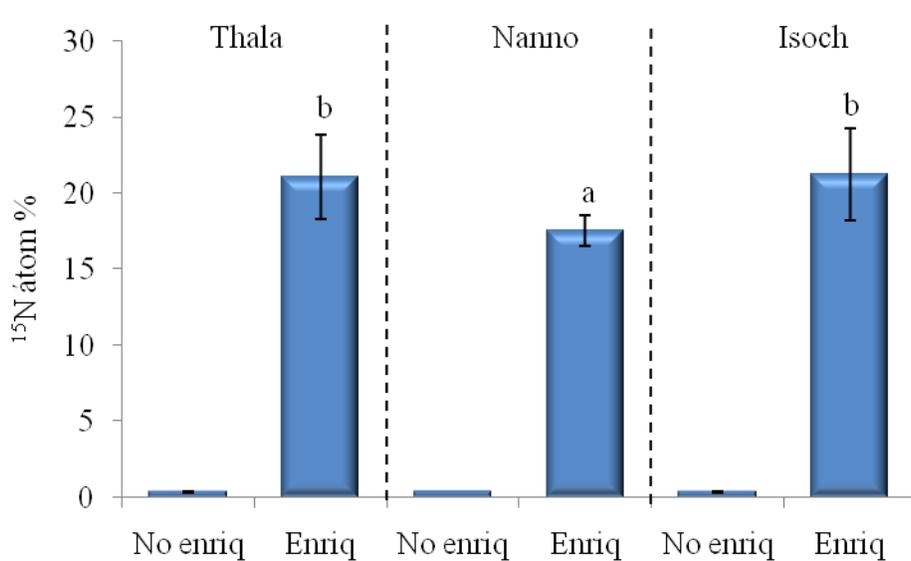


Figura 2. Firmas isotópicas (<sup>15</sup>N) de las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch), antes y después de ser enriquecidas con <sup>15</sup>N durante 48 horas de cultivo.

**Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa orgánica unitaria (POU), contenido de nitrógeno (N), contenido de carbono (C) y la razón C:N de rotíferos y copépodos alimentado con las microalgas experimentales**

La tabla 2 indica que la PSU del rotífero cuando se alimentó con *T. weissflogii* fue de  $0.602 \mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$ , mientras que con las microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., fue de  $0.431$  y  $0.316 \mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$ , respectivamente. La POU de los rotíferos fue de  $0.419$ ,  $0.294$  y  $0.242 \mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$  cuando se alimentaron de manera respectiva con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. En lo que respecta al contenido de nitrógeno, el mayor valor se encontró en los rotíferos alimentados con la microalga *Isochrysis* sp. ( $24.26 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$ ), pero no fue diferente al registrado con *Nannochloropsis* sp. ( $23.37 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$ ) mientras que el valor más bajo se encontró cuando se alimentó con la microalga *T. weissflogii* ( $15.56 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$ ).

Los datos del contenido de carbono en los rotíferos reflejaron un comportamiento similar al contenido de nitrógeno, encontrando los valores mayores con las microalgas *Nannochloropsis* sp. ( $133.99 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$ ) e *Isochrysis* sp. ( $114.26 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$ ). Los rotíferos alimentados con la microalga *T. weissflogii* registraron un valor promedio ( $77.60 \text{ ng}\cdot\text{rot}^{-1}$ ), significativamente menor a los descritos anteriormente.

En lo que respecta a la razón C:N, los valores obtenidos no fueron diferentes entre tratamientos, con valores de  $4.99$ ,  $5.28$  y  $4.71$  para las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., respectivamente. En este sentido se puede observar que la razón C:N de las microalgas fueron mayores a los obtenidos con los rotíferos, esto nos indica que el contenido elemental de las microalgas experimentales, fueron insuficiente para que el rotífero obtenga los requerimientos necesarios de nitrógeno y carbono para realizar sus funciones biológicas.

Tabla 2. Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa orgánica unitaria (POU), contenido de carbono (C) y nitrógeno (N) y la razón C:N de rotíferos alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

	PSU	POU	C	N	
Microalga	$\mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{rot}^{-1}$	$\text{ng}\cdot\text{rot}^{-1}$	$\text{ng}\cdot\text{rot}^{-1}$	C:N
Thala	0.602 <sup>c</sup> $\pm 0.13$	0.419 <sup>b</sup> $\pm 0.08$	77.60 <sup>a</sup> $\pm 12.45$	15.56 <sup>a</sup> $\pm 3.27$	4.99 <sup>a</sup> $\pm 1.17$
Nanno	0.431 <sup>b</sup> $\pm 0.10$	0.294 <sup>a</sup> $\pm 0.07$	133.99 <sup>b</sup> $\pm 20.40$	23.37 <sup>b</sup> $\pm 5.63$	5.28 <sup>a</sup> $\pm 1.59$
Isoch	0.316 <sup>a</sup> $\pm 0.06$	0.242 <sup>a</sup> $\pm 0.09$	114.26 <sup>b</sup> $\pm 22.19$	24.26 <sup>b</sup> $\pm 5.91$	4.71 <sup>a</sup> $\pm 1.28$

