



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**Contribución relativa de las fuentes de alimentación del
camarón en cultivo mediante el uso de isotopos estables.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MC ELSA ISELA BOJORQUEZ MASCAREÑO

TUTOR:

DR. MARTIN FEDERICO SOTO JIMÉNEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. MARTIN MERINO IBARRA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. DAVID SERGIO VALDÉS LOZANO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Isotopía Estable de la Unidad Académica Mazatlán del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El estudio se financió con fondos del proyecto Ciencia Básica SEP-CONACYT 60215: Ciclo del nitrógeno en un estanque camaronícola mediante el uso de isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$), a cargo del Dr. Martín Federico Soto Jiménez.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección:

ebojorquez@cbtis051.edu.mx y/o martin@ola.icmyl.unam.mx

Si el permiso se otorga deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo de la siguiente manera.

Bojórquez Mascareño E.I. Contribución relativa de las fuentes de alimentación del camarón en cultivo mediante el uso de isótopos estables. Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, ICMYL-UNAM, pp121.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias del Mar de la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme como estudiante y por su confianza para el uso de las instalaciones en el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por proporcionarme apoyo en los estudios de doctorado.

Al Dr. Martín Federico Soto Jiménez por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por sus enseñanzas, por sus atinadas tutorías y por su Amistad de tanto tiempo.

Al Dr. Martín Merino Ibarra por la asesoría brindada en todas las etapas del desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Dr. David Sergio Valdés Lozano por su plena disposición y apoyo brindado en la realización del presente trabajo para que culminara adecuadamente.

A la Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés por sus valiosas observaciones, sugerencias y correcciones para mejorar el trabajo de tesis.

A la Dra. Crisantema Hernández González por el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo y sus palabras de aliento.

A los directivos y personal de la granja Aquastrat por su soporte técnico, su plena disposición e invaluable apoyo mostrado en esta investigación.

A la comunidad educativa del CBTis No.51 “Ing. Juan de Dios Batíz Paredes” por su apoyo constante en todo lo que se refiere a superación académica.

Al Químico Humberto Bojórquez Leyva por su valioso apoyo en el laboratorio y por su amistad.

Al M.C. Sergio Rendón Rodríguez por su invaluable asistencia en los trabajos de campo y de laboratorio.

A Victoria Montes Montes por su apoyo logístico durante la realización de éste trabajo y por su amistad.

A Margarita Cordero por su disposición para que los trámites escolares ante el posgrado se hicieran a tiempo y por ayudarme en todo momento con la información necesaria.

DEDICATORIA

A MIS HIJOS PABLO Y ELISA

A MIS NIETAS XIMENA Y VALENTINA

A MIS ESTUDIANTES

ÍNDICE

Índice de figuras	viii
Índice de tablas	x
Índice de anexos	xi
Resumen	1
Abstract	3
I. Introducción	5
II. Antecedentes	11
II.1. Aplicación de los isótopos estables	13
II.2. Uso de los isótopos estables en análisis de fuentes de alimentación del camarón	14
II.3. Fraccionación en el tejido de crustáceos durante la asimilación	15
III. Justificación e importancia del estudio	18
IV. Pregunta de investigación e hipótesis	19
V. Objetivos	20
V.1. Objetivo general	20
V.2. Objetivos específicos	20
VI. Material y métodos	21
VI.1. Área de estudio	21
VI.2. Practicas de manejo en granja	22
VI.3. Diseño experimental	22
VI.4. Ensayo I	29
VI.5. Ensayo II	29
VI.6. Ensayo III y IV	30

VI.7.	Recolección, medición y disección de los organismos	31
VI.8.	Procesamiento de muestras	33
VI.9.	Análisis de agua	34
VI.10.	Procesamiento de datos	40
VI.11.	Análisis estadísticos	43
VII.	Resultados	44
VII.1.	Prácticas de manejo en granja	44
VII.2.	Características del alimento utilizado en los experimentos	45
VII.2.1.	Dieta formulada	45
VII.2.2.	Dieta natural	46
VII.3.	Condiciones ambientales de los experimentos y de los estanques de cultivo	48
VII.4.	Resultados de experimentos a saciedad y comparación con estanques	51
VII.4.1.	Ensayo I: Postlarvas	52
VII.4.2.	Ensayo II: juvenil pequeño	55
VII.4.3.	Ensayo III: juvenil mediano	58
VII.4.4.	Ensayo IV: juvenil grande	61
VII.5.	Resultados de experimentos en organismos sometidos a reducción de alimento y ayuno	64
VII.6.	Discriminación isotópica de nitrógeno ($\Delta^{15}\text{N}$)	68
VII.6.1.	$\Delta^{15}\text{N}$ en función de la dieta y talla	73
VII.7.	Contribuciones relativas de la dieta natural	75
VIII.	Discusiones	77
VIII.1.	Condiciones abióticas de los experimentos y del cultivo	77
VIII.2.	Dieta	82

VIII.3.	Discriminación isotópica en función de la dieta y talla	84
VIII.4.	VIII.4. Contribución relativa de la dieta natural	88
VIII.5.	Implicaciones	93
IX.	Conclusiones	96
X.	Literatura citada	99
XI.	Anexos	121

Índice de figuras

Figura 1	Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreo en las instalaciones de la Aquastrat, S.A. de C.V., localizada en la zona sur del estado de Sinaloa.	21
Figura 2	Esquema de experimentos	28
Figura 3	Ilustración de camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> mostrando órganos y tejidos usados para determinar las señales isotópicas y contenidos de N y C (y relación C:N).	32
Figura 4	Ilustración de camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> mostrando características anatómicas externas.	32
Figura 5	Componentes dominantes de la dieta del tratamiento 4 (AF+AN+S) en los diferentes ensayos realizados.	47
Figura 6	Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado en escenario a saciedad, con diferentes combinaciones de alimento natural y formulado en el ensayo I (Postlarvas).	54
Figura 7	Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado en escenario a saciedad, con diferentes combinaciones de alimento natural y formulado en el ensayo II (juveniles pequeños).	57

- Figura 8 Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* 60
cultivado en escenario a saciedad, con diferentes combinaciones de
alimento natural y formulado en el ensayo III (juveniles medianos).
- Figura 9 Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* 63
cultivado en escenario a saciedad, con diferentes combinaciones de
alimento natural y formulado en el ensayo IV (juveniles grandes).
- Figura 10 Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* 66
cultivado en escenario con alimento limitado, con diferentes
combinaciones de alimento natural y formulado en el ensayo III
(juveniles medianos).
- Figura 11 Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* 68
cultivado en escenario sin alimento: (a), con canibalismo y (b), sin
canibalismo, en camarones juveniles medianos.
- Figura 12 Factor de discriminación isotópica con relación al peso en camarones 73
L. vannamei.
- Figura 13 Factor de discriminación isotópica con relación a la calidad de la 74
dieta en camarones *L. vannamei*.

Índice de tablas

Tabla 1	Diseño experimental para determinar los efectos de la talla del camarón, tipos de dieta y escenarios alimenticios sobre las tasas de recambio isotópico y discriminación isotópica del músculo de <i>L. vannamei</i> .	24
Tabla 2	Técnicas analíticas practicadas a las muestras de agua.	36
Tabla 3	Contenido y composición isotópica C and N, y C:N de cada componente de la dieta para <i>L. vannamei</i> cultivado en cuatro diferentes tratamientos desde PL hasta juveniles mayores (ensayos I a IV).	46
Tabla 4	Parámetros fisicoquímicos monitoreados durante los experimentos en los ensayos y en los estanques estudiados.	49
Tabla 5	Resultados ensayo I: Postlarva 20's (peso inicial 51.7 ± 7 mg y $\delta^{15}\text{N} = 11.12 \pm 0.26$ ‰) de camarón <i>L. vannamei</i> cultivado por 11-días.	55
Tabla 6	Resultados ensayo II camarón juvenil pequeño (peso inicial, 0.25 ± 0.10 g, $\delta^{15}\text{N} = 8.41 \pm 0.1$ ‰) <i>L. vannamei</i> cultivado por 30-días.	58
Tabla 7	Resultados ensayo III: camarón juvenil mediano (peso inicial, 2.79 ± 0.26 g, $\delta^{15}\text{N} = 7.72 \pm 0.3$ ‰) <i>L. vannamei</i> cultivado por 30-días.	61
Tabla 8	Resultados ensayo IV: camarón juvenil grande (peso inicial, 6.21 ± 0.72 g, $\delta^{15}\text{N} = 6.95 \pm 0.34$ ‰) <i>L. vannamei</i> cultivado por 35-días.	64

- Tabla 9 Composición isotópica inicial ($\delta^{15}\text{N}_i$), final ($\delta^{15}\text{N}_f$), ganancia relativa 70
en peso ($W_r=W_f/W_i$) y factor de discriminación trófica ($\Delta^{15}\text{N}$, ‰) en
camarón *L. vannamei* en cuatro tratamientos probados en los ensayos
I a IV, con alimento a saciedad.
- Tabla 10 Composición isotópica inicial ($\delta^{15}\text{N}_i$), final ($\delta^{15}\text{N}_f$), ganancia relativa 72
en peso ($W_r=W_f/W_i$) y factor de discriminación trófica ($\Delta^{15}\text{N}$, ‰) en
camarón *L. vannamei* Juvenil mediano: $\delta^{15}\text{N}_i$ $7.72\pm 0.3\text{‰}$, en cuatro
tratamientos probados en los ensayos con alimento limitado y ayuno.

Índice de Anexos

- Anexo 1. Composición isotópica en equilibrio, contenido de N y C y relación C:N en órganos y tejidos de camarón juvenil (peso inicial, 2.79 ± 0.26 g, $\delta^{15}\text{N} = 7.72 \pm 0.3\text{‰}$) *L. vannamei* cultivado por 28-días con alimento formulado (AF, Engorda Piasa 35%). 121
- Anexo 2. Bojórquez-Mascareño E.I. & Soto-Jiménez M.F., 2013. Effects of natural diet on growth on white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under experimental mesocosms emulating an intensive culture system. *Journal of Aquaculture Research Development* 4, 163. 122
- Anexo 3. Bojórquez-Mascareño E.I. & Soto-Jiménez M.F., 2015. Isotopic turnover rate and trophic fractionation of nitrogen in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) by experimental mesocosms: implications for the estimation of the relative contribution of diets. *Journal of Aquaculture Research Development*, 1-18. doi:10.1111/are.12757. 132

Resumen

Se realizó un estudio de balance de nitrógeno e isótopos estables para evaluar el impacto de la dieta natural en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en experimentos tipo mesocosmos simulando un sistema de cultivo intensivo en estanques de tierra. Nosotros probamos dietas isonitrogenadas usando alimento formulado (AF) comercial, natural (AN) potencialmente producido en la columna de agua (AF+AN) y sedimentos (AF+AN+S) y combinación 50:50, en organismos con diferentes estadios de crecimiento (desde postlarvas hasta juveniles grandes) y bajo distintos escenarios alimenticios (saciedad, alimento limitado y en ayuno). Para tal propósito determinamos la sobrevivencia, las tasas de crecimiento (k) y de recambio metabólico (m), el tiempo de recambio isotópico (t_{50}), y la fraccionación de N ($\Delta^{15}\text{N}$) bajo condiciones controladas. Los resultados revelaron que *L. vannamei* es una especie sensible a la dieta con crecimiento y procesos metabólicos controlados por la cantidad (tasa de alimentación) y calidad (en términos de relación C:N) del alimento. Con relación al cambio isotópico total ($k+m$), la contribución del crecimiento disminuye con la talla del camarón, mientras que el recambio metabólico también disminuye pero presenta una alta variabilidad. El coeficiente k en el escenario con alimento limitado y en ayuno los especímenes fueron más bajos que en el escenario a saciedad; m presentó la tendencia opuesta. Los valores de $\Delta^{15}\text{N}$ promediaron 0.30 a 3.5‰ en camarones a saciedad ($1.87 \pm 0.87\%$), pero incrementaron de 2.59-3.09 y 3.28-4.81‰ en alimentación limitada y en especímenes en ayuno, respectivamente. El $\Delta^{15}\text{N}$ incrementó con la relación C:N de la dieta, indicando un efecto de la calidad de la dieta sobre la discriminación isotópica y también se incrementó con la talla del camarón, indicando la influencia de los cambios metabólicos.

Basados en la resolución de los modelos de mezcla isotópica la contribución relativa de la productividad natural varió entre dietas combinadas y disminuyó con el tamaño del camarón. La contribución de N al crecimiento de postlarvas sumó desde 18-74% y 25-62% para los tratamientos AN+AF y AN+AF+S, respectivamente, hasta 10% o menos en juveniles mayores. Los especímenes cultivados con AN+AF+S y AN+AF presentaron pesos, crecimiento, sobrevivencia y factores de conversión alimenticia significativamente más grandes que los camarones cultivados con dietas puras (AN y AF) y en los estanques al mismo tiempo ($p < 0.05$), excepto para juveniles mayores con diferencias no significativas. Simultáneamente se estudiaron tres estanques representativos de la granja con resultados comparables. Extrapolando nuestros resultados a nivel de granja, con una reducción del 50% de las tasas de alimentación en los primeros estadios de crecimiento y favoreciendo la productividad natural en el estanque, los granjeros podrían reducir los FCA's y proveer factibilidad en el cultivo. Los isótopos estables de N fueron útiles para evaluar los cambios en la señal isotópica del camarón alimentado con diferentes dietas y así determinar la fuente de nitrógeno para el crecimiento del camarón. Sin embargo, las variaciones en el $\Delta^{15}\text{N}$ necesitan ser considerados en estudios de nutrición, para estimar correctamente la relación temporal entre la relación isotópica del organismo y su dieta y analizar las variaciones de la disponibilidad de alimento o preferencias a lo largo de un ciclo de cultivo.

Abstract

A study of nitrogen (N) balance and stable isotopes was conducted to assess the impact of natural diet on white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental mesocosms emulating an intensive culture system on earth ponds. We tested isonitrogenous diets by using commercial formulated feed (FF), natural food (NF) produced in the column water (FF+NF) and sediments (FF+NF+S), and combinations 50:50 ratio based on N content, and feeding scenarios (satiation, limited-fed, and starvation), we determined the growth (k) and metabolic (m) turnover, rate of isotopic turnover (t_{50}) and isotopic fractionation of N ($\Delta^{15}\text{N}$) during different growth stages (from postlarvae (PL20's) to large juveniles), under controlled conditions. Results revealed that *L. vannamei* is a diet sensitive species with growth and metabolic processes controlled by the quantity (feeding rate) and quality (in terms of C:N) of food. Relative to the total isotopic change ($k+m$), the contribution of growth decreased with size shrimp from PL20's to largest juveniles; metabolic turnover also decreased but showed an elevated variability. Coefficient k in limited-fed and starved specimens was lower than those on satiation; m showed the opposite trend. $\Delta^{15}\text{N}$ values averaged from 0.30 to 3.5‰ (1.87 ± 0.87 ‰) in satiated *L. vannamei*, but increased to 2.59-3.09 and 3.28-4.81‰ in limited-fed and starved specimens. $\Delta^{15}\text{N}$ increased with a diet's C:N, indicating an effect of diet quality on isotopic discrimination and also increased with shrimp size, indicating the influence of the metabolic changes.

Based on isotope mixing model the relative contribution of the natural productivity varied among combined diets and trials. N contributions to growth of PL-20's specimens were 18-

74% for FF+NF and 25-62% for FF+NF+S treatments, decreasing with the shrimp size to <10% in largest juveniles. Specimens raised on FF+NF+S and FF+NF treatments showed weight, growth, survival and feed conversion ratios (FCRs) significantly higher than shrimp raised on pure diets (FF and NF); exceptions were observed for the larger shrimp (trial IV) with no significant differences. A followed study was conducted in three representative ponds at farm level with comparable results ($p < 0.05$). Extrapolating our results to a farm level, farmers may be able to reduce FCRs and improve profitability by enhancing the natural productivity during the first weeks of an intensive shrimp farm culture. Stable isotopes of N were useful to assess changes in the isotopic signals of shrimp fed with different diets and thus, to determine the N source for shrimp growth. However, variations in $\Delta^{15}\text{N}$ need to be considered in nutrition studies to estimate correctly the temporal relationship between an organism's isotope ratio and its diet and to analyze the variations of food availability or preferences along a culture cycle.

I. Introducción

La camaronicultura es la industria primaria de producción de alimento con la mayor tasa de crecimiento en los últimas dos décadas en México. Solamente en el 2011, los volúmenes de camarón cultivado rebasaron las 173,000 toneladas (CONAPESCA, 2011). Actualmente, el noroeste del país tiene una superficie de siembra de 63 mil 301 hectáreas para camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con 1 o 2 ciclos de cultivo por año (fuente: <http://www.cosaes.com/> y <http://www.cesasin.com.mx/>). El rápido crecimiento de la camaronicultura ha resultado en impacto a los ecosistemas asociados (Briggs y Funge-Smith, 1994; Smith, 1998; Tookwinas y Songsangjinda 1999; Páez-Osuna et al., 1999; Martínez Córdova, 2003; Xie, et al., 2004; Amezcua y Soto-Jiménez, 2014).

En los inicios de la acuicultura, el cultivo del camarón se apoyaba en el uso de los recursos naturales, como las postlarvas silvestres, los embalses seminaturales (cultivos extensivos), los alimentos naturales, y el uso de grandes ecosistemas colindantes para derramar los efluentes (Chua et al., 1989; Dierberg y Kiattisimkul, 1996; Páez-Osuna et al., 1997; Páez-Osuna et al., 1998). Las prácticas de manejo actuales de la mayoría de granjas están caracterizadas por la adición de grandes cantidades de nitrógeno, tanto de alimento formulado como de fertilizantes para estimular el crecimiento del camarón cultivado, de la cuales solo una cuarta parte es recuperado en biomasa. La mayor cantidad del nitrógeno no aprovechado, es desechado en los efluentes de las granjas a los ecosistemas costeros, donde sus efectos pueden ir desde el enriquecimiento de nutrientes

con incrementos en la productividad primaria, hasta eventos de eutrofización con sus consecuencias ambientales y ecológicas asociadas.

Pero además, del impacto ambiental que produce la descarga de efluentes acuícolas, también representa una importante pérdida económica para los granjeros debido al alto costo de los nutrientes. La sobreoferta de camarón en el mercado, sobre todo proveniente de Asia, ha llevado los precios a la baja, de tal forma que para ser competitivos actualmente a nivel nacional e internacional, es necesario optimizar los procesos productivos y cultivar camarón al menor costo posible. El alimento formulado que se suministra al camarón en cultivo representa el mayor gasto operativo de la actividad (Zendejas-Hernández, 2004).

Considerando que una granja descarga un promedio de 57.4 kg de N/ha provenientes del alimento con 35% de proteína en la dieta comercial (Páez-Osuna et al., 1997) y en una área total de cultivo en la región del Golfo de California de 63,301 ha, se estima un desecho de alimento equivalente a 64,883 toneladas ($[57.4 \text{ N/ha} \times \text{Factor de Conversión a proteína (6.25)/35\% \text{ proteína}] \times 63,301 \text{ ha}$). Para un precio promedio de USD\$905 por tonelada de alimento de camarón, se estima una pérdida de USD \$58 millones por año.

Uno de los principales retos que enfrenta la acuicultura en México (SAGARPA, 2006) y en el mundo (FAO, 2011) es que la industria produzca con un máximo de eficiencia y un mínimo de impacto al ecosistema. En este contexto, las prácticas de manejo en las granjas camaronícolas juegan un papel preponderante, en particular, las relacionadas con el manejo del alimento (Jory, 1995; Burford et al., 2001, 2002). Una práctica óptima en el manejo del alimento proporcionado a los organismos en cultivo, es la que dará como

resultado el máximo crecimiento y supervivencia, el más bajo factor de conversión con mínimo aporte de alimento y el mínimo impacto ambiental (Jory, 2001; Smith et al., 2002; Casillas-Hernández et al., 2007; Quintero y Roy, 2010). Por lo tanto, la adecuada nutrición de camarón es uno de los más grandes retos para una acuicultura sustentable.

Las cadenas tróficas que se desarrollan en los sistemas de cultivo pueden contribuir a la nutrición del camarón en ciertas etapas del proceso. Los principales elementos de la productividad natural que participan en ello, son los productores primarios (fitoplancton sobre todo diatomeas y bacterioplancton), organismos del zooplancton (anfípodos, copépodos y mysidáceos, entre otros), del bentos (poliquetos, bivalvos y gasterópodos) y detritus (Nunes et al, 2000; Tacon, 2000; Martínez-Córdova y Peña-Messina, 2005).

Por otro lado, una buena parte del alimento proporcionado no es consumido por el camarón, al menos de forma directa, sino que pasa a formar parte de la materia orgánica disuelta o particulada que posteriormente sedimenta en forma de detritus. Esta materia orgánica, tanto en la columna de agua como en el sedimento, es utilizada como sustrato por las bacterias formando agregados proteicos, los cuales tienen un alto valor nutricional para muchos organismos, incluyendo el camarón (Bufford et al., 2004).

La contribución relativa de cada una de las posibles fuentes de alimentación del camarón en cultivo es también muy variable, dependiendo de la etapa de desarrollo de los organismos, de la disponibilidad y tipo de alimento natural y del grado de deterioro de la columna de agua y sedimento. La evaluación de esta contribución se ha hecho normalmente de manera indirecta, estableciendo correlaciones entre abundancia de las comunidades con la respuesta productiva del camarón (Martínez-Córdova et al., 1998), o a través de estudios

del contenido estomacal de los organismos cultivados (Martínez-Córdova y Peña-Messina, 2005). Sin embargo, estas formas de evaluación tienen una limitada validez, sobre todo considerando que los estudios de contenido estomacal son laboriosos, y en ocasiones es difícil identificar plenamente los organismos o presas presentes en un material que normalmente se encuentra muy macerado. Por otro lado, aun cuando se pudieran identificar esos organismos y fuentes, queda pendiente por saber con cuánto contribuyen a la dieta, es decir, cuánto es realmente incorporado al tejido de los organismos cultivados. Para ello es necesario echar mano de otras herramientas.

Una herramienta complementaria que se puede utilizar para afinar la información requerida, es el análisis de isótopos estables (SIA, siglas en Inglés), especialmente de carbono (^{12}C y ^{13}C) y nitrógeno (^{14}N y ^{15}N). Esta herramienta permite evaluar cambios en la composición isotópica de tejidos de organismos después de un cambio en su dieta. Por ejemplo, el análisis de isótopos estables de nitrógeno (p.e. $\delta^{15}\text{N}$, el cual es la relación entre el ^{15}N y el ^{14}N con respecto a un estándar de referencia) permite estimar tasas de recambio metabólicos, evaluar la asimilación y contribución relativa de dietas isotópicamente distintas. Además, permiten evaluar los cambios de las relaciones isotópicas que resultan de los procesos químicos o biológicos en los que participan los isótopos por motivos de sus diferentes masas atómicas (fraccionación isotópica).

Algunos trabajos se han hecho utilizando esta herramienta para establecer fuentes de nitrógeno, carbono y otros elementos en aguas y sedimentos (Soto-Jiménez et al., 2003), así como también para conocer la estructura trófica de diferentes ecosistemas (Nixon et al.,

1986; McClellan y Valiela, 1998), y las fuentes de alimentación de organismos de interés (Dittel et al., 1997).

El uso de esta herramienta en acuicultura aún no está muy generalizado, aunque recientemente, el método de SIA se ha usado en el examen de la asimilación y contribución nutricional de dietas comerciales en animales en Operaciones concentradas en alimentación de animales (CAFO, por sus siglas en inglés). A pesar de su potencial para evaluar eficiencia de dietas los SIA, ha sido poco usada para analizar dietas en el camarón (*Litopenaeus vannamei*), una especie cultivada con valor comercial. Para asegurar el uso correcto de SIA, en estudios nutricionales, incluida estimación de tasa de cambio isotópico en tejido de camarón seguido de un cambio de dieta, también como estimación de Fraccionación isotópica. Ambos parámetros también son usados como indicadores condición fisiológica y metabólica del animal con relación a su dieta (Lyndon et al., 1992; Owen et al., 1999; Mente et al., 2002).

El conocimiento del recambio isotópico (t_{50}) y la fraccionación isotópica del nitrógeno ($\Delta^{15}\text{N}$) es importante cuando usamos SIA. Esto con la finalidad de realizar estimaciones de la contribución de la dieta y proveer información con respecto al estado nutricional de una dieta específica o un régimen dietario, y nos permite aproximaciones de cadenas alimenticias y cambios estructurales en ecosistemas costeros. Usando tasas de recambio isotópico inapropiadas y factores de fraccionación puede llevar a errores de interpretación de datos de isotopos estables en estudios de nutrición y ecológicos. Aunque, la mayoría de estudios que aplican SIA no estiman valores precisos de tasas de recambio isotópico ni de factores de discriminación isotópica tejido-dieta. En lugar de eso, ellos

toman de la literatura publicada (Caut et al., 2009). Por ejemplo un valor universal de $\Delta^{15}\text{N}$ de 3.4‰ derivado de la literatura que proviene de un rango amplio de organismos no relacionados es frecuentemente usado en modelos de mezcla isotópica para estimar la contribución relativa de dietas y de posición trófica (Minagawa y Wada, 1984; Ponsard y Arditi, 2000; Post et al., 2000; Vander Zanden y Rasmussen, 2001; Post, 2002).

La limitada disponibilidad de literatura sugiere que valores de t_{50} y $\Delta^{15}\text{N}$ podría variar de acuerdo a la fisiología entre especies, individuos y tejidos (Tieszen et al., 1983; Gannes et al., 1997; Kelly 2000; Overman y Parrish, 2001; McCutchan et al., 2003; Vanderklift y Ponsard, 2003; Pearson et al., 2003; Yokoyama et al., 2005; Stenroth et al., 2006; Mandigan et al., 2012), también como calidad y cantidad del alimento (Hays et al., 2000; Gaye-Siessegger et al., 2004; Robbins et al., 2005). Aunque hay insuficiente conocimiento de cómo varían los valores de las tasas y del recambio isotópico y $\Delta^{15}\text{N}$ entre individuos de una especie dada dentro de condiciones nutricionales, ambientales e individuales. Basados en una revisión de la literatura, todos esos factores podrían influir en las tasas de recambio isotópico y sobre la discriminación isotópica.

Algunos estudios han utilizando isótopos estables en camarones de diferentes especies, entre los que se pueden destacar los de Anderson et al. (1987) y Bufford et al. (2004), en *Litopenaeus vannamei*; Cam et al. (1991) en *Penaeus japonicus*; Nunes et al. (1997) en *Penaeus subtilis* y Bufford et al. (2002), en *Penaeus monodon*. Los isótopos de estos elementos son útiles para identificar las fuentes de alimento, directas e indirectas, para el camarón y para seguir sus rutas en la trama trófica dentro del estanque.

El método se basa en el hecho de que diferentes fuentes de un elemento como carbono y nitrógeno, tienen una diferente proporción de isótopos estables. Las fuentes se ven reflejadas en los organismos que la consumen. Por lo tanto, mediante el estudio de las proporciones de los isótopos en los posibles contribuidores en la dieta de un organismo, y en el organismo mismo, es factible establecer cuál es la contribución relativa a la dieta de cada una de estas fuentes.

Sin embargo, el asunto no es tan sencillo, ya que es necesario considerar los cambios que se dan de un nivel trófico a otro, las diferencias de fraccionación entre tipos de alimento, entre otros aspectos. No obstante existen maneras de llevar a cabo estos cálculos de tal forma que se puede obtener una información bastante confiable. La información proporcionada mediante esta herramienta es útil para optimizar las estrategias de alimentación del camarón cultivado, que conduzca al suministro de las cantidades adecuadas de alimento formulado, e identificar a aquellos componentes de la productividad natural que mayormente contribuyen en su alimentación para incentivarlos. Esto tendría que repercutir de manera significativa en la rentabilidad económica y sustentabilidad de las granjas, al utilizar óptimamente el alimento formulado y minimizar la carga orgánica en los estanques y su descarga a los ecosistemas aledaños.

II. Antecedentes

Muchos estudios han reportado que la productividad primaria de los estanques puede contribuir a la nutrición del camarón (Anderson et al., 1987; Chamberlain et al., 1995; Jory, 1995; Martínez-Córdova et al., 1998; Sangha et al., 2000; Lavens et al., 2000; Soares et al.,

2005). Los beneficios de la dieta natural aportan a los requerimientos nutricionales del camarón durante sus estadios de postlarva y juveniles, a una reducción de la mortalidad en postlarvas e incremento de las tasas de crecimiento en estanques de las granjas de camarón (Moss y Pruder, 1995; Tacon et al., 2002; Roy et al., 2012; Wu y Lu, 2012).

De hecho, los beneficios de la productividad natural han sido reportados para diferentes sistemas de producción en granjas de camarón, incluyendo extensivo (Anderson et al., 1987), semi-intensivo (Soares et al., 2005; Martínez-Córdova et al., 2003; Soares et al., 2004), intensivo e hiper-intensivo (Decamp et al., 2002; Browdy et al., 2005; Wasielesky et al., 2006). La contribución de la producción natural varía entre diferentes sistemas de cultivo (mas alta en extensiva y más baja en hiper-intensiva) y entre especies de camarón. Considerando estos reportes, un manejo adecuado de los estanques que promueva la productividad natural podría elevar la disponibilidad de alimento de alta calidad para el camarón, reduciendo los costos de operación y minimizando los impactos al ambiente (p.ej. Jory, 2001; Smith et al., 2002; Casillas-Hernández et al., 2007). Esto es importante para el éxito operativo y sustentable de cualquier granja comercial de camarón (Quintero y Roy, 2010).

Aunque estudios han reportado beneficios múltiples del alimento natural en granjas de camarón (Moss y Pruder, 1995; Tacon et al. 2002; Roy et al. 2012; Wu y Lu, 2012), es difícil cuantificar tales beneficios a nivel de granja. Además resulta complicado comparar entre un gran número de reportes publicados por las diferentes estrategias y métodos que se han seguido. La mayoría de los estudios se han realizado en sistemas de tanques con agua filtrada, de manera que no es posible evaluar la contribución del alimento natural bajo

condiciones controladas de laboratorio, por lo que hacen difícil su extrapolación a sistemas de cultivo.

II.1. Aplicación de los isótopos estables

Las abundancias naturales de isótopos estables de C y N han demostrado ser útiles para identificar las fuentes alimenticias directas e indirectas para el camarón y para seguir sus rutas en la trama trófica dentro del estanque (Preston et al., 1996). El fundamento se basa en que el crecimiento de tejidos que ocurre después del cambio de una dieta eventualmente reflejará la composición isotópica de la dieta suministrada y, por lo tanto, es factible estimar su contribución al consumidor (Fry y Arnold, 1982; Hobson y Clark, 1992; Hesslein et al., 1993; Herzka y Holt, 2000). En lo que se refiere al uso de los isótopos estables de carbono y nitrógeno para la evaluación de la dinámica de la incorporación de los isótopos a los tejidos/órganos de los animales, Carleton y Martínez del Río (2005) interpretaron que la tasa de incorporación elemental debería ser proporcional al crecimiento del tejido.

En los últimos años, el uso de los isótopos estables especialmente de carbono (^{12}C y ^{13}C) y nitrógeno (^{14}N y ^{15}N), se ha convertido en una herramienta complementaria para cuantificar la contribución relativa de la dieta natural en diversas especies de crianza (Anderson et al., 1987; Preston et al., 1996; Burford et al., 2002; Epp et al., 2002, Gamboa-Delgado y Lewis, 2009a); La mayoría de los estudios se han hecho mediante el uso combinado de ambos isótopos. Gaye-Siessegger et al. (2004), estudiaron los niveles de alimentación y los rangos metabólicos individuales de diferentes fuentes de alimentación de la carpa mediante el uso de isótopos estables de carbono y nitrógeno.

La técnica de SIA se usa también en estudios de nutrición para el seguimiento de propósitos como: determinar tiempo de cambio de dieta, estimar contribución de fuentes de N desde la dieta, entender las relaciones alimenticias temporales entre los consumidores y sus presas, indicando recambio de proteínas en tejido muscular, proporcionando información con respecto al estado nutricional de una dieta específica o de un régimen alimenticio (Herzka y Holt, 2000; Herzka et al., 2005; Gamboa- Delgado y LeVay, 2009a,b; Gamboa-Delgado et al., 2011; 2012; LeVay y Gamboa-Delgado, 2011; Malpica et al., 2012).

II.2. Uso de los isótopos estables en análisis de fuentes de alimentación del camarón

La mayoría de los estudios de contribución del alimento natural al crecimiento del camarón usando isótopos estables han sido expresados en términos de carbono en condiciones de cultivo semi-intensivo (p.e. Anderson et al., 1987; Nunes et al., 1997; Parcker et al., 1989). Anderson et al. (1987) hicieron un trabajo similar en camarón tigre, *Penaeus monodon*, pero utilizando un isótopo radioactivo de carbón. Estos estudios han encontrado que entre 44 y 86% del crecimiento del camarón puede ser debido a la productividad natural del estanque.

Los isótopos del nitrógeno han sido evaluados para detectar tasa de recambio de la dieta de crustáceos, examinando la mejor asimilación de dietas y evaluar la contribución relativa de dietas isotópicamente distintas (Anderson et al., 1987, Preston et al., 1996, Burford et al., 2002, Epp et al., 2002, Gamboa y Lewis, 2009a). Entre otros estudios utilizando isótopos estables en camarones de diferentes especies, destacan los de Parker et al. (1989), Bufford et al. (2004), y Wu and Lu (2012) para *Litopenaeus vannamei*; Cam et

al. (1991) para *Penaeus japonicus*; Nunes et al. (1997) para *Penaeus subtilis*; Preston et al. (1996), Focken et al. (1998) y Bufford et al. (2002) para *Penaeus monodon*.

Pocos estudios han reportado la contribución del alimento natural en términos de N emulando el cultivo intensivo en estanques a cielo abierto. Uno de los más representativos fue llevado a cabo por Epp et al. (2002) en un mesocosmos experimental con juveniles medianos de *L. vannamei* con cero intercambio. Los autores revelaron que la contribución del alimento natural fue de 28-31%. Siguiendo estrategias metodológicas similares, Bufford et al. (2004) estimaron una contribución natural (por bioflocs) a la nutrición de *L. vannamei* para animales juveniles de 1 a 9 gr encontrando contribuciones de de 18% a 29%.

II.3. Fraccionación en el tejido de crustáceos durante la asimilación

Las señales isotópicas de C y N de los animales, típicamente reflejan las señales isotópicas de sus dietas más un factor de discriminación ($\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{tejido}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{dieta}}$) causada por las diferencias isotópicas del mismo elemento incorporado dentro del tejido a diferentes tasas, mas probablemente a través de la selección diferencial del isótopo más pesado en cada paso metabólico (fraccionación isotópica) (Martínez del Rio y Wolf, 2005; Martínez del Rio et al., 2009).

En experimentos alimenticios, el factor de discriminación puede ser normalmente determinado esperando hasta que se alcance una diferencia constante entre la dieta y el tejido animal. Para algunas larvas por ejemplo, especies de crustáceos tropicales, esto puede ser difícil de lograr debido a su rápida metamorfosis y cambios tróficos, ya que el intervalo de tiempo en que recibe el alimento propio para su estadio es limitado, y no se

alcanza el equilibrio entre los tejidos y la dieta (Schlechtriem et al., 2004; Comtet y Riera, 2006).

La discriminación puede variar de acuerdo al tejido o elemento estudiado, también de acuerdo a diferencias en la composición de los tejidos y a la fisiología de la especie (Post 2002; McCutchan et al., 2003; Vanderklift y Ponsard, 2003). En estudios ecológicos de sistemas acuáticos, se asume que el $\Delta^{13}\text{C}$ es cercano a +1‰, reflejando solamente un ligero incremento en el contenido del ^{13}C con relación a la dieta (Michener y Schell, 1994; Fry y Sherr, 1984). Procesos que podrían causar esta discriminación por la pérdida de $^{12}\text{CO}_2$ durante la respiración y la captación de los componentes del ^{13}C durante la digestión o la biosíntesis de los diferentes tejidos (DeNiro y Epstein, 1981; Tieszen et al., 1983). La discriminación del ^{15}N alcanza valores generalmente más grandes de ($\Delta^{15}\text{N} = 3.4\text{‰}$), debido a la excreción selectiva del isótopo pesado (Minagawa y Wada, 1984; Tibbets et al., 2008).

Los valores del $\Delta^{15}\text{N}$ han sido usados para estimar el nivel trófico relativo de organismos dentro de una cadena alimenticia con una diferencia promedio cercana a +3.4‰ normalmente asumido para representar un nivel trófico (DeNiro y Epstein, 1981, Minagawa y Wada, 1984; Kelly, 2000). La aplicación generalizada de tal valor de $\Delta^{15}\text{N} = 3.4\text{‰}$ ha sido aceptada casi universalmente en la determinación de posición trófica en ambientes terrestres y acuáticos (Fry y Sherr, 1984; Fry, 1991; Van der Zanden et al., 1999, Post, 2002). Sin embargo, las relaciones entre la discriminación isotópica del nitrógeno y otros factores tales como el suministro de proteína dietética y calidad permanecen poco entendidas (Robbins et al., 2005; Martínez del Rio et al., 2009).

Más aún, existen evidencias de los factores de discriminación isotópica son diferentes entre distintas especies y entre tejidos de la misma especie (DeNiro y Epstein, 1981;

Tieszen et al., 1983; Yokoyama et al., 2005; Stenroth et al., 2006) y una variación considerable entre los valores reportados demuestran que debe de hacerse una validación cuidadosa de los factores de discriminación ya que son críticos para la interpretación de datos isotópicos en estudios de dietas (Cabana y Rasmussen, 1996; McCutchan et al., 2003; Crawley et al., 2007; Martínez del Rio et al., 2009).

Recientemente Caut et al. (2009) hizo una revisión de los estudios publicados donde se aplican técnicas de isótopos estables, reportando que en más de la mitad de los estudios que usaron modelos de mezcla isotópica para la reconstrucción de dietas no estimaron los factores de discriminación, sino que fueron tomados de datos previamente publicados. Se han reportado variaciones del factor de discriminación dependiendo de la dieta. Por ejemplo, Gamboa-Delgado y Le Vay (2009a, 2009b) observaron que la calidad de las proteínas en alimento ofrecido a larvas y postlarvas de camarón *L. vannamei*, puede tener efectos sobre el $\Delta^{15}\text{N}$.

Al observar el intervalo tan amplio de los valores reportados por estos autores, tanto en $\Delta^{15}\text{N}$ como en el $\Delta^{13}\text{C}$, nos indica que debemos incluir determinaciones experimentales de la discriminación dentro del diseño experimental aplicando isótopos estables en nutrición larval. Esto es necesario que se repita en cada estudio experimental, ya que la discriminación isotópica podría variar durante la ontogénesis de las larvas acuáticas, debido a los cambios en la tasa metabólica y con relación a la dieta específica que se lleve a cabo en el estudio (Hentschel, 1998; Rossi et al., 2004; Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009b).