En la tabla 3 se presenta la biomasa seca y orgánica promedio por organismo, de los copépodos en los estadios de nauplios+copepoditos mezclados, cuando fueron alimentados con las microalgas experimentales. Los nauplios+copepoditos alimentados con *T. weissflogii* registraron una biomasa seca unitaria de 1.68  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$  y de 2.03 y 1.33  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$  cuando se alimentaron con las microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. La biomasa orgánica unitaria de nauplios+copepoditos vario entre 1.0 y 1.29  $\mu\text{g}\cdot\text{cop}^{-1}$  sin mostrar diferencias entre los tratamientos. El contenido de nitrógeno para los nauplios+copepoditos combinados presentaron un contenido de nitrógeno de 155.96, 198.91 y 125.82  $\text{ngN}\cdot\text{cop}^{-1}$  para cuando fueron alimentados con *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., presentando con ésta última el valor significativamente menor. El contenido de nitrógeno fue significativamente mayor en los nauplios+copepoditos alimentados con *Nannochloropsis* sp. (846.90  $\text{ngC}\cdot\text{cop}^{-1}$ ), seguido en orden decreciente por los alimentados con *T. weissflogii* (717.22  $\text{ngC}\cdot\text{cop}^{-1}$ ) e *Isochrysis* sp. (524.52  $\text{ngC}\cdot\text{cop}^{-1}$ ). Se observa en la tabla 3, que la razón C:N fue muy homogénea en los nauplios+copepoditos alimentados con las tres microalgas, con valores que fluctuaron entre 4.17 y 4.60.

Tabla 3. Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa organica unitaria (POU), contenido de carbono (C) y nitrogeno (N) y la razón C:N de los copépodos en los estadios nauplios+copepoditos combinados, alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

	PSU	POU	C	N	C:N
Microalga	$\mu\text{g.cop}^{-1}$	$\mu\text{g. cop}^{-1}$	$\text{ng.cop}^{-1}$	$\text{ng.cop}^{-1}$	
Thala	1.68 <sup>a</sup> ± 0.59	1.01 <sup>a</sup> ± 0.38	717.22 <sup>b</sup> ±12.45	155.96 <sup>b</sup> ±18.11	4.60 <sup>a</sup> ±1.11
Nanno	2.03 <sup>b</sup> ± 0.08	1.29 <sup>b</sup> ± 0.09	846.90 <sup>c</sup> ±58.75	198.91 <sup>b</sup> ±23.06	4.26 <sup>a</sup> ±1.03
Isoch	1.33 <sup>a</sup> ± 0.10	1.00 <sup>a</sup> ± 0.10	524.52 <sup>a</sup> ±34.43	125.82 <sup>a</sup> ±10.67	4.17 <sup>a</sup> ±1.07

Los copépodos adultos registraron valores del PSU de 11.91, 8.43 y 7.15  $\mu\text{g.cop}^{-1}$ , con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., respectivamente (tabla 4). El PSU fue significativamente mayor cuando fueron alimentados con la microalga *T. weissflogii*. En lo que respecta a la POU, ésta fue mayor en los copépodos adultos alimentados con *T. weissflogii* (7.40  $\mu\text{g.cop}^{-1}$ ), mientras que fue significativamente menor (5.66  $\mu\text{g.cop}^{-1}$ ) con *Isochrysis* sp. Cuando fueron alimentados con *Nannochloropsis* sp. registraron un valor promedio de 6.67  $\mu\text{g.cop}^{-1}$  y no fue significativamente diferente de los obtenidos con *T. weissflogii* e *Isochrysis* sp. (tabla 4). El contenido de carbono fue diferente en los copépodos adultos alimentados con las tres microalgas, con valores en orden descendente de 5120.05, 3249.50 y 2434.82  $\text{ng.cop}^{-1}$  con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. El contenido de nitrógeno fue mayor (1068.09  $\text{ng.cop}^{-1}$ ) en los copépodos adultos alimentados con *T. weissflogii*, mientras que fueron menores y similares en los copépodos alimentados con *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp.

Con respecto a la razón C:N, los valores fluctuaron entre 3.08 y 4.79, con los copépodos alimentados con *Isochrysis* sp. presentando el menor valor (3.08), evidenciando un mayor

contenido de nitrógeno en los copépodos adultos alimentados con ésta microalga. Las diferencias en la razón C:N de los copépodos adultos alimentados con *T.weissflogii* y *Nannochloropsis* sp. no fueron significativas, con valores superiores (4.29 y 4.79) al registrado en los copépodos adultos alimentados con *Isochrysis* sp.

Tabla 4. Biomasa seca unitaria (PSU), biomasa organica unitaria (POU), contenido de carbono (C) y nitrogeno (N) y la razón C:N de los copépodos adultos, alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch).

	PSU	POU	C	N	
Microalga	$\mu\text{g.cop}^{-1}$	$\mu\text{g. cop}^{-1}$	$\text{ng.cop}^{-1}$	$\text{ng.cop}^{-1}$	C:N
Thala	11.91 <sup>b</sup> $\pm 1.49$	7.40 <sup>b</sup> $\pm 0.57$	5120.06 <sup>c</sup> $\pm 416.59$	1068.09 <sup>b</sup> $\pm 91.43$	4.79 <sup>b</sup> $\pm 1.00$
Nanno	8.43 <sup>a</sup> $\pm 0.72$	6.67 <sup>ab</sup> $\pm 0.22$	3249.50 <sup>b</sup> $\pm 151.23$	757.40 <sup>a</sup> $\pm 75.80$	4.29 <sup>b</sup> $\pm 1.07$
Isoch	7.15 <sup>a</sup> $\pm 0.36$	5.66 <sup>a</sup> $\pm 0.32$	2434.82 <sup>a</sup> $\pm 107.21$	789.51 <sup>a</sup> $\pm 67.15$	3.08 <sup>a</sup> $\pm 0.96$