III. Justificación e importancia del estudio

Mediante el estudio de las proporciones de los isótopos en las posibles fuentes contribuidoras en la dieta de un organismo y en el organismo mismo, es factible establecer una aproximación, sobre la contribución relativa a la formación de tejido de cada una de estas fuentes. Con esta información, se tendrán las bases para optimizar las estrategias de alimentación del camarón cultivado, suministrando las cantidades adecuadas de alimento formulado e incentivando aquellos elementos de la productividad natural que mayormente contribuyen en su alimentación.

Para asegurar el uso correcto de SIA, en estudios nutricionales, incluida estimación de tasa de cambio isotópico en tejido de camarón seguido de un cambio de dieta, también como estimación de fraccionación isotópica. Se estudiaron ambos parámetros porque son usados como indicadores de la condición fisiológica y metabólica de *Litopenaeus vannamei* con relación a su dieta.

Con esta tesis se promueve la generación de conocimiento científicamente probado y atractivo, además de ecológicamente útil, para entender y resolver problemas causados por actividades económica y socialmente importantes en México. La información generada es de gran importancia para los granjeros, productores de alimentos, diseñadores de sistemas de tratamiento y autoridades responsables de regular esta actividad. Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto Ciencia Básica 60215) titulado: “Ciclo del nitrógeno en un estanque camaronícola mediante el uso de isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ ”. Esto repercutirá de manera significativa no solamente en la rentabilidad económica de la granja, sino además se avanzará en la

implementación de proyectos camaronícolas sustentables al minimizar la carga orgánica suministrada a los estanques y como consecuencia, al impacto ambiental que provoca el alimento no consumido.

IV. Preguntas de investigación e hipótesis

Aunque hay insuficiente conocimiento de cómo varían los valores de las tasas y del recambio isotópico y $\Delta^{15}\text{N}$ entre individuos de una especie dada dentro de condiciones nutricionales, ambientales y de los individuos, nosotros hipotetizamos que los valores de t_{50} y $\Delta^{15}\text{N}$ varían de acuerdo a la calidad (en términos de C:N) y cantidad (saciedad, limitado o en ayuno) del alimento y con la talla de los especímenes.

Además, aunque se sabe que en camarones cultivados, el alimento formulado constituye la dieta principal, sin embargo, nos preguntamos cómo varía la contribución de la productividad natural a la dieta del camarón durante el ciclo de cultivo de camarón. Nuestra hipótesis es que los diferentes componentes de la productividad primaria que se producen en el estanque de cultivo contribuyen a la dieta del camarón en cultivo y su contribución está en función de los estadios de crecimiento de los especímenes. Mayor contribución a menor talla. Las técnicas isotópicas en combinación con modelos matemáticos de mezcla ayudarán en estimar las contribuciones relativas de cada una de las fuentes y los procesos de enriquecimiento trófico.

V. Objetivos

V.1. Objetivo General

Evaluar las contribuciones relativas de las dietas a la biomasa del camarón cultivado en sus diferentes fases de crecimiento mediante la aplicación de la isotopía estable de C y N, en experimentos tipo mesocosmos y en estanques de camarón bajo un sistema intensivo.

V.2. Objetivos Específicos

1. Analizar isotópicamente las fuentes naturales de alimento en la columna de agua (fitoplancton y consumidores primarios y secundarios (zooplancton), y material floculado, y en los sedimentos (micro-flóculos, zoobentos).
2. Mediante experimentos tipo mesocosmos estudiar la variabilidad isotópica de nitrógeno en el músculo de camarón alimentado con dietas isonitrogenadas de alimento formulado, natural y combinaciones 50:50, bajo diferentes escenarios de alimentación (a saciedad, limitado y ayuno) en diferentes estadios de crecimiento (desde postlarvas a juveniles mayores).
3. Con el propósito de mantener condiciones controladas, determinar las características de calidad de agua tradicionales (e.j. oxígeno disuelto, especies de nitrógeno disuelto, material orgánico particulado, clorofilas, fosfatos), entre otros.
4. Determinar los parámetros de crecimiento y metabólicos, y el fraccionamiento isotópico durante la asimilación de las diferentes fuentes de alimento.
5. Mediante la resolución de modelos de mezclas, realizar un estudio de aprovechamiento de la dieta de alimentación del camarón en diferentes estadios del cultivo y bajo diferentes escenarios de alimentación.

VI. Materiales y Métodos

VI.1. Área de estudio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Aquastrat, S.A. de C.V., localizada en la zona sur del estado de Sinaloa, en el municipio de Escuinapa (Fig.1). En este sitio se encuentra asentado un complejo acuícola de 42 hectáreas de cultivo intensivo de camarón distribuidas en 22 estanques. La producción es de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con una densidad de siembra de $\sim 60 \text{ PL m}^{-2}$.



Fig. 1. Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreo en las instalaciones de la Aquastrat, S.A. de C.V., localizada en la zona sur del estado de Sinaloa.

VI.2. Prácticas de manejo en granja

Las prácticas de manejo en la granja tales como densidad de siembra, estrategias alimenticias, tasas de recambio de agua y parámetros de calidad de agua fueron monitoreadas con técnicas analíticas estandarizadas (Tabla 1). El estudio se realizó en tres estanques representativos, en el influente (bahía de Teacapán) y en el efluente de la granja, muestras fueron colectadas tres veces al día (mañana, mediodía y tarde) durante 90-100 días de cada ciclo de cultivo, durante los ciclos Verano-Otoño 2008 y Primavera-Verano 2009.

VI.3. Diseño experimental

Los mesocosmos experimentales y el estudio de seguimiento en granja fueron conducidos durante el ciclo Primavera-Verano 2009 (Tabla 1). Cuatro ensayos representando diferentes estadios de vida del camarón: postlarvas (ensayo I), juveniles pequeños (ensayo II), juveniles medianos (ensayo III) y juveniles grandes (ensayo IV). En este estudio probamos dietas isonitrogenadas (35-40% de proteínas) usando alimento natural (AN) y alimento comercial formulado (AF) dentro de cuatro tratamientos: 1) alimento artificial (AF), 2) alimento natural (AN), 3) combinación de ambos en relación 50:50 basado en el contenido de nitrógeno promoviendo la producción potencial de alimento natural en la columna de agua (plancton + bioflocs, AN+AF) y 4) similar al tres pero con la promoción para sedimentos de una cadena trófica bentónica además de la planctónica como en los estanques de tierra (plancton +bioflocs+ bentos, AN+AF +S).

Durante el experimento, las tasas de alimentación fueron adaptadas a los cambios en la biomasa del camarón de acuerdo al escenario alimenticio (Tabla 1). Para el escenario de saciedad, la alimentación fue una ración simple en la mañana y en la tarde y una doble en la noche. El total de las raciones correspondieron aproximadamente del 12-20% de la biomasa del camarón por día para PL20's y una cantidad entre 10% y 4% para juveniles pequeños y grandes. La saciedad en el alimento fue evaluada colocando alimento en charolas alimentadoras, las cuales fueron checadas una y dos horas después de alimentados. La porción de alimento se incrementó con base en el alimento que quedaba en las charolas. Para el escenario donde se les limitó el alimento, nosotros probamos juveniles medianos a las mismas condiciones y un periodo de duración como en el ensayo 3 pero aplicando un 55% del nivel de saciedad aparente (aproximadamente entre el 4-5% de la biomasa del camarón; Mente et al., 2002). Porque los niveles de fraccionación del ^{15}N también fueron afectados por el ayuno (Hesslein et al., 1993), nosotros también probamos el efecto de privación de alimento a corto plazo en juveniles medianos usando el ensayo 3 durante 10 días.

Tabla 1. Diseño experimental para determinar los efectos de la talla del camarón, tipos de dieta y escenarios alimenticios sobre las tasas de recambio isotópico y discriminación isotópica del músculo de *L. vannamei*. En el mesocosmos experimental, la información incluye estadio de vida de *L. vannamei* (desde postlarvas hasta juveniles grandes), tratamientos de dieta (alimento natural y formulado comercial y combinación de ambos), escenarios alimenticios (saciedad, alimento limitado y ayuno), duración de cada ensayo alimenticio y días de recolección de muestras para análisis biométricos e isotópicos, composición isotópica ($\delta^{15}\text{N}_{\text{dieta}}$, ‰) y calidad nutricional de las dietas (en término de relación C:N), y composición isotópica inicial ($\delta^{15}\text{N}_i$, ‰) y peso inicial de los especímenes (W_i , g).

Información de mesocosmos				Dieta		Camarón	
Estadio de vida (Ensayo #)	Escenario alimenticio	Tratamiento	Días de recolección	$\delta^{15}\text{N}_{\text{dieta}}$	C:N _{dieta}	W_i	$\delta^{15}\text{N}_i$
Postlarvas (Ensayo 1): 11 días	Saciedad: 12-20% de la biomasa del camarón por día	AN	3, 6, 9, 11	9.80±0.76 ^c	8.63±0.20 ^d	0.0517±0.003	11.12±0.26
		AF		6.45±0.20 ^a	7.60±0.22 ^c		
		AN+AF		8.32±0.54 ^b	5.70±0.21 ^a		

		AN+AF+S		7.03±0.57	6.93±0.20 ^b		
Juveniles pequeños (Ensayo 2): 30 días	Saciedad: cerca del 10%	AN	7, 14, 21, 30	8.13±1.42 ^c	7.42±0.18 ^{a,b}	0.25±0.10	8.41±0.10
		AF		4.82±0.26 ^a	8.32±0.50 ^b		
		AN+AF		6.83±0.40 ^b	7.87±0.34 ^{a,b}		
		AN+AF+S		6.48±0.71 ^b	7.02±0.49 ^a		
Juveniles medianos (Ensayo 3): 30 días	Saciedad: 7-10%	AN	7, 14, 21, 30	6.81±0.70 ^{a,b}	4.65±0.20 ^a	2.79±0.26	7.72±0.17
		AF		5.80±0.13 ^a	8.51±0.30 ^d		
		AN+AF		6.28±0.49 ^a	6.59±0.16 ^b		
		AN+AF+S		6.12±0.60 ^a	7.32±0.20 ^c		
Juveniles grandes (Ensayo 4): 35 días	Saciedad: 4-6%	AF	7, 14, 21, 30, 35	5.80±0.13 ^a	8.81±0.03 ^c	6.21±0.72	6.95±0.34
		AN+AF		6.25±0.48 ^b	6.70±0.08 ^a		
		AN+AF		6.81±0.53 ^b	7.65±0.12 ^b		
Juveniles medianos (Ensayo 3): 28 días	Alimento limitado: 3.5-5%	AN	7, 14, 21, 28	6.81±0.70 ^b	4.91±0.40 ^a	2.79±0.26	7.72±0.17
		AF		5.80±0.13 ^a	8.51±0.30 ^c		

		AN+AF	6.28±0.49 ^b	6.59±0.16 ^b
Juveniles medianos (Ensayo 3): 10 días	Ayuno con canibalismo	7, 10	2.79±0.26	7.72±0.17

AN: dieta de alimento natural, AF: dieta de alimento formulado, AN+AF y AN+AF+S combinación de ambos 50:50 con relación al contenido de nitrógeno N sin y con sedimentos, respectivamente. Análisis bromatológicos hechos en las diferentes dietas comerciales usadas en los experimentos indicando como % peso seco: proteínas 40-45%, grasas 8-9%, fibra cruda 3.5-4.5%, y extracto libre de nitrógeno (ELN) 42-48%. Componentes del alimento natural (AN): proteínas 35-40%, grasas 6-7%, fibra cruda 8.6-9%, y ELN 30-46%. Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas: a<b<c<d como resultado de un análisis de varianza (ANOVA) seguido por pruebas de comparación múltiple de Tukey.

Los experimentos en los ensayos del I-IV se realizaron en 12 tanques circulares (0.5 m² de área superficial de fondo, 400 L de volumen de agua) colocados adyacentes a la granja de cultivo intensivo de camarón (Fig. 2). Postlarvas y juveniles de camarón blanco fueron directamente obtenidos de los tres estanques de cultivo seleccionados en la granja y aclimatados por una semana antes de cada ensayo. Durante este tiempo los organismos fueron alimentados con alimento comercial siguiendo las mismas prácticas de alimentación de la granja. Después de la aclimatación, los organismos fueron separados y distribuidos al azar en los tanques. Tres tanques fueron seleccionados al azar para cada uno de los cuatro tratamientos, incluyendo alimento natural (AN), alimento formulado (AF), y combinación de ambos a razón de 50:50 basado en contenido de nitrógeno (AN+AF) y con sedimentos (AN+AF+S).

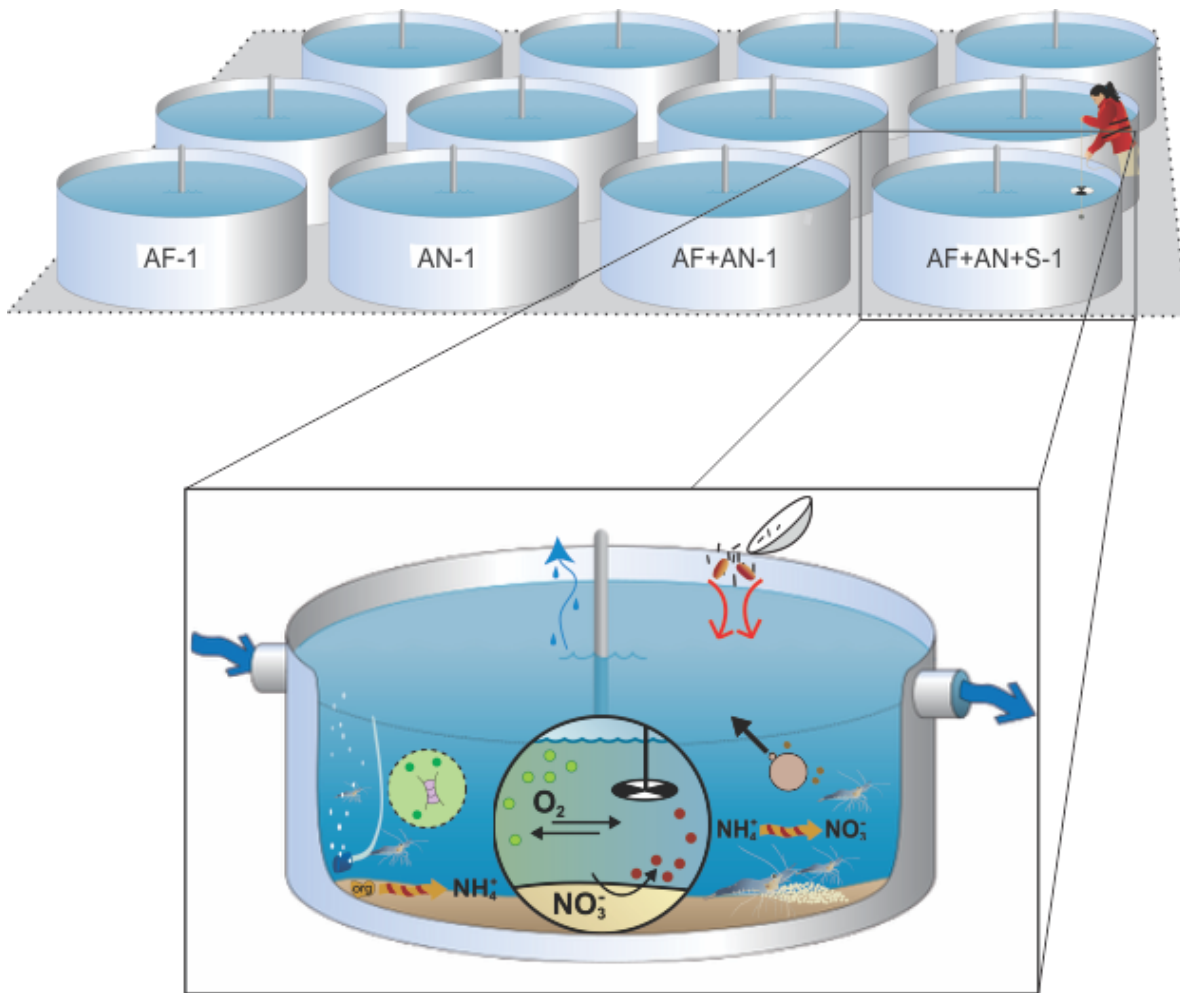


Fig. 2. Representación esquemática de los experimentos tipo mesocosmos realizados en 12 tanques de polipropileno de 400 L. Los experimentos fueron realizados en diferentes tallas de camarón (desde PL-20's hasta juveniles mayores) y empleando diferentes fuentes de alimento: alimento formulado (AF) o alimento natural (AN) o mezclas de ambos sin (AN+AF) o con sedimentos (AN+AF+S). Los experimentos fueron realizados en las instalaciones de la granja Aquastrat durante los meses de Abril-Julio 2009. Múltiples variables ambientales y biométricas descritas en los métodos fueron medidas en cada uno de los experimentos.

La granja de camarón y los tanques de experimentación fueron abastecidos con agua de mar desde la costa de la Bahía de Teacapán, se mantuvieron a temperatura ambiente y luz natural. Los sedimentos fueron colectados directamente desde los estanques de cultivo de tierra y adicionados sin tratamiento a los tanques experimentales, para garantizar que fueran introducidos animales bentónicos vivos. Los tanques fueron cubiertos con una malla sombra para prevenir exceso de calor. Piedras aireadoras conectadas a un regenerador de aire se instalaron para asegurar aireación y mezcla del agua.

VI.4. Ensayo I

Para el primer ensayo, un total de 100 postlarvas con una longitud total de 12.0 a 18.0 mm y un peso promedio de 51.7 ± 7 mg en cada tanque experimental. El AF usado fue migaja (<0.5 mm) con 40% de proteína (peso húmedo, Tabla 1). La tasa de alimentación fue de 30-40% de la biomasa y el intercambio de agua fue $0\% \text{ d}^{-1}$, solamente con reposición por evaporación (<3% d^{-1}). El periodo de experimentación fue de 11 días.

VI.5. Ensayo II

En el segundo ensayo, 30 juveniles pequeños de *L. vannamei* (peso inicial, 0.251 ± 0.105 g) fueron sembrados dentro de cada tanque para probar los cuatro tratamientos durante 4 semanas. La tasa de alimentación fue 10% y la tasa de intercambio de agua (TIA) de 15-20% d^{-1} . Se usó alimento comercial iniciador (micropellets 0.5-0.75 mm) con 40% de proteína. La migaja y el iniciador son alimentos con tamaño de partícula pequeños recomendado como alimento desde que se siembran las postlarvas (0-15 días) hasta que alcanzan un peso promedio de 3-4 g, respectivamente. De acuerdo a los productores estos

tiene una alta digestibilidad y contienen todos los requerimientos nutricionales del camarón para las etapas tempranas de desarrollo.

VI.6. Ensayos III y IV

Para los ensayos tercero y cuarto, el protocolo fue una repetición del ensayo dos pero usando 30 y 24 especímenes con peso inicial de 2.79 ± 0.26 g y 6.21 ± 0.72 g, respectivamente. Los organismos fueron alimentados con pellets (1.5-2.5 mm) con 35% de proteína (Tabla 1). Los pellets son usados durante el estadio de crecimiento exponencial de los juveniles (3-8 g, de los días 30-60 hacia adelante). La tasa de alimentación fue de 10% y la TIA de 15-20% para el ensayo III, y 7% y 30%, respectivamente para el ensayo IV. Las raciones alimenticias fueron divididas en tres porciones (25% por la mañana y a mediodía y 50% por la tarde-noche) y proporcionado de tal forma el alimento que fue claramente visible usando las charolas alimentadoras. Durante el experimento, la tasa de alimentación fue progresivamente ajustada semanalmente con base en la biomasa observada, comparada con lo aplicado en la granja de camarón. La cantidad de alimento aplicado a cada tanque experimental fue registrado.

Los lodos que se depositaron en los tanques AF derivado de los productos de desechos alimenticios y del detritus fueron removidos diariamente vía un dren central y las paredes de los tanques fueron limpiadas para prevenir la acumulación de bio-flocs. Para minimizar el riesgo de infección bacteriana o viral, todos los materiales fueron cuidadosamente desinfectados usando solución de cloro y enjuagados con abundante agua. Las ecdisis y sobrevivencia fueron observadas diariamente, y las mudas y los especímenes muertos fueron removidos de cada tanque experimental.

VI.7. Recolección, medición y disección de los organismos

Al inicio de los experimentos, 10 individuos fueron recolectados al azar para análisis de características biométricas, condición de salud y para los análisis de isotopos estables de C y N. Al final de los experimentos los camarones se cosecharon, se contaron y se analizaron para características biométricas. El peso (W), fue medido en una balanza semi-analítica (± 0.1 mg) y la longitud total (LT) de las postlarvas usando un microscopio estereoscópico con un micrómetro con resolución de 0.01 mm y a los juveniles se midió su longitud total y longitud del cefalotórax usando una escala Vernier.

Un total de 9 individuos de cada tratamiento fueron seleccionados para análisis isotópicos (3 por cada réplica). Al final de los experimentos solamente los especímenes más grandes fueron escogidos para SIA porque nosotros asumimos que ellos mantuvieron la mejor condición durante el experimento.

Solamente los organismos de tratamiento AF del ensayo III se cosecharon en su totalidad. Los camarones fueron disectados para separar cefalotórax y abdomen. Del cefalotórax se obtuvieron los órganos hepatopáncreas, estomago e intestino medio y del abdomen se extrajo el músculo y exoesqueleto con sus apéndices (Figs. 3 y 4).

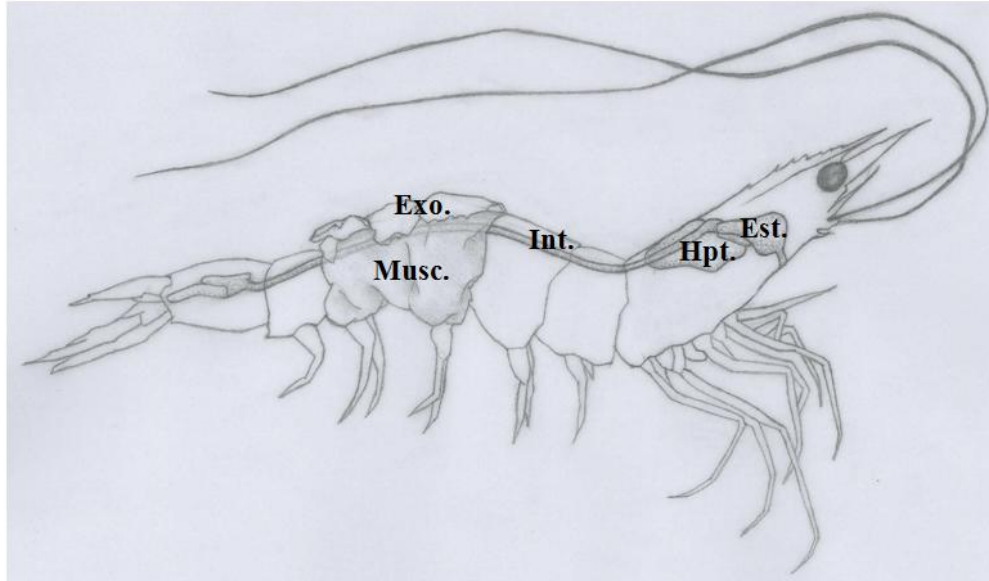


Fig. 3. Ilustración de camarón *Litopenaeus vannamei* mostrando órganos y tejidos usados para determinar las señales isotópicas y contenidos de N y C (y relación C:N).

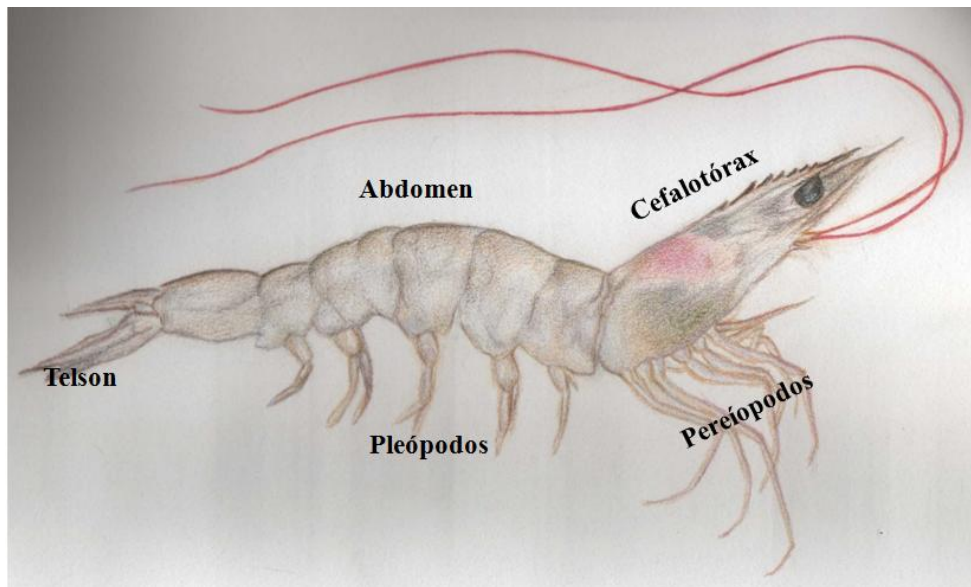


Fig. 4. Ilustración de camarón *Litopenaeus vannamei* mostrando características anatómicas externas.

A causa de que la variabilidad natural de las señales isotópicas en los componentes de la dieta natural puede variar entre los lotes, nosotros preparamos una muestra homogénea que fue colectada por varios días.

Para los tratamientos con dieta formulada nosotros usamos tres diferentes alimentos comerciales de la marca Vimifos para acuicultura, los cuales fueron aplicados en la granja de camarón durante diferentes estadios de cultivo (Tabla 1), incluyendo (PL20's y juveniles más pequeños alimentados con migaja e iniciador respectivamente con 40% de proteínas y organismos juveniles mas grandes alimentados con 35% de proteínas). Los organismos no dispusieron de otro alimento.

VI.8. Procesamiento de muestras

Todas las muestras y los componentes de la dieta fueron liofilizaron por 72 h (Labconco, -43°C y 133×10^{-3} mBar), las muestras secas fueron molidas, homogenizadas, y almacenadas y selladas en contenedores de polipropileno hasta su análisis. Las muestras molidas y homogenizadas, fueron colocadas en una cámara de vidrio con vapores de HCl concentrado por 4 horas con el fin de remover los carbonatos. Después secadas a 60 °C (4 h) y almacenados a 4°C. Los lípidos no fueron removidos de las muestras antes del análisis isotópico. Alícuotas de 1.0 ± 0.1 mg fueron pesadas en cápsulas de estaño de 5x3.5 mm. Las muestras encapsuladas fueron analizadas en el Departamento de Plant Science of University of California at Davis, CA, USA, en un analizador elemental PDZ Europa Scientific Roboprep acoplado a un espectrómetro de masas para isotopos estables (IRMS)

PDZ Europa Hydra 20/20. Las muestras fueron analizadas para contenido de carbono y nitrógeno y composición isotópica. La precisión analítica (desviación estándar, n=5) fue 0.2‰ para nitrógeno y carbono, estimada de un estándar de hojas de durazno NIST-1547 e hígado de bovino NIST-157b, (ambos materiales del National Institute of Standard Technology) analizado cada 12 muestras. La composición isotópica ($\delta^{15}\text{N}$) en partes por mil (‰) fue expresada como la diferencia relativa entre la razón isotópica en la muestra y en estándar convencional (N_2 atmosférico para nitrógeno):

$$(\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{estandar}}) - 1]1000, \text{ donde } R \text{ es } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N})$$

VI.9. Análisis de agua

Parámetros críticos de calidad de agua, incluyendo oxígeno disuelto, temperatura y salinidad fueron diariamente monitoreados 3 veces al día con una sonda YSI 5775 y registrada a través del periodo experimental. Las muestras de agua de los tanques experimento para los análisis de nutrientes fueron recolectadas al inicio, una vez por semana y al final de los experimentos. Los sólidos suspendidos totales (SST) fueron analizados filtrando entre 200-1000 mL de muestras de agua de mar con una bomba de vacío a baja presión, a través de filtros de fibra de vidrio (GF/F) pre-calcinados (500°C, 4 h). Las partículas en el filtro (>0.45 μm) fueron secadas a 55-60°C. Los SST totales fueron determinados comparando pesos de los filtros antes y después de la filtración en un volumen de agua conocido. Muestras de agua fueron filtradas por duplicado y congeladas inmediatamente a -20°C.

El resumen de las técnicas analíticas empleadas se presenta en Tabla 2. Brevemente, la clorofila *a* (*Cl a*) fue extraída del material particulado suspendido congelado con la

adición de acetona al 90%, macerando mecánico del filtro, centrifugando y separando el sobrenadante para su análisis en un espectrofotómetro UV-Visible (Grasshoff et al., 1983). El análisis de su amonio total (TAN) se realizó por el método del hipoclorito y fenol (Solórzano y Sharp 1980), el análisis de nitratos se hizo por la reducción de nitritos pasando las muestras a través de una columna de cadmio tratado con sulfato de cobre. El nitrito de la conversión de nitrato y el original se determina por diazonización con sulfanilamida seguido por acoplamiento con N-(1-naftil) etilendiamina diclorado (Solórzano y Sharp 1980). El nitrógeno disuelto total (NDT) fue analizado convirtiendo todo el nitrógeno a nitrato por oxidación alcalina con persulfato y el nitrógeno orgánico particulado (NOP) fue analizado por un analizador elemental acoplado a IRMS. El nitrógeno total se obtuvo con la suma del NDT y NOP.

Tabla 2. Técnicas analíticas practicadas a las muestras de agua.

Análisis de muestras	Determinación	Referencia
Nitrógeno total y nitrógeno disuelto total (NT y NDT)	Se realizaron en muestras de agua sin filtrar y filtrada donde los compuestos orgánicos y amoniacales se oxidaron a nitratos bajo presión con persulfato de potasio en una solución alcalina. Después de la oxidación los nitratos se redujeron a nitritos con una columna de Cd y finalmente se determinaron por medio de colorimetría. La concentración se midió por absorbancia del complejo a una longitud de onda máxima de 543 nm.	Grasshoff et al., 1983
Amonio total (N-NH ₃ /NH ₄ ⁺)	La concentración en muestras filtradas de agua, se determinó mediante la reacción con fenol e hipoclorito de sodio para producir el azul de indofenol, cuyo valor de absorbancia se lee en el espectrofotómetro a 640 nm.	Solórzano y Sharp (1980)
Nitritos (N-NO ₂ ⁻)	Se realizaron en muestras de agua filtrada donde los nitritos de la muestra reaccionan con el reactivo sulfanilamida y <i>N</i> -1 naftil-etilendiamina, la cual forma un azo compuesto cuya absorbancia es de 543 nm en el	Strickland y Parsons (1972)

	espectrofotómetro.	
Nitratos (N-NO ₃ ⁻)	Se realizaron en muestras de agua filtrada mediante la reducción cuantitativa de nitratos a nitritos usando una columna de cadmio, en presencia de cloruro de amonio el cual produce un efecto buffer en la disolución y forma un complejo con el cadmio.	Strickland y Parsons (1972)
Sólidos suspendidos totales (SST)	Se determinaron por diferencia entre el peso inicial del filtro de fibra de vidrio y final del filtro dividido entre el volumen de filtración de la muestra. Para el filtrado del agua se utilizaron filtros de 0.45 µm, previamente secados en estufa a 55°C y pesados en una balanza analítica. Se filtraron determinados volúmenes de agua para cada filtro, dependiendo del sitio de muestreo hasta llegar a la saturación del mismo y agregando posteriormente entre 30 y 50 mL de agua destilada para remover las sales retenidas. Posteriormente se secaron las muestras y se obtuvo el peso final.	APHA-AWWA-WPCF, 1989. American Public Health Association (APHA), et al., 1992.
Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T)	Se determinaron con Sonda YSI 556 MPS	-
Fósforo (P-PO ₄ ³⁺)	Se realizaron en muestras filtradas y sin filtrar después	(Rosales-

de la digestión descrita para NT Y NDT. En este método Hoz, 1980).
se agrega una disolución de molibdato de amonio en ácido sulfúrico y una disolución de ácido ascórbico a la disolución de la muestra. El radical fosfato presente en la muestra reacciona con el molibdato para formar el complejo amonio molibdofosfato, una reducción controlada de este compuesto produce un complejo azul de molibdeno. Normalmente la reducción es lenta, pero la adición de un catalizador, en este caso tartrato de antimonio hace que se lleve a cabo rápidamente la reducción. La cantidad de azul de molibdeno formado es proporcional a la concentración de fósforo como ortofosfatos presentes en la muestra.

Silicatos (SiO_3)	El complejo del ácido β -silicomolíbico se reduce a un complejo azul intenso, con absorbancia máxima a 815 nm.	Fanning y Pikon (1973).
Clorofilas (<i>Cl</i>)	Primero se efectúa una filtración de agua empleando una membrana de fibra de vidrio Whatman GF/F de 0.45 μm , con una bomba de vacío de cámara seca. La mitad de los filtros se tratan con 10 ml de solución de acetona al 90% para después medir la absorbancia en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 630, 647, 664	Parsons, et al; (1984)

y 750 nm.

Fitoplancton cualitativo y cuantitativo	La recolección de fitoplancton para análisis cualitativo, se tomaron muestras directas de agua en botellas de 500 ml para después ser fijadas con solución de yoduro lugol (1%) para su conservación hasta el procesamiento en el laboratorio. Para análisis cuantitativo, se tomó una alícuota de 1 ml y se colocó en una cámara de recuento de Sedgewick-Rafter, se realizó un barrido del área total de la cámara a 20 aumentos (20x) en un microscopio compuesto Leica con cámara fotográfica acoplada. La identificación se realizó hasta el nivel que fue posible, basándose en literatura general y especializada.	Arredondo- Vega y Voltolina (2007)
---	--	---

VI.10. Procesamiento de datos

Usando los datos biométricos medidos, nosotros calculamos los índices de crecimiento y tasas de sobrevivencia de los camarones en los múltiples tratamientos y ensayos. La biomasa fue estimada basada en el peso promedio y número total de especímenes. La tasa de crecimiento específico promedio ($[TCE=(\ln W_f - \ln W_i)/(t_f - t_i) \times 100]$) (Tacon et al. 2002), fue calculada para cada grupo experimental al inicio y cada semana hasta completar el tiempo que permaneció el ensayo. El peso inicial (W_i) y peso final (W_f) fue el promedio en peso para los tres camarones al tiempo t_i y t_f respectivamente. Además, se calculó el factor de conversión alimenticia $FCA = \text{Alimento consumido total (kg)} / \text{cosecha total}$ (Tacon et al., 2002; Hassan et al., 2012).

El modelo de Hesslein et al. (1993) se usó para estimar la proporción de cambio en la composición isotópica de los tejidos en función del tiempo. Este modelo exponencial asume que cualquier cambio en el tejido del camarón seguido de un cambio en la dieta es debido al crecimiento y/o al recambio metabólico (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009a). Este modelo provee una estimación de la tasa de recambio del N en los tejidos y sus efectos sobre los cambios isotópicos.

En el modelo se integra crecimiento y cambio isotópico en el tiempo y se asume que cualquier cambio isotópico en tejidos de camarón siguiendo un cambio en la dieta es debido al crecimiento y/o al recambio metabólico. Este modelo provee una estimación de la tasa de recambio de N elemental en tejidos y su efecto sobre el cambio isotópico:

$$\delta^{15}N_t = \delta^{15}N_f + (\delta^{15}N_i - \delta^{15}N_f)e^{-(k+m)t}$$

Donde $\delta^{15}\text{N}_t$ es el valor isotópico del tejido del camarón al tiempo t , $\delta^{15}\text{N}_i$ es el valor inicial antes del cambio de dieta, $\delta^{15}\text{N}_f$ es la composición isotópica final en equilibrio con la nueva dieta, t es el tiempo de experimentación (días), la constante m es la tasa de recambio metabólico (por día) y k la tasa de crecimiento específico (por día). La constante k fue calculada con la siguiente ecuación (Kushner et al., 1992):

$$k = \ln(W_f/W_i)/t$$

Donde W_f y W_i son los pesos al final y al inicio respectivamente.

El coeficiente m fue derivado del ajuste de una ecuación no lineal. Los valores isotópicos fueron ajustados a un modelo exponencial de tres parámetros que integra los cambios de crecimiento y los datos isotópicos en el tiempo. El parámetro m fue estimado con la diferencia entre la constante de crecimiento en el modelo de ajuste y el parámetro k calculado con la ecuación de Kushner et al. (1992).

En nuestro modelo se considera que tanto el crecimiento como el recambio metabólico contribuyen al patrón de cambio isotópico ($m > 0$) para animales en crecimiento ($k > 0$). El tiempo medio (t_{50}) definido como el tiempo necesario para que la mitad de los tejidos corporales alcancen el equilibrio isotópico (ser reemplazado) después de consumir la nueva dieta, fue calculado usando los coeficientes m y k ($t_{50} = \ln_2/(m+k)$).

El factor de fraccionación isotópica de nitrógeno ($\Delta^{15}\text{N}$), es la diferencia entre la relación isotópica de los tejidos del animal y su dieta (Peterson y Fry 1987), fue estimado como la diferencia entre el valor promedio del $\delta^{15}\text{N}$ medido en el tejido del camarón y el $\delta^{15}\text{N}$ de su respectivas dietas puras, después de que alcanzaron el equilibrio isotópico.

La contribución relativa de la dieta natural al crecimiento del camarón fue estimada usando las siguientes ecuaciones (Anderson et al. 1987; Epp et al. 2002):

$$W_{AN}/W_{FF} = (\delta^{15}N_{AF} - \delta^{15}Ng) / (\delta^{15}Ng - \delta^{15}N_{AN})$$

$$\delta^{15}Ng = (W_t \delta^{15}N_t - W_i \delta^{15}N_i) / W_g$$

Donde W_{AN} y W_{AF} es el peso ganado del el alimento natural y el alimento formulado respectivamente, los valores de $\delta^{15}N_{AF}$, $\delta^{15}N_{AN}$ y $\delta^{15}Ng$ son los valores isotópicos del alimento formulado, alimento natural y del camarón (ganado a partir de la dieta nueva). $W_t \delta^{15}N_t$ son el peso y el valor δ en el tejido del camarón al tiempo t, W_i y $\delta^{15}N_i$ son el peso y el valor de δ en el tejido del camarón al inicio del experimento y W_g es el peso ganado al final del experimento.

La proporción de contribución de N desde el componente de la dieta natural al crecimiento del camarón cultivado con dieta pura (AN), fue basada en un modelo de mezcla de dos fuentes (Burford et al. 2002; Gamboa-Delgado y Le Vay 2009; Phillips y Gregg 2001), como sigue:

$$X_{AN\ dieta1} + (1-X)_{AN\ dieta2} = 1$$

$$X_{AN\ dieta1} = 1 - [(\delta^{15}N_{AN\ dieta2} - \delta^{15}N_{camarón} + \Delta^{15}N) / (\delta^{15}N_{AN\ dieta1} - \delta^{15}N_{AN\ dieta2})]$$

Donde $\delta^{15}N_{AN\ dieta1}$ y $\delta^{15}N_{AN\ dieta2}$ son las relaciones isotópicas del N de las fuentes potenciales (por ejemplo plancton y bentos), $\delta^{15}N_{camarón}$ es la relación isotópica del tejido del camarón al final del experimento en el tratamiento AN, y el $\Delta^{15}N$ es el enriquecimiento trófico para el N experimentalmente cuantificado para este estudio.

VI.11. Análisis estadístico

La normalidad de datos se evaluó por medio de la prueba Kolmogorov-Smirnov. Después de evaluar normalidad y homogeneidad de las varianzas, los parámetros de crecimiento y las relaciones isotópicas entre las diferentes tallas y dietas se compararon por la prueba ANOVA de Tukey (Zar, 1984). Para análisis estadísticos, los valores individuales del camarón fueron promediados para un mismo tratamiento (3 tanques por tratamiento y tres especímenes por tanque, total 9 especímenes por grupo).

Para evaluar la calidad del modelo exponencial de tres parámetros utilizado para estimar el parámetro m , se siguió el criterio Akaike con una corrección para muestras finitas (AICc, por sus siglas en inglés) (Burnham y Anderson, 2002; Malpica et al., 2012). Además se estimó el coeficiente de determinación R^2 como una medida estadística de la linealidad de la regresión o que tanto se aproxima a los datos reales. Se realizaron análisis de regresión lineal para establecer las relaciones entre los parámetros k y m , y fraccionación isotópica con la talla y la relación C:N.

Nosotros usamos Statistica 7.0 (Statistica para Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA), Office Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) y JMP 11 (SAS Institute Inc.) para todos los análisis estadísticos. Las pruebas fueron corridas a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

VII. RESULTADOS

VII.1. Prácticas de manejo en granja

En cada uno de los ciclos Verano-Otoño 2008 y Primavera-Verano 2009, dos semanas antes de la siembra, los estanques se fertilizaron con una combinación de nutrientes inorgánicos (silicatos, nitrato y fosfato de amonio), con el fin de promover la productividad natural en los estanques. Las tasas de aplicación fueron $470 \pm 9 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ de silicatos, $18.3 \pm 1.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ de nitrógeno y $5.6 \pm 0.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ de fósforo. La densidad de siembra en los estanques fue de 55-60 PL m^{-2} , una población de aproximadamente 600,000 PL $\text{ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$.

Las tasas de recambio de agua en los estanques incrementaron desde 0% a 30% d^{-1} . Al inicio, el agua de mar bombeada a los estanques fue solamente para reponer niveles perdidos por la infiltración y evaporación (0-10% día^{-1}). Después de la semana 3, la tasa de recambio de agua incrementó de 10-15% d^{-1} hasta un máximo de 30% en las semanas 6-8 y así continuó hasta el término del ciclo de cultivo. A partir de las semanas 5-6, los estanques fueron provistos de aireación con aproximadamente 6 hp ha^{-1} usando aireadores de aspas y de inyección, para mantener el oxígeno disuelto superior a 3 mg L^{-1} .

El alimento formulado comercial se suministró con tasas de alimentación de 100% de la biomasa al inicio, con ajustes por estanque después de la segunda semana. Se alimentó tres veces al día (8:00, 13:00 y 18:00 horas) con doble ración por la tarde-noche, empleándose el método de boleo en un vehículo en movimiento y revisándose el consumo de alimento en charolas alimentadoras dos veces al día. El cultivo se mantuvo durante 128 ± 9 días y se les suministró un total de $11,342 \pm 1,292 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$ de alimento

formulado (AF). La sobrevivencia registrada fue de $73\pm 10\%$ (sin considerar el estanque P1 ciclo 2008 donde fue del $>30\%$), se obtuvieron cosechas de $6,614\pm 750$ kg ha⁻¹ciclo⁻¹. El factor de conversión alimenticia (FCA) fue de 1.8 ± 0.1 (Tabla 3).

VII.2. Características del alimento utilizado en los experimentos

VII.2.1. Dieta formulada

El alimento comercial usado para el camarón (AF) fue marca Vimifos, la composición proximal (% en peso seco) varió desde 42-45% (micropellets migaja e iniciador) y 38-40% de proteína, 8-9% de lípidos, 3.5-4.5% de fibra cruda, y 42-48% de extracto libre de nitrógeno (ELN). La composición proximal (% en peso seco) de los componentes de la dieta natural colectada directamente desde los estanques y de los tanques experimentales, varió entre diferentes tipos de alimento natural (Tabla 1). Los contenidos desde 35 a 40% de proteína, 6-7 de lípidos, 8.6-9% de fibra cruda, y varían de 30-46% de ELN. El análisis del detritus reveló bajo contenido de proteínas (13-17%) y grasas (3-4%), pero alto contenido de fibra cruda (7.5-9.2%) y ELN (60-70%, incluyendo cenizas).

Tabla 3. Contenido y composición isotópica C and N, y C:N de cada componente de la dieta para *L. vannamei* cultivado en cuatro diferentes tratamientos desde PL hasta juveniles mayores (ensayos I a IV).

Componente de la dieta	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	mg N g ⁻¹	mg C g ⁻¹	C:N	Ensayo
Alimento natural (AN)						
Fitoplancton	6.88±0.09	-21.59±0.03	39.8±0.74	214±1.1	6.27±0.2	1
Zooplancton	11.2±0.11	-20.62±0.73	61.6±0.4	245±2.7	4.65±0.2	1-3
Floc algal	6.70±0.04	-22.59±0.10	42.3±0.53	207.1±0.54	5.7±0.06	1-4
Floc microbiano	4.81±0.50	-22.64±0.66	75.4±27.0	271±48.4	7.65±1.9	1-4
² Detritos	4.83±0.57	-25.08±0.90	2.03±0.98	21.6±12.9	11.76±2.2	1-3
Alimento formulado (AF)						
Migaja 40%	6.45±0.20	-22.91±0.15	80.5±0.03	521±50	7.6±0.22	1
Iniciador 40%	4.82±0.26	-23.95±0.24	64.7±5.98	459±10	8.32±0.5	2
Engorda 35%	5.80±0.13	-23.97±0.17	67.9±11.5	494±63	8.51±0.3	3, 4

VII.2.2. Dieta natural

La disponibilidad de los componentes del alimento natural AN (por ejemplo fitoplancton, zooplancton, zoobentos, bioflocs y detritus) varió entre ensayos a lo largo del ciclo de cultivo, probablemente en respuesta a las prácticas de manejo (por ejemplo, tasas de alimentación, tasas de recambio de agua), condiciones ambientales y concentración de

nutrientes (Fig. 5). Variaciones similares en los componentes de la productividad natural fueron observadas a lo largo del ciclo del cultivo de camarón en granja.

Como era de esperarse, la variación isotópica de la dieta en los tejidos es mayormente dependiente de los cambios en la dieta natural, ya que la señal isotópica del alimento formulado es frecuentemente constante (Tabla 1). De hecho, se detectaron cambios en los datos isotópicos, siendo más altos en especímenes usando componentes naturales que los cultivados solamente con AF (dieta única y constante).

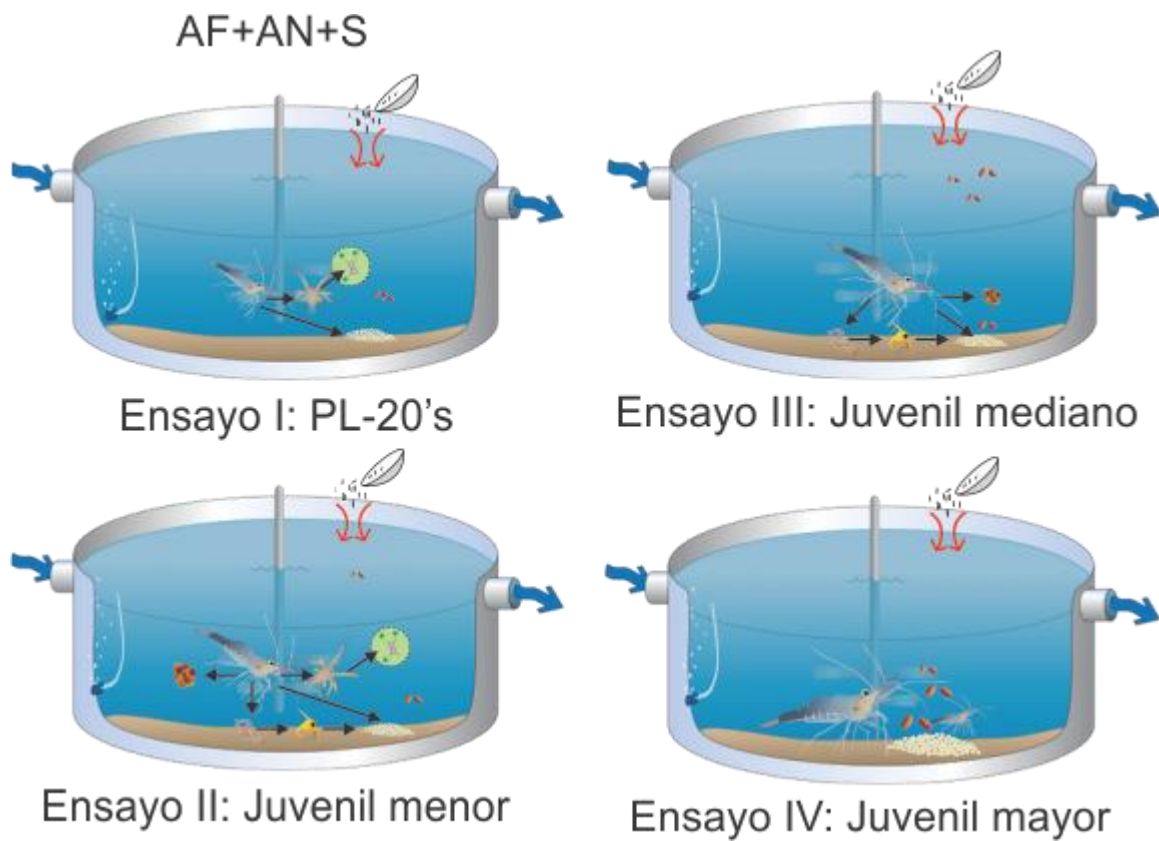


Fig. 5. Componentes dominantes de la dieta del tratamiento (AN+AF+S) en los diferentes ensayos realizados. Ensayo I (postlarvas): Nutrición planctónica sostenida por la cadena alimenticia: fitoplancton, zooplancton, postlarva de camarón. Ensayo II: La contribución de

nutrición planctónica disminuyó con la talla del camarón mientras se incrementa la dependencia por la nutrición bentónica: detritos (microflocs), meiofauna, poliquetos, camarón. Ensayo III: Nutrición bentónica con el detritus como base de la siguiente cadena trófica: detritos (microflocs), meiofauna, poliquetos, camarón. Ensayo IV: dependencia de prácticamente el 100% de alimento formulado. Nula o baja contribución de la dieta natural a los juveniles mayores debido su escasez.

VII.3. Condiciones ambientales de los experimentos y de los estanques de cultivo

Con el propósito de mantener condiciones controladas, se monitorearon parámetros críticos para el cultivo de camarón tales como: temperatura y oxígeno disuelto, fósforo total, formas químicas del nitrógeno, clorofila *a* y sólidos suspendidos totales. En la Tabla 4 se presenta un resumen de las variables fisicoquímicas estudiadas en los experimentos y en los estanques. En general se observaron condiciones ambientales favorables para el cultivo de camarón durante los experimentos, en términos de temperatura (promedios de 22.5 a 28.3°C), salinidad (35 a 36), pH (8.2 a 8.4) y concentraciones de oxígeno disuelto (OD) (4.8-7.1 mg L⁻¹), los cuales nunca fueron menores a 4.6 mg L⁻¹. Estos valores fueron comparables a los dentro de los estanques de estudio para temperatura (25.8 a 30.1°C), salinidad (34.5-35.5), pH (8.1-8.7) y OD (5.4-8.0 mg L⁻¹). Se observó un incremento sustancial en función del tiempo de los SST (desde <30 a 70-250 mg L⁻¹), clorofila *a* (desde <15 a 30-150 µg L⁻¹), NT (desde ~1 a 1.7-3.2 mg L⁻¹), y las formas químicas de N tales como NH₄⁺ (<10 a 25-245 µg L⁻¹) y NO₃⁻+NO₂⁻ (<20 a máximos >1300 µg L⁻¹), con

concentraciones finales significativamente mayores que los valores iniciales ($p < 0.05$) (Tabla 4).

Las concentraciones clorofila *a*, SST, NT y sus formas químicas fueron significativamente más altas e los ensayos III y IV (juveniles) que en ensayo I (PL's). Además, estas variables de calidad de agua fueron consistentemente más altas en los tanques experimentales que en los estanques de camarón ($p < 0.05$). La salinidad, pH, and OD fueron comparables entre experimentos y ensayos, excepto en temperatura que se incrementó gradualmente con el tiempo desde $22.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$ (ensayo I en Marzo, 2009) a $28.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$ (ensayo IV en Julio, 2009).

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos monitoreados durante los experimentos en los ensayos y en los estanques estudiados.

Analito	Inicio	NF	FF	NF+FF	NF+FF+S	Estanques
Ensayo I						
NH_4^+ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	9.59 ± 0.01	24.8 ± 1.38	28.4 ± 27.4	12.5 ± 2.44	28.4 ± 27.4	25.8 ± 9.84
NO_2^- ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.05	0.09 ± 0.04	0.12 ± 0.09	0.09 ± 0.04	0.17 ± 0.08
NO_3^- ($\mu\text{g L}^{-1}$)	17.5 ± 0.01	18.9 ± 4.38	16.0 ± 2.57	25.5 ± 19.3	16.0 ± 2.57	9.56 ± 6.65
NT (mg L^{-1})	2.4 ± 0.00	0.70 ± 0.19	1.26 ± 0.49	0.62 ± 0.12	1.26 ± 0.49	1.03 ± 0.04
Chl- <i>a</i> (mg m^{-3})	3.64 ± 1.62	31.1 ± 22.7	134 ± 75.8	32.9 ± 13.2	134 ± 75.9	5.13 ± 1.33
SST (mg L^{-1})	27.1 ± 0.01	29.6 ± 0.24	70.3 ± 18.0	85.2 ± 21.0	70.3 ± 18.0	40.0 ± 6.11

T(°C)	22.3±0.60	22.5±0.87	23.2±0.57	22.5±0.87	23.2±0.57	26.8±0.19
OD (mg L ⁻¹)	7.43±0.21	7.03±0.21	7.07±0.06	7.03±0.21	7.07±0.06	7.02±0.07
Ensayo II						
NH ₄ ⁺ (µg L ⁻¹)	17.0±3.53	16.7±5.50	82.1±17.4	35.2±24.7	70.5±2.54	13.2±9.35
NO ₂ ⁻ (µg L ⁻¹)	0.06±0.01	0.34±0.01	0.36±0.13	0.21±0.03	0.32±0.13	0.19±0.02
NO ₃ ⁻ (µg L ⁻¹)	9.03±2.7	12.1±1.61	9.86±0.45	9.08±2.39	8.16±2.84	15.7±9.82
NT (mg L ⁻¹)	0.84±0.15	1.81±0.46	1.70±0.51	1.73±0.16	1.91±0.41	1.48±0.16
Chl- <i>a</i> (mg m ⁻³)	8.03±3.71	6.19±1.11	115±16.9	96.8±66.5	208±119	15.9±6.00
SST (mg L ⁻¹)	24.6±3.04	43.5±1.18	83.9±5.95	57.8±14.1	80.3±28.2	100±18.7
T(°C)	24.4±0.08	25.1±0.46	24.8±0.37	25.2±0.46	24.9±0.23	28.5±0.13
OD (mg L ⁻¹)	7.00±0.01	6.35±0.08	6.33±0.08	6.33±0.08	6.43±0.12	7.14±0.39
Ensayo III						
NH ₄ ⁺ (µg L ⁻¹)	8.49±0.37	115±54.8	468±13.4	251±33.4	260±13.0	32.3±27.8
NO ₂ ⁻ (µg L ⁻¹)	0.03±0.01	1.05±0.25	1.21±0.46	1.35±0.51	1.21±0.12	0.13±0.02
NO ₃ ⁻ (µg L ⁻¹)	20.5±1.14	19.6±5.46	28.4±20.3	32.1±4.26	23.1±3.31	5.12±2.89
NT (mg L ⁻¹)	0.94±0.03	2.65±0.87	2.47±2.05	2.40±0.60	3.2±0.6	1.64±0.46
Chl- <i>a</i> (mg m ⁻³)	21.5±6.51	94.4±25.3	57.8±37.7	53.0±23.8	108±43	45.1±8.70
SST (mg L ⁻¹)	16.1±1.08	56.2±2.83	184±32.2	108±24.8	205±32.2	142±35.1
T(°C)	24.4±0.58	26.7±0.60	25.7±0.63	26.7±0.60	26.0±0.40	27.5±0.42

OD (mg L ⁻¹)	6.29±0.13	6.97±0.10	6.50±0.18	6.97±0.10	6.70±0.13	6.5±0.23
Ensayo IV						
NH ₄ ⁺ (µg L ⁻¹)	8.03±4.0		118±121	51.0±13.6	245±13.5	19.5±2.22
NO ₂ ⁻ (µg L ⁻¹)	0.26±0.01		4.38±0.79	4.58±0.31	4.3±0.01	0.24±0.02
NO ₃ ⁻ (µg L ⁻¹)	17.7±12.7		1326±626	1680±390	894±412	11.0±0.64
NT (mg L ⁻¹)	1.10±0.29		3.17±0.15	2.59±0.50	1.8±0.45	1.54±0.66
Chl- <i>a</i> (mg m ⁻³)	14.3±8.20		104±88.8	63.3±25.3	58.7±31.0	33.2±8.55
SST (mg L ⁻¹)	26.8±5.6		250±207	71.0±16.6	141±52.0	98. 8±22.4
T(°C)	28.2±1.05		28.3±0.42	28.6±0.29	28.4±0.15	30.1±0.28
OD (mg L ⁻¹)	7.2±0.4		4.77±0.31	5.27±0.15	5.10±0.20	7.02±1.01

VII.4. Resultados de experimentos a saciedad y comparación con estanques

En la mayoría de los tratamientos a saciedad, la biomasa de los especímenes se incrementó lo suficiente para alcanzar el equilibrio isotópico con sus dietas, con excepción del AN en los ensayos con juveniles medianos y AN+AF+S en el ensayo con juveniles grandes (Tabla 10). Hubo diferencias significativas en los valores del $\delta^{15}\text{N}$ del tejido muscular de los especímenes cultivados con dietas constantes al inicio y al final de los experimentos ($p < 0.05$). Nosotros ajustamos los datos de isotopos de nitrógeno a la ecuación de Hesslein et al. (1993) en los tratamientos en equilibrio para estimar los coeficientes de crecimiento y metabolismo e inferir sus contribuciones al recambio isotópico.

VII.4.1.1. Ensayo I: Postlarvas

Los resultados para el estadio de postlarva (ensayo I) se presentan en la Figura 6 y se resumen en la Tabla 5. El peso promedio final varió de 0.243 a 0.317 g. No se encontraron diferencias ($p < 0.05$) en porcentaje de sobrevivencia entre los tratamientos, pero fueron significativamente más altas que en los estanques ($p > 0.05$). Los promedios de los parámetros de crecimiento k (0.043-0.222 d^{-1}) y m (0.005-0.176 d^{-1}) fueron comparables entre los tratamientos en éste ensayo, y con los determinados en los estanques. En los tratamientos con dietas puras (AN+AF), los promedios de parámetros de crecimiento k fueron (0.113±0.07 y 0.15±0.03 d^{-1} respectivamente) y m (0.027±0.01 y 0.13±0.02 d^{-1} , respectivamente). Mientras que en dietas combinadas (AN+AF y AN+AF+S), estos mismos parámetros fueron k (0.152±0.07 y 0.16±0.02 d^{-1}) y m (0.146±0.03 y 0.015±0.01 d^{-1}), respectivamente. En cuanto a los estanques de cultivo la tasa de crecimiento promedio k (0.15 d^{-1}) y la de recambio metabólico m (0.02 d^{-1}) fueron comparables con los tratamientos ($p < 0.05$). La tasa de crecimiento específico (de 14 a 16% d^{-1}) fue observado en especímenes cultivados con AN+AF+S, aunque estos no fueron significativamente diferentes con los otros tratamientos ni con los estanques de cultivo de camarón en granja, ($p > 0.05$) excepto con AN ($p < 0.05$).

El tiempo necesario para que la mitad de los tejidos alcancen el equilibrio isotópico después de haber consumido la nueva dieta (t_{50}), fue también estimado en cada tratamiento. De acuerdo a los resultados, t_{50} varió desde 1.9 a 5.9 días entre tratamientos y desde 3.2 a 5.0 días en los estanques. En los tratamientos con dietas puras (AN y AF), los valores de t_{50} fueron (5.30±0.69 y 2.47±0.30 días) ligeramente mayor que en dietas combinadas

(2.23 ± 0.29 y 2.24 ± 0.33 días). En cuanto a los estanques de cultivo éste parámetro t_{50} fue de 4.1 ± 0.9 días, comparable con los tratamientos.

El FCA fue comparable entre tratamientos y estanques (0.7-1.0), con excepción del tratamiento AF (FCA) En los tratamiento donde se involucra al alimento natural (AN+AF y AN+AF+S), los factores de conversión alimenticia se registraron entre 0.7-0.8, mientras que en el tratamiento con el alimento formulado los valores fueron de 1.3-1.7 y en los estanques entre 0.8 y 1.0.

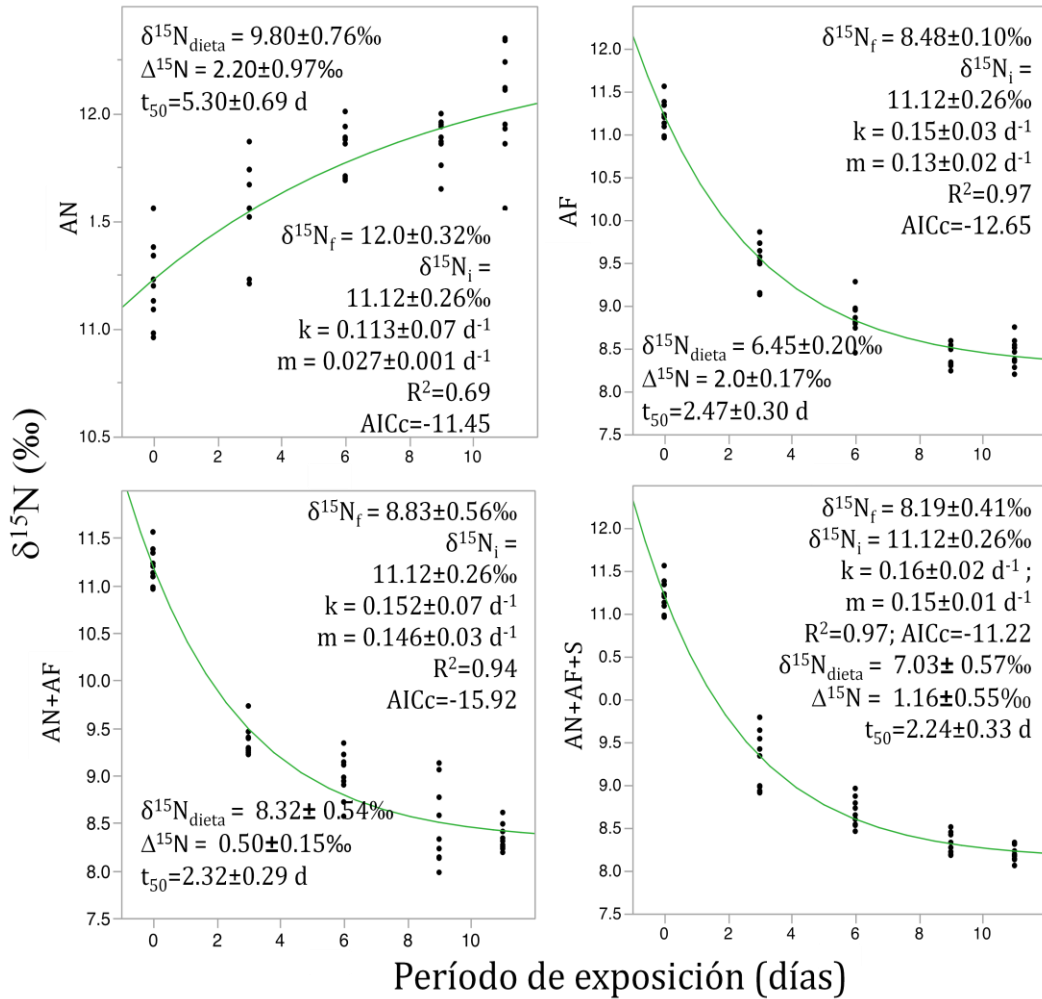


Fig. 6. Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* cultivado en escenario a saciedad, con diferentes combinaciones de alimento natural y formulado en el ensayo I (postlarvas). AN, alimento natural; AF, alimento formulado; AN+AF, alimento natural y alimento formulado; AN+AF+S, promoviendo la productividad natural adicionando sedimentos. Las líneas sólidas representan el ajuste de los datos a la ecuación de Hesslein et al. (1993), para evaluar la contribución del crecimiento y recambio metabólico al cambio isotópico. El coeficiente de determinación se refiere al ajuste de los datos a la curva y el valor AICc es la medida de la calidad relativa del modelo.

Tabla 5. Resultados ensayo I: Postlarva 20's (peso inicial 51.7 ± 7 mg y $\delta^{15}\text{N} = 11.12 \pm 0.26$ ‰) de camarón *L. vannamei* cultivado por 11-días. Tasa de crecimiento específico (TCE, % d^{-1}), factor de conversión alimenticia (FCA), parámetros de crecimiento (k , d^{-1}) y recambio metabólico (m , d^{-1}), vida media isotópica de nitrógeno en músculo (t_{50} en días).

Parámetro	Estanque de camarón	Tratamientos			
		AN	AF	AN+AF	AN+AF+S
Peso final promedio (mg)	$276 \pm 80^{\text{a,b}}$	$243 \pm 40^{\text{a}}$	$271 \pm 138^{\text{a,b}}$	$275 \pm 103^{\text{a,b}}$	$317 \pm 67^{\text{b}}$
TCE (% d^{-1})	12-17(15)	12-15(14)	8-19(15)	11-18(15)	14-18(16)
Tasa de sobrevivencia (%)	$85.7 \pm 3^{\text{a}}$	$95.0 \pm 2^{\text{b}}$	$93.3 \pm 2^{\text{b}}$	$97.8 \pm 1^{\text{b}}$	$95.3 \pm 3^{\text{b}}$
FCA	0.8-1.0	—	1.3-1.7	0.7-0.8	0.7-0.8
k (d^{-1})	$0.15 \pm 0.03^{\text{a}}$	$0.113 \pm 0.07^{\text{a}}$	$0.15 \pm 0.03^{\text{a}}$	$0.152 \pm 0.07^{\text{a}}$	$0.16 \pm 0.02^{\text{a}}$
m (d^{-1})	$0.02 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.027 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.13 \pm 0.02^{\text{a}}$	$0.146 \pm 0.03^{\text{a}}$	$0.015 \pm 0.01^{\text{a}}$
t_{50} (d)	$4.1 \pm 0.9^{\text{b}}$	$5.30 \pm 0.69^{\text{b}}$	$2.47 \pm 0.30^{\text{a}}$	$2.23 \pm 0.29^{\text{a}}$	$2.24 \pm 0.33^{\text{a}}$
Contribución relativa (%)	52-78(66)	100	—	18-74(55)	25-62(56)

Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($\text{a} < \text{b}$).

VII. 4.1.2. Ensayo II: juvenil pequeño

Los resultados para el estadio de juvenil pequeño (ensayo II) se presentan en la Figura 7 y se resumen en la Tabla 6. El peso final promedio (2.91 a 5.43 g) y TCE (8-11% d^{-1}) fueron más altos para especímenes cultivados con AN+AF y AN+AF+S que con las dietas puras (AN y AF) y en estanques. En los especímenes cultivados con dietas AN+AF y AN+AF+S

la tasa de crecimiento específico fue 10.5% y 11%, respectivamente; mientras que en especímenes cultivados con dietas puras los porcentajes fueron de 8-9.5% comparables con los estanques de 9.2%.

Los parámetros m (0.061-0.146 d^{-1}) fueron también significativamente más altos para especímenes cultivados con dietas combinadas que los cultivados con dietas puras y en estanques y k (0.05-0.15 d^{-1}) fueron comparables entre tratamientos y camarones de los estanques en esa etapa del cultivo. En los especímenes cultivados con dietas AN+AF y AN+AF+S, los parámetros m (0.133±0.05 y 0.144±0.02 d^{-1}) fueron mayores a los cultivados con dietas puras m (0.071±0.01 y 0.076±0.01 d^{-1}) y a los estanques (0.11±0.03 d^{-1}) ($p>0.05$), mientras que en dietas puras k (0.09±0.01 y 0.09±0.02 d^{-1}) como en dietas combinadas k (0.10±0.05 y 0.11±0.04 d^{-1}) y en los estanques (k 0.091±0.01 d^{-1}) No se encontraron diferencias ($p<0.05$) en este parámetro de crecimiento.

Los valores de t_{50} variaron entre tratamientos de 1.69 a 5.6 días y promediaron 3.7±0.9 días en estanques. Los valores promedios de t_{50} en tratamientos con dietas combinadas de 3±1.31 días para AN+AF y 2.81±1.57 días fueron para AN+AF+S. Los valores de t_{50} en tratamientos con dietas puras 4.26±0.73 días fueron para AF y 4.53±0.53 días para AN.

Los valores de FCA fueron cercanos o por debajo de la unidad, excepto en el tratamiento AF (1.2-1.5). Los valores en los tratamientos combinados AN+AF y AN+AF+S fueron 0.7-1.0 y 0.7-0.8, respectivamente, comparables con los valores de los camarones cultivados en granja (FCA=0.8-1.0).

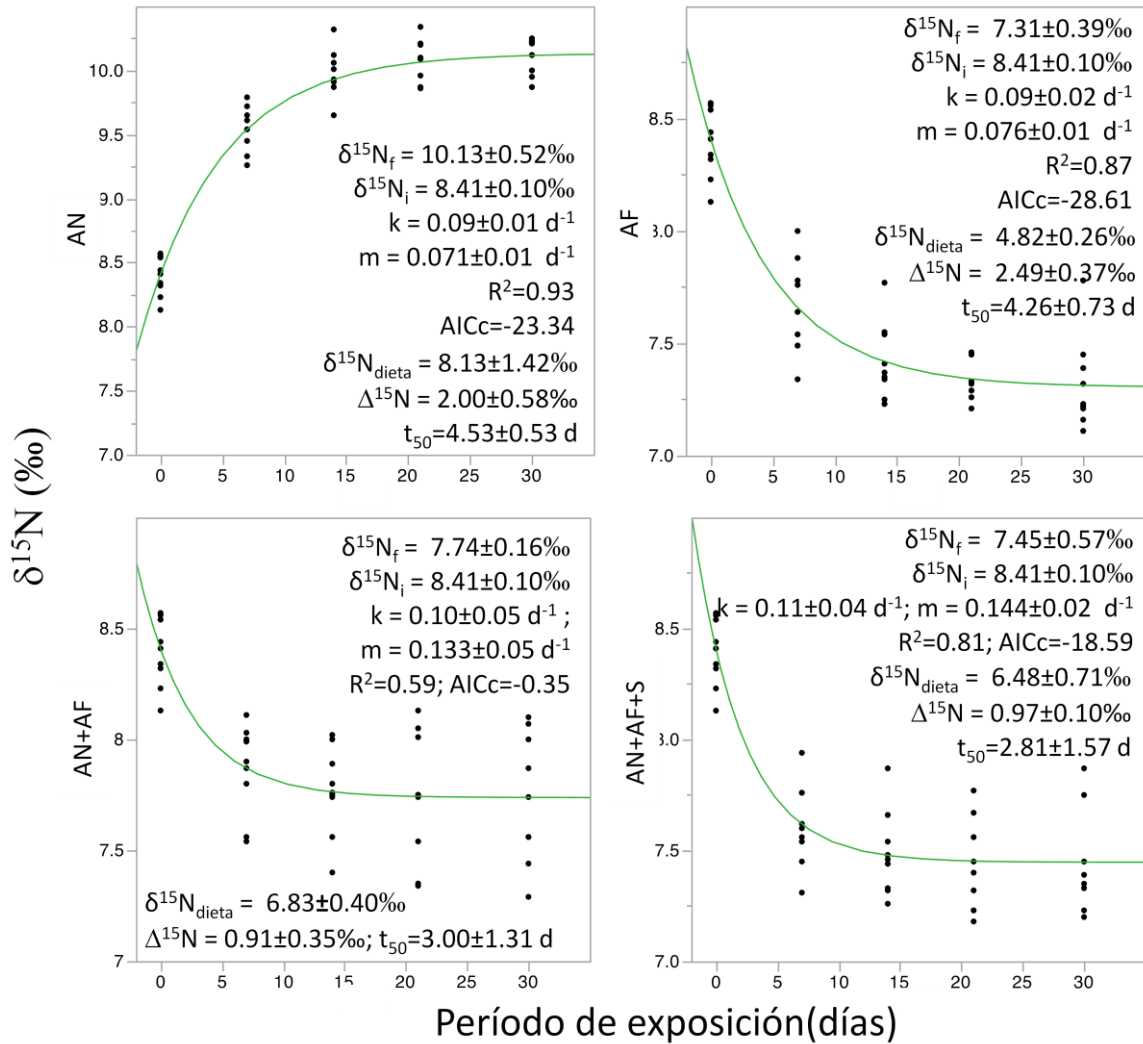


Fig. 7. Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* cultivado en escenario a saciedad, con diferentes combinaciones de alimento natural y formulado en el ensayo II (juveniles pequeños). AN, alimento natural; AF, alimento formulado; AN+AF, alimento natural y alimento formulado; AN+AF+S, promoviendo la productividad natural adicionando sedimentos. Las líneas sólidas representan el ajuste de los datos a la ecuación de Hesslein et al. (1993), para evaluar la contribución del crecimiento y recambio metabólico al cambio isotópico. El coeficiente de determinación se refiere al ajuste de los datos a la curva y el valor AICc es la medida de la calidad relativa del modelo.

Tabla 6. Resultados ensayo II camarón juvenil pequeño (peso inicial, 0.25 ± 0.10 g, $\delta^{15}\text{N} = 8.41 \pm 0.1\text{‰}$) *L. vannamei* cultivado por 30-días. Tasa de crecimiento específico (TCE, % d^{-1}), factor de conversión alimenticia (FCA), parámetros de crecimiento (k , d^{-1}) y recambio metabólico (m , d^{-1}), vida media isotópica de nitrógeno en músculo (t_{50} en días).

Parámetro	Tratamientos				
	Estanque de camarón	AN	AF	AN+AF	AN+AF+S
Peso final promedio (g)	$3.3 \pm 0.88^{\text{a,b}}$	$2.91 \pm 0.7^{\text{a}}$	$3.37 \pm 0.8^{\text{a,b}}$	$5.02 \pm 0.32^{\text{c}}$	$5.43 \pm 0.61^{\text{c}}$
TCE	8-10(9.2)	7-10(8)	9-10(9.5)	10-11(10.5)	11-12(11)
Tasa de sobrevivencia (%)	$84 \pm 6^{\text{a}}$	$90 \pm 3^{\text{a}}$	$96.7 \pm 2^{\text{b}}$	$90 \pm 4^{\text{a,b}}$	$93 \pm 3^{\text{a,b}}$
FCA	0.8-1.0	—	1.2-1.5	0.7-1.0	0.7-0.8
k (d^{-1})	$0.091 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.09 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.09 \pm 0.02^{\text{a}}$	$0.10 \pm 0.05^{\text{a}}$	$0.11 \pm 0.04^{\text{a}}$
m (d^{-1})	$0.11 \pm 0.03^{\text{a,b}}$	$0.071 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.076 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.133 \pm 0.05^{\text{a,b}}$	$0.144 \pm 0.02^{\text{b}}$
t_{50} (d)	$3.7 \pm 0.9^{\text{a,b}}$	$4.53 \pm 0.53^{\text{b}}$	$4.26 \pm 0.73^{\text{b}}$	$3.00 \pm 1.31^{\text{a}}$	$2.81 \pm 1.57^{\text{a}}$
Contribución relativa (%)	6-32(26)	100	—	8-22(15)	27-67(31)

Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($\text{a} < \text{b} < \text{c}$).

VII. 4.1.3. Ensayo III: juvenil mediano

Los resultados para el ensayo III se presentan en la Figura 8 y se resumen en Tabla 7. En este ensayo el peso final promedio (3.99 a 9.47 g) y TCE (2-4.4% d^{-1}) fueron más altos para especímenes cultivados con AN+AF y AN+AF+S que con las dietas puras (AN y AF) y en

estanques. En los especímenes cultivados con dietas AN+AF y AN+AF+S la tasa de crecimiento específico fue 4.4% y 4.1%, respectivamente, mientras que en cultivados con dietas puras (AN, 3.99%) y AF (7.66%) fue comparable al de los estanques (7.87%).

Los parámetros m (0.03-0.193 d^{-1}) y k (0.004-0.074 d^{-1}) fueron también significativamente más altos para especímenes cultivados con dietas combinadas que los cultivados con dietas puras (AN). En los especímenes cultivados con dietas AN+AF y AN+AF+S, los parámetros m ($0.04 \pm 0.01 d^{-1}$ y $0.082 \pm 0.03 d^{-1}$ respectivamente), y k ($0.054 \pm 0.02 d^{-1}$ y $0.04 \pm 0.01 d^{-1}$ respectivamente), mientras que en cultivados con dietas puras (AN y AF) los valores de los parámetros fueron m ($\sim 0 d^{-1}$) y k ($0.014 \pm 0.01 d^{-1}$) y m ($0.143 \pm 0.05 d^{-1}$) y k ($0.036 \pm 0.01 d^{-1}$) respectivamente; los valores de AF comparables con los estanques m ($0.18 \pm 0.01 d^{-1}$) y k ($0.04 \pm 0.01 d^{-1}$).