### Enriquecimiento de rotíferos y copépodos con <sup>15</sup>N.

La figura 3 muestra la composición isotópica (<sup>15</sup>N átom%) de los rotíferos alimentados con *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. enriquecidas con <sup>15</sup>N. La figura indica que hubo una tendencia a aumentar los valores del <sup>15</sup>N cuando los rotíferos fueron alimentados con la microalga enriquecida. En el caso de *T. weissflogii* fue desde 0.38 a 1.44 <sup>15</sup>N átom%, para *Nannochloropsis* sp. de 0.34 a 1.27 <sup>15</sup>N átom% y para *Isochrysis* sp. de 0.37 a 0.97 <sup>15</sup>N átom%). El enriquecimiento con <sup>15</sup>N de los nauplios+copépodos combinados, después de 13 horas de alimentación con la microalga marcada, se describe en la tabla 4. El factor de enriquecimiento vario desde valores de 4 (sin enriquecer: 0.36 átom%; enriquecidos: 1.48 átom%), 5.8 (sin enriquecer: 0.40 átom%; enriquecidos: 2.34 átom%) y 6.5 (sin enriquecer: 0.38 átom%; enriquecidos: 2.48 átom%) veces el valor inicial, cuando fueron alimentados con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e

*Isochrysis* sp., respectivamente. En este mismo orden, el factor de enriquecimiento en los copéodos adultos fluctuaron entre 8.8 (sin enriquecer: 0.36 átom%; enriquecidos: 3.18 átom%), 6.7 (sin enriquecer: 0.41 átom%; enriquecidos: 2.75 átom%) y 7.4 (sin enriquecer: 0.40 átom%; enriquecidos: 2.95 átom%) veces el valor inicial.

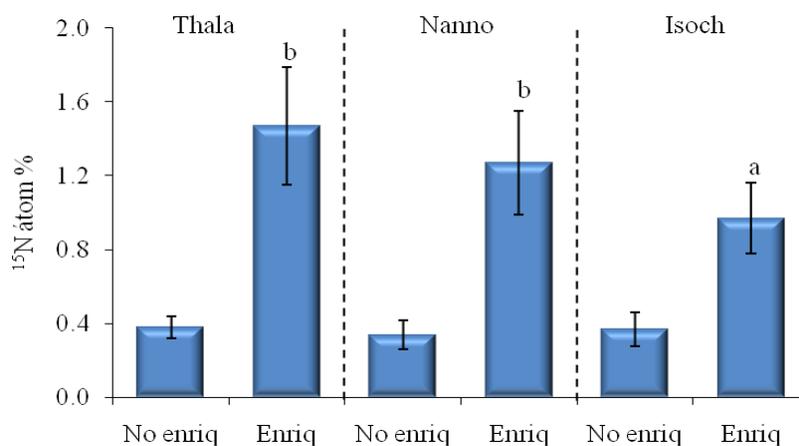


Figura 3. Firmas isotópicas ( $^{15}\text{N}$ ) del rotífero antes (microalga sin enriquecer) y después de ser alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ .

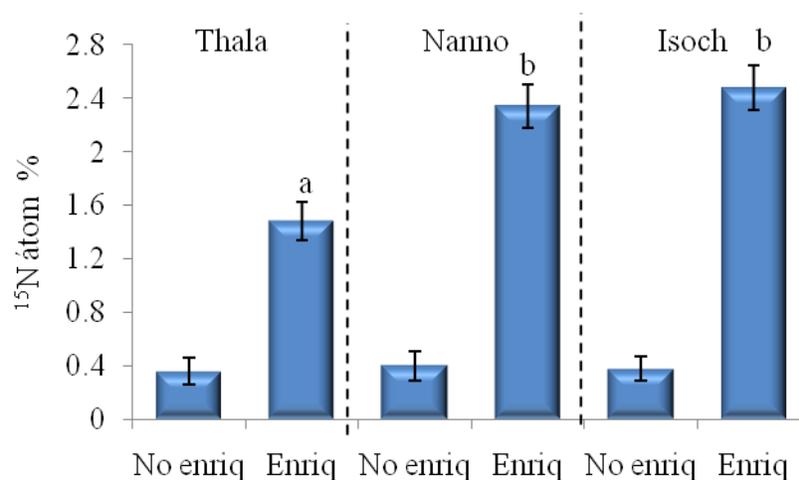


Figura 4. Firmas isotópicas ( $^{15}\text{N}$ ) de los copéodos en los estadios nauplios+copepoditos combinados, antes (microalga sin enriquecer) y después de ser alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ .

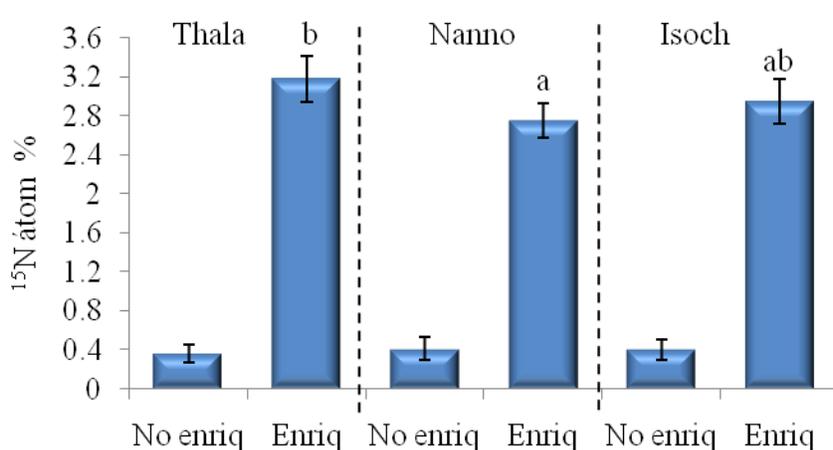


Figura 5. Firmas isotópicas ( $^{15}\text{N}$ ) de los copépodos adultos, antes (microalga sin enriquecer) y después de ser alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ .

#### **Tasa de asimilación de nitrógeno por rotíferos y copépodos alimentados con las microalgas *T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp.**

Las tasas de asimilación de nitrógeno de rotíferos y copépodos se muestran en las tablas 5, 6 y 7, en donde se resumen los parámetros de las regresiones lineales, el tiempo de máximo enriquecimiento de rotíferos y copépodos alimentados con las microalgas enriquecidas con  $^{15}\text{N}$  y la firma isotópica de las microalgas enriquecidas. Se utilizó la pendiente de la parte lineal de la curva para determinar la tasa de incremento del  $^{15}\text{N}$  con respecto al tiempo de experimentación, y consecuentemente la tasa de asimilación de nitrógeno. Las regresiones lineales del tiempo de alimentación de los rotíferos y copépodos alimentados con las microalgas experimentales marcadas con  $^{15}\text{N}$  y las tasas de incremento del  $^{15}\text{N}$  fueron significativas ( $p < 0.05$ ) y los modelos de regresión explicaron más del 97% de la variabilidad observada ( $r^2 > 0.97$ ). Los rotíferos asimilaron con mayor eficiencia el nitrógeno de la microalga *Nannochloropsis* sp. con una tasa de asimilación de  $3.42 \text{ \%N corporal}\cdot\text{hora}^{-1}$  con un tiempo de máximo enriquecimiento de 90 minutos (tabla 5). *T. weissflogii* fue la segunda microalga mejor asimilada con promedio de  $2.57 \text{ \%N corporal}\cdot\text{hora}^{-1}$ , mientras que el nitrógeno de la microalga *Isochrysis* sp. fue asimilado con menor eficiencia ( $1.41 \text{ \%N}$

corporal·hora<sup>-1</sup>). El tiempo de máximo enriquecimiento de los rotíferos alimentados con estas dos últimas microalgas fue de 120 minutos.

Los copépodos en los estadio combinados de nauplios+copepoditos asimilaron el nitrógeno de la microalga *Nannochloropsis* sp. con una tasa de 3.37 %N corporal·hora<sup>-1</sup>, con un tiempo de máximo enriquecimiento de 3 horas, mientras que *T. weissflogii* e *Isochrysis* sp. fueron asimiladas con tasas de 1.79 y 2.06 %N corporal·hora<sup>-1</sup> y no fueron estadísticamente diferentes. El tiempo de máximo enriquecimiento fue de 9 y 10 horas con las microalgas *T. weissflogii* e *Isochrysis* sp., respectivamente.

El nitrógeno de la microalga *T. weissflogii* fue asimilada a una tasa de 0.81 %N corporal·hora<sup>-1</sup> y fue significativamente inferior a los valores de la tasa de asimilación de nitrógeno registradas cuando los copépodos adultos fueron alimentados con *Nannochloropsis* sp. (1.84 %N corporal·hora<sup>-1</sup>) e *Isochrysis* sp. (1.64 %N corporal·hora<sup>-1</sup>) y cuyas diferencias no fueron significativas (p>0.05). Los copépodos adultos alimentados con la microalga *Nannochloropsis* sp. presentaron el menor tiempo de máximo enriquecimiento (5 horas) y por consiguiente un tiempo de asimilación del nitrógeno de la dieta de más corta duración. Los copépodos adultos tardaron más tiempo en asimilar el nitrógeno de las microalgas *T. weissflogii* (8 horas) e *Isochrysis* sp. (9 horas).

Tabla 5. Parámetros de la recta de regresión  $^{15}\text{N} = a + bt$  ( $^{15}\text{N}$  átom% vs. Tiempo en minutos) para determinar la tasa de asimilación de nitrógeno ( $A/W_b$ ), en rotíferos alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ .

Microalga	$t_{\max}$ minutos	a $^{15}\text{N}$ átom%	b $^{15}\text{N}$ átom%·min <sup>-1</sup>	r		$A/W_b$
				<sup>2</sup> %	$I_f$ $^{15}\text{N}$ átom%	
Thala	120	0.398	0.009	99.6	21.05 <sup>b</sup>	2.57 <sup>b</sup>
Nanno	90	0.388	0.010	97.7	17.53 <sup>a</sup>	3.42 <sup>c</sup>
Isoch	120	0.362	0.005	98.2	21.23 <sup>b</sup>	1.41 <sup>a</sup>

$t_{\max}$  = Tiempo de máximo enriquecimiento con  $^{15}\text{N}$

a, b y  $r^2$  = Intercepto, pendiente y coeficiente de determinación de la recta de regresión

$A/W_b$  = Tasa de asimilación de nitrógeno

$I_f$  =  $^{15}\text{N}$  de la microalga enriquecida

Tabla 6. Parámetros de la recta de regresión  $^{15}\text{N} = a + bt$  ( $^{15}\text{N}$  átom% vs. Tiempo en horas) para determinar la tasa de asimilación de nitrógeno ( $A/W_b$ ), de copépodos en los estadios de nauplios+copepoditos combinados, alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ .

Microalga	$t_{\max}$ horas	a $^{15}\text{N}$ átom%	b $^{15}\text{N}$ átom%·h <sup>-1</sup>	r		$I_f$ $^{15}\text{N}$ átom%	$A/W_b$ %N corporal·h <sup>-1</sup>
				$r^2$ %	$r$ %		
Thala	9	0.208	0.298	97.8	97.8	14.43 <sup>b</sup>	2.06 <sup>a</sup>
Nanno	3	0.447	0.512	99.1	99.1	15.2 <sup>b</sup>	3.37 <sup>b</sup>
Isoch	10	0.468	0.225	99.4	99.4	12.59 <sup>a</sup>	1.79 <sup>a</sup>

$t_{\max}$  = Tiempo de máximo enriquecimiento con  $^{15}\text{N}$

a, b y  $r^2$  = Intercepto, pendiente y coeficiente de determinación de la recta de regresión

$A/W_b$  = Tasa de asimilación de nitrógeno

$I_f$  =  $^{15}\text{N}$  de la microalga enriquecida

Tabla 7. Parámetros de la recta de regresión  $^{15}\text{N} = a + bt$  ( $^{15}\text{N}$  átom% vs. Tiempo en horas) para determinar la tasa de asimilación de nitrógeno ( $A/W_b$ ), en copépodos adultos alimentados con las microalgas *T. weissflogii* (Thala), *Nannochloropsis* sp. (Nanno), e *Isochrysis* sp. (Isoch) enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ .

Microalga	$t_{\max}$ horas	a $^{15}\text{N}$ átom%	b $^{15}\text{N}$ átom%·h <sup>-1</sup>	r		$I_f$ $^{15}\text{N}$ átom%	$A/W_b$ %N corporal·h <sup>-1</sup>
				$r^2$ %	$r$ %		
Thala	8	0.355	0.116	99.1	99.1	14.43 <sup>ab</sup>	0.81 <sup>a</sup>
Nanno	5	0.454	0.279	98.6	98.6	15.2 <sup>b</sup>	1.84 <sup>b</sup>
Isoch	9	0.296	0.207	98.7	98.7	12.59 <sup>a</sup>	1.64 <sup>b</sup>

$t_{\max}$  = Tiempo de máximo enriquecimiento con  $^{15}\text{N}$

a, b y  $r^2$  = Intercepto, pendiente y coeficiente de determinación de la recta de regresión

$A/W_b$  = Tasa de asimilación de nitrógeno

$I_f$  =  $^{15}\text{N}$  de la microalga enriquecida

Roman, C. 2013. El Isótopo  $^{15}\text{N}$  como Indicador de la Asimilación del Nitrógeno de la Dieta en Rotíferos y Copépodos Utilizados como Alimento vivo en la Acuicultura. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 599-632.

## Discusión

Los resultados de la presente investigación se obtuvieron experimentalmente siguiendo un método novedoso de dilución isotópica que consistió en alimentar a rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) cuyos tejidos corporales fueron equilibrados inicialmente con la microalga no enriquecida con  $^{15}\text{N}$  ( $< ^{15}\text{N}$  átom%) y posteriormente transferirlos a la microalga enriquecida ( $> ^{15}\text{N}$  átom %) y registrar cambios consecutivos de las señales isotópicas en el tiempo (Martínez del Rio y Anderson-Sprechner, 2008).

Dada las características de las dietas, la hipótesis planteada al inicio de la investigación consistió en probar si las tres dietas monoalgales (*T. weissflogii*, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp.) tienen efecto sobre la tasa de asimilación de nitrógeno en rotíferos y copépodos. En general, los resultados mostraron claramente que ambas especies tuvieron la capacidad de utilizar nitrógeno de todas las microalgas experimentales, pero la asimilación de nitrógeno fue dependiente de la especie de microalga ofrecida como alimento, así como del estadio de desarrollo de los copépodos (copépodos adultos y nauplios+copepoditos combinados). Los rotíferos y los copépodos de ambos estadios tuvieron mayor capacidad para asimilar a la microalga *Nannochloropsis* sp., incluso los copépodos adultos tuvieron tasa de asimilación muy semejante a la obtenida con *Nannochloropsis* sp. cuando fueron alimentados con la microalga *Isochrysis* sp., mientras que en los nauplios+copepoditos combinados, la tasa de asimilación con ésta última microalga fue inferior. Lo anterior indica que los copépodos pueden cambiar su preferencia de alimentación dependiendo de los estadios de desarrollo.

La calidad nutricional de la microalga *Nannochloropsis* sp. es ampliamente reconocida, pues constituyen unas de las microalgas más utilizadas en la acuicultura comercial (Sukenik *et al.*, 1989; Duerr *et al.*, 1998) y es común encontrar que se combinen con otras especies de microalgas en los cultivos de rotíferos y copépodos. La microalga *Nannochloropsis* sp. es una célula inmóvil, con un tamaño pequeño (2-4  $\mu\text{m}$ ) relativo a las otras microalgas experimentales. El valor nutricional de *Nannochloropsis* sp. se basa en ser fuente de vitamina B<sub>12</sub> y ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentanoico (EPA) y en que tiene compuestos nutricionales tales como esteroides (Rocha *et al.*, 2003).

Los rotíferos, al igual que los nauplios+copepoditos combinados, asimilaron con menor eficiencia a la microalga *Isochrysis* sp., mientras que la microalga *T. weissflogii* fue la segunda más importante. Los copépodos de ambos estadios asimilaron con menor eficiencia a la microalga *T. weissflogii*. Las características de las microalgas en términos de tamaño, forma, concentración de células, calidad nutricional y la digestibilidad de las células podrían ser consideradas como el posible factor influenciando este patrón (Vincent *et al.*, 2007). Por ejemplo, Jeffrey *et al.* (1994) mencionan que las células de *Isochrysis* sp. son fácilmente asimilables debido a su pequeño tamaño, a la ausencia de una pared celular gruesa y no poseen toxinas. Sin embargo, las bajas tasas de asimilación, comparado con la microalga *T. weissflogii* y *Nannochloropsis* sp., se debieron más probablemente al exceso en la concentración de células de *Isochrysis* sp., ya que se ha observado que menores eficiencias de asimilación y mayor producción de heces está relacionada con raciones de alimentación excesivas (Yúfera y Pascual, 1985), como fue observado en el presente trabajo. Los cultivos de rotíferos con dietas monoalgales de *Isochrysis* sp., aunque inducen buenas tasas de crecimiento, contribuyen en gran medida con grandes descargas de nitrógeno particulado y no son recomendadas en los cultivos de rotíferos en grandes densidades (García Marín, 2010).