Los valores promedio de t_{50} entre tratamientos variaron de 3.7 a 70 días y 3.6 días en estanques. Los valores promedio de t_{50} en camarones cultivados con dietas combinadas fue de 12.0 ± 7.0 días para AN+AF y de 5.8 ± 2.1 días para AN+AF+S. Los valores de t_{50} en tratamientos con dietas puras fue 49.5 ± 21.0 días para AF y 3.9 ± 1.22 días AN.

Los valores de FCA estuvieron muy cercanos o por encima de la unidad comparable a el tratamiento AF (1.3-1.7). Los valores en los tratamientos combinados AN+AF y AN+AF+S fueron 0.6-1.3 y 0.6-1.4 respectivamente, comparables con los valores de los camarones cultivado en granja 1.1-1.3.

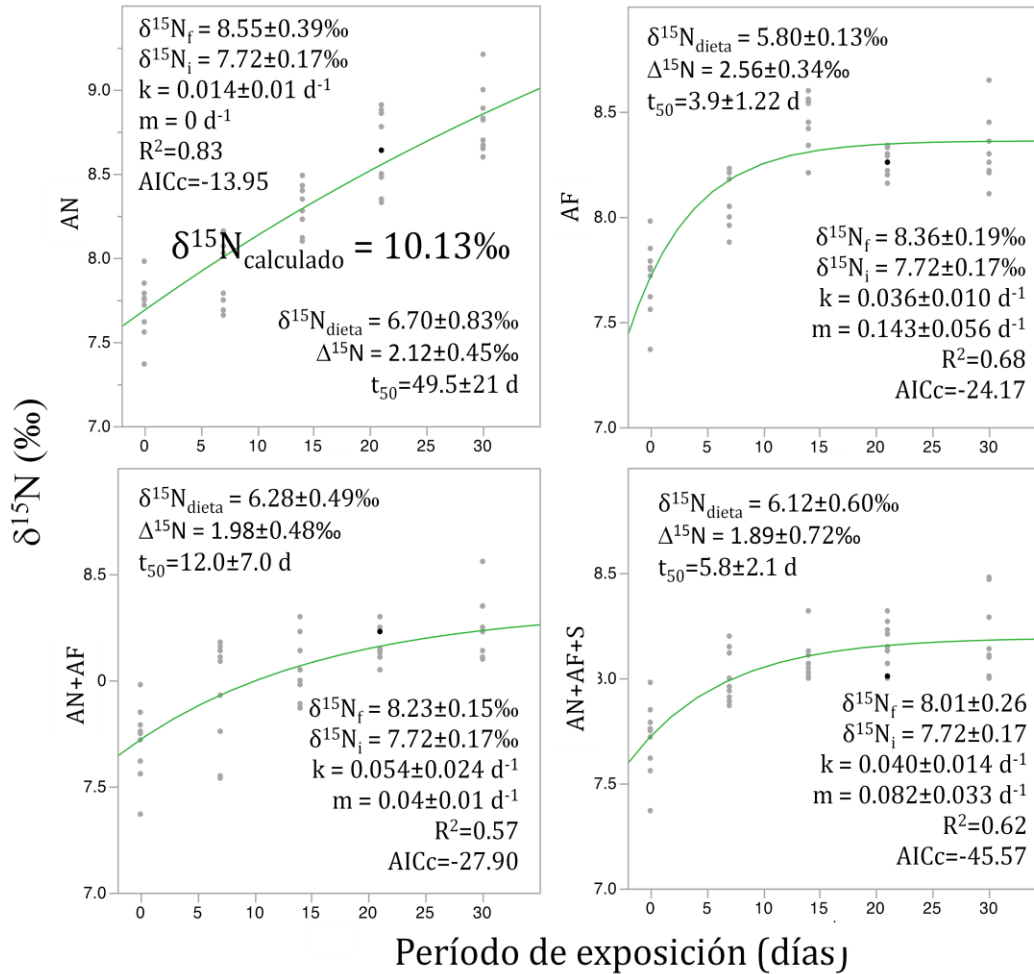


Fig. 8. Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* cultivado en escenario a saciedad, con diferentes combinaciones de alimento natural y formulado en el ensayo III (juveniles medianos). AN, alimento natural; AF, alimento formulado; AN+AF, alimento natural y alimento formulado; AN+AF+S, promoviendo la productividad natural adicionando sedimentos. Las líneas sólidas representan el ajuste de los datos a la ecuación de Hesslein et al. (1993), para evaluar la contribución del crecimiento y recambio metabólico al cambio isotópico. El coeficiente de determinación se refiere al ajuste de los datos a la curva y el valor AICc es la medida de la calidad relativa del modelo.

Tabla 7. Resultados ensayo III: camarón juvenil mediano (peso inicial, 2.79 ± 0.26 g, $\delta^{15}\text{N} = 7.72 \pm 0.3\text{‰}$) *L. vannamei* cultivado por 30-días. Tasa de crecimiento específico (TCE, % d^{-1}), factor de conversión alimenticia (FCA), parámetros de crecimiento (k , d^{-1}) y recambio metabólico (m , d^{-1}), vida media isotópica de nitrógeno en músculo (t_{50} en días).

Parámetro	Tratamientos				
	Estanque de camarón	AN	AF	AN+AF	AN+AF+S
Peso final promedio (g)	7.87 ± 0.29^b	3.99 ± 1.8^a	7.66 ± 0.7^b	9.47 ± 1.0^c	$8.72 \pm 0.31^{b,c}$
TCE	3.7 ± 0.2	2.0 ± 1.0	3.7 ± 0.4	4.4 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Sobrevivencia (%)	80 ± 5	85 ± 3	87 ± 3	90 ± 2	97 ± 1
FCA	1.1-1.3	—	1.3-1.7	0.6-1.3	0.6-1.4
$k(\text{d}^{-1})$	0.04 ± 0.01^b	0.014 ± 0.01^a	0.36 ± 0.01^b	0.054 ± 0.02^c	$0.041 \pm 0.01^{b,c}$
$m(\text{d}^{-1})$	0.18 ± 0.01^b	~0	0.143 ± 0.05^c	0.04 ± 0.01^a	0.082 ± 0.03^b
t_{50} (d)	3.2 ± 0.4	49.50 ± 21.0^c	3.9 ± 1.22^a	12.0 ± 7.0^b	5.8 ± 2.22^a
Contribución relativa (%)	7-32(16)	100	—	5-29(10)	16-38(18)

Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($a < b < c$).

VII. 4.1.4. Ensayo IV: juvenil grande

Los resultados para el ensayo IV se presentan en la Figura 9 y se resumen en la en Tabla 8. El peso final promedio (17.19 a 18.10 g) y TCE (2.9-3.1% d^{-1}) no fueron diferentes para ninguno de los tratamiento ni en estanques. En los especímenes cultivados con dietas

AN+AF y AN+AF+S la tasa de crecimiento específico fue $2.9\pm 0.9\%$ y $3.1\pm 1.0\%$ respectivamente, siendo en cultivados con AF ($2.6\pm 1.5\%$) porcentaje comparable con los estanques $3.0\pm 1.2\%$.

Los parámetros m ($0.059-0.090 \text{ d}^{-1}$) y k ($0.003-0.043 \text{ d}^{-1}$) no fueron significativamente diferentes ($p>0.05$) entre tratamientos y estanques con excepción de dieta combinada mas sedimento. En los especímenes cultivados con dietas AN+AF y AN+AF+S, los parámetros m (0.069 ± 0.01 y $\sim 0 \text{ d}^{-1}$, respectivamente) y k (0.033 ± 0.01 y $0.013\pm 0.01 \text{ d}^{-1}$, respectivamente), mientras que en cultivados con alimento formulado los valores de los parámetros fueron m ($0.08\pm 0.01 \text{ d}^{-1}$) y k ($0.03\pm 0.01 \text{ d}^{-1}$), todos los tratamientos comparables con los estanques m ($0.075\pm 0.01 \text{ d}^{-1}$) y k ($0.030\pm 0.00 \text{ d}^{-1}$).

Los valores promedio de t_{50} varían desde 5.1 a 61.3 días entre tratamientos y estanques. Los valores promedio de t_{50} en los camarones cultivados con AN+AF, AF y estanques, se estimó en 2 días.

Los valores de FCA estuvieron muy cercanos o por encima de la unidad, los valores en los tratamientos combinados AF+AN y AF+AN+S fueron 0.7-1.3 y 0.8-1.4, respectivamente. En el tratamiento AF (1.3-1.7), FCA comparable con los valores de los camarones cultivados en granja (1.1-1.3).

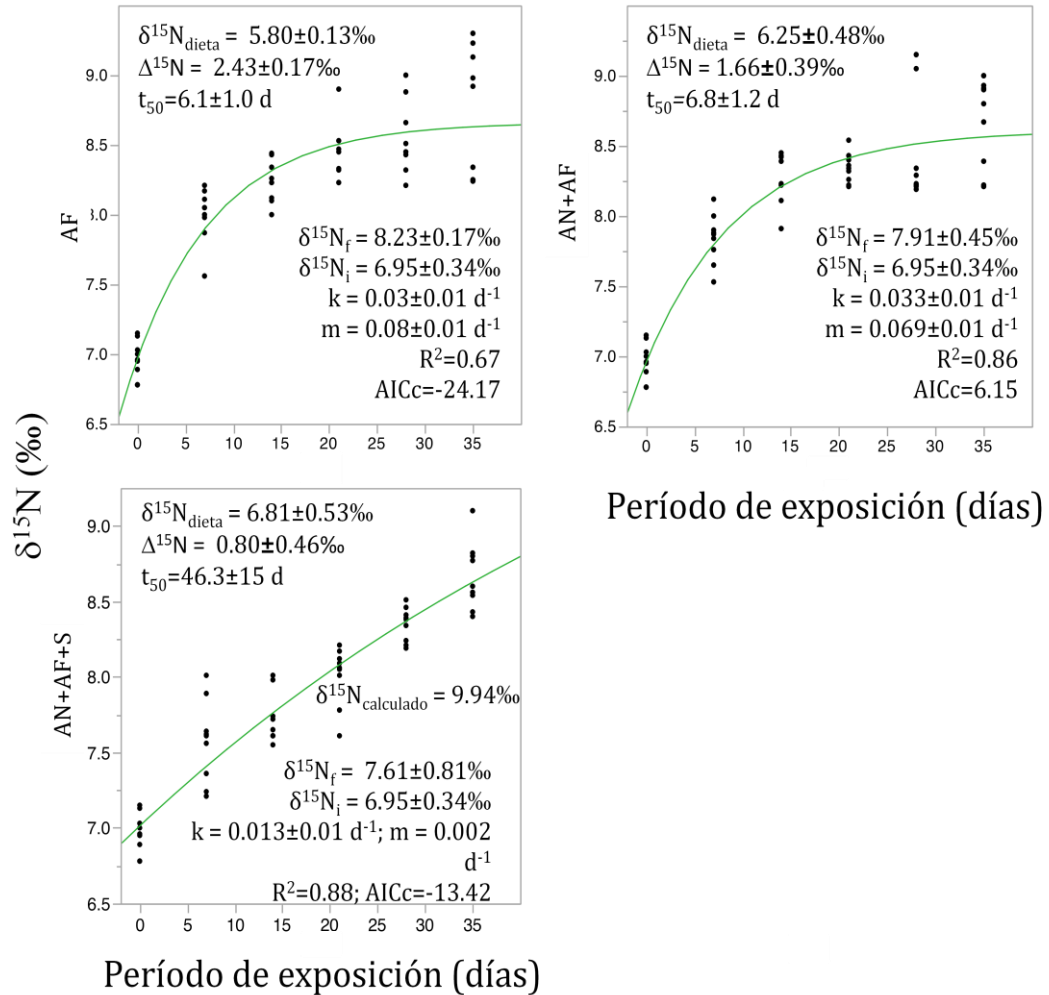


Fig. 9. Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* cultivado en escenario a saciedad, con diferentes combinaciones de alimento natural y formulado en el ensayo IV (juveniles grandes). AN, alimento natural; AF, alimento formulado; AN+AF, alimento natural y alimento formulado; AN+AF+S, promoviendo la productividad natural adicionando sedimentos. Las líneas sólidas representan el ajuste de los datos a la ecuación de Hesslein et al. (1993), para evaluar la contribución del crecimiento y recambio metabólico al cambio isotópico. El coeficiente de determinación se refiere al ajuste de los datos a la curva y el valor AICc es la medida de la calidad relativa del modelo.

Tabla 8. Resultados ensayo IV: camarón juvenil grande (peso inicial, 6.21 ± 0.72 g, $\delta^{15}\text{N} = 6.95 \pm 0.34\text{‰}$) *L. vannamei* cultivado por 35-días. Tasa de crecimiento específico (TCE, % d^{-1}), factor de conversión alimenticia (FCA), parámetros de crecimiento (k , d^{-1}) y recambio metabólico (m , d^{-1}), vida media isotópica de nitrógeno en músculo (t_{50} en días).

Parámetro	Tratamientos				
	Estanque de camarón	de AN	AF	AF+AN	AF+AN+S
Peso final promedio (g)	17.60 ± 0.23^a	—	17.34 ± 1.32^a	17.19 ± 0.23^a	18.1 ± 0.84^a
TCE	3.0 ± 1.2^a	—	2.6 ± 1.5^a	2.9 ± 0.9^a	3.1 ± 1.0^a
Sobrevivencia (%)	75 ± 6	—	93 ± 2	87 ± 6	90 ± 4
FCA	1.1-1.3	—	1.3-1.7	0.7-1.3	0.8-1.4
$k(\text{d}^{-1})$	0.030 ± 0.00^b	—	0.03 ± 0.01^b	0.033 ± 0.01^b	0.013 ± 0.01^a
$m(\text{d}^{-1})$	0.075 ± 0.01^a	—	0.08 ± 0.01^a	0.069 ± 0.01^a	~0
t_{50} (d)	6.0 ± 0.9^a	—	6.1 ± 1.0^a	6.8 ± 1.2^a	46.3 ± 15.0^b
Contribución relativa (%)	0	—	—	<10	9-16(13)

Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($a < b < c$).

VII.5. Resultados de experimentos en organismos sometidos a reducción de alimento y ayuno

Los especímenes con alimento limitado experimentaron crecimiento más bajo como respuesta a ese cultivo contra el escenario de saciedad ($p < 0.05$), con peso final corporal

≤50% de los especímenes a saciedad en la misma dieta, con excepción del tratamiento AN donde no fue suficiente el alimento que estaba disponible. Aunque no se alcanzó el equilibrio, como ocurrió en alimento limitado en camarones y ayuno, aplicamos el modelo de Hesslein et al. (1993) (Fig. 10), para estimar parámetros de crecimiento y valores durante el equilibrio con el procedimiento de ajuste de curva ($\delta^{15}\text{N}_{\text{calculado}}$) (Malpica et al., 2012). Aunque reconocemos que los modelos podrían dar resultados sesgados y nosotros así los interpretamos con precaución.

Los coeficientes k (~0 a 0.02 d^{-1}) y m (~0 a 0.035 d^{-1}) de *L. vannamei* con alimento limitado fueron más bajos que en especímenes alimentados a saciedad con la misma dieta (Tablas 5-8). Los tiempos de recambio de $\delta^{15}\text{N}$ en tejido, usando los datos de crecimiento y recambio metabólico, fueron mayores en organismos con alimento limitado que en camarones alimentados a saciedad ($p < 0.05$). En promedio fue $t_{50} \geq 40$ días, con la excepción de el tratamiento AN+AF con $t_{50} = 16.5$ días. El modelo de Hesslein et al. (1993) nos ayudó a predecir que los juveniles con alimento limitado requieren periodos de tiempo mayores (>1.5 a 3 meses) para alcanzar el equilibrio siguiendo un cambio de dieta.

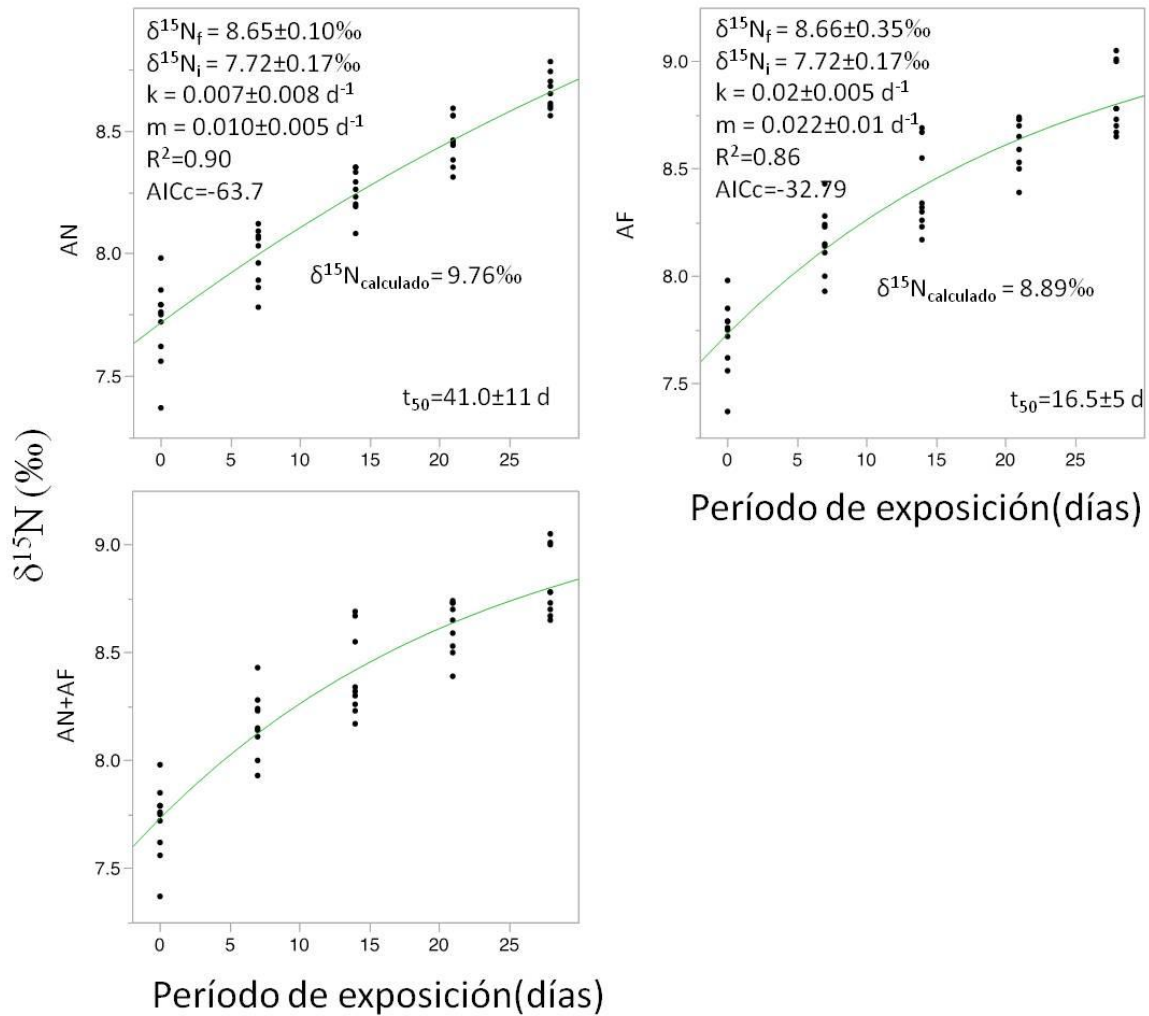


Fig. 10. Variación temporal del $\delta^{15}\text{N}$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* cultivado en escenario con alimento limitado, con diferentes combinaciones de alimento natural y formulado en el ensayo III (juveniles medianos). AN alimento natural, AF, alimento formulado, AN+AF alimento natural mas alimento formulado, AN+AF+S, promoviendo la productividad natural adicionando sedimentos. Las líneas sólidas representan los resultados de los datos ajustados al modelo Hesslein et al (1993) para evaluar la contribución relativa del crecimiento y recambio metabólico al cambio isotópico.

En organismos en ayuno su peso disminuyó significativamente con respecto al peso inicial, con valores negativos de k ($-0.024 \pm 0.00 \text{ d}^{-1}$). El recambio metabólico m ($0.355 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$) en especímenes en ayuno fue significativamente más alto que en especímenes a saciedad y alimento limitado. Nosotros no pudimos evitar el canibalismo en todos los tanques, debido a la alta densidad de *L. vannamei*, lo cual llevó a agresiones y mortalidad cercana a 45%. Al final del experimento, separamos los especímenes de los tanques con canibalismo de los sin canibalismo. Los coeficientes k (0.024 d^{-1}) y m (0.234 d^{-1}) en tanques con canibalismo fueron más bajos que en los tanques sin canibalismo ($k = -0.0238 \text{ d}^{-1}$ y $m = 0.355 \text{ d}^{-1}$).

Para los especímenes en ayuno, nosotros usamos los valores finales ($\delta^{15}\text{N}_{\text{final}}$) como valores de equilibrio isotópico, 11.6‰ y 12.53‰ en tanques con canibalismo y sin él, respectivamente (Fig. 11).

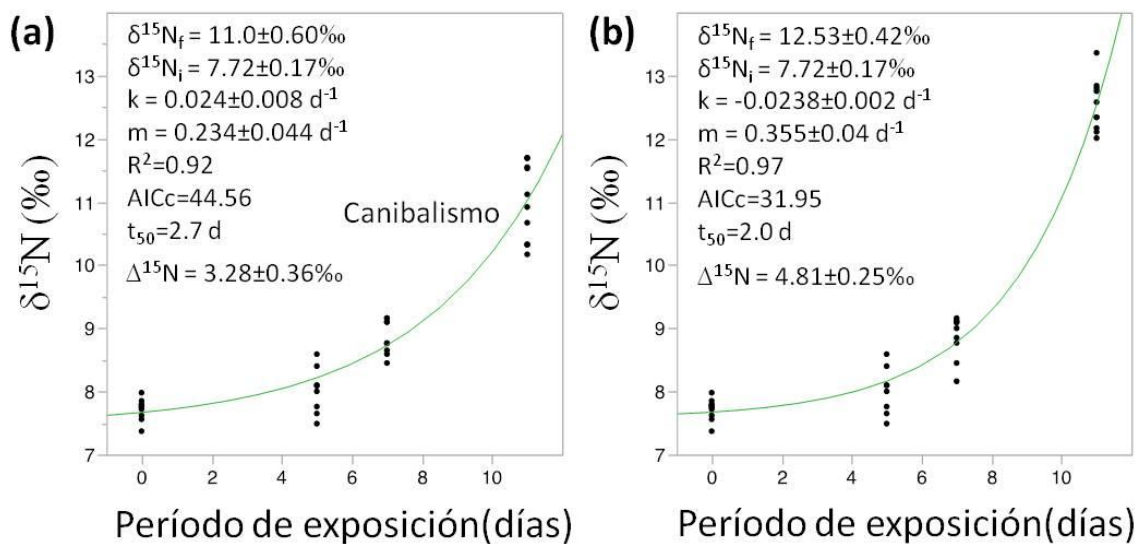


Fig. 11. Variación temporal del $\delta^{15}N$ en músculo de *Litopenaeus vannamei* cultivado en escenario sin alimento: (a), con canibalismo y (b), sin canibalismo, en camarones juveniles medianos. Líneas sólidas representan los resultados de los datos ajustados al modelo Hesslein et al (1993) para evaluar la contribución relativa del crecimiento y recambio metabólico al cambio isotópico. Los coeficientes de determinación se refieren a los resultados derivados de la ecuación y los valores AICc son una medida de la calidad relativa del modelo.

VII.6. Discriminación isotópica de nitrógeno ($\Delta^{15}N$)

Se estimó el factor de fraccionación como la diferencia entre el valor promedio de $\delta^{15}N$ medido en el camarón y el $\delta^{15}N$ de su respectiva dieta después de que alcanzó el equilibrio isotópico. En la mayoría de los tratamientos a saciedad, la biomasa de los especímenes se incrementó lo suficiente para alcanzar el equilibrio isotópico con sus dietas, con excepción del AN en los ensayos III y IV y AN+AF+S en el ensayo IV. Hubo diferencias

significativas en los valores del $\delta^{15}\text{N}$ del tejido muscular de los especímenes cultivados con dietas constantes al inicio y al final de los experimentos ($p < 0.05$). Aunque, la falta de ganancia en peso en los camarones con alimento limitado y previendo el no alcance del equilibrio, se modelaron los datos obtenidos usando la ecuación de Hesslein et al. (1993) y se estimaron coeficientes de crecimiento y metabolismo infiriéndose su contribución al recambio isotópico (Tabla 9).

Los valores de equilibrio isotópico desde los tratamientos con suficiente ganancia en peso ($W_r \geq 4$) fueron incluidos en las estimaciones de la fraccionación isotópica. Fueron observados variaciones en $\Delta^{15}\text{N}$ entre individuos con la misma dieta, sin embargo, estas diferencias fueron pequeñas con relación a la variación entre los promedios de dietas. Los valores de $\Delta^{15}\text{N}$ variaron desde 0.3 a 3.5‰ para especímenes a saciedad. Aunque diferencias en las señales isotópicas promedio fueron observados entre especímenes cultivados en dietas puras (AN y AF, $p > 0.05$), estas no fueron significativas (Tabla 9, $p < 0.05$). $\Delta^{15}\text{N}$ fue significativamente más bajo en dietas combinadas que en dietas puras dentro de cada tamaño de animal ($p < 0.05$).

Tabla 9. Composición isotópica inicial ($\delta^{15}\text{N}_i$), final ($\delta^{15}\text{N}_f$), ganancia relativa en peso ($W_r=W_f/W_i$) y factor de discriminación trófica ($\Delta^{15}\text{N}$, ‰) en camarón *L. vannamei* en cuatro tratamientos a saciedad probados en los Ensayos I a IV.

Tratamientos a saciedad				
	AN	AF	AN+AF	AN+AF+S
Postlarva 20's: $\delta^{15}\text{N}_i$ 11.12±0.26‰				
$\delta^{15}\text{N}_f$ (‰)	12.0±0.32 ^b	8.48±0.10 ^a	8.83±0.56 ^a	8.19±0.41 ^a
W_r	4.0-5.5	4.4-6.2	4.6-6.1	5.4-7.0
$\Delta^{15}\text{N}$	2.20±0.97 ^c	2.03±0.17 ^c	0.50±0.15 ^a	1.16±0.55 ^b
Juvenil chico: $\delta^{15}\text{N}_i$ 8.41±0.1‰				
$\delta^{15}\text{N}_f$ (‰)	10.13±0.52 ^b	7.31±0.39 ^a	7.74±0.16 ^a	7.45±0.57 ^a
W_r	9.6-14	11.5-16	18-22	19-25
$\Delta^{15}\text{N}$	2.00±0.58 ^b	2.49±0.37 ^b	0.91±0.35 ^a	0.97±0.10 ^a
Juvenil mediano: $\delta^{15}\text{N}_i$ 7.72±0.3‰				
$\delta^{15}\text{N}_f$ (‰)	8.55±0.39 ^a	8.36±0.19 ^a	8.23±0.15 ^a	8.01±0.26 ^a
W_r	1.2-1.7	2.4-3.1	2.8-3.7	2.8-3.5
$\Delta^{15}\text{N}$	3.43*	2.56±0.34 ^b	1.95±0.48 ^a	1.89±0.72 ^{a,b}
Juvenil grande: $\delta^{15}\text{N}_i$ 6.7±0.83‰				
$\delta^{15}\text{N}_f$ (‰)	-	8.23±0.17 ^a	7.91±0.45 ^a	7.61±0.81 ^a
W_r	-	2.5-3.1	2.6-3.0	2.7-3.2
$\Delta^{15}\text{N}$	-	3.13*	3.05*	3.09*

Análisis comparativo entre tratamientos en el mismo ensayo. Diferentes superíndices representan diferencias significativas: a<b<c como resultado de un análisis de varianza (ANOVA) entre tratamientos en el mismo ensayo, seguido por pruebas de comparación

múltiple. *Valor de discriminación trófica estimada como la diferencia entre el $\delta^{15}\text{N}_f$ calculado desde el modelo de Hesslein et al. (1993) y el $\delta^{15}\text{N}$ de la dieta.

Posteriormente, nosotros estimamos valores de $\Delta^{15}\text{N}$ en tratamientos no equilibrados (en tratamientos con alimento limitado y ayuno) usando valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{final}}$ estimados por el modelo de ajuste de Hesslein et al. (1993). Tales valores son presentados en la Tabla 10.

Tabla 10. Composición isotópica inicial ($\delta^{15}\text{N}_i$), final ($\delta^{15}\text{N}_f$), ganancia relativa en peso ($W_r=W_f/W_i$) y factor de discriminación trófica ($\Delta^{15}\text{N}$, ‰) en camarón *L. vannamei* Juvenil mediano: $\delta^{15}\text{N}_i$ $7.72\pm 0.3\%$, en cuatro tratamientos probados en los ensayos con alimento limitado y ayuno.

Tratamientos con alimento limitado				
	AN	AF	AN+AF	AN+AF+S
$\delta^{15}\text{N}_f(\text{‰})$	8.65 ± 0.10^a	8.66 ± 0.35^a	8.82 ± 0.30^a	-
Wr	1.0-1.4	1.1-1.6	1.6-2.1	-
$\Delta^{15}\text{N}$	3.05	3.09	2.59	-
Ensayo en ayuno con				
Ensayo en ayuno	canibalismo			
$\delta^{15}\text{N}_f(\text{‰})$	12.53 ± 0.42^b			11.0 ± 0.60^a
Wr	0.5-1.2			1.0-1.5
$\Delta^{15}\text{N}$	4.81 ± 0.25^b			3.28 ± 0.36^a

Análisis comparativo entre tratamientos en el mismo ensayo. Diferentes superíndices representan diferencias significativas: $a < b < c$ como resultado de un análisis de varianza (ANOVA) entre tratamientos en el mismo ensayo, seguido por pruebas de comparación múltiple.

VII.6.1. $\Delta^{15}\text{N}$ en función de la dieta y talla

Nosotros examinamos la relación entre $\Delta^{15}\text{N}$ y la calidad nutricional del alimento (medida como la relación C:N de la dieta) y la talla del camarón, usando valores desde tratamiento en equilibrio. Al realizar el análisis de regresión lineal encontramos una correlación positiva ($R^2=0.58$, $p<0.05$) entre el enriquecimiento de ^{15}N y la relación C:N de la dieta (Fig. 12). Porque el enriquecimiento del ^{15}N incrementó significativamente con la relación C:N de la dieta, la calidad de la dieta juega un papel importante controlando los valores del factor de fraccionación.

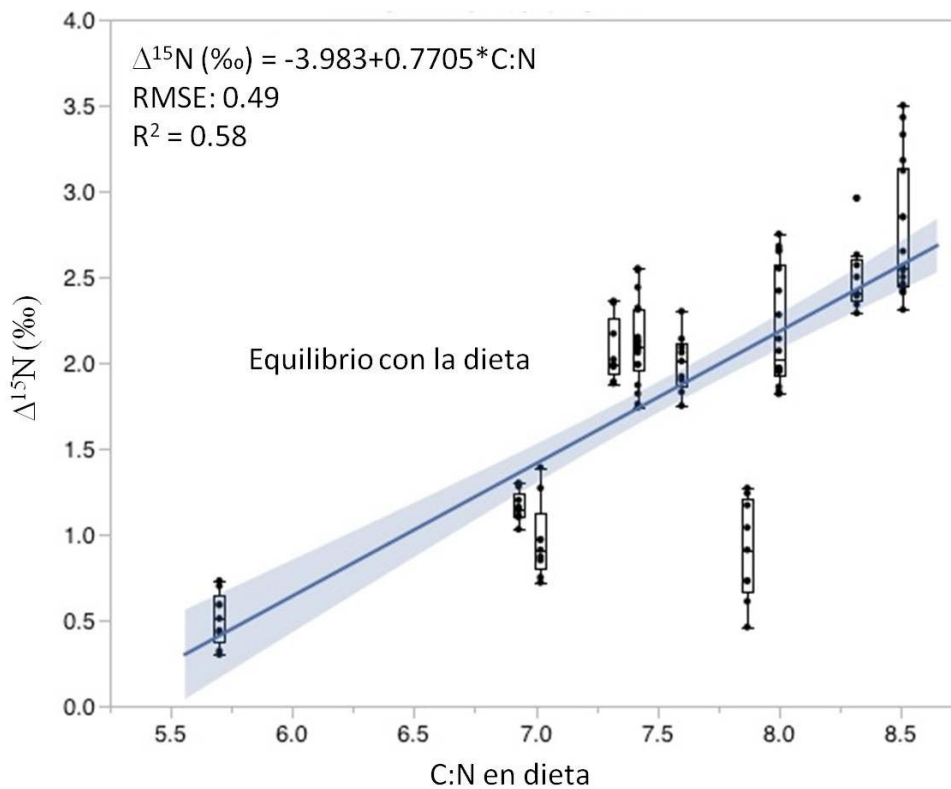


Fig. 12. Variación del factor de fraccionación isotópica en función de la calidad de la dieta en camarones *L. vannamei* alimentados a saciedad.

Nosotros también estudiamos el efecto de la talla del camarón sobre la discriminación isotópica y encontramos diferencias entre tamaños de clases de camarón ($p < 0.05$) (Tabla 10), valores más bajos ocurrieron en PL20's y valores más altos ocurrieron en especímenes más grandes, En suma, ocurrió un incremento significativo en $\Delta^{15}\text{N}$ en función del peso ($R^2 = 0.60$, $p < 0.05$) (Fig. 13). Análisis de regresión entre $\Delta^{15}\text{N}$ y la talla indicando una intercepción de 2.296‰ y una pendiente de 0.0466 por gramo.

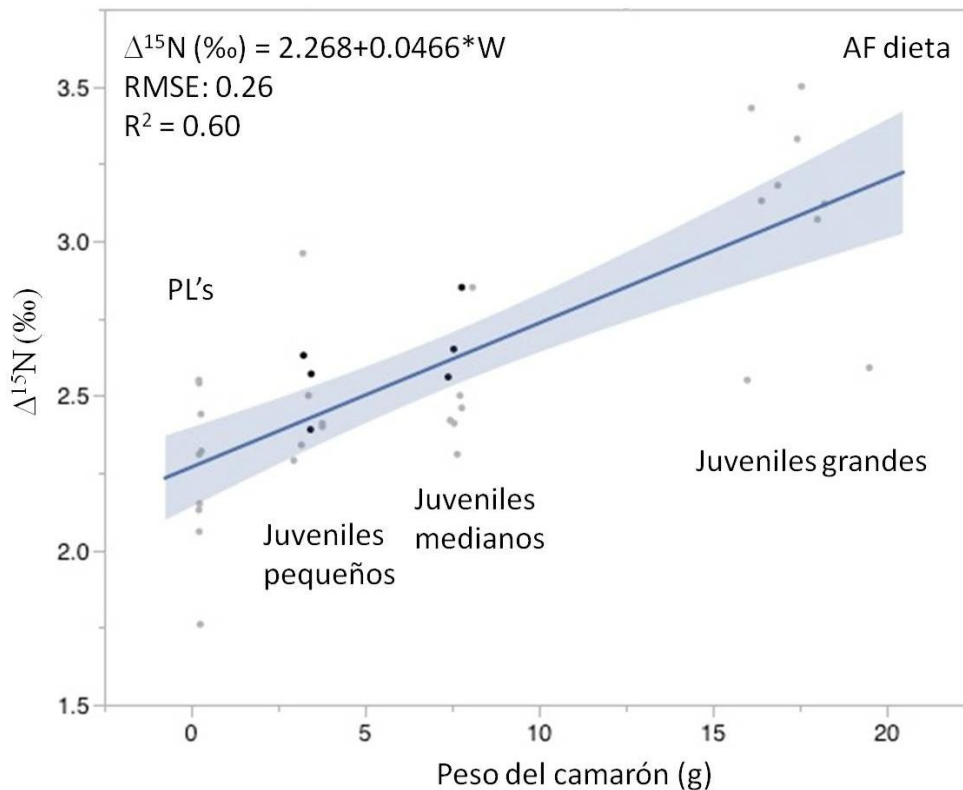


Fig. 13. Variación del factor de fraccionación isotópica con relación al peso en camarones *L. vannamei* alimentados a saciedad.

VII.7. Contribuciones relativas de la dieta natural

Una vez determinados los parámetros de crecimiento y los factores de fraccionación isotópica, aplicamos modelos de mezcla para la determinación de la contribución relativa de las dietas, alimento natural y formulado.

La evaluación de la contribución de la productividad natural al crecimiento del camarón usando isótopos estables es difícil debido a las variaciones en la biomasa relativa y a los valores de la composición isotópica en el AN. Un prerrequisito que se asume para resolver modelos de mezcla isotópica es que cada fuente potencial tenga valores distintos de $\delta^{15}\text{N}$. En nuestro estudio la mayoría de los componentes del AN tuvieron valores contrastantes de $\delta^{15}\text{N}$, pero dos de los más abundantes presentaron señales muy similares (Tabla 3). En este caso, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre micro-flocs y detritus presentan señales isotópicas no diferentes. Con el fin de resolver este conflicto nosotros consideramos ambas fuentes dietéticas como una sola, la cual fue nombrada como bentos. Además, con el fin de facilitar la resolución de las ecuaciones de mezcla nosotros llamamos plancton a la combinación de zooplancton y floc-algal en la columna de agua.

Basados en un balance de masas de isótopos de N en los componentes naturales disponibles en los tanques con AN y en las señales finales de $\delta^{15}\text{N}$ en tejido de camarón, se estimó la contribución de los componentes principales de la dieta natural en cada ensayo (Tablas 5-8). Los resultados revelaron que el alimento natural estuvo constituido por zooplancton (70%) y floc-algal y fitoplancton (30%) para el ensayo I, por plancton (26%) y bentos (74%) para el ensayo II, igualmente para el ensayo III con porcentajes de 15 y 85%,

respectivamente. En el ensayo IV, prácticamente el 100% de la dieta natural estuvo compuesta por bentos.

Los resultados de las contribuciones relativas de la dieta natural en el peso corporal de PL's y juveniles también se presentan en las Tablas 5-8. Para PL20's (ensayo I, Tabla 5), la contribución del AN al crecimiento en especímenes cultivados en los tratamientos AF+AN y AF+AN+S varió de 18 a 74% y de 25 a 62%, respectivamente. En los ensayos de II a IV (Tablas 6-8), la contribución del AN al crecimiento fue de 8 a 22% y de 27 a 67% para juveniles pequeños, de 5 a 29% y de 16 a 38% para juveniles medianos y <10 y entre 9-16% para juveniles más grandes, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) en la contribución del nitrógeno en función de la talla (postlarvas > juveniles pequeños > juveniles medianos) y tratamientos (AN+AF+S > AN+AF).

Las ganancias de biomasa acumulada (peso promedio x sobrevivencia) observadas en cada tratamiento respecto a los estanques en el mismo rango de tallas, fue estimada entre 4-26% para AF, 13-26% para AN+AF y 19-31% para AN+AF+S. Las mayores ganancias de biomasa fueron determinadas en tallas más pequeñas, por lo que el mayor beneficio de la dieta natural se tiene en esos estudios de crecimiento.

En los estanques la contribución del AN al crecimiento del camarón varió también con la talla de los especímenes (Tablas 5-8). La contribución varió desde 52-78% para PL20's, 6-32% en juveniles pequeños y medianos, hasta ser despreciable para juveniles mayores. La amplia variabilidad en los valores isotópicos de especímenes cultivados con las diferentes dietas resultó en un amplio rango de porcentajes de contribución.

VIII. DISCUSIONES

VIII. 1. Condiciones abióticas de los experimentos y del cultivo

Debido a que la variabilidad en el crecimiento del camarón se ve influenciada por una gama de factores bióticos y abióticos (Rosas et al., 1998; Jiang et al., 2000; Laramore et al., 2001; Tacon, 2002; Cuzon et al., 2004), en este estudio se procuró que los factores tales como la temperatura, salinidad y concentración de oxígeno disuelto en el agua fueran similares entre los tratamientos y los estanques. En general, esto se logró con el oxígeno, temperatura y salinidad. Sin embargo, la concentración de nitrógeno total (NT) y sus formas químicas variaron con ensayos y tratamientos, y a lo largo del ciclo de cultivo con relación a la talla de los organismos y a sus tasas alimenticias. La productividad primaria medida a través de la clorofila a (y SST), así como la trama trófica generada fueron también significativamente incrementadas en los ensayos con respecto a lo observado en los estanques.

La temperatura afecta el estado fisiológico del camarón; su mayor efecto es sobre el metabolismo (Prosser, 1973) porque controla la actividad enzimática, el consumo de alimento y la tasa de crecimiento. La temperatura óptima para juveniles de *L. vannamei* cambia con la edad (Wyban et al., 1995). La temperatura óptima para camarones <5g de peso podría ser mayor de 30°C, mientras que para camarones mas grandes la temperatura óptima es cercana a los 27°C. Postlarvas de *L. vannamei* son sensibles a los cambios en la temperatura entre 23°C y 27°C (Cuzon et al., 2004). La tasa alimenticia y el comportamiento alimenticio observado en granjas estuvieron fuertemente relacionados con la temperatura (Villareal et al., 1994). Esto se relaciona con las variaciones en la demanda

energética que es controlada por la temperatura. Además, el consumo de oxígeno se incrementó entre $0.36 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ a 20°C a $1.0 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ a 32°C en juveniles de *L. vannamei* (Villareal et al., 1994), revelando un incremento de demanda energética con el incremento en la temperatura.

El incremento en las tasas de alimentación afecta la retención de proteínas. *L. vannamei* incrementa la excreción de amonio de acuerdo a un intervalo de temperatura de 24°C ($8.7\text{-}9 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), 28°C ($13\text{-}22 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), y a 32°C ($17\text{-}23 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a 10‰, 25‰ y 40‰, indicando que el metabolismo de las proteínas es afectado por la temperatura en este rango de salinidades (Jiang et al., 2000).

El oxígeno disuelto, es común que ocurran variaciones en el OD en los estanques acuícolas. La baja tensión de oxígeno puede reducir el crecimiento y la digestibilidad del alimento (Seidman y Lawrence, 1986; Rosas et al., 1998) y causar mortalidad en las granjas de camarón. En *L. vannamei* el nivel letal de OD está cerca de $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Bajas concentraciones de OD disminuye el metabolismo respiratorio así como la alimentación y las tasas de crecimiento en camarones expuestos a $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (Rosas et al., 1998). Las bajas concentraciones de oxígeno disuelto no dañan ninguna respuesta fisiológica o bioquímica del camarón, sino que limita el metabolismo aeróbico a través de la reducción de oxígeno al receptor del último electrón de la cadena respiratoria (Cuzon et al., 2004). Juveniles de *L. vannamei* expuestos a niveles subletales se recuperan si se restablecen los niveles adecuado de OD (Charmantier et al., 1994).

La salinidad es uno de los factores más importantes en ambientes de cultivo que afecta el crecimiento, la sobrevivencia y el consumo de alimento por el camarón (Jory, 1995; Kumlu

et al., 1999, 2000). La influencia de la salinidad sobre el crecimiento de camarones peneidos ha sido asociada con la cantidad y calidad de alimento natural en el medio; la fisiología, a través de proceso de osmoregulación; y la nutrición (Bray et al., 1994). Estos factores fueron probablemente responsables de los bajos crecimientos obtenidos en *Farfantepenaeus subtilis* a salinidades de 5 ups (Silva et al., 2010).

Los efectos de la salinidad sobre el crecimiento y la sobrevivencia de varias especies de camarón ha sido revisada por Dall et al. (1990). Salinidad en el intervalo de 15-20 ups es considerada ideal para el cultivo de *Penaeus monodon* (Ferraris et al., 1986a; Chen et al., 1995), mientras que se observó un crecimiento mayor en el intervalo de 20-30 ups *Fenneropenaeus chinensis* (Chen et al., 1995; Zhang et al., 1999). Aunque la sobrevivencia más alta en juveniles de *L. vannamei* fue encontrada en salinidad por encima de 20 ups (Ponce-Palafox et al., 1997), esta especie ha sido cultivada dentro de condiciones de salinidad baja (Laramore et al., 2001; McGraw et al., 2002; Saoud et al., 2003). El consumo de alimento podría también ser afectado por la salinidad, como se observó en juveniles de *Fenneropenaeus merguensis* que presentaron valores más bajos de consumo a salinidades altas (45 ups) (Vinod et al., 1996). En contraste, Wasielesky et al. (2003) no encontró diferencias significativas en el consumo de alimento en *Fenneropenaeus paulensis* a salinidades entre 2 y 36 ups.

Las formas de nitrógeno estudiadas (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ (ión amonio), NH_3 (gas disuelto) la que más llama la atención es el amonio por ser generalmente el más tóxico y se encuentra comúnmente en mayor concentración en las aguas de desecho, tanto domésticas como industriales y de acuicultura (Frías-Espericueta y Páez-Osuna, 2001).

Conforme el nivel de amonio en el agua aumenta, la excreción de amonio de la mayoría de los animales acuáticos decrece y el nivel de amonio en hemolinfa y tejidos aumenta. Este incremento puede tener serios efectos sobre la fisiología del animal, a nivel célula, de órganos y sistemas (Colt y Armstrong, 1981). Por lo tanto, al volverse difícil la excreción, la primera reacción del organismo puede ser el cese y/o reducción de la alimentación, lo cual reduce la formación de amonio metabólico. Por lo anterior, uno de los principales efectos subletales del amonio es la reducción en la tasa de crecimiento (Colt y Armstrong, 1981) lo cual tendría graves efectos en los sistemas de cultivo camaronícolas.

Magallon-Barajas et al. (2006), reportaron que en PL de *L. vannamei* en ambiente de agua de mar con pH de 9 y amonio 7 mg L^{-1} , las tasas de sobrevivencia disminuyeron.

El amonio es necesario y es un componente benéfico para la vida porque es la base para la síntesis de aminoácidos y fundamental para el anabolismo de las proteínas (Lehninger 1995), pero exposiciones a concentraciones $>1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$ en el ambiente puede ser letal para *L. vannamei* (Frías-Espéricueta et al. 1999; Lin y Chen 2003). Aun a concentraciones mas bajas puede ser tóxico en exposiciones a corto periodo de tiempo (<12 h) en agua de mar que alcanza pH alcalino, como en el estudio de Magallón-Barajas et al. (2006).

Efectos tóxicos de los nitritos, entre los principales sobresalen aquellos que tienen una relación directa sobre el transporte de oxígeno, oxidación de importantes compuestos y daños a los tejidos. Jensen (1990) al someter al crustáceo *Astacus astacus* a diferentes concentraciones de NO_2^- , observó que éste era acumulado rápidamente en sus compartimentos extracelulares provocando un incremento en el pH de la hemolinfa,

originado por el incremento en la concentración de CO_2 , el cual es convertido al ión bicarbonato (HCO_3^-). El pigmento respiratorio de los crustáceos es la hemocianina (cada sitio de unión de O_2 contiene 2 átomos de Cu^{I} Cu^{I} , conocida como deoxihemocianina), la cual cambia su estado de oxidación cuando se le une el O_2 (Cu^{II} Cu^{II} , conocida como oxihemocianina) (Chen y Cheng, 1995). De esta manera la hemocianina sufre una reacción de oxido-reducción en los procesos de oxigenación-deoxigenación, y NO_2^- el puede reaccionar con la hemocianina de los crustáceos para formar metahemocianina, y así reducir su afinidad por el oxígeno imposibilitando a la hemolinfa para transportar oxígeno (Tahon et al., 1998).

Los efectos de los nitratos fueron examinados en protozoa de *Penaeus monodon* Muir et al. (1991), y encontraron que se presenta una mortalidad significativa dentro de las 40 horas en concentraciones de NO_3^- tan bajas como 1 mgL^{-1} . Los efectos subletales de esta concentración resultaron en cambios en las neuropilas gangliónicas y los músculos. En concentraciones más elevadas ($10\text{-}100 \text{ mgL}^{-1}$) fueron adicionalmente afectados la hipodermis, la glándula digestiva y proventrículos.

En este estudio se podría establecer que el crecimiento del camarón no estuvo limitado por ninguno de los parámetros de calidad medidos amonio, nitrito y nitrato que fluctuaron entre <0.10 y 0.24 , <0.01 y 0.04 , 0.05 y 1.68 , respectivamente; mientras que las concentraciones de oxígeno disuelto entre 4.77 y 7.43 mgL^{-1} . La temperatura y salinidad 22.3 y 30.5°C y 35.0 ups, nunca estuvieron más allá del nivel de riesgo durante el periodo de estudio (Villalon, 1991).

VIII.2. Dieta

Una dieta artificial exitosa para el cultivo de camarón contiene los principales polímeros tales como proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales presentan también el mayor porcentaje en peso de la formulación (Akiyama et al., 1991). En el tracto digestivo del camarón ocurre la digestión, que permite la obtención de los monómeros alimentarios tales como los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos (Nolasco et al., 2000). Estos monómeros, además de los que ya vienen libres en la dieta comercial, representan la fracción principal que potencialmente será asimilada y metabolizada a partir del alimento formulado y del alimento natural disponible (Akiyama et al., 1991; Shiau, 1997).

En un estanque típico de tierra para cultivo de camarón en granja, el alimento natural se presenta en diferentes formas como son: plancton que involucran fitoplancton y zooplancton viviendo en la columna de agua, una cadena bentónica sostenida por microfitoros, microflocs formados por la descomposición del alimento formulado y células fitoplanctónicas sedimentadas de la columna de agua y que sostienen una variedad de meiofauna y algunas especies de macro-invertebrados (Reymond y Lagarde 1990; Allan y Maguire 1992; Newel et al. 1995; Tidwell et al. 1997; Focken et al., 1998).

Para especies que presentan comportamiento alimenticio oportunista o exhibe cambios ontogenéticos rápidos, como es el caso de *L. vannamei*, las manipulaciones de las dietas y variaciones naturales de las presas que ocurren durante el periodo de cultivo, resultan en una gran variación isotópica entre individuos. *L. vannamei* es capaz de seleccionar presas específicas de la mezcla de los componentes naturales disponibles en la columna de agua y en los sedimentos, como ocurre por los camarones Peneidos en sistemas

naturales (Dittel et al., 1997). De hecho, los análisis microscópicos del contenido intestinal de camarón en estanques de tierra, revelan la presencia de una gran variedad de alimento natural junto al alimento comercial formulado, incluyendo detritus, nematodos, copépodos, anfípodos, poliquetos, bivalvos y diatomeas.

Parámetros de crecimiento relacionados con la calidad de la dieta (relación C:N) y talla.

La energía de una dieta es un factor importante que influye en el crecimiento ya que está relacionada con la utilización óptima de las proteínas dietéticas. Los organismos como los camarones, donde el metabolismo proteico tiene un marcado valor (Fox et al., 1994), es importante considerar el tiempo necesario para que la mitad del N en el músculo, alcance el equilibrio isotópico en los especímenes de *L. vannamei* con las diferentes dietas (tratamientos) y las tallas (ensayos). El recambio depende del crecimiento (k) y de las tasas metabólicas (m) las cuales están en función de la talla y de la dieta (calidad y cantidad) (Fry y Arnold, 1982; Tieszen et al., 1983; Houlihan, 1991; Wolfe y Chinkes, 2002).

Los valores de t_{50} incrementaron con el tamaño del camarón, aunque nosotros observamos que no hubo diferencias entre los tratamientos, excepto en los que no alcanzaron el equilibrio con la nueva dieta. Previa determinaciones de tasas de recambio isotópico en tejidos usando SIA en varias taxa de ectodermos y endodermos, sugieren que las tasas de recambio son específicas para taxones y tejidos analizados (Fry y Arnold, 1982; Tieszen et al., 1983; Hobson y Clark, 1992; Hesslein et al., 1993; Herzka y Holt, 2000). Periodos cortos para alcanzar el equilibrio isotópico, han sido estimados para estadios tempranos en decápodos. Por ejemplo, periodos de 15 días en postlarvas de *Penaeus*

semisulcatus (Al-Maslamani et al., 2009), 9 días en *Piaractus mesopotamicus* (Jomori et al., 2008), de 6-9 días en *Sesarma rectum* y *Petrolisthes armatus* (Schwamborn et al., 2002), y 5 días en larvas mysis de *L. vannamei* (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009b). Bajos valores de t_{50} también fueron encontrados en juveniles de camarón café, los cuales podrían reflejar el hecho de que ellos estaban creciendo activamente (Fry y Arnold, 1982).

En nuestro estudio la tasa de recambio isotópico estuvo en función de la biomasa adicionada (crecimiento) y del rompimiento y reemplazamiento de tejido corporal existente (recambio metabólico), el cual varía en función de la talla. Para los animales en crecimiento (p.e. postlarvas 20's y juveniles pequeños en ensayos I y II, respectivamente), la composición isotópica ocurrió principalmente como resultado del aumento de los tejidos, el cual está asociado con tasas de crecimiento rápido característico de estadios tempranos de *L. vannamei*. Durante este periodo de crecimiento rápido, el recambio metabólico del N estructural fue también significativo.

VIII.3. Discriminación isotópica en función de la dieta y talla

En crustáceos peneidos, los aminoácidos de las proteínas de los tejidos y del alimento son usados como la fuente primaria de energía para el metabolismo (Rosas et al. 2001a, 2001b). Los aminoácidos son catabolizados vía transaminación, resultando en excreción de amonio y la producción de aminoácidos libres que son metabolizados para obtener energía directa (Rosas et al. 2001a, 2001b). Durante la transaminación de aminoácidos, la fraccionación isotópica puede ocurrir debido a la excreción preferencial del amonio empobrecido en ^{15}N (Macko et al., 1986). La excreción de amonio de camarones alimentados y no alimentados

se relaciona con la talla del camarón (Rosas et al. 2001a, 2001b), por tanto sus factores de discriminación también varían directamente con la talla.

El factor $\Delta^{15}\text{N}$ en los tejidos tuvo un intervalo amplio a través de los grupos experimentales (0.3-3.5‰), promediando un $1.87 \pm 0.87\text{‰}$ en *L. vannamei* alimentados a saciedad. Aunque nuestro intervalo de $\Delta^{15}\text{N}$ incluye los valores asumidos comúnmente de 3.4‰ (DeNiro y Epstein, 1978; DeNiro y Epstein, 1981; Post, 2002), nuestro promedio global difiere. Sin embargo, nuestros valores son comparables a los reportados por Caut et al. (2009) de 2.1‰ (0.1-5.3‰) para muestras de organismos invertebrados completos. Vanderklift y Ponsard (2003) reportan valores de 1.6‰ para invertebrados amonotéticos (aquellos que excretan amonio como su desecho nitrogenado primario; incluyendo *L. vannamei*), y Al-Maslamani et al. (2009) de 1.9‰ para músculo de camarón tigre.

Resultados controversiales han sido reportados con respecto a la influencia de la calidad del alimento sobre los valores de $\Delta^{15}\text{N}$. Los autores anteriores encontraron diferencias entre animales alimentados con dietas diferentes (Gaye-Siessegger et al., 2004; Gamboa-Delgado y LeVay, 2009a; Malpica-Cruz et al., 2012), pero otros autores no (Post, 2002; Vanderklift y Ponsard, 2003).

En nuestros experimentos la discriminación en especímenes en equilibrio con sus dietas presentó una elevada variabilidad entre los ensayos (tallas) y tratamientos (tipo de alimento). Las variaciones en el $\Delta^{15}\text{N}$ en especímenes cultivados con tratamientos diferentes podría ser el resultado de la influencia de la calidad de la proteína de la dieta (Roth y Hobson, 2000, Waddington y MacArthur, 2008) y la cantidad (Fantle et al., 1999,

Pearson et al., 2003) y de las tasas de excreción del camarón (Olive et al. 2003, Gamboa-Delgado et al., 2008).

Las variaciones en el $\Delta^{15}\text{N}$ dentro de un ensayo y tratamiento podrían también estar relacionadas con el estrés del camarón y con su estadio de muda (McCutchan et al., 2003; Yokoyama et al., 2005). A pesar de la elevada variabilidad del $\Delta^{15}\text{N}$, nosotros observamos diferencias significativas entre tratamientos, también como una correlación significativa con la relación C:N. Gamboa-Delgado y LeVay (2009a) también identificaron diferencias en $\Delta^{15}\text{N}$ relacionadas al contenido proteico de dietas. Los autores reportan valores más bajos (0.08-3.6‰) en dietas con 46% de proteína cruda, y más altos (1.1-5.0‰) con dietas con 23% de proteína cruda.

En nuestro estudio el $\Delta^{15}\text{N}$ incrementó con la relación C:N de la dieta, indicando un efecto de calidad de dieta sobre la discriminación isotópica. Posteriormente, nosotros soportamos la hipótesis que a mejor calidad de la dieta (por ejemplo relación C:N mas baja) tiende a un menor enriquecimiento de ^{15}N . Esto coincide con la conclusión de Perga y Grey (2010) que una dieta rica en N lleva a una baja fraccionación pero contradice a Vanderklift y Ponsard (2003), que argumentan que una dieta pobre en N resulta en menores valores de $\Delta^{15}\text{N}$.

Debido a que las tasas de crecimiento y el grado de recambio metabólico dependen del tamaño del camarón (Fry y Arnold, 1982; Hesslein et al., 1993), nosotros esperábamos que las tasas de recambio isotópico y factores de discriminación pudieran variar en función de la talla. Los resultados confirmaron nuestra hipótesis. En animales de rápido crecimiento las tasas de recambio isotópico fueron más rápidas (tiempo más corto para alcanzar el

equilibrio), debido a la elevada tasa de acreción de tejido, característico de estadios de vida tempranos (por ejemplo PL's y juveniles pequeños). Así su factor de fraccionación trófica fue también más baja (Martínez del Rio et al., 2009). Al contrario de organismos de crecimiento más lento (por ejemplo juveniles mas grandes), las tasas de recambio isotópico dependieron estrictamente del recambio metabólico de los tejidos, donde tomó más tiempo alcanzar el equilibrio isotópico. Así su discriminación isotópica fue mayor. Las variaciones en el $\Delta^{15}\text{N}$ con la talla han sido reportados para *L. vannamei*, con valores de 0.8-5.0‰ en postlarvas de camarón y 1.3-7.8‰ en juveniles de camarón (Gamboa-Delgado y LeVay, 2009a).

Tres escenarios en relación al peso de los animales fueron considerados: a) crecimiento rápido (alimentados a saciedad), b) mantenimiento del peso corporal (alimentados con una dieta deficiente) y c) pérdida de peso (ayuno). Debido a que el estado de equilibrio fue alcanzado solamente en especímenes alimentados a saciedad, en nuestro estudio nosotros no pudimos comparar valores $\Delta^{15}\text{N}$ entre escenarios. Aunque de acuerdo a nuestras observaciones la tendencia en los valores de $\Delta^{15}\text{N}$ es a aumentar en especímenes con alimento limitado y en ayuno. Nosotros asumimos que una deficiencia de nutrientes en la dieta incrementaría el reciclaje de nutrientes no esenciales, causando una fraccionación isotópica más alta (Martínez del Rio y Wolf, 2005).

Debido a que el enriquecimiento isotópico podría ser mayor bajo condiciones de estrés nutricional (Hobson y Clark, 1992; Hobson et al., 1993; Fantle et al., 1999; Adams y Sterner, 2000), mayores enriquecimientos en ^{15}N podrían caracterizar a los especímenes en ayuno. De hecho, Gamboa-Delgado y LeVay (2009a) explicaron valores inusualmente altos

de $\Delta^{15}\text{N}$ como desbalances en los nutrientes dietarios necesarios para el desarrollo del camarón. Nuestros resultados indicaron que los animales en ayuno tuvieron un enriquecimiento progresivo de ^{15}N , como resultado de la re-utilización de tejidos existentes para sostener las demandas metabólicas y excreción selectiva de ^{14}N en el catabolismo de los tejidos corporales (Hobson et al., 1993; Gannes et al., 1997).

Por tanto, no nos sorprende que valores de recambio isotópico y de discriminación trófica más bajos caractericen a organismos mejor alimentados, y más altos para aquellos organismos con deficiencia proteica o privación de alimento (por ejemplo alta relación C:N y/o alimento limitado o ayuno).

VIII.4. Contribución relativa de la dieta natural

En este estudio los datos isotópicos en músculo de camarón fueron usados para reconstruir la dieta natural de *L. vannamei*, en tratamientos con dietas combinadas en cada ensayo y estanques integrando los cambios en las fuentes alimenticias a lo largo del ciclo de cultivo. Basados en los resultados, las postlarvas de *L. vannamei* alimentadas para su crecimiento con zooplancton el cual obtuvo su nutrición desde el fitoplancton-derivado de la materia orgánica. En presencia de sedimentos y detritos asociados, las postlarvas probablemente consumieron microflocs (agregados microalgales) suspendidos en la columna de agua o encontrados sobre los sedimentos. Sin embargo, la importancia relativa de la nutrición bentónica a la postlarva fue más baja que la nutrición planctónica. Las postlarvas fueron enriquecidas en 2.2 y 5.1‰ en $\Delta^{15}\text{N}$ relacionado al zooplancton y fitoplancton,

respectivamente. Esta fraccionación isotópica refleja dos niveles tróficos de la cadena alimenticia: fitoplancton>zooplancton>postlarva de camarón.

La contribución de la dieta zooplancton disminuyó con la talla del camarón mientras que la dependencia por la nutrición bentónica se incrementó (detritos como base de la cadena trófica natural). Para los juveniles pequeños, las señales isotópicas de los organismos cultivados con dieta natural AN indican que zooplancton y alimento bentónico representan el 25 y 75%, respectivamente. Mientras que para los juveniles medianos y más grandes fue solamente bentónico. La base de la cadena alimenticia fueron los detritos constituida por microflocs y fauna béntica (por ejemplo meiofauna y poliquetos). Los datos isotópicos revelaron que los camarones no utilizan directamente los detritos, sino que ellos seleccionaron sus presas desde la mezcla de detritos como se ha reportado en ecosistemas naturales (Parker et al. 1989; Dittel et al., 1997). Aunque el detrito podría proveer nutrientes específicos que promuevan más altas sobrevivencias, la calidad nutricional (por ejemplo C:N) y digestibilidad baja lo que limita su contribución al crecimiento de los organismos. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en el tratamiento AN implican que hay dos eslabones tróficos entre los detritos (4.81‰) y los camarones con (10.13‰).

La dependencia hacia la dieta natural AN disminuyó gradualmente en juveniles cultivados se incrementó con tratamientos de dietas combinadas y en los estanques, mientras que la dependencia del AF hasta ser prácticamente del 100% para juveniles mayores. La voracidad del *L. vannamei* y la disponibilidad reducida de la productividad natural explica la drástica reducción en su importancia como alimento. La falta de fauna béntica (pocos organismos de meiofauna y ausencia de poliquetos en ensayo IV) explican

la nula contribución de la dieta natural a los juveniles mayores cultivados con el tratamiento AN y en los estanques. Incluso, se tuvieron bajas tasas de crecimiento en el ensayo IV debido a la escasez de AN.

A pesar de la reducción del 50% del AF en los tratamientos de la dieta combinada con respecto a las tasas alimenticias aplicadas a nivel granja, la mayoría de los ensayos presentaron suficientes nutrientes para sostener al fitoplancton y cadenas alimenticias con base en detritos en la columna de agua y en los sedimentos, respectivamente.

Basados en los resultados de los cuatro ensayos, nosotros medimos la contribución de la productividad natural regulando tasas de crecimiento y factor de condición de los animales, los cuales variaron entre ensayos y tiempos de cultivo, disminuyendo con el tamaño del camarón. El análisis de tejido muscular de postlarvas y juveniles pequeños cultivados con dietas combinadas y en estanques indicaron una mayor contribución de la productividad natural al crecimiento de las postlarvas PL20's (>50%), y luego para juveniles pequeños y medianos (15-31% y 16%, respectivamente).

La contribución del AN a los especímenes más grandes (ensayo IV) fue significativamente más baja (<10 a 13%), similar a lo observado en los estanques para las misma tallas. Aparentemente, la productividad natural no fue un contribuyente importante al crecimiento y la nutrición de los camarones más grandes, sin embargo, esto se puede explicar a la falta de suficiente AN durante el período de experimentación, tanto en los tanques experimentales como en los estanques de la granja. Por otro lado, el canibalismo observado entre los camarones en el tratamiento AN del ensayo IV confirma la falta de alimento.

La mayoría de los estudios de contribución de AN al crecimiento del camarón usando abundancia natural de isotopos estables ha sido expresada en términos de C dentro de condiciones de cultivo semi-intensivo de camarón (Anderson et al., 1987; Parker et al., 1989; Nunes et al., 1997;). Estos estudios han encontrado que entre el 44 y 86% del crecimiento del camarón puede ser debido a la productividad natural del estanque. Entre los pocos estudios reportando la contribución del alimento natural AN en términos de N está el hecho por Epp et al. (2002). Los autores emularon las condiciones de crecimiento de camarón en cultivo intensivo en estanques al aire libre en un mesocosmos experimental con juveniles medianos de *L. vannamei* (50 orgs. m⁻², peso inicial de 3.5 g) con intercambio de agua cero. Los autores revelaron que la contribución del AN fue mayor al 28-31%. Siguiendo estrategias metodológicas similares, Burford et al. (2004) estimaron una contribución de la dieta natural sustentada por bioflocs del 18% a 29% a la nutrición de especímenes de *L. vannamei* de 1 a 9 g. Estos intervalos de contribución son comparables a los de nuestros resultados en el ensayo III (peso inicial de 2.79 g), donde la contribución varió entre 5-29% (10) y 16-38% (18) para los tratamientos AN+AF y AN+AF+S.

Previos estudios representan que cerca del 16.7% (en peso seco) del alimento formulado aplicado a los estanques es convertido a biomasa de camarón (Hassan y Datta, 2012), esto indica que la mayoría de las partículas no ingeridas y no asimiladas del AF, y son acumuladas en los sedimentos se desintegran en pocas horas y una parte de las partículas depositadas son eventualmente descompuestas en pocos días. En Aquastrat, nosotros estimamos que solamente del 14-16% de dicho alimento fue convertido en biomasa en ambos ciclos, la mayoría es eliminado como materia orgánica particulada y metabolitos disueltos vía efluentes y sedimentos. Cantidades excesivas de materia orgánica

derivadas del alimento formulado incrementa durante el ciclo de cultivo y da como resultado una baja en la calidad de agua y una disminución en la disponibilidad de alimento natural.

Por otro lado, la acumulación de desechos alimenticios resulta en eventos de hipoxia o anoxia y en la eventual formación de sedimentos reducidos, lo cual afecta al cultivo de los organismos vivos y también en términos de calidad comercial del camarón (por ejemplo mala apariencia por branquias negras) y por consecuencia de bajo precio en el mercado. La única solución que se aplica en las granjas de camarón con sistemas de cultivo intensivo es incrementar el intercambio de agua. Por ejemplo, en Aquastrat el agua de los estanques es renovada cerca de 200 veces por ciclo ($\sim 30 \text{ m}^3$ de agua de mar por kilogramo de camarón). Sin embargo, esta práctica común en granjas con sistema de cultivo intensivo incrementa los costos de operación (exceso de alimento formulado, gastos en energía para aeración mecánica y bombeo) y en impacto ambiental hacia los sistemas costeros adyacentes recibiendo efluentes (materia orgánica, nutrientes y otras sustancias aplicadas incluyendo antibióticos).

VIII.5. Implicaciones

Desde el 2003, el camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) se ha convertido en la principal especie de crustáceos producido a nivel mundial a través de varios sistemas de acuicultura (desde extensiva hasta hiperintensiva) (FAO, 2006). Esta industria representa ganancias de aproximadamente US\$700 millones en México (FAO, 2012). La acuicultura del camarón es criticada por sus prácticas insostenibles, que incluye los efectos de su actividad sobre las reservas de sardina y anchoveta usadas para la producción de alimento formulado y la contaminación por las descargas de efluentes ricos en nutrientes y materia orgánica, causando eutrofización y frecuentes explosiones algales dañinas en las aguas costeras (Páez-Osuna et al., 2003; Amezcua y Soto-Jiménez, 2014). Así, el conocimiento sobre la adecuada nutrición del camarón y el desarrollo de alimento para proveerse en cada estadio del ciclo de cultivo es urgente para usar eficientemente las dietas comerciales, maximizando la producción de camarón y minimizando los desechos de los alimentos.

En ese sentido, las técnicas isotópicas para examinar la asimilación y la contribución nutricional de las dietas en *L. vannamei*, se están convirtiendo en una herramienta muy útil (Gamboa-Delgado y LeVay, 2009a; 2011; Gamboa-Delgado et al., 2011, 2012; Martínez-Rocha et al., 2013). Esencialmente nos permiten a) estimar la relación temporal entre la relación isotópica de los organismos y su dieta y b) analizar las variaciones de la disponibilidad o preferencias a lo largo del ciclo de cultivo. Aunque, el uso apropiado de esta herramienta requiere una cuidadosa validación de los valores de $\Delta^{15}\text{N}$ y t_{50} en *L. vannamei* y otras especies CAFO.

En nuestros experimentos alimenticios controlados revelan que el camarón blanco es una especie sensible a la dieta, como lo indicado por los efectos de la cantidad alimenticia (tasas de alimentación) y calidad (en términos de relación C:N) sobre el crecimiento procesos metabólicos (Jomori et al., 2008; Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009a). Los resultados también presentan cambios metabólicos con relación a la talla, cambios de dieta que pueden afectar significativamente los valores de $\Delta^{15}\text{N}$ y t_{50} . Este conocimiento es crítico en estudios de nutrición para evitar una interpretación insostenible de datos isotópicos que resultan en conclusiones ambiguas.

Basados en la evaluación de pesos y tasa de crecimiento y los resultados isotópicos, la dieta natural es un buen complemento para sostener el crecimiento de postlarvas y juveniles, al menos durante las primeras 5 semanas de cultivo. Una adecuada combinación de alimento formulado (a un 50% de la tasa de alimentación actual) y promoción de la productividad natural provoca el crecimiento y desarrollo de postlarvas a juveniles pequeños. Después de la semana 5, el mantenimiento de crecimiento apropiado de juveniles de *L. vannamei* es alcanzado usando exclusivamente alimento formulado siguiendo mejores técnicas de manejo, por ejemplo usando sistemas de control como las charolas alimentadoras (Casillas-Hernández et al., 2007).

Puesto que los resultados se basaron en mesocosmos experimentales dentro de condiciones de cultivo intensivo e incluimos un seguimiento en estanques de tierra representativos de la granja, es posible extrapolarlos a nivel granja. Esto sugiere que durante las primeras 2-3 semanas de cultivo intensivo de camarón en granja, en estadio de

postlarva, la cantidad de alimento artificial adicionados a los estanques son convertidos en producción natural.

Promoviendo la disponibilidad de otras fuentes alimenticias distintas al alimento comercial, se puede subsidiar el crecimiento y producción de camarón cultivado, reduciendo el uso de alimento comercial, los FCA, los costos de operación e impacto al ecosistema. Por tanto, es muy importante establecer el tipo y cantidad de alimento a proporcionar en las diferentes etapas del cultivo, con miras de lograr un mejor rendimiento y menor pérdida de recursos altamente costosos como el nitrógeno y que puede provocar eutrofización en los sistemas costeros que reciben los efluentes de las granjas.

Si el alimento natural es abundante en el agua de cultivo, siguiendo una adecuada fertilización y manejo de la calidad del agua y de los sedimentos, los granjeros podrían ser capaces de reducir la adición de alimento formulado, permitiendo que el camarón dependa más de la productividad natural del estanque, reduciendo con esto las FCAs y con ello promoviendo factibilidad del cultivo. En resumen, este estudio confirma que un adecuado manejo del alimento formulado en las granjas de camarón resulta en beneficios económicos, en menor afectación de los sistemas de producción y minimiza la contaminación en los sistemas naturales receptores.

IX. CONCLUSIONES

Este trabajo se realizó para identificar isotópicamente las fuentes de alimento del camarón en cultivo intensivo y evaluar las contribuciones relativas de cada alimento a la biomasa del camarón cultivado desde PL´20s hasta juveniles mayores de *Litopenaeus vannamei*, bajo la hipótesis el alimento natural que se fomenta en los estanques (p.ej. material floculado, el plancton, la fauna bentónica, y el detrito) es parte importante de la dieta de camarones cultivados. Aunque pudiera ser obvio el resultado que previos autores han reportado, lo difícil ha sido la cuantificación de la contribución a la dieta en estanques de cultivo. En este estudio mediante el uso de las técnicas isotópicas identificamos y trazamos los diferentes componentes de la dieta generados o aplicados al estanque de cultivo y cuantificamos su contribución a la señal isotópica en el tejido del camarón. Este seguimiento se ha realizado tanto en estanques de cultivo como en experimentos tipo mesocosmos donde se reprodujeron las mismas condiciones pero se probaron tratamientos para diferentes tallas.

Nuestros resultados confirman que estos componentes son importantes contribuyentes a la nutrición de camarón principalmente en estadios iniciales (postlarvas y juveniles pequeños). Los resultados fueron generados de cuatro experimentos de alimentación en cuatro diferentes fases de desarrollo del camarón, dentro de condiciones de cultivo intensivo e incluyendo un seguimiento en estanques de tierra representativos de la granja en condiciones similares de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto entre otros parámetros fisicoquímicos.

En estos mismos experimentos, se determinó el enriquecimiento trófico isotópico en el musculo de animales alimentados con dietas puras y en equilibrio con sus dietas (1.9 y 2.56‰).

En los ensayos fue posible detectar dos cadenas tróficas que se generan dentro de los estanques de cultivo y basado en la fraccionación isotópica fue posible cuantificar los niveles tróficos de ambas cadenas. La primera cadena alimenticia es fitoplancton-zooplancton-postlarva de camarón durante los primeros días del cultivo. Durante las primeras 2-3 semanas de cultivo intensivo de camarón en granja, en estadio de postlarva, parte del alimento artificial adicionados a los estanques es convertido en producción natural y se adiciona a la sostenida por la fertilización inicial del estanque.

Simultáneamente, se desarrolla una cadena bentónica que empieza a ser explotada por el camarón una vez que deja su estadio de post-larva y cambia sus hábitos de plantónicos a bentónicos. Esta cadena está conformada por: micro-floc-meiofauna-macroinvertebrados (poliquetos)-camarón. Esta cadena trófica es básicamente sostenida por el alimento formulado no ingerido o defecado.

Ambas cadenas (planctónica y bentónica) contribuyen significativamente al crecimiento del camarón cultivado en sus primeros estadios, reduciendo el uso de alimento comercial y consecuentemente los FCAs.

De acuerdo a nuestros resultados, una adecuada combinación de alimento formulado (p.ej. hasta de un 50% de la tasa de alimentación actual) y promoción de la productividad natural provoca el crecimiento y desarrollo de postlarvas a juveniles pequeños. Basados en la evaluación de pesos y tasa de crecimiento y análisis de isotopos estables de C y N, la dieta

natural es un buen complemento para sostener el crecimiento de postlarvas y juveniles, al menos durante las primeras 5 semanas de cultivo.

En Aquastrat, nosotros estimamos que solamente del 14-16% de AF fue convertido en biomasa en ambos ciclos, la mayoría del AF es eliminado como materia orgánica particulada y metabolitos disueltos vía efluentes y una pequeña fracción remanente en sedimentos. Cantidades excesivas de materia orgánica derivada de AF se incrementa durante el tiempo de cultivo y da como resultado una baja calidad del agua y del alimento natural.

Si el alimento natural es abundante en el agua de cultivo, siguiendo una adecuada fertilización y manejo de la calidad del agua y sedimentos, los granjeros podrían reducir la entrada de alimento formulado, permitiendo que el camarón consuma más sobre la productividad natural del estanque, reduciendo con esto los FCAs y con ello promoviendo factibilidad del cultivo.

Es muy importante establecer el tipo y cantidad de alimento a proporcionar en las diferentes etapas del cultivo, con miras de lograr un mejor rendimiento y menor pérdida de recursos altamente costosos como el nitrógeno y que puede provocar eutrofización en los sistemas costeros que reciben los efluentes de las granjas.

La acuicultura en México y alrededor del mundo podría ser usada para maximizar los recursos naturales en los estanques. Particularmente, un adecuado manejo del alimento formulado en las granjas de camarón resultaría en beneficios económicos, menos afectación de los sistemas de producción y minimizar la contaminación en los sistemas naturales receptores.

X. LITERATURA CITADA

- Adams, S.A. y Sterner R.W., 2000. The effect of dietary nitrogen content on trophic level ^{15}N enrichment. *Limnology and Oceanography* 45, 601–607.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., and Addison, L.L., 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. In: DM Akiyama and Tan R.K. (Eds). Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. September 19-25. American Soybean Association. pp 80-98.
- Allan, G.L. & Maguire, G.B., 1992. Effects of stocking density on production of *Penaeus monodon* Fabricius in model farming ponds. *Aquaculture* 107, 49–66.
- Allan, G.F., Moriarty, D.J.W., Maguirre, G.B., 1995. Effects of pond preparation and feeding rate on production of *Penaeus monodon* Fabricius, water quality, bacteria and benthos in model farming ponds. *Aquaculture* 130, 329–349.
- Al- Maslamani I., Le Vay L. & Kennedy H., 2009. Feeding on intertidal microbial mats by postlarval tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Marine Biology* 156, 2001-2009.
- Amezcua F., Soto-Jiménez M.F., 2014. Current State of Aquaculture in México. *Fisheries* 39(11), 554-555.
- Anderson, R. K., Parker, L. P., Lawrence, A., 1987. A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tracer study of the utilization of presented feed by a commercial important shrimp *Penaeus vannamei* in pond grow out system. *Journal of the World Aquaculture Society* 18, 148-155.