Por otra parte, Hotos (2003) menciona que la ingestión de grandes partículas (como *T. weissflogii* en este estudio) puede ser ventajosa para los rotíferos desde el punto de vista energético, puesto que se obtiene mayor energía y mejor crecimiento utilizando presas mayores. *T. weissflogii* es una diatomea caracterizada por una pared de sílice que rodea la célula y que dificulta su digestión y eficiencia de asimilación; sin embargo, los rotíferos son capaces de triturar el alimento con un estómago especializado (mastax) para macerar el alimento. Esto, probablemente explica la eficiencia de asimilación intermedia obtenida en rotíferos. Lo anterior también puede explicar por qué Rothhaupt (1995) no encontró diferencias en las tasas de crecimiento de rotíferos alimentados con dietas a base de microalgas verdes y diatomeas con pared celular de sílice.

La menor asimilación de nitrógeno de la microalga *T. weissflogii* por los copépodos (aunque no muy diferente de la tasa de asimilación obtenida para nauplios+copepoditos combinados

alimentados con *Isochrysis* sp.), puede ser el resultado de la alimentación fragmentaria (sloppy feeding) debido al gran tamaño de la microalga. Este fenómeno ha sido observado en copépodos alimentándose de microalgas de gran tamaño como *T. weissflogii*, mientras que no se presenta en microalgas pequeñas (Vincent *et al.*, 2007, Saba *et al.*, 2011) y se cree que tiene un efecto importante en la subestimación de la ingestión y la asimilación de nutrientes en copépodos alimentados con microalgas de gran tamaño (Roy *et al.*, 1989). Además, se ha encontrado que algunas diatomeas inhiben el crecimiento en algunas especies zooplactónicas, lo cual está relacionado con la producción de aldehídos (Lacoste *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados son controversiales debido a que dietas puras de diatomeas son utilizadas rutinaria y exitosamente en la acuicultura de *B. plicatilis* (Luis Villaseñor, 2003).

Con respecto a la microalga *Isochrysis* sp., constituye una microalga pequeña y móvil con un tamaño celular promedio de 5 x 3,5  $\mu\text{m}$ . Su uso en el cultivo de varias especies de copépodos es relativamente común y ha sido determinado que sostiene altas tasas de producción de huevos y altas tasas de desarrollo en los estadios juveniles de copépodos calanoideos (Knuckey *et al.*, 2005); sin embargo, fue identificada como la dieta con menor tasa de asimilación de nitrógeno en los nauplios+copepoditos combinados, y pero mejor asimilado en los copépodos adultos, lo cual sugiere una posible selección de presas de acuerdo al estado de desarrollo de los copépodos.

Los nauplios del copépodo *P. euryhalinus* eclosionan del huevo y experimentan seis mudas (estadios naupliares NI a NVI) antes del cambio a copepoditos y se nutren del saco vitelino durante los estadios NI y N2. Los copepoditos también pasan por seis estadios de desarrollo, con el estadio final CVI como estado adulto (Johnson, 1948; Su *et al.*, 2005). A partir de este estadio han alcanzado la talla de 300  $\mu\text{m}$  e inicia el periodo de reproducción y en la formación de sacos ovígeros por las hembras (Flores Santana, 2008). Considerando el desarrollo vital anterior de los copépodos, separamos a los copépodos alimentados con las tres microalgas experimentales en dos grupos de tamaños para separar el efecto del estado reproductivo (copépodos adultos >300 $\mu\text{m}$ ) y del crecimiento somático (nauplios+copepoditos <300 $\mu\text{m}$ ), sobre la asimilación de nitrógeno. Aunque se esperaba observar una cierta preferencia de los nauplios+copepoditos combinados por las microalgas más pequeñas (*Nannochloropsis* sp., e *Isochrysis* sp.), los nauplios+copepoditos también asimilaron cantidades importantes de

nitrógeno de la microalga *T. weissflogii*, mientras que los copépodos adultos presentaron la menor asimilación de nitrógeno con esta última microalga. Las diferencias probablemente se vean enmascaradas por la combinación de nauplios+copepoditos, puesto que se ha observado en otros copépodos calanoideos, que los estadios naupliares prefieren presas de menor tamaño, mientras que los copepoditos y los copépodos adultos muestran cierta preferencia por células de mayor tamaño, sin discriminar a las más pequeñas (Bonnet y Carlotii, 2001).

Finalmente, fue observado que los copépodos adultos presentaron tasas de asimilación de nitrógeno, inferiores al nitrógeno asimilado por los nauplios+copepoditos combinados, lo cual se debe probablemente a que están utilizando rápidamente el nitrógeno para maximizar la producción de huevos.