- APHA-AWWA-WPCF, 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. Washington, D.C.
- Aragon-Axomulco, H., Chiapa-Carrara, X., Soto, L., Cuzon, G. Arena, L., Maldonado, C., Cárdenas, R., Gaxiola, G., 2012. Seasonal Variability in Trypsin and α -Amylase Activities Caused by the molting Cycle and Feeding Habits of Juvenile Pink Shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939). Journal of Crustacean Biology 32(1), 89-99.
- Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D., 2007. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. 27-30. En: Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D. (Eds.). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México.
- Banerjee, S., Khatoon, H. Shariff, M., Yusoff, F.M., 2010. Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. Fish. Sci. 76, 481-487.
- Bray, W. A., A.L. Lawrence, and J. R. Leung-Trujillo., 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. Aquaculture 122, 133-146.
- Briggs, M.R.P. and Funge-Smith S.J., 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. Aquaculture and Fisheries Management 25, 789-811.
- Browdy, C.L., Moss, S.M., 2005. Shrimp Culture in Urban, Superintensive Closed Systems. In: Costa Pierce, B.A. (Ed.), Urban Aquaculture. Blackwell Science, Oxford UK, 173–186.

- Burford, M.A., Jackson, C.J., Preston, N.P., 2001. Reducing N waste from shrimp farming: an integrated approach. In: C.L. Browdy and D.E. Jory, Editors, The New Wave: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 35–43.
- Burford, M.A., Preston, N.P., Glibert, M., Dennison, W.C., 2002. Tracing the fate of ^{15}N -enriched feed in an intensive shrimp system. *Aquaculture* 206, 199-216.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Barman, R.H., Pearson, D.C., 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity zero-water exchange system. *Aquaculture* 232, 225-237.
- Burnham, K.P., and Anderson, D.R. 2002. Model selection and inference: a practical information-theoretic approach. 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Cabana, G., Rasmussen, J.B., 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10844–10847.
- Cam, D., Rollet, P. E., Mariotti, A., Guillaume, J., 1991. The relative contribution of natural productivity and formulated food in the nutrition of *Penaeus japonicus* reared in semi-intensive conditions. *Aquat. Living Resour.* 4, 175–180.
- CNA, 2009. Comisión Nacional del Agua.
- Carleton, A., Martínez del Rio, C., 2005. The effect of cold-induced increased metabolic rate on the rate of ^{13}C and ^{15}N incorporation in house sparrows (*Passer domesticus*). *Oecologia* 144, 226-232.
- Casillas-Hernández, R., Nolasco-Soria, H., García-Galano, T., Carrillo-Farnes, O., Páez-Osuna, F., 2007. Water quality, chemical fluxes and production in semi-intensive

Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture ponds utilizing two different feeding strategies. *Aquacultural Engineering* 36, 105–114.

- Caut, S., Angulo, E., Courchamp, F., 2009. Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J. Appl. Ecol.* 46, 443–453.
- CESASIN, 2014. <http://www.cesasin.com.mx/BOLETIN%20INFORMATIVO%202013-01-10.pdf> (Consultado el 20 de Mayo de 2014).
- Charmantier, G., Soyés, C., Aquacop, 1994. Effect of moult stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Ecol.* 178, 223-246.
- Chamberlain, G.W., 1995. Frontiers in Shrimp Nutrition Research. In: *Swimming Through Troubled Water* (Browdy, C.L. & Hopkins, J.S. Ed.), 108–117. The World Aquaculture Society. Baton Rouge Louisiana, USA.
- Chen, J. C., M. N. Lin, Y. Y. Ting & J. N. Lin., 1995. Survival haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels. *Comp. Biochem. Physiol.* 110 (3), 253–258.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y., 1995. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *J. Comp. Physiol. B* 164, 530–535.
- Chua, T.E., Paw, J.N., Guarin, F.Y., 1989. The environmental impact of aquaculture and the effects of pollution on coastal aquaculture development in Southeast Asia. *Marine Pollution Bulletin* 20, 335–343.

- Colt, H.E., Armstrong, D.A., 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and mollusks. In: Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture. Fish Culture Section of the American Fisheries Society (FCS publ. 1), 34-47.
- Comtet, T., 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. Helgol. Mar. Res. 60, 281–288.
- CONAPESCA, 2011. Programa Nacional de Pesca y Acuicultura.
- COSAES, 2014. <http://www.cosaes.com/> (Consultado el 20 de Mayo de 2014).
- 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*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 349, 370–377.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. Aquaculture 235, 513–551.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. y Sharples, D.J. 1990. Moulting and Growth. In: Blaxter, J.M.S. y Southward, A.J. (Eds.) The Biology of Penaeidae . Advances in Marine Biology, Vol. 27. Academic Press. London. p. 213-250.
- Decamp, O., Conquest, L., Forster, I., Tacon, A. G.J., 2002. The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-exchange aquaculture production systems: role of Eukaryotic microorganisms. Pages 79–86 in C. S. Lee and P. O’Byrne, editors. Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- De Niro, M. J. & S. Epstein. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochim. Cosmochim. Acta 42:495–506.

- DeNiro, M.J., Epstein, S., 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochem. Cosmochem. Acta* 45, 341–351.
- Dierberg, E.F., Kiattisimkul, W., 1996. Issues, impacts and implications of shrimp aquaculture in Thailand. *Environmental Management* 20 (5), 649–666.
- Dittel, A.I., Epifanio, C.E., Cifuentes, L.A. and Kirchtman, D.L., 1997. Carbon and nitrogen sources for shrimp postlarvae fed natural diets from a tropical mangrove system. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 45, 629-637.
- Epp, M.A., Ziemann, D.A., and 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.
- FAO, (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2006. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome.
- FAO, (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2011. The Global Aquaculture Advocate (The Global Magazine for Farmed Seafood). *Global Aquaculture Alliance*, 14(1), 10.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2012. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome.
- Fanning, K. A. & M.E.Q. Pilson, 1973. On the spectrophotometric determination of dissolved silica in natural waters. *Anal. Chem.*, 45 (1), 136-140.

- Fantle M.S., Dittel A.I., Schwalm S.M., Epifanio C.E. & Fogel M.L. (1999). A food web analysis the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia* 120, 416–426.
- Ferraia, R.P. Parado-Esteva, F.D., De Jesús, E.G., Ladjá, J.M., 1986. Osmotic and chloride regulation in the hemolymph of the tiger prawn *Penaeus monodon* during molting in various salinities. *Mar. Biol.* 95, 377–385.
- Focken, U., Groth, A., Coloso, R., and Becker, K., 1998. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in semi-intensive pond system in the Phillipines. *Aquaculture*, 164, 105-116.
- Fox, C., Brown, J., Briggs, M., 1994. The nutrition of prawns and shrimp in aquaculture- a review of recent research. In: Muir J, Roberts R, eds. Recent Advances in Aquaculture V. Blackwell Science Ltd., Oxford, England, 132-206.
- Frías-Espericueta, M.G., Harfush-Melendrez M., Osuna-López J.I. y Páez-Osuna F., 1999. Acute toxicity of ammonia to juvenile *Penaeus vannamei* Boone. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 646-652.
- Frías-Espericueta, M.G. y Páez-Osuna F., 2001. Toxicidad de los compuestos del Nitrógeno en camarones. En el libro *Camaronicultura y Medio Ambiente*. (Editor). UNAM y El Colegio de Sinaloa, México. 225-242 p.
- Fry, B., 1991. Stable isotope diagrams of freshwater food webs. *Ecology* 72, 2293–2297.
- Fry, B., Arnold, C., 1982. Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia* 54, 200–204.

- Fry, B., Sherr, E.B., 1984. $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Contrib. Mar. Sci.* 27, 13–47.
- Gamboa-Delgado J., Cañavate J.P., Zerolo 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.
- Gamboa-Delgado J., Lewis Le Vay., 2009a. Artemia replacement in cofeeding 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., Le Vay, L., 2009b. Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fishmeal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture* 291, 115-123.
- Gamboa-Delgado, J., Peña-Rodríguez, A., Cruz-Suárez, L.E., Ricque, D., 2011. Assessment of nutrient allocation and metabolic turnover rate in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* co-fed live macroalgae *Ulva clathrata* and inert feed: dual stable isotope analysis. *Journal of Shellfish Research* 30, 969–978.
- Gamboa-Delgado, J., Rojas-Casas, M.G., Nieto-López, M.G., Cruz-Suarez, L.E., 2012. Simultaneous estimation of the nutrition contribution of fish meal, soy protein isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using dual stable isotope analysis. *Aquaculture* 380-383, 33-40.
- Gaye-Siessegger J., Ulfert Focken, Stefan Muetzel, Hansjörg Abel and Klaus Becker., 2004. Feeding level and individual metabolic rate affect $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* 138, 175–183.

- Gannes, L. Z., O'Brien, D.M. & Martínez del Rio, C., 1997. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78, 1271–1276.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 419 pp.
- Hassan, B.M.A., Guha, B., Datta, S., 2012. Optimization of Feeding Efficiency in Semi-Intensive Farming System for Sustainable and Cost Effective Production of *Penaeus monodon Fabricius*. *Journal Aquaculture Research Development* 3,149.
- Hays, G.C., C.R., Broderick A.C., Godley B.J., Lucas D.J., Metcalfe J.D. & Prior A.A., 2000. The diving behavior of green turtles at Ascension Island. *Animal Behaviors* 59, 577–586.
- Hentschel, B.T., 1998. Intraspecific variations in $\delta^{13}\text{C}$ indicate ontogenetic diet changes in deposit-feeding polychaetes. *Ecology* 79, 1357–1370.
- 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. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 137–147.
- Herzka, S.Z., 2005. Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ratio analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64, 58-69.
- 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 ^{34}S , ^{13}C , and ^{15}N . *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 2071–2076.
- Hobson, K., Clark, R., 1992. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. *Condor* 94, 181–188.

- Hobson K.A., Alisauskas R.T. & Clark R.G. (1993) Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analysis of diet. *Condor* 95, 388–394.
- Jensen, F.B., 1990. Sublethal physiological changes in freshwater crayfish, *Astacus astacus*, exposed to nitrite: haemolymph and muscle tissue electrolyte status, and haemolymph acid-base balance and gas transport. *Aquatic Toxicology*, 18:51-60.
- Jiang, D.H., Lawrence, A.L., Neil, W.H., Gong, H., 2000. Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253 (2), 193–209.
- 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.
- Jory D.E., 1995. Feed management practices for healthy pond environment. In: C.L. Browdy and J.S. Hopkins, Editors, *Swimming trough troubled water*, Proceeding of the special session on shrimp farming. *Aquaculture'95*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 118-143.
- Jory, D.E., 2001. Feed management practices for a healthy pond environment. In: Browdy CL, Jory, DE (Eds.). *The new wave. Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 118-143.
- Kelly, J.F., 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can. J. Zool.* 78, 1–27.

- Kumulu, M., Eroldogan, O.T., Aktas, M., 1999. The effect of salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). *Isr. J. Aquac.- Bamidgeh* 51 (3), 114–121.
- Kumulu, M., Eroldogan, O.T., Aktas, M., 2000. Effects of temperature and salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus*. *Aquaculture* 188 (1–2), 167–173.
- Kusher, D.I., Smith, S.E., and Cailliet, G.M., 1992. Validated age and growth of the leopard shark, *Triakis semifasciata*, with comments on reproduction. *Environmental Biology Fishes* 35(2), 187–203.
- Laramore, S., Laramore, C.R., Scarpa, J., 2001. Effect of low salinity on growth and survival of postlarvae and juvenile *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 32, 385–392.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. *Aquaculture* 191, 169– 176.
- Le Vay, L. & Gamboa-Delgado, J., 2011. Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture* 315, 95–103.
- Lin, Y.C., Chen, J.C., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*. 224, 193–201.
- Lyndon, A. R., Houlihan, D. F. and Hall, S. J. (1992) The effect of short term fasting and a single meal on protein synthesis and oxygen consumption in cod, *Gadus morhua*. *Journal Comparative Physiology B* 162, 209-215.

- Macko, S.A., Fogel Estep, M.L., Engel, M.H., Hare, P.E., 1986. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta* 50:2143–2146.
- Magallon-Barajas F., Servin-Villegas R., Portillo-Clarck G. y López M.B., 2006. *Litopenaeus vannamei* (Boone) postlarval survival related to age, temperature, pH, and ammonium concentration. *Aquaculture Research* 37, 492-499.
- Madigan, D.J., Litvin, S.Y., Popp, B.N., Carlisle, A.B., Farwell, C.J., Block, B.A., 2012. Tissue Turnover Rates and Isotopic Trophic Discrimination Factors in the Endothermic Teleost, Pacific Bluefin Tuna (*Thunnus orientalis*). *PLoS ONE* 7(11), e49220.doi:10.1371/journal.pone.0049220.
- Malpica_Cruz L., Herzka S.Z., Sosa-Nishizaki O., Lazo J.P. (2012) Tissue-specific isotope trophic discrimination factors and turnover rates in a marine elasmobranch: empirical and modeling results. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 69, 551–564.
- Martínez-Cordova, L.R., Porchas-Cornejo, A., Villareal-Colmenares, H., Calderon-Pérez, J.A., Naranjo-Paramo, J., 1998. Evaluation of three feeding strategies on the culture of white *Penaeus vannamei* Boone 1931 in low water exchange ponds. *Aquacult. Eng.* 17, 21–28.
- Martínez-Cordova, L., A. Torres, M. Porchas-Cornejo., 2003. Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition* 9,155–160.
- Martínez-Córdova, L.R., Peña-Messina, E., 2005. Biotic communities and feeding habits of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson

- 1974) in monoculture and polyculture semi-intensive ponds. *Aquaculture Research* 36, 1075-1084.
- Martínez del Río, C. & Wolf, B.O., 2005. Mass balance models for animal isotopic ecology. *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates* (eds. M. A. Starck & T. Wang), pp. 141–174. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
 - Martínez del Río, C. Wolf, N., Carleton, S. A. & Gannes, L. Z., 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews*, 84, 91–111.
 - Martínez-Rocha, L., Gamboa-Delgado J., Nieto-López M., Ricque-Marie D. & Cruz-Suárez L. E., 2013. Incorporation of dietary nitrogen from fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low protein compound diets. *Aquaculture Research* 44, 847–859.
 - McClelland, J.W., Valiela, I., 1998. Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources. *Limnology and Oceanography*, 43, 577-585.
 - McCutchan, J.H., Lewis, W.M., Kendall, C., McGrath, C.C., 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102, 378–390.
 - McGraw, W.J., Davis, D.A., Teichert-Coddington, D., Rouse, D.B., 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* post larvae to low salinity: influence of age, salinity endpoint and rate of salinity reduction. *J. World Aquac. Soc.* 33 (1), 78 – 84.
 - Mente, E., Coutteau P., Houlihan D.F., Davidson I., Sorgeloos P. (2002) Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology* 205, 3107–3122.

- Michener, R.H., Schell, D.M., 1994. Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: Lajtha, K., Michener, R.H. (Eds.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Scientific Publications, London, UK, pp. 138–157.
- Minagawa, M., Wada, E., 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between ^{15}N and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* 48, 1135–1140.
- Moss, S.M., Pruder, G.D., 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 187, 175-191.
- Muir, P.R., Sutton, D.C., y Owens, I., 1991. Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoa. *Marine Biology*, 108, 67-71.
- Newell, R.I.E., Marshall, N., Sasekumar, A, Chong, V.C., 1995. Relative importance of benthic microalgae, phytoplankton, and mangroves as sources of nutrition for penaeid prawns and other coastal invertebrates from Malaysia. *Marine Biology* 123, 595-606.
- Nixon, S.W., Oviatt, C., Frithsen, J., Sullivan, B., 1986. Nutrients and productivity of estuaries and coastal marine ecosystems. *Journal of the Limnological Society of South Africa*. 12, 43-71.
- Nolasco-Soria, H. y Vega-Villasante F., 2000. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. pp. 149-165 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de*

Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México. Libro electronic: ISBN-970-694-51-0.

- Nunes, A.J.P., Gesteira, T.C.V., Goddard, S., 1997. Food consumption and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149, 121–136.
- Nunes, A.J.P., Pearson, J. P., 2000. Size-related feeding gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture* 187, 133-151.
- Olive, P. J.W., Pinnegar, J. K., Polulin, N. V. C., Richards, G., Welch. R., 2003. Isotope trophic-step fractionation: a dynamic equilibrium model. *Journal of Animal Ecology* 72, 608–617.
- Overman, N. C. & Parrish D.L., 2001. Stable isotope composition of walleye: $\delta^{15}\text{N}$ accumulation with age and area-specific differences in $\delta^{13}\text{C}$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1253–1260.
- Owen, S.F., McCarthy, I.D., Watt, P.W., Ladero, V., Sanchez, J.A., Houlihan, D.F., Rennie, M. J., 1999. In vivo rates of protein synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts measured using a single flooding dose injection of ^{15}N -phe. *Fish Physiology Biochem* 20, 87–94.
- Páez-Osuna, F., Guerrero-Galván, S.R., Ruiz-Fernández, A.C., Espinoza-Angulo, R., 1997. Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in north-western Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 34, 290–297.

- Páez-Osuna F., Guerrero-Galván S.R., Ruiz-Fernández A.C., 1998. The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 36, 65–75.
- Páez-Osuna F., Guerrero-Galván S.R., Ruiz-Fernández A.C., 1999. Discharge of nutrients from shrimp farming to coastal waters of the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin* 38, 585–592.
- Parker P.L., R.K. Anderson and A. Lawrence., 1989. A $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ tracer study of nutrition in aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond growout system. In: P.W. Rundel, J.R. Ehleringer and K.A. Nagy, Editors, *Stable Isotopes in Ecological Research*, Springer-Verlag, New York, pp. 288–303.
- Parsons, T.R., Maita, Y., Lally, C.M. (1984). *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Oxford: Pergamon, 173 p.
- Pearson, D.F., Levey, D.J., Greenberg, C.H., Martínez 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 Ecological Systems* 18, 293–320.
- Phillips, D.L., Gregg, J.W., 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* 127,171–179.
- Ponsard, S. & Ardití, R., 2000. What can stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) tell about the food web of soil macro-invertebrates? *Ecology* 81, 852–864.

- Ponce-Palafox, J., J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107–115.
- Post, D. M., Pace M.L. & Hairston N.G., 2000. Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature* 405, 1047–1049.
- Post, D. M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83, 703–718.
- Preston, N.P., Smith, D.M., Kellaway, D.M., Bunn, S.E., 1996. The use of enriched ¹⁵N as an indicator of the assimilation of individual protein sources from compound diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 147, 249–259.
- Prosser, L.C., 1973. *Comparative Animal Physiology*, 3rd Edition. Saunders, Philadelphia, PA, USA.
- Quintero, H.E., Roy, L.A., 2010. Practical feed management in semi- intensive systems for shrimp culture. In: V. Alday-Sanz, (Ed.). *The shrimp book*. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 443–454.
- Reymond, H., Lagarde`re, J.P., 1990. Feeding rhythms and food of *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in salt water ponds: role of halophilic entomofauna. *Aquaculture* 81, 125–143.
- 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.

- Rosas, C., Martínez, E., Gaxiola, G., Díaz, E., Brito, R., Soto, L., 1998. Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of *Penaeus setiferus* juveniles. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 174, 67–75.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola G., LePriol Y., Pascual C., Rossignol J., Contreras F., Sánchez A., van Wormhoudt A., 2001a. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 259, 1–22.
- Rosas, C. Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Van Wormhoudt, A. 2001b. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea; Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research* 32, 1-20.
- Rosales-Hoz, M.T.L., 1980. Manual de Laboratorio de Oceanografía Química. México, D.F: U.N.A.M., Centro de Ciencias del Mar y Limnología, 170 p.
- 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*. *Limnol. Oceanogr.* 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.

- Roy, L.A., Allen, D.D., Whitis, G.N., 2012. Effect of feeding rate and pond primary productivity on growth of *Litopenaeus vannamei* reared in inland saline waters of west Alabama. North American Journal of Aquaculture 74, 20-26.
- SAGARPA/CONAPESCA, 2006. Disponible en la página de la Red Mundial: www.sagarpa.gob.mx/pesca/anuario2006.
- Sangha, R.S., Puello, A.C., Chávez-Sánchez, M.C., Jones, D.A., 2000. Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae fed a single dose of live algae and artificial diets with supplements. Aquac. Res. 31, 683–689.
- Saoud, I.P., Davis, D. A. and Rouse, D. B., 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. Aquaculture 217:373-383.
- Schlechtriem, C., Focken, U., Becker, K., 2004. Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. Aquat. Ecol. 38, 93–100.
- Seidman, E. R., Lawrence, A.L., 1986. Growth, feeding digestibility and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* growth at different dissolved oxygen levels. J. World Maric. Soc. 16, 333–346.
- Shiau, S.Y., 1997. Nutrient requirements of Penais shrimps. Aquaculture. 164, 77-93.
- Silva, E., Calazans, N., Soares, M., Soares R., Peixoto S., 2010. Effect of salinity on survival, growth, food consumption and haemolymph osmolality of the pink shrimp *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967). Aquaculture 306, 352–356.
- Smith DM, Burfod MA, Tabrett SJ, Irvin SJ, Ward L., 2002. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 207, 125-136.

- Soares, R., Peixoto, S., Bemvenuti, C., Wasielesky, W., D’Incao, F. N., Suita S., 2004. Composition and abundance of invertebrate benthic fauna in *Farfantepenaeus paulensis* culture pens (Patos Lagoon estuary, southern Brazil). *Aquaculture* 239,199-215.
- Soares R, Wasielesky W, Peixoto S, D’Incao F., 2005. Food consumption and gastric emptying of *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture* 250, 283-290.
- Sokal, R.R. and Rohlf F.J., 1981. *Biometry*. 2a. ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco. 859 pp.
- Solórzano, L., Sharp, J.H., 1980. Determination of total dissolved nitrogen in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 25, 751–754.
- Soto-Jiménez M. F., Páez-Osuna F. and Bojórquez-Leyva H., 2003. Nutrient cycling at the sediment-water interface and sediments at Chiricahueto marsh: a subtropical ecosystem associated with agricultural land uses. *Water Research* 37, 719-728.
- 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. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 63, 821–831.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, 310 pp.
- Tacon, A.G.J., 2002. Thematic review of feed and feed management practices in shrimp aquaculture. A Report for FAO, World Bank, WWF, and NACA. Kanehoe, HI, USA. 69.

- Tahon, J.P., Van Hoof, D., Vinckier, C., Witters, R., Deley, M. y Lontie, R., 1988. The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astracus leptodactilus*. *Biochemical Journal*, 249, 891-896.
- Tibbets, T., Wheelless, L., Martínez del Rio, C.M., 2008. Isotopic enrichment without change in diet: an ontogenetic shift in $\delta^{15}\text{N}$ during insect metamorphosis. *Funct. Ecol.* 22, 109–113.
- 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.
- Tidwell, J. H., S. D. Coyle, C. D. Webster, J. D. Sedlacek, P. A. Weston, W. L. Knight, S. J. Hill Jr., L. R. D’Abramo, W. H. Daniels, and M. J. Fuller., 1997. Relative prawn production and benthic macroinvertebrate densities in unfed, organically fertilized, and fed pond systems. *Aquaculture* 149, 227–242.
- Vanderklift, M.A., Ponsard, S., 2003. Sources of variation in consumer–diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136, 169–182.
- Van der Zanden, M.J., Shuter, B.J., Lester, N., Rasmussen, J.B., 1999. Patterns of food chain lengths in lakes: a stable isotope study. *Am. Nat.* 154, 406–416.
- Villalon, J.R., 1991. Practical Manual for Semi-intensive Commercial Production of Marine Shrimp. Texas A&M University Sea Grant College Program. TAMU-SG-91-501. College Station, Texas, USA.
- Vinod, K., Bhat, U.G., Neelakantan, B., 1996. Effect of salinity on food intake, growth and conversion efficiencies of juvenile *Penaeus merguensis* (Man). *Environ. Ecol.* 14 (1), 74–75.

- Waddington, K. & MacArthur L., 2008. Diet quality and muscle tissue location influence consumer–diet discrimination in captive-reared rock lobsters (*Panulirus cygnus*). *Marine Biology* 154, 569–576.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Sanchez, C., Poersch, L., 2003. The effect of temperature, salinity and nitrogen products on food consumption of pink shrimp *Farfantepenaeus*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46, 135–141.
- Wu, J.X., Lu, Q.P., 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture* 356-357, 147-152.
- Wyban, J., Walsh, W.A., Godin, D.M., 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp. *Aquaculture* 138, 267– 279.
- Xie B., Ding ZH, Wang XR (2004) Impact of the intensive shrimp farming on the water quality of the adjacent coastal creeks from Eastern China. *Marine Pollution Bulletin* 48, 543-553.
- 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.
- Zhang, S., Dong, S., Wang, F., 1999. The effects of salinity and food on carbon budget of *Penaeus chinensis*. *J. Fish. China* 23 (2), 144–149.
- Zar, J., 1984. *Biostatistical análisis*. Prentice-Hall. 2nd Ed. pp 718.
- Zendejas-Hernandez, J., 2004. Shrimp farming in Mexico: a description and production cost analysis. Presentation to World Aquaculture Society, March 1-4 20.

ANEXOS

Anexo 1. Composición isotópica en equilibrio, contenido de N y C y relación C:N en órganos y tejidos de camarón juvenil (peso inicial, 2.79 ± 0.26 g, $\delta^{15}\text{N} = 7.72 \pm 0.3\%$) *L. vannamei* cultivado por 28-días con alimento formulado (AF, Engorda Piasa 35%).

	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	N (mg g^{-1})	C (mg g^{-1})	C:N
Engorda Piasa 35%	5.80 ± 0.13	-24.0 ± 0.17	67.9 ± 11.5	494 ± 63	8.51 ± 0.3
Músculo (Musc.)	8.36 ± 0.39	-20.52 ± 0.69	136 ± 34.9	476 ± 115	4.08 ± 0.10
Hepatopáncreas (Hpt.)	5.71 ± 0.56	-23.03 ± 1.29	55.9 ± 7.30	523 ± 195	9.40 ± 3.30
Intestino (Int.)	6.52 ± 1.7	-21.47 ± 0.98	75.4 ± 25.1	378 ± 134	5.87 ± 1.13
Estómago (Est.)	5.38 ± 0.69	-22.03 ± 0.61	102 ± 33.1	482 ± 149	5.61 ± 0.71
Cefalotórax	5.90 ± 0.71	-21.97 ± 0.25	103 ± 37.2	437 ± 158	4.94 ± 0.39
Exoesqueleto (Exo.)	5.11 ± 1.42	-22.05 ± 0.49	96.2 ± 32.8	411 ± 105	5.13 ± 0.59

Anexo 2.

Bojórquez-Mascareño E.I. & Soto-Jiménez M.F., 2013. Effects of natural diet on growth on white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under experimental mesocosms emulating an intensive culture system. Journal of Aquaculture Research Development 4, 163.

Anexo 3.

Bojórquez-Mascareño E.I. & Soto-Jiménez M.F., 2015. Isotopic turnover rate and trophic fractionation of nitrogen in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) by experimental mesocosms: implications for the estimation of the relative contribution of diets. Journal of Aquaculture Research Development, 1-18. doi:10.1111/are.12757.

Effects of Natural Diet on Growth on White-Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Under Experimental Mesocosms Emulating an Intensive Culture System

Bojórquez-Mascareño EI¹ and Soto-Jiménez MF^{2*}

¹Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica Mazatlán, Mexico

²Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UAM-ICMyL-UNAM), México

Abstract

A study of nitrogen (N) balance and stable isotopes was conducted to assess the impact of natural diet on white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental mesocosms emulating an intensive culture system. We tested isonitrogenous diets by using commercial formulated feed (FF), natural food (NF) produced in the column water (FF+NF) and sediments (FF+NF+S) on earth ponds, and combinations 50:50 ratio based on N content. A followed study was conducted in three representative ponds at farm level. Specimens were tested for gain of weight, survival rate, specific growth rate (SGR) and parameters k and m and t_{50} in four trials, from post-larvae of twenty days (PL-20's) to larger juveniles. Specimens raised on FF+NF+S and FF+NF treatments showed weight, SGR's and survival significantly higher than shrimp raised on pure diets (FF and NF) and in ponds at the same time ($p < 0.05$). Exceptions were observed for the larger shrimp (trial 4) with no significant differences. Feed conversion ratios (FCR) in organisms reared on combined diets were lower than FF diet. Based on isotope mixing model the relative contribution of the natural productivity varied among combined diets and trials. N contributions to growth of PL-20's specimens were 18-74% for FF+NF and 25-62% for FF+NF+S treatments, decreasing with the shrimp size to $< 10\%$ in largest juveniles. Comparable results were observed in ponds. Extrapolating our results to a farm level, farmers may be able to reduce FCRs and improve profitability by enhancing the natural productivity during the first weeks of an intensive shrimp farm culture. Stable isotopes of N were useful to assess changes in the isotopic signals of shrimp fed with different diets and thus, to determine the N source for shrimp growth.

Keywords: Stables isotopes; Shrimp farm; Formulated food; Specific growth rate

Introduction

Numerous studies have reported that pond primary productivity can contribute to shrimp nutrition [1-7]. Benefits of natural diet includes sustainability of nutritional requirements during post larval and juvenile stages shortly after the stocking of the ponds, reduction of mortality in post-larvae and increases of growth rates in shrimp farm ponds. In fact, benefits of the natural productivity have been reported for different production systems of shrimp farm, including extensive [1], semi-intensive [7-9], intensive and hyper-intensive systems [10-12]. Contribution of the natural production varied among different culture systems (higher for extensive and lower for hyper-intensives) and shrimp species. Considering these reports an adequate management of the pond enhancing the natural production would elevate the availability of high quality food for shrimp, reducing operation costs and minimizing environmental impact [13-15], which is paramount for the success and sustainability of any commercial shrimp farming operation [16]. Although studies have reported the multiple benefits of natural food in shrimp farm ponds [1,17-20], is it difficult to quantify at the farm level exactly to what extent it does so. In addition, it is difficult to make comparison among a large number of research reports published because different strategies and methodologies were followed. Most of the studies have been conducted in clear water tank systems or in laboratory under controlled conditions, thus the contributions of natural foods has not been evaluated, making it difficult to extrapolate to culture systems. Stable isotopes analysis (SIA) has emerged as an important tool for addressing questions of changes in the isotopic composition of tissues after a change in diet. This application takes advantage of natural variations in stable isotopes ratios, which result from the chemical or biological processes that cause

isotopic discrimination or fractionation. The use of natural nitrogen stable isotope analysis (e.g., $\delta^{15}\text{N}$, which is the ratio of ^{15}N to ^{14}N relative to a reference standard) has been valuable to detect diet turnover rates, to examine the better assimilation of diets and to evaluate the relative contributions of isotopically distinct diets [1,21-24]. We conducted a multiple controlled experiments to evaluate the contribution of natural food production to shrimp growth in an intensive culture system. Our study was carried out in the shrimp farm facilities, the nearest to get the field conditions, but the advantage of the possibility to replicate. Our mesocosms diet-shift study was designed considering pond management practice and feeding scenarios in a typical intensive shrimp farm from the Gulf of California coastal zone. This culture type is based on 100% commercial formulated food, but with the potential to enhance the natural productivity in earth ponds. We run a series of growth trials with post-larvae and different size-classes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (juveniles from < 1 to 6-7 g) along with observations in shrimp farm ponds. Based on the analysis of factors regulating the growth

***Corresponding author:** Soto-Jiménez MF, Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Tel: +52 (669) 9852845 to 48; Fax: +52 (669) 9826133; E-mail: martin@ola.icmyl.unam.mx

Received August 13, 2012; **Accepted** November 21, 2012; **Published** November 30, 2012

Citation: Bojórquez-Mascareño EI, Soto-Jiménez MF (2013) Effects of Natural Diet on Growth on White-Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Under Experimental Mesocosms Emulating an Intensive Culture System. J Aquac Res Development 4:163 doi:[10.4172/2155-9546.1000163](https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000163)

Copyright: © 2013 Bojórquez-Mascareño EI, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

rates and performance of animals (e.g., survival, weight, feed conversion ratio, and growth rates), and by using SIA we determined the relative importance of natural diet and its contribution to the shrimp biomass.

Material and Methods

The mesocosm experiments were conducted in a commercial shrimp farm located on the Northwest coast of Mexico (Aquastrat S. A. de C. V. in Teacapán, Sinaloa; 22°40'08"N, 105°45'22"). Aquastrat is a shrimp farm with intensive cultivation system with two annual cycles (Summer-Autumn and Spring-Summer). The management practices in the farm (stocking densities, feeding strategies, water exchange rates, water quality parameters, etc.) were monitored during one cycle previous to run trials (Summer-Autumn 2008). First of all, the ponds are filled with seawater from Teacapán bay and immediately fertilized with inorganic fertilizer (urea containing 46% N and single super phosphate containing 16% P₂O₅) to improve the natural productivity of the pond. In order to "mature" the pond, commercial feed was added (FR at 100% of the initial biomass) one week before stocking. The stocking density in the farm is 60 PLs per m². Farmers typically follow a feeding table to calculate the feeding rates (FR) based on survival rate, expected feed conversion ratio (FCR), and predicted biomass over a given period. Each week FR is adjusted based on food consumption in feeding trays and biometric analysis. Large variations in FR occurred along culture cycle, mostly following a feeding pattern. During the first 4-5 weeks the post larvae are fed with formulate feed (crumble and starter with 40% of protein) in ratios from 100% (week 1), 30-40% (week 2-3) to 10% (week 4-5) of the biomass. During the following 45-50 days (week 7 to 14-15) the feed are dried pellets with 35% protein. The FR is 3-10% (geometric media of 6%) of the body weight. During the last 5-6 weeks of the cycle, shrimp are fed with FF with 30% proteins in rates of 5-7% of the body weight. Feed is supplied mostly by volley from a movement vehicle in three ratios per day: 25% in the morning and afternoon and 50% in the evening. Exchange water rates (EWR) in the ponds increased from 0% to 30% d⁻¹. At the beginning, the seawater pumping to the ponds was only to keep the levels lost by infiltration and evaporation (0-10% per day). After week 3 the EWR increased from 10-15% d⁻¹ to a maximum of 30% of week 6-8 onward. Besides, the availability of natural feed and the growth of shrimp at farm level were evaluated in three representative ponds of Aquastrat during two cycles (Summer-Autumn 2008 and Spring-Summer 2009). Different component of natural foods were identified in our study, including phytoplankton, zooplankton, zoobenthos, bioflocs, and detritus. Microscopic analysis of zooplankton, collected with a mesh from 300 to 500 microns, revealed the presence of a large variety of potential food

items for shrimp including copepods, amphipods, diatoms and larvae of bivalves, polychaetes and other crustaceans, and some detritus. Detritus collected by syphoning surface sediments revealed the presence of non-eaten particles of artificial feed, organic matter remains, microphytobenthos and meiofauna constituted by nematodes, polychaetes and Harpacticoid copepods. It was observed that two types of bioflocs were developed few days after starting the experiments; first a green algal-based floc attached to the tank wall (algal-floc) and then particulate matter aggregates (microbial-floc) associated to detritus. Experimental mesocosms and a followed study in shrimp farm ponds were conducted during the Spring-Summer 2009 cycle. Four trials represented different life stages of shrimp: postlarvae, smaller, medium and larger juveniles. In this study, we tested isonitrogenous (35-40% protein) diets by using natural food (NF) and commercial formulated feed (FF) under four treatments: 1) artificial feed (FF), 2) natural feed (NF), 3) combination 50:50 ratio based on the N content enhancing the natural food potentially produced in the water column (plankton+bioflocs, FF+NF), and 4) similar to 3 but with sediments enhancing the natural food potentially produced in earthen ponds (plankton+bioflocs+benthos, FF+NF+S). The experiments on trials 1-4 were conducted in 9 circular tanks (0.5 m² bottom surface area, 400 L water volume) set up adjacent to the shrimp farm. White shrimp post-larvae and juveniles were directly obtained from three selected ponds from this shrimp farm and acclimated for one week before each trial. During this time the organisms were fed with commercial feed, the same as the ones in ponds. After acclimation, specimens were separated and randomly distributed into tanks. Three tanks were randomly selected for each one of the four treatments, including natural feed (NF), formulated feed (FF) and combination with natural feed of both 50:50 ratio based on the N content without (NF+FF) and with (NF+FF+S) sediments. Shrimp farm ponds and treatment tanks were supplied with seawater from Bay Teacapán at ambient temperature and with natural daylight. Sediments were collected directly from earth ponds and added to the tanks without treatment to warranty that living benthic organisms were also introduced. Tanks were covered with a shade net to prevent excessive heating. Air stones connected to a regenerative blower were placed to ensure proper aeration and mixing of the water. For the first trial, a total of 100 postlarvae with a total length of 12.0-18.0 mm and an average weight of 51.7 ± 7 mg were stocked in each experimental tank. The FF used was crumble (<0.5 mm) with 40% protein (wet weight, Table 1). FR was 30-40% of biomass and WER of 0% d⁻¹, only with reposition of evaporated water (<3% d⁻¹). In the second trial, 30 *L. vannamei* small juveniles (initial weight, 0.251 ± 0.105 g) were stocked into each tank to test the four treatments for 4

Diet component	δ ¹⁵ N	δ ¹³ C	mg N g ⁻¹	mg C g ⁻¹	C:N	Trial
¹ Natural feed						
Phytoplankton	6.88 ± 0.09	-21.59 ± 0.03	39.8 ± 0.74	214 ± 1.1	6.27 ± 0.2	1
Zooplankton	11.2 ± 0.11	-20.62 ± 0.73	61.6 ± 0.4	245 ± 2.7	4.65 ± 0.2	1-3
Algal-flocs	6.70 ± 0.04	-22.59 ± 0.10	42.3 ± 0.53	207.1 ± 0.54	5.7 ± 0.06	1-4
Micro-flocs	4.81 ± 0.50	-22.64 ± 0.66	75.4 ± 27.0	271 ± 48.4	7.65 ± 1.9	1-4
² Detritus	4.83 ± 0.57	-25.08 ± 0.90	2.03 ± 0.98	21.6 ± 12.9	11.76 ± 2.2	1-3
³ Formulated feeds						
Crumble 40%	6.45 ± 0.20	-22.91 ± 0.15	80.5 ± 0.03	521 ± 50	7.6 ± 0.22	1
Micropellets 40%	4.82 ± 0.26	-23.95 ± 0.24	64.7 ± 5.98	459 ± 10	8.32 ± 0.5	2
Pellet 35%	5.80 ± 0.13	-23.97 ± 0.17	67.9 ± 11.5	494 ± 63	8.51 ± 0.3	3, 4

¹Natural diet components (% dry weight): Protein content: 35-40%, fats 6-7%, Crude fiber: 8.6-9%, Nitrogen-Free Extract (NFE) 30-46%. ²Detritus: Protein content: 13-17%, fats 3-4%, crude fiber: 7.5-9.2%, and NFE (including ash): 60-70%. ³Different formulated feed used in intensive shrimp culture: Protein content: 40-45% (indicated), fats 8-9%, crude fiber: 3.5-4.5%, and NFE: 42-48%. Facts as reported on labels.

Table 1: Contents and isotopic composition of C and N, and C:N of each diet component For *L. vannamei* reared on four different treatments from PL to larger juveniles (trials 1 to 4).

weeks. FR was 10% and the WER of 15-20% d⁻¹. We used commercial feed starter pelletized (micropellets 0.5-0.1 mm) with 40% protein. Crumbles and starter are small-particle-size feeds recommended from stocking to ~1 g and then from >1 g (0-15 days) to 3-4 g average body weight, respectively. According to the manufacturer, they are highly digestible and contain all nutrients required by shrimp on the early developmental stages. For the third and fourth trials, the protocol was a repetition of trial 2, but using 30 and 24 specimens with an initial weight of 2.79 ± 0.26 g and 6.21 ± 0.72 g, respectively. Organisms were fed with pellets (1.5-2.5 mm) with 35% protein (Table 1). Pellets are used during the stage of juvenile exponential growth (3-8 g, day 30-60 d onward). The FR was 10% and the WER of 15-20% d⁻¹ for trial 3, and 7% and 30%, respectively, for trial 4. Rations were divided in three portions (25% in the morning and afternoon and 50% in the evening) and supplied in such a way that the food was clearly visible by using feeding trays. During the experiment, FR was progressively adjusted on a weekly basis in relation to the biomass observed, similarly to the procedure in the farm ponds. The amount of feed supplied to each tank was recorded. Commercial shrimp feeds (FF) by Vimifos were used in our experiments (Table 1). Proximal composition (% dry weight) of the formulated feed varied from 42-45% (crumble and starter micropellets) and 38-40% (1.5-2.5 mm pellets) protein, 8-9% of lipids, 3.5-4.5% crude fiber, and 42-48% as nitrogen-free extract (NFE). Component of natural foods were collected directly from ponds and treatment tanks. Proximal composition (% dry weight) varies among different types of natural feed with contents from 35-40% protein, 6-7% lipids, 8.6-9% crude fiber, and 30-46% NFE. Analysis of etritus revealed low protein content (13-17%) and fats (3-4%), but high content of crude fiber (7.5-9.2%) and NFE content (60-70%, including ash) (Table 1). Sludge accumulated in the tank as a result of deposition of waste products from feeding and other detritus was removed daily via a central drain and wall tanks in treatment FF were manually cleaned using a mop to prevent the accumulation of organic rich bio films. In order to minimize the risk of bacterial and viral infection, all the material was carefully disinfected by using chloride solution, which was rinsed with abundant water. Molting and survival were observed daily, and molts and dead specimens were removed from each tank.

Data and sample collection

At the beginning of the experiments, 10 individuals were randomly collected for analysis of the biometric characteristics, health condition and for analysis of C and N stable isotopes. At the end of the experiment shrimp were harvested, counted and specimens from the same treatment were analyzed for biometric characteristics. The weight (W) was measured in a semi-analytical scale (±0.1 mg) and total length (TL) was measured stereomicroscopically using a micrometer to 0.01 mm and using a Vernier scale for juveniles. Shrimp specimens were dissected to separate the muscle. In total, tissues from 9 individuals from each treatment were selected for isotopes analysis (3 per replicated tank). At the end the experiment only the largest specimens were collected for SIA because we assumed they were the best acclimatized during the experiment. Due the natural variability in the isotopic signatures in natural diet components could vary among batches, we prepared a homogeneous mixture of samples collected for several days. For the formulated diet treatments we used three different commercial aquaculture feeds by Vimifos, which are applied in the shrimp farm during different stages of culture (Table 1), including (PL20's and smaller juvenile fed with crumble and starter, 40% protein respectively and larger juvenile fed with shrimp food, 35% protein). No other food was available to the shrimp. All samples and diet components

were frozen and freeze-dried for 72 hours. The dried samples were ground, homogenized, and stored in sealed polypropylene containers until analysis. Dried, ground and homogenized samples were placed in a glass chamber vaporized with concentrated HCl (4 h) in order to remove carbonates, dried at 60°C (4 h) and stored at 4°C. Lipids were not removed from our samples prior to analysis. Aliquots of 1.0 ± 0.1 mg were weighed into 5×3.5 mm tin capsules. Encapsulated samples were analyzed at the Department of Plant Science of The University of California at Davis, CA, USA, in a PDZ Europa Scientific Roboprep elemental analyzer coupled to a PDZ Europa Hydra 20/20 stable isotope ratio mass spectrometer (IRMS). Samples were analyzed for carbon and nitrogen contents and isotopic composition. Analytical precision (standard deviation, n=5) was 0.2‰ for nitrogen and carbon, as estimated from standards (peach leaves NIST-1547 and bovine liver NIST-1577b, from National Institute of Standard Technology) analyzed every 12 samples. The isotopic composition (δ¹⁵N) in per mil (‰) was expressed as the relative difference between isotopic ratios in the sample and in conventional standards (atmospheric N₂ for nitrogen):

$$\delta^{15}\text{N} = \left[\left(\frac{\text{R sample}}{\text{R standard}} \right) - 1 \right] 1000, \text{ where R is } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$$

Critical parameters, including dissolved oxygen, temperature, pH and salinity were daily monitored 3 times per day with a YSI 5775 sonde and recorded throughout the experimental periods. Water samples were collected from each tank once a week and at the end of the experiments for nutrient analysis. Suspended particulate matter (SPM) was collected by filtering 200-1000 ml of the water samples through a pre-combusted (500°C, 4 hr) glass fiber filter (GF/F) with a low-pressure vacuum pump. The particulates on the filters (>0.45 μm) were air-dried at 55-60°C. Total SPM was determined by comparing filter weights before and after filtration of a known amount of water. Duplicate water samples were filtered and frozen immediately at -20°C. Chlorophyll a (Chl a) was extracted from frozen SPM with the addition of acetone, mechanical grinding, centrifuging and then supernatant was analyzed in a spectrophotometer [25]. Analysis of total ammonia (TAN) was analyzed by Phenol hypochlorite method [26], nitrate reduced to nitrite by passing the sample through a copperized cadmium column and then the reduced nitrate and original nitrite were determined by diazotizing with sulfanilamide followed by coupling with N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride [26]. Total dissolved N (TDN) was analyzed by converting all N into nitrate by alkaline persulfate oxidation, and particulated organic N (PON) was analyzed by elemental analyzer coupled to IRMS. Total N was obtained as the sum of TDN and PON. Calculations of the growth indexes and survival rates of the shrimps in the multiple treatments and were done. By using the biometric and counting data. Biomass was estimated based on the average weight and total number of specimens. The mean specific growth rate ($[\text{SGR} = (\text{Ln } W_f - \text{Ln } W_i) / (t) \times 100]$) [18] was calculated for each experimental group. W_i and W_f were the averaged weights for the shrimps at the beginning and at the completion of trial time (t), respectively. Besides, the ratios of food conversion ratio ($\text{FCR} = \text{Total feed consumed (kg)} / \text{total yield (kg)}$) were also calculated [18,27]. An exponential model [23,28] was used to estimate the proportions of changes in tissue isotopic composition over time, which are due to metabolic turnover. In the model that integrates growth and isotope shifts over time, it is assumed that any isotopic change in shrimp tissues following a change in diet is due to growth and/or metabolic turnover. This model provides an estimate of the elemental N turnover rate in shrimp and its effect on isotopic change:

$$\delta^{15}\text{N}_t = \delta^{15}\text{N}_f + (\delta^{15}\text{N}_i - \delta^{15}\text{N}_f) e^{-(k+m)t}$$

where $\delta^{15}\text{N}_t$ is the shrimp tissue isotope value at time t, $\delta^{15}\text{N}_i$ is the initial

and ponds, except in NF treatments, where reached a maximum of 11 d. The reduced growth of specimens in this treatment explained the elevated value of t50. FCR for specimens reared on FF+NF and FF+NF+S showed a minimum range of 0.6-1.4, while FF treatment reached maximum values from 1.3 to 1.7. Growth parameters measured in specimens reared on ponds were comparable to FF treatment. In trial 4 (Table 6), the larger specimens reared on NF did not showed growth and cannibalism was present, thus results were discarded. For the rest of treatments, the mean final weight (17.19-18.1 g), SGR (2.7-3.1% d⁻¹), m (0.314-0.340 d⁻¹) and k (0.029-0.031 d⁻¹) were not different among treatments and in ponds. Values for t50 ranged from 1.9 to 2 d among treatments and ponds. Similar FCR ranges (from 0.7-1.4) were observed for specimens reared on FF+NF and FF+NF+S, lower to those in FF treatment (1.3-1.7) and all lower to specimens in ponds (1.6-2.8).

Results of the isotopic composition in specimens reared on different treatment and trials are shown in tables 3-6. $\delta^{15}\text{N}$ values measured in the tested shrimp averaged from 8.19 to 12.0‰, 7.43 to 10.13‰, and 8.01 to 8.36‰ and from 7.61 to 8.23‰ on trials 1 to 4, respectively. Significantly, differences were observed in $\delta^{15}\text{N}$ values in specimens at the end of experiments respect to those found at the beginning and with their diets ($p < 0.05$). As expected, $\delta^{15}\text{N}$ values in specimens varied according to the signals in the different diets and those specimens reared on unique and constant diet were gradually reaching the isotopic equilibrium. This occurred in weeks 1-2 for post-larvae and 3-4 weeks in juveniles after the dietary switch. In the case of larger juveniles reared on NF diet, with low rates of growth and turnover, the equilibrium was not reached at the end of the experiments (7 weeks). Thus, NF treatment at trial 4 was discarded and non estimations of trophic shift were done. The trophic enrichment in $\delta^{15}\text{N}$ between shrimp and diets varied 2.03 to 2.49 and 1.90 to 2.56‰ for NF and FF, respectively. Non-differences in the $\Delta^{15}\text{N}$ were observed for specimens reared on natural diet compared to specimens reared with formulated diet, and although differences between $\delta^{15}\text{N}$ mean in shrimp and its diet was higher for postlarvae than for juveniles, the mean trophic shift was not significantly different ($p > 0.05$). Thus, we estimated a mean $\Delta^{15}\text{N}$ value of $+2.31 \pm 0.23\text{‰}$. Isotopes data measured in specimens reared on combined diets were not considered to account the discrimination factor, but they were used to estimate the relative contribution in the muscle.

The availability of the different components of natural foods identified (e.g., phytoplankton, zooplankton, zoobenthos, bioflocs, and detritus) varied among trials and during experiments. Similar variations in the components of natural productivity were observed along the shrimp farm cycle. Assessing nutrient contribution of natural productivity to growth shrimp using stable isotopes is difficult due to the variations in the relative biomass and in the isotopic composition values of NF. An assumed prerequisite to resolve the isotopic mixing models is that each potential source has distinct values of $\delta^{15}\text{N}$. In our study most of the NF components had contrasting $\delta^{15}\text{N}$ values, but two of the most abundant showed very similar signals (e.g., detritus and microflocs) (Table 1). In this case, with non-significant differences between micro-flocs and detritus, resolving mixing models is limited due to the overlapping isotopic signals. In order to resolve this conflict we considered both dietary sources as one, and denominated it as benthos. Besides, the combination of phytoplankton, zooplankton and algae-floc in the water column was denominated plankton.

Based on N isotope mass balance of the available natural components in NF tanks and final $\delta^{15}\text{N}$ signals in shrimp, we estimated the contribution of the main components of the natural food diet in each trial. Results revealed that natural food was constituted by zooplankton

(70%) and algae-floc and phytoplankton (30%) for trial 1 (global average NF=9.8‰), by plankton (26%) and benthos (74%) for trial 2 (NF=8.13‰), and accounting 15 and 85% for trial 3 (NF=7.54‰), respectively. In trial 4, practically 100% of the natural diet was composed by benthos (NF=6.81‰). The influence of the natural diet on a body weight of PLs and juveniles was also evaluated by using an isotope-mixing model (Table 3). For PL20's at trial 1, the N contributions to growth of NF in specimens reared on FF+NF and FF+NF+S treatments averaged from 18 to 74% and 25 to 62%, respectively. In trials 2 to 4, N contributions to growth ranged from 8-22% and 27-67% for small juveniles, 5-29% and 16-38% for medium juveniles and <10% and 9-16% for larger juveniles, respectively. In ponds, the NF contributions to growth shrimp varied also with the size of the specimens, from 52-78% for PL20's, 6-32% in small and medium juveniles, to negligible for larger juveniles. The wide variability in the isotopic values of specimens reared on the different diets at the end of the experiment resulted in a wide range of contribution percentages. However, significant differences ($P < 0.001$) were detected in the N contribution in function of size (postlarvae > small and medium juveniles > larger juveniles) and treatment (NF+FF+S > NF+FF). The accumulated biomass gains (estimated as the averaged weight x survival percentage) observed in each treatment compared to the pond specimens of the same size ranges, was accounted in 4-26% for FF, 13-26% for FF+NF and 19-31% for FF+NF+S treatments.

Discussions

Because the variability in shrimp growth is influenced by a range of biotic and abiotic factors [31], in this study factors such as temperature, salinity, oxygen concentration, and pH were similar among treatments and ponds. However, the concentration of TN and their chemical forms varied in trials and along the culture cycle, related to the size of the organisms and feeding rates.

At the end of the experiments, survival rates and growth (e.g., final weight, weight gain and SGR) of the shrimp reared on combined diet treatments were comparable (trial 3 and 4) or even better (trials 1 and 2) than those reared on pure diet. The FCR values were lower in combined diet than in FF treatments. The growth's parameters and FCR measured over the same periods in the farm ponds were comparable to those observed in the experimental mesocosms. Particularly, the NF+FF+S treatment. However, the survival rates in ponds (70-85%) were lower than those in experiments (>90%), thus the biomass performance was higher on experimental trials than ponds. Better environmental conditions in the trials could explain a higher performance on trials than ponds.

The rapid growth of PL and small juveniles (fed on pure and combined diets) allows them to achieve isotopic equilibrium ($t_{50} < 5$ d) within the experimental periods (11 to 35 d). The isotopic fractionation between equilibrated animal tissue and diet ranged from 1.9 to 2.56‰, without distinction among trials (sizes) and treatments (pure diets). Previous experiments have demonstrated that 5 to 15 d is the time period to reach isotopic equilibriums between *L.vannamei* and their constant diets and $\Delta^{15}\text{N}$ values in the same range [23]. However, these authors found differences between diets related to the protein content (0.8-3.6‰ and 1.1-5.0‰ for 46 and 23% crude protein diets, respectively) and the sizes (0.8-5.0‰ in postlarval shrimp and 1.3-7.8‰ in juvenile shrimp) concluding that discrimination factors are influenced by shrimp's age, dietary protein level and type of ingredients used in the diets. In this study, we considered that both FF and NF diets (roughly isonitrogenous) showed comparable nutritional quality (e.g.,

C:N of 4.65-7.65 and 7.6-8.51, respectively) resulting in comparable $\Delta^{15}\text{N}$ values [32,33].

Based on the results from the four growth trials, we accounted the contributions of the natural productivity regulating growth rates and performance of the animals, which varied among trials and culture time, decreasing with size of shrimp. Analysis of postlarval and small juvenile muscle tissue reared on combined diets and ponds indicated a major contribution of natural productivity the PL20's growth (accounting over 50%), and then for small and medium juveniles (accounting 15-31% and 16% for, respectively). NF contribution for larger specimens (trial 4) was significantly lower (<10 to 13%), while in the ponds it was negligible. Natural productivity did not appear to be a significant contributor to the growth and nutrition of larger juveniles; however, not enough NF throughout the experimental days, both tanks and ponds, explains its low contribution. Even cannibalistic behavior of shrimps was observed in the NF treatment in trial 4, thus results were discarded. Most studies of the contribution of NF to shrimp growth using natural abundances of stable isotopes have been expressed in terms of C whiting semi-intensively reared pondraised shrimp [1,34,35]. These studies have found that between 44 and 86% of the shrimp growth can be due to pond natural productivity. Few studies have reported NF contributions in terms of N emulating intensive growth-out ponds. One of the most representative was carried out [24] in experimental mesocosms with medium juveniles *L. vannamei* (50 m², initial weight of 3.5 g) in zero water exchange outdoor. Authors revealed that the NF contributions were up to the 28-31%. Following similar methodological strategies, Bufford et al. [36] estimated a natural contribution (by bioflocs) to the nutrition of *L. vannamei* from 18% to 29% for 1 to 9 g animals. Ranges of contribution are comparable with our results on trial 3 (initial weight of 2.79 g), where the contributions account a 5-29%(10) and 16-38%(18) in NF+FF and NF+FF+S treatments.

Components of the natural productivity

In a typical earth pond shrimp farm, the natural foods are present in different forms [37-42], which were evidenced in our observations. *L. vannamei* are capable of selecting specific prey items from the mixture of natural components available in the water column and sediments, as it occurs in natural systems for Penaeid shrimp [43]. In fact, microscopical analysis of shrimp gut content on culture earth ponds have revealed the presence of a large variety of food items in addition to the commercial feed, including detritus, nematodes, copepods, amphipods, polychaetes, bivalves, and diatoms [1,7-9,38-40].

Based on our observations, the availability of the NF components (e.g., plankton, benthic organisms, flocs, and detritus) changed among trials and ponds along the cycle, in response to the management practices (e.g., FR, WER), environmental conditions and nutrient concentrations [31,41,42]. For a species that feeds opportunistically or exhibits rapid ontogenetic changes, such as *L. vannamei*, the manipulations occurring in the diet during the culture time, may result in a large isotopic variance among individuals, partially or completely depending on natural diet. In fact, changes in the isotopic data were detected, being higher in specimens using natural components than those reared on FF (unique and constant diet).

Isotopic data in shrimp muscle were used to reconstruct the natural diet of *L. vannamei* in treatments with combined diets in each trial and ponds integrating the changes in the food sources along the culture cycle. Based on the results, *L. vannamei* postlarvae grew by feeding on zooplankton, which obtained their nutrition from phytoplankton-derived organic matter. In the presence of sediment and detritus

associated, postlarvae probably consumed micro-flocs (microbial aggregates) found in detritus. However, the relative importance of benthonic nutrition to postlarva was lower than planktonic nutrition. Postlarvae were enriched by 2.2 and 5.1‰ in $\delta^{15}\text{N}$ relative to the zooplankton and phytoplankton, respectively. This isotopic fractionation reflects a two level trophic food-chain: phytoplankton < zooplankton < shrimp postlarvae.

The contribution of the zooplankton diet declined with the shrimp size while the dependence for benthic nutrition (detritus-based food-web) increased. For small juveniles, the isotopic signal of the specimens reared on NF diet indicates that zooplankton and benthonic foods accounted 25 and 75%, respectively, while for medium and larger juveniles it was only benthonic. The detritus-based food-web was constituted by micro-flocs and benthic fauna (e.g., meiofauna and polychaetes). Isotopic data revealed that shrimp did not utilize the detritus directly, but they selectively picked preys from the detritus mixture as reported in natural ecosystems [43]. Although detritus may provide specific nutrients that promote higher survival, the low nutritional quality (e.g., high C:N ratio) and low digestibility limits its contribution to the tissue growth. The $\delta^{15}\text{N}$ values in the NF treatment imply that there are two trophic links between the detritus (4.81‰) and the shrimp (10.13‰).

The dependence of NF gradually decreased in juveniles reared on combined diet treatments and in ponds, while the dependence of FF accounted practically 100% for larger juveniles. The voracity of *L. vannamei* and the reduced availability of natural productivity explain the drastic reduction in its importance as a contributor. Lack of benthic fauna (few meiofaunal organisms and absence of polychaetes) explains the null contribution of NF diet to larger juveniles reared on NF treatment and in ponds. Even, serious implications in the growth and survival rates of specimens were observed in trial 4 when NF components were scarce.

Despite the reduction of the 50% of the FF in the combined diet treatment regarding the FR applied at the farm level, most trials showed enough nutrients to sustain the phytoplankton and detritus-based food-webs in the water column and sediments, respectively. The degradation of the excess of FF supplied the necessary nutrients to promote the natural productivity resulting in non-differences in the growth respect to the 100% FF diet treatment and in ponds.

Implications

About 16.7% (by dry weight) of the total FF applied to the pond is converted into shrimp biomass [27], but most of the non-ingested and no-assimilated particles of the FF pellets are accumulated in the sediments and disintegrated in few hours and one part of deposited particles are eventually decomposed in few days. In Aquastrat, we estimated that only the 14-16% of the FF was recovered in biomass in both cycles, most of FF is eliminated as particulate organic matter and dissolved metabolites via effluents and a small fraction remains in sediments. Excessive amounts of FF-derived organic matter increase during the culture time and result in loss of water and sediment quality affecting the availability and quality of natural food. Besides the accumulation of feed waste results in hypoxia or anoxia events and in black soil formation, which affects the cultured organism's life but also in terms of commercial qualities (e.g., bad appearance by black gills) and then the market price? The only solution applied in the shrimp farm with intensive culture system is increasing the water exchange, for example, in Aquastrat the water pond is renewed close to 200 times per cycle (~30 m³ of seawater per kilogram of shrimp).

However, this common practice in farms with intensive culture systems increases the operation cost (excess of FF, pumping and mechanical aeration energy) and the environmental impact to the adjacent coastal ecosystems receiving effluents (organic matter, nutrients and many other deleterious substances).

According to our results, an adequate combination of formulated feed (50% of the actual FR) and promotion of the natural productivity enhance the growth and development of PLs to smaller juveniles. Based on a weight and growth rates evaluation and SIA, the natural diet is a good complement to sustain the growth of post-larvae and juveniles at least during the first 5 weeks of the culture. After week 5, maintaining the proper grow of juveniles *L. vannamei* is achieved with exclusive use of formulated feed following better management techniques, for example using control systems such feeding trays [15].

Because the results were based on experimental mesocosms under the conditions of an intensive culture and we included a followed study in representative earth ponds, it is possible to extrapolate them to a farm level. This suggests that during the first 2-3 weeks of shrimp farm intensive culture, in the postlarvae stage, the significant amounts of artificial feed added to the ponds are converted in natural production. Promoting the availability of feed sources other than commercial feeds can markedly improve the growth and production of cultured shrimp, while reducing FCRs and consequently the use of commercial food. If natural food items are abundant in the culture water following an adequate fertilization and management of the water quality and sediments, farmers may be able to reduce feed inputs and allow shrimp to rely slightly more on pond primary productivity to reduce FCRs and improve profitability.

Aquaculture in Mexico and around the world should be used to maximize the natural resources in ponds. Particularly, an adequate FF management in the shrimp farms results in economic benefits, less affectation of production systems and minimizes the pollution in receiving natural ecosystems. Following this strategy, a significant reduction of formulated feed can be viable in intensive culture systems by promoting natural food production in ponds, with a consequent reduction of the operation costs and the environmental impact.

Acknowledgements

The authors would like to thank the directives and personnel of Granja Aaquatrat for their support for this research, also thanks to H. Bojórquez-Leyva, S. Rendón-Rodríguez and A. Nuñez-Pastén for their invaluable assistance in the field and laboratory work, and V. Montes and Y. Montañón-Ley for their support in the preparation of this manuscript. Financial support was provided by the grant SEP-CONACYT 60215.

References

1. Anderson RK, Parker PL, Lawrence AA (1987) A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tracer study of the utilization of presented feed by a commercially important shrimp *Penaeus vannamei* in a pond grow out system. J World Aquaculture Society 18: 148-155.
2. Chamberlain GW (1995) Frontiers in Shrimp Nutrition Research. In: Browdy CL, Hopkins JS (Eds) Swimming Through Troubled Water. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 108-117.
3. Jory DE (1995) Management of natural productivity in marine shrimp semi intensive ponds. Aquaculture Magazine 21: 90-100.
4. Martínez-Córdova LR, Porchas-Cornejo MA, Villarreal-Coleman H, Calderon-Perez JA, Naranjo-Paramo J (1998) Evaluation of three feeding strategies on the culture of white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931 in low water exchange ponds. Aquaculture Engineering 1: 21-28.
5. Sangha RS, Puello-Cruz A, Chávez-Sánchez MC, Jones DA (2000) Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae fed a single dose of live algae and artificial diets with supplements. Aquaculture Research 31: 683-689.
6. Lavens P, Sorgeloos P (2000) Experiences on importance of diet for shrimp post larval quality. Aquaculture 191: 169-176.
7. Soares R, Peixoto S, Wasielesky W, D'Incao F (2005) Feeding rhythms and diet of *Farfantepenaeus paulensis* under pen culture in Patos Lagoon estuary, Brazil. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 322: 167-176.
8. Martínez-Córdova LR, Campaña-Torres A, Porchas-Cornejo MA (2003) Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. Aquaculture Nutrition 9:155-160.
9. Soares R, Peixoto S, Bemvenuti C, Wasielesky W, D'Incao F, et al. (2004) Composition and abundance of invertebrate benthic fauna in *Farfantepenaeus paulensis* culture pens (Patos Lagoon estuary, southern Brazil). Aquaculture 239: 199-215.
10. Decamp O, Conquest L, Forster I, Tacon AGJ (2002) The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-exchange aquaculture production systems: role of Eukaryotic microorganisms. In: Lee CS, O'Bryen P (Eds) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 79-86.
11. Browdy CL, Moss SM (2005) Shrimp Culture In Urban, Superintensive Closed Systems. In: Costa Pierce BA (Eds) Urban Aquaculture. Blackwell Science, Oxford UK, 173-186.
12. Wasielesky W, Atwood H, Stokes A, Browdy CL (2006) Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258: 396-403.
13. Jory DE (2001) Feed management practices for a healthy pond environment. In: Browdy CL, Jory, DE (Eds) The new wave. Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 118-143.
14. Smith DM, Burford MA, Tabrett SJ, Irvin SJ, Ward L (2002) The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 207: 125-136.
15. Casillas-Hernández R, Nolasco-Soria H, García-Galano T, Carrillo-Farnes O, Páez-Osuna F (2007) Water quality, chemical fluxes and production in semi-intensive Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture ponds utilizing two different feeding strategies. Aquaculture Engineering 36: 105-114.
16. Quintero HE, Roy LA (2010) Practical feed management in semi-intensive systems for shrimp culture. In: Alday-Sanz V (Eds) The shrimp book. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 443-454.
17. Moss SM, Pruder GD (1995) Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. J Exper Mar Biol Ecol 187: 175-191.
18. Tacon AGJ, Cody JJ, Conquest LD, Divakaran S, Forster IP, et al. (2002) Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition 8: 121-137.
19. Roy LA, Allen DD, Whittis GN (2012) Effect of feeding rate and pond primary productivity on growth of *Litopenaeus vannamei* reared in inland saline waters of west Alabama. North American Journal of Aquaculture 74: 20-26.
20. Wu JX, Lu QP (2012) Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. Aquaculture 356-357: 147-152.
21. Preston NP, Smith DM, Kellaway DM, Bunn SE (1996) The use of enriched ^{15}N as an indicator of the assimilation of individual protein sources from compound diets for juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture 147: 249-259.
22. Burford MA, Preston NP, Glibert M, Dennison WC (2002) Tracing the fate of ^{15}N -enriched feed in an intensive shrimp system. Aquaculture 206: 199-216.
23. Gamboa-Delgado J, Le Vay L (2009) Natural 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.
24. Epp MA, Ziemann DA, Schell DM (2002) Carbon and Nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. Aquaculture Research 33: 839-846.

25. Grasshoff K, Ehrhardt K, Kremling K (1983) Methods of seawater analysis. Verlag Chemie, Weinheim, New York, USA.
26. Solorzano L, Sharp JH (1980) Determination of total dissolved nitrogen in natural waters. *Limnology and Oceanography* 25: 751-754.
27. Hasan BMA, Guha B, Datta S (2012) Optimization of Feeding Efficiency in Semi-Intensive Farming System for Sustainable and Cost Effective Production of *Penaeus monodon Fabricius*. *J Aquacult Res Dev* 3: 149.
28. Hesslein RH, Hallard KA, 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 ^{34}S , ^{13}C , and ^{15}N . *Can J Fish Aquat Sci* 50: 2071-2076.
29. Phillips DL, Gregg JW (2001) Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* 127: 171-179.
30. Zar J (1984) Biostatistical análisis. Prentice-Hall. (2ndedn), New Jersey. 718.
31. Tacon AGJ (2002) Thematic review of feed and feed management practices in shrimp aquaculture. A Report for FAO, World Bank, WWF, and NACA. Aquatic Farms Ltd., Kanehoe, HI.
32. Le Vay L, Gamboa-Delgado J (2011) Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture* 29: 95-103.
33. Martínez del Rio C, Wolf BO (2005) Mass-balance models for animal isotopic ecology. In: Starck JM, Wang T (Eds) *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates*, Science Publishers, Enfield, NH, pp: 141-174 .
34. Nunes AJP, Gesteira TC, Goddard S (1997) Food consumption and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149: 121-136.
35. Parker PL, Anderson RK, Lawrence A (1989) A d^{13}C and d^{15}N tracer study of nutrition in Aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond grow-out system. In: Rundel PW, Ehleringer JR, Nagy KA (Eds) *Stable Isotopes in Ecological Research*. Springer-Verlag, New York, 288-303.
36. Burford MA, Thompson PJ, McIntosh RB, Bauman RH, Pearson DC (2004) The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a highintensity, zero-exchange system. *Aquaculture* 232: 525-537.
37. Reymond H, Lagardère JP (1990) Feeding rhythms and food of *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in salt-water ponds: role of halophilic entomofauna. *Aquaculture* 81:125-143.
38. Newell RIE, Marshall N, Sasekumar A, Chong VC (1995) Relative importance of benthic microalgae, phytoplankton, and mangroves as sources of nutrition for penaeid prawns and other coastal invertebrates from Malaysia. *Marine Biology* 123: 595-606.
39. Tidwell JH, Coyle SD, Webster CD, Sedlacek JD, Weston PA, et al. (1997) Relative prawn production and benthic macroinvertebrate densities in unfed, organically fertilized, and fed pond systems. *Aquaculture* 149: 227-242.
40. Focken U, Groth A, Coloso R, Becker K (1998) Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon Fabricius* in semi-intensive pond system in the Phillipines. *Aquaculture* 164: 105-116.
41. Allan GL, Maguire GB (1992) Effects of stocking density on production of *Penaeus monodon Fabricius* in model farming ponds. *Aquaculture* 107: 49-66.
42. Allan GF, Moriarty DJW, Maguire GB (1995) Effects of pond preparation and feeding rate on production of *Penaeus monodon Fabricius*, water quality, bacteria, and benthos in model farming ponds. *Aquaculture* 130: 329-349.
43. Dittel I, Epifanio CE, Cifuentes LA, Kirchman DL (1997) Carbon and nitrogen sources for shrimp postlarvae fed natural diets from a tropical mangrove system. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 45: 629-637.

Citation: Bojórquez-Mascareño EI, Soto-Jiménez MF (2013) Effects of Natural Diet on Growth on White-Leg Shrimp *Litopenaeus Vannamei* Under Experimental Mesocosms Emulating an Intensive Culture System. J Aquac Res Development 4:163 doi:[10.4172/2155-9546.1000163](https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000163)

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

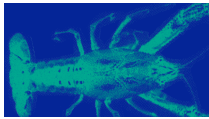
Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 250 Open Access Journals
- 20,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submission>



Isotopic turnover rate and trophic fractionation of nitrogen in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) by experimental mesocosms: implications for the estimation of the relative contribution of diets

Elsa I Bójorquez-Mascareño¹ & Martín F Soto-Jiménez²

¹Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, México

²Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, México

Correspondence: M F Soto-Jiménez, Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, Sinaloa, México. E-mail: martin@ola.icmyl.unam.mx

Abstract

The effect of size and diet on the relative contribution of growth and metabolic turnover to changes in isotopic composition of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* was examined by mesocosm experiments. Through testing different diet types (natural and commercial formulated foods and combinations) and feeding scenarios (satiation, limited-fed and starvation), we determined the growth (k) and metabolic (m) turnover, rate of isotopic turnover (t_{50}) and isotopic fractionation of N ($\Delta^{15}\text{N}$) during different growth stages [from postlarvae (PL20's) to large juveniles], under controlled conditions. Results revealed that *L. vannamei* is a diet sensitive species with growth and metabolic processes controlled by the quantity (feeding rate) and quality (in terms of C:N) of food. Relative to the total isotopic change ($k + m$), the contribution of growth decreased with size shrimp from PL20's to largest juveniles. Metabolic turnover also decreased, but showed an elevated variability. Coefficient k in limited-fed and starved specimens was lower than those on satiation; m showed the opposite trend. $\Delta^{15}\text{N}$ values averaged from 0.30‰ to 3.5‰ ($1.87 \pm 0.87\%$) in satiated *L. vannamei*, but increased to 2.59–3.09 and 3.28–4.81‰ in limited-fed and starved specimens. $\Delta^{15}\text{N}$ increased with a diet's C:N, indicating an effect of diet quality on isotopic discrimination and also increased with shrimp size, indicating the influence of the metabolic changes. Variations in $\Delta^{15}\text{N}$ need to be considered in nutrition studies to estimate correctly the temporal relationship between an

organism's isotope ratio and its diet and to analyse the variations of food availability or preferences along a culture cycle.

Keywords: nutrient assimilation, diet switching, growth and metabolic turnover, mixing models, aquaculture

Introduction

Stable isotopes analysis (SIA) has emerged as an important tool in trophic ecology for estimation of trophic position, ontogeny of aquatic animals and dietary reconstruction key to understanding food-web structure in natural ecosystems (Cabana & Rasmussen 1996; Post 2002; McCutchan, Lewis, Kendall & McGrath 2003; Crawley, Hyndes & Vanderklift 2007; Martínez del Rio, Wolf, Carleton & Gannes 2009). The SIA technique is also used in nutrition studies for the following purposes: determining diet timing changes, estimating contributions of dietary N sources, understanding the temporal feeding relationship between consumers and their prey, indicating protein turnover in muscle tissue, supplementing information regarding the nutritional performance of a specific diet or feeding regime (Herzka & Holt 2000; Herzka 2005; Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a,b; Gamboa-Delgado, Peña-Rodríguez, Ricque-Marie & Cruz-Suárez 2011; Le Vay & Gamboa-Delgado 2011; Gamboa-Delgado, Rojas-Casas, Nieto-López & Cruz-Suárez 2012; Malpica-Cruz, Herzka, Sosa-Nishizaki & Lazo 2012).

Knowledge of isotopic turnover (t_{50}) and N fractionation ($\Delta^{15}\text{N}$) is important when using SIA, as

it enables reliable estimates of diet contributions and provides information regarding nutritional performance of a specific diet or feeding regime, and allows approximation of food web and structural changes in coastal ecosystems. Using inappropriate isotopic turnover rates and trophic fractionation factors can lead to erroneous interpretation of stable isotope data in nutrition and ecological studies. However, most studies that apply SIA do not estimate the precise values of isotope turnover rates and tissue-diet isotope discrimination factors. Rather, they are taken from published reviews (Caut, Angulo & Courchamp 2009). For example, an universal $\Delta^{15}\text{N}$ value of 3.4‰ derived from literature across a broad range of unrelated organisms is frequently used in isotope mixing models to estimate the relative contribution of diets and trophic positions (Minagawa & Wada 1984; Ponsard & Ardit 2000; Post, Pace & Hairston 2000; Vander Zanden & Rasmussen 2001; Post 2002). Limited available literature suggests that t_{50} and $\Delta^{15}\text{N}$ values may vary according to the physiology between species, individuals and tissue type (Tieszen, Boutton, Tesdahl & Slade 1983; Gannes, O'Brien & Martínez del Rio 1997; Kelly 2000; Overman & Parrish 2001; McCutchan *et al.* 2003; Pearson, Levey, Greenberg & Martínez del Rio 2003; Vanderklift & Ponsard 2003; Yokoyama, Tamaki, Harada, Shimoda, Koyama & Ishihi 2005; Stenroth, Holmqvist, Nyström, Berglund, Larsson & Granéli 2006; Madigan, Litvin, Popp, Carlisle, Farwell & Block 2012), as well as food quantity and quality (Hays, Adams, Broderick, Godley, Lucas, Metcalfe & Prior 2000; Gaye-Siessegger, Focken, Muetzel, Abel & Becker 2004; Robbins, Felicetti & Sponheimer 2005). However, there is insufficient knowledge on how rates of isotopic turnover and $\Delta^{15}\text{N}$ values vary among individuals of a given species under different nutritional, environment and individual conditions. Based on the literature review, all these factors may influence in the rates of isotopic turnover and isotopic discrimination.

Recently, the SIA method has been used in examining the assimilation and nutritional contributions of commercial animal diets in Concentrated Animal Feeding Operations (CAFO). However, despite its potential to evaluate diet efficiency SIA has not yet been used to analyse diets in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a valuable commercially cultivated species. To ensure correct SIA use, in nutritional studies, must include estimation of isotopic

change rate in shrimp tissues following a dietary, as well as estimation of isotopic fractionation. Both parameters are also useful indicators of an animal's physiological and metabolic condition in relation to its diet (Lyndon, Houlihan & Hall 1992; Owen, McCarthy, Watt, Ladero, Sanchez, Houlihan & Rennie 1999; Mente, Coutteau, Houlihan, Davidson & Sorgeloos 2002).

The objective of our study was to determine the effects of growth stages, diet types and feeding scenarios on isotopic turnover rates and $\Delta^{15}\text{N}$ of *L. vannamei* muscle. We used experimental mesocosms to evaluate the four life stages of shrimp (postlarvae, smaller, medium and larger juveniles), diets with variable C:N ratios (natural and commercial formulated feeds and combinations) and different feeding scenarios (satiation, limited-fed and starvation). Environmental conditions and feeding scenarios of the mesocosms were based on upon those of natural and cultured systems. We hypothesize that isotopic turnover rates and $\Delta^{15}\text{N}$ exhibited by *L. vannamei* are diet-dependent (diet type and feeding scenario) and vary as a function of size. Changes in these values with dietary treatment and as a function of the shrimp size are necessary for accurate estimation of mixing models and exponential models of isotopic change in nutritional studies of *L. vannamei*, as well as other cultured species. Furthermore, these values enable estimation of trophic position in food-web structures in natural ecosystems.