## Conclusiones

La técnica del  $^{15}\text{N}$  enriquecido mostró ser reproducible y eficaz para definir la significancia de la asimilación de nitrógeno en la alimentación de rotíferos y copépodos. Los valores mayores de la asimilación de nitrógeno, obtenidos con la microalga *Nannochloropsis* sp., confirman los buenos resultados que se tienen al utilizarla como alimento en los cultivos de rotíferos y copépodos. La microalga *T. weissflogii* constituye una buena alternativa para enriquecer el contenido de nitrógeno en rotíferos y copépodos (nauplios+copepoditos). La menor tasa de asimilación de nitrógeno en rotíferos y copépodos (nauplios+copepoditos) alimentados con *Isochrysis* sp., se debe probablemente a su baja digestibilidad, debido a que se ha reportado que la alimentación con ésta microalga contribuye con grandes descargas de nitrógeno particulado al medio de cultivo. Las menores tasas de asimilación de nitrógeno registradas en los copépodos adultos, se debe probablemente a que están utilizando rápidamente el nitrógeno para maximizar la producción de huevos.

## Agradecimientos

Agradecemos al Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa (Proyecto PROFAPI-2011/155), por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

## Referencias

- Abou Debs, C. 1984. Carbon and nitrogen budget of the calanoid copepod *Temora stylifera*: effect of concentration and composition of food. *Marine Ecology Progress Series* 15: 213-223.
- Alm, L. 1981. The effect of fermentation on the biological value of milk proteins evaluated using rats. A study on Swedish fermented milk products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31: 1247-1253.
- Aoki, S., Kanda, J. y Hino, A. 1995. Measurements of the nitrogen budget in the rotifer *Brachionus plicatilis* by using  $^{15}\text{N}$ . *Fisheries science* 61: 406-410.
- Baer, A, Langdon, C, Mills, S., Schulz, C., y Hamre, K. 2008. Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* “Cayman” using polystyrene latex beads. *Aquaculture* 282: 75–82
- Bakonyi, G. 1998. Nitrogen Turnover of *Sinella Coeca* (Collembola: Emtombryidae). *European Journal of Entomology* 95: 321-326.
- Bonnet, D. y Carlotii F. 2001. Development and eggs production in *Centropages typicus* (Copepoda: Calanoida) fed different food types: a laboratory study. *Marine Ecology and Progress Series* 224: 133-148
- Boschker, H.T.S. y Middelburg J.J. 2002. Minireview: Stable isotope and biomarker in microbial biology. *FEMS Microbial Ecology* 40: 85-95.
- Braude, R., Mitchell, K.G., Newport, M.J. y Porter, J.W. 1970. Artificial rearing of pigs. 1. Effect of frequency and level of feeding on performance and digestion of milk protein. *British Journal of Nutrition* 24: 501–516.
- Cheng, S.H., Aoki, S., Maeda M. y Hino, A. 2004. Competition between the rotifer *Brachionus rotundiformis* and the ciliate *Euplotes vannus* fed on two different algae. *Aquaculture* 241: 331-343.
- Comtet, T. y Riera, P. 2006.  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  changes after dietary shift in veliger larvae of the slipper limpet *Crepidula fornicata*: an experimental evidence. *Helgological Marine Research* 60: 281-285.
- Conceição, L.E.C., Morais, S.J. y Rønnestad, I. 2007. Tracers in fish larvae nutrition: an overview of tools and applications. *Aquaculture* 267: 62-75.
- Duerr, E.O., Molnar, A. y Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology* 6:65–70.
- Flores Santana, R.E. 2008. Variación en el contenido de ácidos grasos del copépodo calanoide *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939) alimentado con las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur. México. 52 p.

- García Marín, M.E. 2010. Balance de nitrógeno del rotífero *Brachionus plicatilis* (s.s.) “10-2003” alimentado con dos especies de microalgas, utilizando el  $^{15}\text{N}$  enriquecido como trazador. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, Sinaloa. México. 42 p.
- Guillard, R.R.L. y Rhyther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal Microbiology. 8: 229–239.
- Hasegawa, T., Koike, I., y Mukai, H. 2001. Fate of food nitrogen in marine copepods. Marine Ecology Progress Series 210: 167-174.
- Hino, A., Aoki, S. y Ushiro, M. 1997. Nitrogen-flow in the rotifer *Brachionus rotundiformis* and its significance in mass cultures. Hydrobiologia 358: 77-82.
- Hotos, G.N. 2003. Growth, filtration and ingestion rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed with large (*Asteromonas gracilis*) and small (*Chlorella* sp.) celled algal species. Aquaculture Research 34: 793-802.
- Jeffrey, S.W., Brown, M.R. y Garland, C.D. 1994. Microalgae for mariculture. Final report to fisheries research and development council on FIRTA grant 86/81 and 47 FIRDC grant 90/63. Division of Fisheries. Miscellaneous Publication. CSIRO Australia. 79 p.
- Johnson, M.W. 1948. The postembryonic development of the copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* Johnson, and its phylogenetic significance. Transaction of the American Microscopic Society 68: 319-330.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J. y Rimmer, M.A. 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. Aquaculture 249: 339-351.
- Kreeger, D.A., Hawkins, A.J.S. y Bayne, B.L. 1996. Use of dual-labeled microcapsules to discern the physiological fates of assimilated carbohydrate, protein carbon, and protein nitrogen in suspension-feeding organisms. Limnology and Oceanography 41:208-215.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M. y Poulet, S.A. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Diseases of Aquatic Organisms 46: 139-145.
- Loick-Wilde, N., Dutz, J., Miltner, A., Gehre, M., Montoya, J.P. y Vossa, M. 2012. Incorporation of nitrogen from  $\text{N}_2$  fixation into amino acids of zooplankton. Limnology of Oceanography 57: 199-210.
- Luis Villaseñor, I.E. 2003. Cultivos de larvas mysis de *Litopenaeus vannamei* con el rotífero *Brachionus plicatilis* alimentadas con dos especies de diatomeas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, México. 37 p.
- Martínez del Río, C. y Anderson-Sprecher, R. 2008. Beyond the reaction progress variable: the meaning and significance of isotopic incorporation data. Oecologia 156: 765–772.

- Nagata, W. D. 1989. Nitrogen flow through a *Brachionus/Chlorella* mass culture system. *Hydrobiologia* 186/187: 401-408.
- Otsuki, A., Seki, H., McAllister, C.D. y Levings, C.D. 1987. Measurement of net growth rates of herbivorous benthic animals using periphyton labeled simultaneously with  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ . *Limnology and Oceanography* 32: 499-503.
- Owens, N. 1987. Natural variations in  $^{15}\text{N}$  in the marine environment. *Advanced in Marine Biology* 24: 390-451.
- Peters, R.H. 1984. Methods for the study of feeding, grazing and assimilation by zooplankton. In Downing, J. A. & F. H. Rigler (eds) *A manual for the assessment of secondary production in fresh waters*. IBP Handbook 17 (2nd edn., 36-412 p.). Blackwell, Oxford, 336-412.
- Peterson, B.J. y Fry, B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematic* 18: 293-320.
- Preston, N.P., Smith, D.M., Kellaway, D.M. y 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.
- Puello-Cruz, A. C., Gonzales-Rodríguez, B. y García-Ortega, A. 2008. Investigación en producción y uso del copépodo larvario. *Avances en Nutrición Acuícola IX/IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad en Acuicultura y Manejo Ambiental. 90-107 p.
- Rennie, M.J., Tadros, L. y Khogali, S. 1994. Glutamine transport and its metabolic effects. *Journal of Nutrition* 124: 1503S-8S.
- Rocha, J.M., Gracia, J.E. y Henriques, M.H. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana* *Biomolecular Engineering* 20 (4-6): 237242.
- Ronneberger, D. 1998. Uptake of latex beads as size-model for food of planktonic rotifers. *Hydrobiologia* 387/388: 445-449.
- Rothhaupt, K.O. 1995. Algal nutrient limitation affects rotifer growth rate but not ingestion rate. *Limnology and Oceanography* 40: 1201-1208.
- Roy, S. H., Deluca, C. J. y Casavant, D. A., 1989. Lumbar muscle fatigue and chronic lower back pain. *Spine* 14: 992-1001.
- Saavedra, M., Beltrán, M., Pousão-Ferreira, P., Dinis, M.T., Blasco, J. y Conceição, L.E.C., 2007. Evaluation of bioavailability of individual amino acids in *Diplodus puntazzo* larvae: towards the ideal dietary amino acid profile. *Aquaculture* 263: 192-198.
- Saba, G.K., Steinberg, D.K. y Bronk, D.A. 2011. The relative importance of sloppy feeding, excretion, and fecal pellet leaching in the release of dissolved carbon and nitrogen by *Acartia tonsa* copepods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 404: 47-56.

- Schlechtriem, C., Focken, U. y Becker, K. 2004. Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. *Aquatic Ecology* 38: 93-100.
- Sorokin, C. 1973. Dry Weight, Packed Cell Volume and Optical Density. En: Stein, J. R. (Ed.). *Handbook of physiological methods. Culture methods and growth. Measurements*: 321-343. Cambridge University Press. Cambridge, MA.USA. 448 pp
- Su, H.M., Cheng, S.H., Chen, T.I. y Su, M.S. 2005. Culture of copepods and application to marine finfish larval rearing in Taiwan. En: *Copepods in Aquaculture* (Ed. By C.S. Lee, P.J. O'Bryen, N.H. Marcus. 183-104 p. Blackwell Publishing Ltd., UK.
- Sukenik, A., Falkowski, P.G. y Bennet, J. 1989. Energy transfer in the light-harvesting complex II of *Dunaliella teriolecta* is unusually sensitive to Triton X-100. *Photosynthesis Research* 21: 37-44.
- Tanaka, Y. 1991. Nitrogen budget for the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 22:57-64.
- Teixeira, P.F., Kaminski, S.M., Avila, T.R., Cardozo, A.P., Bersano, J.G.F. y Bianchini, A. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82: 333-339.
- Twarowska, G.T., Westermam, W.P. y Losordo, M.T. 1997. Water treatment and waste characterization evaluation of an intensive recirculating fish production system. *Aquaculture Engineering* 16: 133-147.
- Vadstein, O., Oie, G. y Olsen, Y. 1993. Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. En: J. J. Gilbert, E. Lubzens y M. R. Miracle (eds), *Rotifer Symposium VI. Hydrobiologia* 255/256 : 261-267.
- Verschoor, A.M., Boonstra, H. y Meijer, T. 2005. Application of stable isotope tracers to studies of zooplankton feeding, using the rotifer *Brachionus calyciflorus* as an example. *Hydrobiology* 546: 535-549.
- Vincent, D., Slawyk, G., L'Helguen, S., Sarthou, G., Gallinari, M., Seuront, L., Sautour, B. y Ragueneau, O. 2007. Net and gross incorporation of nitrogen by marine copepods fed on <sup>15</sup>N-labelled diatoms: Methodology and trophic studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352: 295-305.
- Wikfors, G.H. y Ohno, M. 2001. Impact algae research in aquaculture. *Journal of Phycology* 37: 968-974.
- Yúfera, M. y Pascual, E. 1985. Effects of algal food concentration on feeding and ingestión rates of *Brachionus plicatilis* in mass cultura. *Hydrobiologia* 122: 181-187.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Fourth edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 663p.