Methods

Experimental mesocosms

Experiments were conducted at a commercial shrimp farm located on the northwest coast of Mexico (Aquastrat S.A. de C.V. in Teacapán, Sinaloa; 22°40'08"N, 105°45'22"). Aquastrat is a shrimp farm with an intensive cultivation system with two annual cycles (summer-autumn and spring-summer). We conducted four trials (animal sizes) of controlled experiments, using four different diets and three feeding scenarios (satiation, limited-fed and starving). Experimental conditions of the trials, treatments and feeding scenarios are summarized in Table 1.

Experiments were conducted during the 2009 spring-summer cycle, with treatment periods of 11 days for postlarvae (trial 1), 30 days for juvenile specimens (trials 2 and 3) and 35 days for larger juveniles (trial 4). Postlarvae and juveniles of

Table 1 Experimental design to determine the effects of shrimp size, diet types and feeding scenarios on the isotopic turnover rates and isotopic discrimination of the muscle of *L. vannamei*. Experimental mesocosms information includes life stage of *L. vannamei* (from postlarvae to larger juveniles), dietary treatments (natural and commercial formulated feeds and combinations), feeding scenarios (satiation, limited-fed and starvation), duration of each feeding trial and specific collection days for biometric and stable isotopes analysis, isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$, ‰) and nutritional quality of diets (in terms of C:N ratio) and initial isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}_i$, ‰) and weight of specimens (W_i , g)

Mesocosms information				Diet		Shrimp	
Life stage (Trial #)	Feeding scenario	Treatment	Collection days	$\delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$	C:N _{diet}	W_i	$\delta^{15}\text{N}_i$
Postlarvae (Trial 1): 11 days	Satiation: 12–20% of shrimp biomass per day	NF	3, 6, 9, 11	9.80 ± 0.76 ^c	8.63 ± 0.20 ^d	0.0517 ± 0.003	11.12 ± 0.26
		FF		6.45 ± 0.20 ^a	7.60 ± 0.22 ^c		
		NF + FF		8.32 ± 0.54 ^b	5.70 ± 0.21 ^a		
		NF + FF + S		7.03 ± 0.57	6.93 ± 0.20 ^b		
Small juveniles (Trial 2): 30 days	Satiation: about 10% of shrimp biomass per day	NF	7, 14, 21, 30	8.13 ± 1.42 ^c	7.42 ± 0.18 ^{a,b}	0.25 ± 0.10	8.41 ± 0.10
		FF		4.82 ± 0.26 ^a	8.32 ± 0.50 ^b		
		NF + FF		6.83 ± 0.40 ^b	7.87 ± 0.34 ^{a,b}		
		NF + FF + S		6.48 ± 0.71 ^b	7.02 ± 0.49 ^a		
Medium juveniles (Trial 3): 30 days	Satiation: 7–10% of shrimp biomass per day	NF	7, 14, 21, 30	6.81 ± 0.70 ^{a,b}	4.65 ± 0.20 ^a	2.79 ± 0.26	7.72 ± 0.17
		FF		5.80 ± 0.13 ^a	8.51 ± 0.30 ^d		
		NF + FF		6.28 ± 0.49 ^a	6.59 ± 0.16 ^b		
		NF + FF + S		6.12 ± 0.60 ^a	7.32 ± 0.20 ^c		
Large juveniles (Trial 4): 35 days	Satiation: 4–6% of shrimp biomass per day	FF	7, 14, 21, 30, 35	5.80 ± 0.13 ^a	8.81 ± 0.03 ^c	6.21 ± 0.72	6.95 ± 0.34
		NF + FF		6.25 ± 0.48 ^b	6.70 ± 0.08 ^a		
		NF + FF		6.81 ± 0.53 ^b	7.65 ± 0.12 ^b		
Medium juveniles (Trial 3): 28 days	Limiting-feeding scenario: 3.5–5%	NF	7, 14, 21, 28	6.81 ± 0.70 ^b	4.91 ± 0.40 ^a	2.79 ± 0.26	7.72 ± 0.17
		FF		5.80 ± 0.13 ^a	8.51 ± 0.30 ^c		
		NF + FF		6.28 ± 0.49 ^b	6.59 ± 0.16 ^b		
Medium juveniles (Trial 3): 10 days	Starvation with cannibalim		7, 10			2.79 ± 0.26	7.72 ± 0.17

NF, natural food diet; FF, formulated food diet; NF + FF and NF + FF + S combination of both 50:50 ratio based on the N content without and with sediments respectively. Bromatological analysis performed on the different commercial diets used in our experiments indicated the following % dry weights: protein 40–45%, fats 8–9%, crude fiber 3.5–4.5% and nitrogen-free extract (NFE) 42–48%. Natural feed (NF) components contained 35–40% protein, 6–7% fats, 8.6–9% crude fiber and 30–46% NFE. Different letters represent significant differences: a < b < c < d as resulted of an ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison tests.

whiteleg shrimp used for each set of experiments were obtained from three shrimp farm ponds and left to acclimate prior each trial. During this time, the organisms were fed to satiation with a commercial feed containing 40% protein for PLs ($3 \times /$ day) and 35% protein for juveniles ($2 \times /$ day). Following acclimation, specimens were randomly distributed in 12 plastic tanks of 500 L with four blocks consisting of three tanks each – the first with a formulated food diet (FF), the second with a natural food diet (NF) and the third with a 50:50 combination based on the N content without (NF + FF) and with (NF + FF + S) sediments. For the NF + FF + S treatment, we collected wet sediment from the rearing ponds that were added directly to the tanks (25–30 L per tank). Sediments enhanced the natural productivity through of a benthonic food chain.

In trial 1, the tanks were stocked with *L. vannamei* postlarvae hatchlings (mean weight of 51.7 ± 7 mg) at stocking densities of about 60 PL20's m^{-2} . For trial 2, we used small *L. vannamei* juveniles with a wet weight of 0.25 ± 0.10 g. In the trial 3, tanks were stocked with 30 specimens of whiteleg shrimp with a mean body weight of 2.79 ± 0.26 g. In trial 4, we used 24 individuals with an average weight of 6.21 ± 0.72 g. Specimens used in the experiments were collected from the same population (single rearing pond) and were kept under same experimental conditions during trials. Thus, we avoided confounding factors that potentially could have influenced the intra-population variability.

Experimental diets

We created isotopically distinct experimental feeds using combinations of commercially formulated (soy and fish-based shrimp feed) and natural foods. For the formulated diet treatments, we used three different commercial aquaculture feeds from Vimifos, which were applied in the shrimp farm during different culturing stages. These included crumble for PL20's (trial 1), 'starter' for smaller juveniles (trial 2) (both containing a 40% of protein), and growth shrimp food (35% protein) for larger juveniles (trials 3 and 4). The natural feed was collected from the filter station at the shrimp farm that consisted of a battery of nine bag nets (0.82 m diameter, 5 m in length) used to filter the inflowing water from the Teacapán bay. Natural diet components (e.g. zooplankton, crustacean and fish larvae and detritus) were collected by filtering the inflowing water ini-

tially used to fill ponds through bag nets with fine (200–250 μm) screens. Because components of the natural food varied during collection days, we prepared a mixture of material collected from several days that was frozen, lyophilized and homogenized as a single batch. Thus, natural diet was derived from single source to ensure the consistency of bromatological components and $\delta^{15}\text{N}$ throughout each treatment (Table 1).

During the experiment, feeding rates were adapted to changes in the shrimp biomass according to the feeding scenario (Table 1). For the satiation scenario, feeding was a simple ration in the morning and afternoon and a double ration in the evening. Total rations corresponded to approximately 12–20% of shrimp biomass per day for PL20's and a quantity between 10% and 4% for smaller to larger juveniles. Satiation feeding was evaluated by placing the feed in feeding trays, which were checked 1 and 2 h after feeding. The feed allowance was increased or decreased on the basis of feed remaining on the trays. For the limited-feeding scenario, we tested medium juveniles at the same condition as in trial 3, but applied a 55% of the apparent satiation level (approximately to 4–5% of shrimp biomass; Mente *et al.* 2002). Because the levels of ^{15}N fractionation were also affected by starvation (Hesslein, Hallard & Ramlal 1993), we also tested the effect of short-term food deprivation in medium juveniles used in trial 3 during 10 days.

Environmental conditions

Each tank was supplied with seawater (Teacapán Bay inshore sea temperature of 29–32°C) and natural daylight. Tanks were covered with a shade net to prevent excessive heating. Air stones were included to ensure proper aeration and mixing of the water. Water exchange rates in each tank increased from 15 to 30% day^{-1} in trials 1–4. Accumulated sludge in tanks, a result of food waste products, moulting and other detritus, was removed daily via a central drain, except for tanks from treatment NF + FF + S, where a benthonic food chain was enhanced.

Three times per day water quality was monitored with a YSI 6600 V2 sonde and water samples for nutrient analysis were collected. Overall, environmental conditions were appropriate for shrimp growth, in terms of water temperature (mean ranging from 22.5 to 28.3°C), salinity (35–36),

pH (8.2–8.4) and DO concentrations (4.8–7.1 mg L⁻¹). All variables were stable and were compared among trials. Substantial increases were observed for SST (from <30 to 70–250 mg L⁻¹), chlorophyll *a* (from <15 to 30–150 mg m⁻³), TN (from ~1 to 1.7–3.2 mg L⁻¹) and chemical forms of N such as NH₄⁺ (<10 to 25–245 µg L⁻¹) and NO₃⁻ + NO₂⁻ (<20 to >1300 µg L⁻¹). Concentrations of chlorophyll *a*, SST, TN and their chemical forms in trials 3 and 4 (juveniles) were significantly higher than in trial 1 (PL20's).

Sample collection

Before each trial, 10 shrimp were randomly selected, measured and sacrificed to determine initial weight and isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}_i$) in the muscle prior to the diet switch. Every third day, three PL20's specimens per treatment in trial 1 ($n = 9$) were collected for biometric and isotopic analysis. Remaining specimens were collected at day 11. Sample collection in remaining trials was completed each week (three specimens per tank for a total of nine specimens per treatment/week. Remaining specimens were harvested at the end of the corresponding experimental periods (Table 1). To avoid depuration procedures, shrimp samples were obtained several hours (3–4 h) after feeding. Weight (W) was measured with a semi-analytical scale (± 0.1 mg) and the total length (TL) was measured stereo-microscopically using a 0.01 mm micrometer and a Vernier scale for juveniles. The animals were then dissected using clean stainless-steel implements. Tail muscle tissues from nine individuals from each treatment were randomly selected for isotope analysis (three per replicated tank). We selected the largest specimens at the end of each experiment for isotopical analyses, because they contributed to the best possible characterization of $\delta^{15}\text{N}$ final. All samples and diet components were frozen and freeze-dried for 72 h. The dried samples were grounded, homogenized and stored in sealed polypropylene containers until analysis. When cannibalism had taken place in the tanks, nine animals from the cannibal tanks and nine from the non-cannibal tanks were randomly sampled and analysed.

Analysis

Ground samples were placed in a glass chamber and vaporized with concentrated HCl (4 h) to

remove carbonates, dried at 60°C (4 h) and stored at 4°C. Lipids were not removed from our samples prior to analysis. Aliquots of 1.0 ± 0.1 mg were weighed into 5 x 3.5 mm tin capsules. Encapsulated samples were analysed at the Department of Plant Science of the University of California at Davis, CA, USA, in a PDZ Europa Scientific Roboprep elemental analyzer coupled to a PDZ Europa Hydra 20/20 stable isotope ratio mass spectrometer. Analytical precision (SD, $n = 5$) was analysed every 12 samples and was 0.2‰ for nitrogen, as estimated from standards (peach leaves NIST-1547 and bovine liver NIST-1577b, from the National Institute of Standard Technology). Isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}$) in parts per thousand (‰) was expressed as the relative difference between isotopic ratios in the sample and in conventional standards (atmospheric N₂ for nitrogen):

$$\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1]1000, \\ \text{where } R \text{ is } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$$

Data processing

Hesslein *et al.* (1993) model was used to estimate the proportion of changes in the tissue's isotopic composition as a function of time. This exponential model assumes that any isotopic change in shrimp tissues following a change in diet is due to growth and/or metabolic turnover (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a). This model provides an estimate of the N turnover rate in tissue and its effect on isotopic change [Eqn (1)]:

$$\delta^{15}\text{N}_t = \delta^{15}\text{N}_f + (\delta^{15}\text{N}_i - \delta^{15}\text{N}_f)e^{-(k+m)t} \quad (1)$$

where $\delta^{15}\text{N}_t$ is the shrimp tissue isotope value at time t , $\delta^{15}\text{N}_i$ is the initial value before the diet switch, $\delta^{15}\text{N}_f$ is the final isotopic composition in equilibrium with a new diet, t is the time that the shrimp was in the experiment (day), k is the specific growth rate (per day) and m is the metabolic turnover (per day). Values of k were calculated from the exponential growth equation (Eqn (2); Kusher, Smith & Cailliet 1992):

$$k = \ln(W_f/W_i)/t \quad (2)$$

where W_f and W_i are the final and initial weights.

The constant m was derived through nonlinear curve fitting [Eqn (1)]. The isotope values were fit to an exponential model of three parameters that

integrates growth and isotope value shift over time. The parameter m was estimated as the difference between the growth constant in the fit model and the calculated parameter k . Tests were run at significance level of $P < 0.05$. Quality of the model for each treatment was measured with the Akaike information criterion with a correction for finite sample sizes (AICc) (Burnham & Anderson 2002; Malpica-Cruz *et al.* 2012) and by estimation of the R^2 coefficient of determination as a statistical measure of how well the regression line approximates the real data points. As isotopic turnover takes place at the individual level, we applied the Hesslein *et al.* (1993) model using the individual specimen measurements collected at the same time and treatment.

The coefficients k and m indicate the magnitude of the isotopic change in relation to growth and metabolic turnovers respectively. Both coefficients were also used in the estimation of the isotopic half-life of the body tissue (t_{50} , 50% of isotopic turnover) to reach isotopic equilibrium after consuming the new diet [Eqn (3)]:

$$t_{50} = \ln 2 / (m + k) \quad (3)$$

The N isotope discrimination factor ($\Delta^{15}\text{N}$) was estimated as the difference between $\delta^{15}\text{N}$ mean values in shrimp and the $\delta^{15}\text{N}$ of their respective diet after reaching isotopic equilibrium.

Statistical analysis

Nine specimens were collected from three tanks with diet treatments corresponding to animal sizes and diets and feeding scenarios. We performed preliminary analyses to test significant differences among tanks. All values are means \pm SD. The level of significance in all statistical tests was 0.05. Growth and metabolic turnover data, $\Delta^{15}\text{N}$ values, t_{50} values were compared by ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison tests according to Zar (2010). $\Delta^{15}\text{N}$ was examined as a functions of C:N and size using regression analysis. Curve fits and statistical analysis of the results were performed using JMP 11 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Survival results, final weights, growth parameters and isotopic compositions of specimens reared to

satiation under different treatments for trials 1–4 and for limited-fed and food-deprivation experiments are shown in Table 2. Survival was comparable among treatments and trials under the satiation (82–97%) and limited-feed treatments (71–88%), but significantly lowers in the food-deprivation treatment (45–60%). A large variability in weight was found among specimens within treatments; however, no significant differences were found in average weights and growth rates among tanks fed within diet (treatment triplicate) (ANOVA, $P > 0.05$). Thus, we averaged results of shrimp reared on the same diet. For the PL stage receiving the satiation treatment, body mass increased (W_r) 4–6.2-fold in the 11 day period with no significant differences among treatments ($P > 0.05$), exceptions were observed in postlarvae reared on NF + FF + S with W_r from 5.2–7.0 and weights 17–30% higher than the other diets. In trial 2 the W_r for specimens reared on NF + FF and NF + FF + S (17.9–22.7 times W_i) was higher than those of NF and FF treatments (9.6–16 times). In trial 3, the W_r (3.99–9.47 g) showed great variations among treatments reflecting the different growth responses of animals to different diets. NF fed animals maintained the initial weight, while specimens reared on combined diets reached the maximum growth (W_r 2.8–3.7). In trial 4, the mean final weight (17.2–18.1 g) and W_r (2.5–3.2) were not different among treatments. An exception occurred with the larger specimens reared on NF that decreased significantly and were excluded from trial 4. Limited-fed specimens experienced lower growth responses than those reared on satiation scenario ($P < 0.05$), with final body weights $\leq 50\%$ of satiated specimens at in the same diet, with exception of NF treatments where not-enough food was available.

Equilibrated treatments

In most of the satiation treatments, the specimen's biomass increased enough to achieve nitrogen isotopic equilibrium with their diets, with exceptions of NF in trials 3 and 4 and NF + FF + S in trial 4. There were significant differences in the $\delta^{15}\text{N}$ values of muscle tissue in specimens reared on constant diet at the beginning and end of the experiments ($P < 0.05$). However, the lack of weight gain in limited-fed shrimp prevented them from reaching equilibrium.

Table 2 Results of experiments to determine the effects of shrimp size, diet types and feeding scenarios on the isotopic turnover rates and isotopic discrimination of the muscle of *L. vannamei*, including final weight (W_f , g), relative weight gain ($W_r = W_f/W_i$), final isotopic composition ($\delta^{15}N_f$, ‰), growing (k , day⁻¹) and metabolic (m , day⁻¹) parameters, nitrogen half time in days (t_{50}) and trophic discrimination factor ($\Delta^{15}N$, ‰) in muscle tissue of *L. vannamei* in the different trials and treatments

Trial	Treatment	Survival	W_f	W_r	k	m	t_{50}	$\delta^{15}N_f$	$\Delta^{15}N$
Trial 1: Satiation	NF	95.0 ± 2 ^b	0.243 ± 0.040 ^a	4.0–5.5	0.113 ± 0.01 ^a	0.027 ± 0.01 ^a	5.30 ± 0.69 ^b	12.0 ± 0.32	2.20 ± 0.97 ^c
	FF	93.3 ± 2 ^{a,b}	0.271 ± 0.138 ^{a,b}	4.4–6.2	0.150 ± 0.03 ^b	0.130 ± 0.02 ^b	2.47 ± 0.30 ^a	8.48 ± 0.10	2.03 ± 0.17 ^c
	NF + FF	97.8 ± 1 ^c	0.275 ± 0.10 ^{a,b}	4.6–6.1	0.152 ± 0.03 ^b	0.146 ± 0.03 ^b	2.32 ± 0.29 ^a	8.83 ± 0.56	0.50 ± 0.15 ^a
	NF + FF + S	95.3 ± 3 ^{b,c}	0.317 ± 0.067 ^b	5.4–7.0	0.16 ± 0.02 ^b	0.150 ± 0.01 ^b	2.24 ± 0.33 ^a	8.19 ± 0.41	1.16 ± 0.55 ^b
Trial 2: Satiation	NF	90 ± 3 ^{a,b}	2.91 ± 0.7 ^a	9.6–14	0.09 ± 0.01 ^a	0.071 ± 0.01 ^a	4.53 ± 0.53 ^b	10.13 ± 0.52	2.00 ± 0.58 ^b
	FF	96.7 ± 2 ^c	3.37 ± 0.8 ^{a,b}	11.5–16	0.09 ± 0.02 ^a	0.076 ± 0.01 ^a	4.26 ± 0.73 ^b	7.31 ± 0.39	2.49 ± 0.37 ^b
	NF + FF	90 ± 4 ^a	5.02 ± 0.32 ^c	18–22	0.10 ± 0.05 ^a	0.133 ± 0.05 ^b	3.00 ± 1.31 ^a	7.74 ± 0.16	0.91 ± 0.35 ^a
	NF + FF + S	93 ± 3 ^{b,c}	5.43 ± 0.61 ^c	19–25	0.11 ± 0.04 ^a	0.144 ± 0.02 ^b	2.81 ± 1.57 ^a	7.45 ± 0.57	0.97 ± 0.10 ^a
Trial 3: Satiation	NF	82 ± 3 ^a	3.99 ± 1.8 ^a	1.2–1.7	0.014 ± 0.01 ^a	~0	49.5 ± 21.0 ^c	8.55 ± 0.39	3.43*
	FF	87 ± 3 ^a	7.66 ± 0.7 ^b	2.4–3.1	0.036 ± 0.01 ^b	0.143 ± 0.05 ^c	3.9 ± 1.22 ^a	8.36 ± 0.19	2.56 ± 0.34 ^b
	NF + FF	90 ± 2 ^a	9.47 ± 1.0 ^c	2.8–3.7	0.054 ± 0.02 ^c	0.04 ± 0.01 ^a	12.0 ± 7.0 ^b	8.23 ± 0.15	1.95 ± 0.48 ^a
	NF + FF + S	97 ± 1 ^b	8.72 ± 0.31 ^{b,c}	2.8–3.5	0.04 ± 0.01 ^{b,c}	0.082 ± 0.03 ^b	5.8 ± 2.1 ^a	8.01 ± 0.26	1.89 ± 0.72 ^{a,b}
Trial 4: Satiation	FF	93 ± 3 ^b	17.34 ± 1.32 ^a	2.5–3.1	0.03 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.01 ^a	6.1 ± 1.0 ^a	8.23 ± 0.17	2.43 ± 0.17 ^b
	NF + FF	87 ± 5 ^a	17.19 ± 0.23 ^a	2.6–3.0	0.033 ± 0.01 ^b	0.069 ± 0.01 ^a	6.8 ± 1.2 ^a	7.91 ± 0.45	1.66 ± 0.39 ^a
	NF + FF + S	90 ± 3 ^{a,b}	18.10 ± 0.84 ^a	2.7–3.2	0.013 ± 0.01 ^a	~0	46.3 ± 15 ^b	7.61 ± 0.81	3.13*
Trial 3: Limiting-feeding scenario	NF	71 ± 7 ^a	3.39 ± 0.10 ^a	1.0–1.4	0.01 ± 0.001 ^a	0.01 ± 0.005 ^a	41.0 ± 11.0 ^b	8.65 ± 0.10	3.05*
	FF	82 ± 4 ^a	3.69 ± 0.41 ^a	1.1–1.6	0.02 ± 0.005 ^b	0.022 ± 0.01 ^b	16.5 ± 5.0 ^a	8.66 ± 0.35	3.09*
	NF + FF	86 ± 5 ^a	4.88 ± 0.45 ^b	1.6–2.1	0.02 ± 0.01 ^b	0.021 ± 0.01 ^b	16.7 ± 4.1 ^a	8.82 ± 0.30	2.59*
Trial 3: Starvation		45 ± 15	2.32 ± 0.96 ^a	0.5–1.2	-0.024 ± 0.0 ^a	0.355 ± 0.04 ^b	2.0	12.53 ± 0.42	4.81 ± 0.25 ^{a,b}
Trial 3: Starvation with cannibalism		60 ± 13 ^a	3.45 ± 0.33 ^a	1.0–1.5	0.024 ± 0.01 ^b	0.234 ± 0.04 ^a	2.7	11.0 ± 0.60	3.28 ± 0.36 ^a

Comparative analysis among treatments in a same trial. Different letters represent significant differences: a < b < c < d as resulted of an ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison tests.

*Values of trophic discrimination estimated as the difference between the predicted $\delta^{15}N$ obtained from curve fits of Hesslein *et al.*'s (1993) model and $\delta^{15}N$ of the diet.

We fitted the Hesslein *et al.* (1993) model to the N isotopes dataset in equilibrated treatments to estimate growth and metabolism coefficients and infer their contributions to isotopic turnover (Figs 1–4). Values of k (0.15–0.16 day⁻¹) and m (0.13–0.15 day⁻¹) were comparable among treatments in trial 1, with exception of NF where $k > m$ (Table 2; $P < 0.05$). Coefficient k -values were not significantly different among treatments in trial 2 (0.076–0.11 day⁻¹; $P > 0.05$), but m values in NF + FF and NF + FF + S (0.133–0.144 day⁻¹) were higher than in NF and FF treatments (0.071–0.076 day⁻¹; $P < 0.05$). In trial 3, the NF treatment showed the lowest

k -value (0.014 day⁻¹) with respect to the other treatments (0.036–0.054 day⁻¹; $P < 0.05$), while m varied greatly (0–0.082 day⁻¹ for most treatments to 0.143 day⁻¹ in the FF diet). Low values of k (0.013–0.033 day⁻¹) and m (0–0.08 day⁻¹) characterized trial 4 treatments. Given the relative contributions of k and m to isotopic change, in PL20's and small juveniles equilibrium likely occurred primarily as a result of tissue accretion and metabolic turnover. Conversely, in larger juveniles, equilibrium was primarily attributed to metabolic turnover.

Overall, the parameters m and k correlated significantly ($R^2 = 0.52$). Due to the high variability,

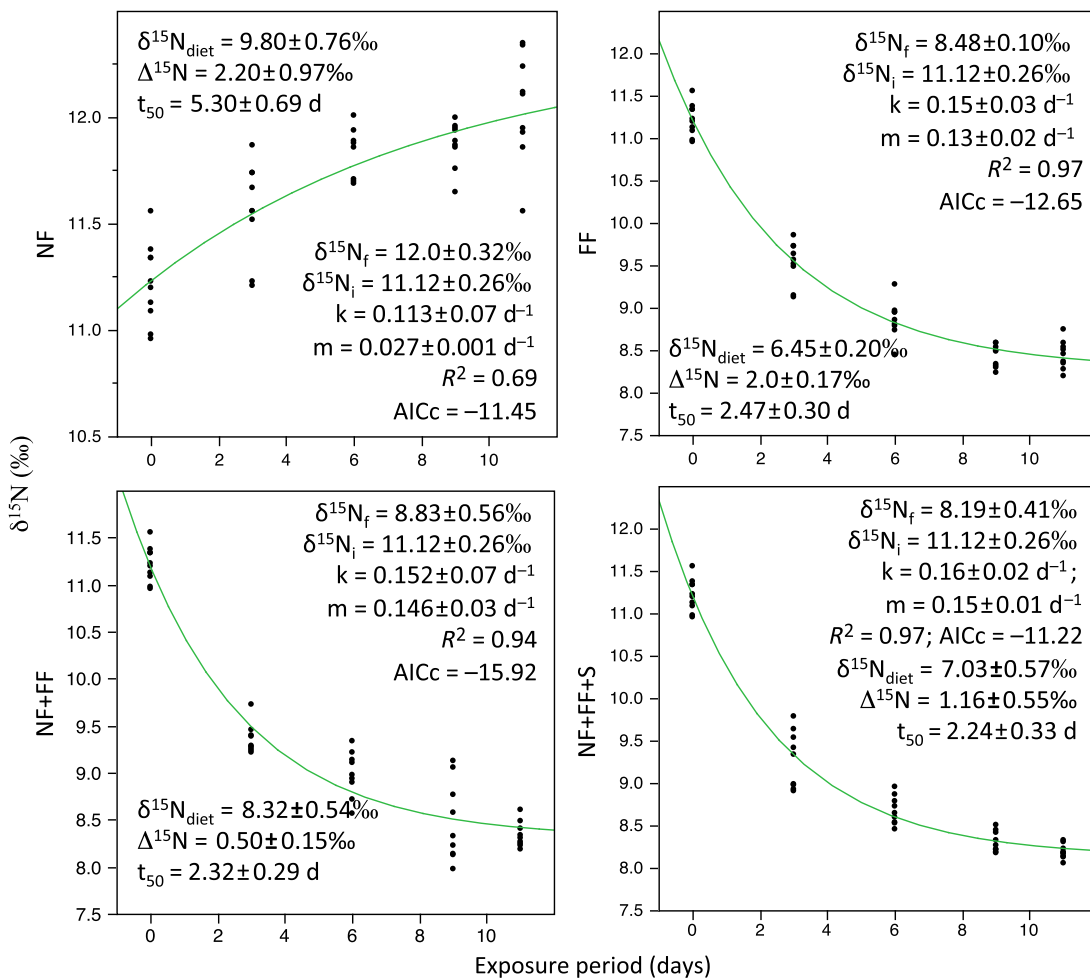


Figure 1 Temporal variation in the δ¹⁵N in *Litopenaeus vannamei* muscle reared on satiation scenario with different combinations of natural and formulated food in trial 1 (postlarvae). NF, natural food; FF, formulated food; NF + FF, natural and formulated food; NF + FF + S, enhancing natural productivity adding sediments. Solid lines represent model results derived from curve fitting Hesslein *et al.* (1993) equation to the data to assess the relative contribution of growth and metabolic turnover to isotopic change. Coefficient of determination refers to curve fit results and the AICc value is a measurement of the relative quality of the model.

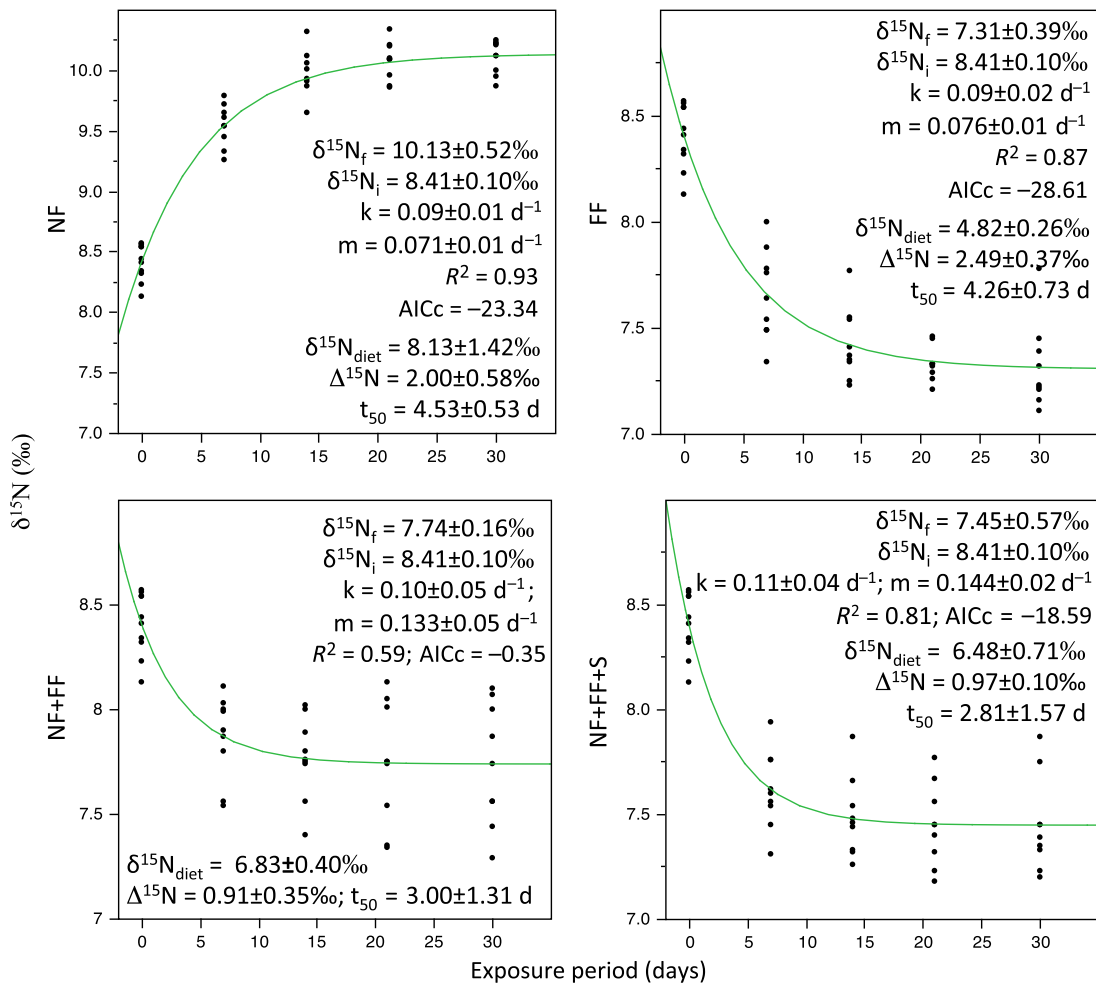


Figure 2 Temporal variation in the $\delta^{15}\text{N}$ in *Litopenaeus vannamei* muscle reared on satiation scenario with different combinations of natural and formulated food in trial 2 (small juveniles). NF, natural food; FF, formulated food; NF + FF, natural and formulated food; NF + FF + S, enhancing natural productivity adding sediments. Solid lines represent model results derived from curve fitting Hesslein *et al.* (1993) equation to the data to assess the relative contribution of growth and metabolic turnover to isotopic change. Coefficient of determination refers to curve fit results and the AICc value is a measurement of the relative quality of the model.

no significant differences were observed among trials with regard to metabolic turnover rates. Growth rate decreased exponentially with shrimp size ($R^2 = 0.84$), with significantly higher values in small shrimp ($P < 0.05$). The coefficient m also decreased non-significantly with animal weight. No correlations were observed between coefficients k and m and C:N.

The time necessary for half of the body tissue to reach isotopic equilibrium after consuming a new diet was calculated using coefficients k and m (Table 2). Great variability was observed among diets and shrimp size. For example, in trial 1 post-larvae, t_{50} decreased from 5.3 days in NF to 2.24–

2.47 days in the remaining treatments. t_{50} averaged between 2.81 and 4.53 days in trial 2 and between 3.9 and 12 days in trials 3 and 4. In PL20's, equilibrium state was reached in 4–5 to 10 days following the dietary switch, while larger juveniles took between 12–14 and 24 days. Exceptions occurred in trial 3 (NF) and 4 (NF and NF + FF + S) treatments, where equilibrium was not reached during the treatment period.

Non-equilibrated treatments

When equilibrium was not reached, such as in limited-fed (Fig. 5) and starving (Fig. 6) specimens,

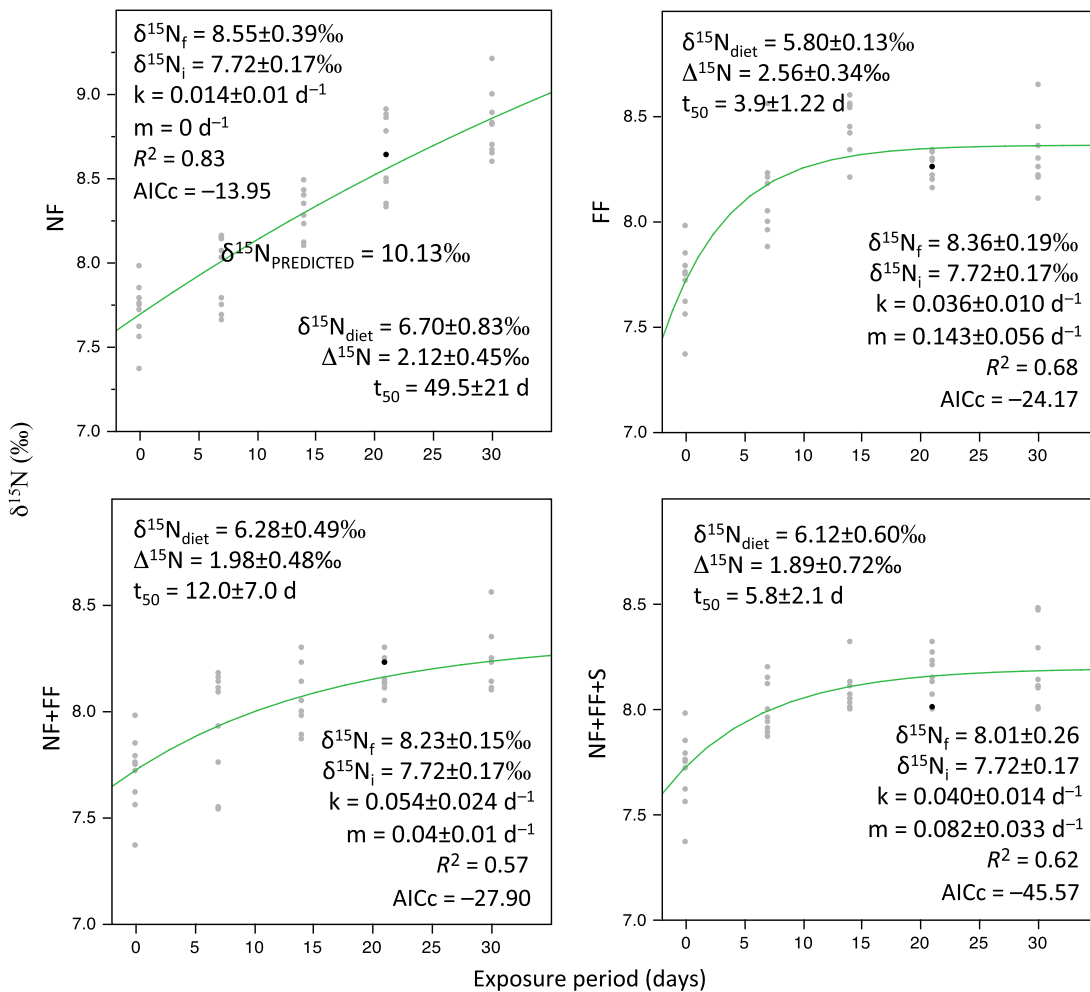


Figure 3 Temporal variation in the $\delta^{15}\text{N}$ in *Litopenaeus vannamei* muscle reared on satiation scenario with different combinations of natural and formulated food in trial 3 (medium juveniles). NF, natural food; FF, formulated food; NF + FF, natural and formulated food; NF + FF + S, enhancing natural productivity adding sediments. Solid lines represent model results derived from curve fitting Hesslein *et al.* (1993) equation to the data to assess the relative contribution of growth and metabolic turnover to isotopic change. Coefficient of determination refers to curve fit results and the AICc value is a measurement of the relative quality of the model.

we still applied Hesslein *et al.*'s. (1993) model to estimate growth parameters and equilibrium value during the curve fitting procedure itself ($\delta^{15}\text{N}_{\text{predicted}}$) (Malpica-Cruz *et al.* 2012). We recognized that models may yield skewed results and were thus interpreted with caution. Coefficients k ($\sim 0\text{--}0.02 \text{ day}^{-1}$) and m ($\sim 0\text{--}0.035 \text{ day}^{-1}$) of limited-fed *L. vannamei* were lower than measured values in satiated specimens on the same diet (Table 2). Tissue $\delta^{15}\text{N}$ time lag values, calculated using growth and metabolic turnover, were greater in limited-fed than in satiated shrimp ($P < 0.05$). On average, $t_{50} \geq 40$ days, with the

exception of the FF + NF treatment, where $t_{50} = 16.5$ days. Hesslein *et al.*'s (1993) model predicts that limited-fed juveniles require a longer time period ($>1.5\text{--}3$ months) to reach equilibrium following a dietary switch.

In starved specimens, weight decreased significantly with respect to initial weight and with respect to negative k -values (Table 2). However, the metabolic turnover m in starved specimens was significantly higher than in satiated and limited-fed specimens. We were unable to avoid cannibalism in all tanks, like due to high *L. vannamei* density, which led to aggression and near 45%

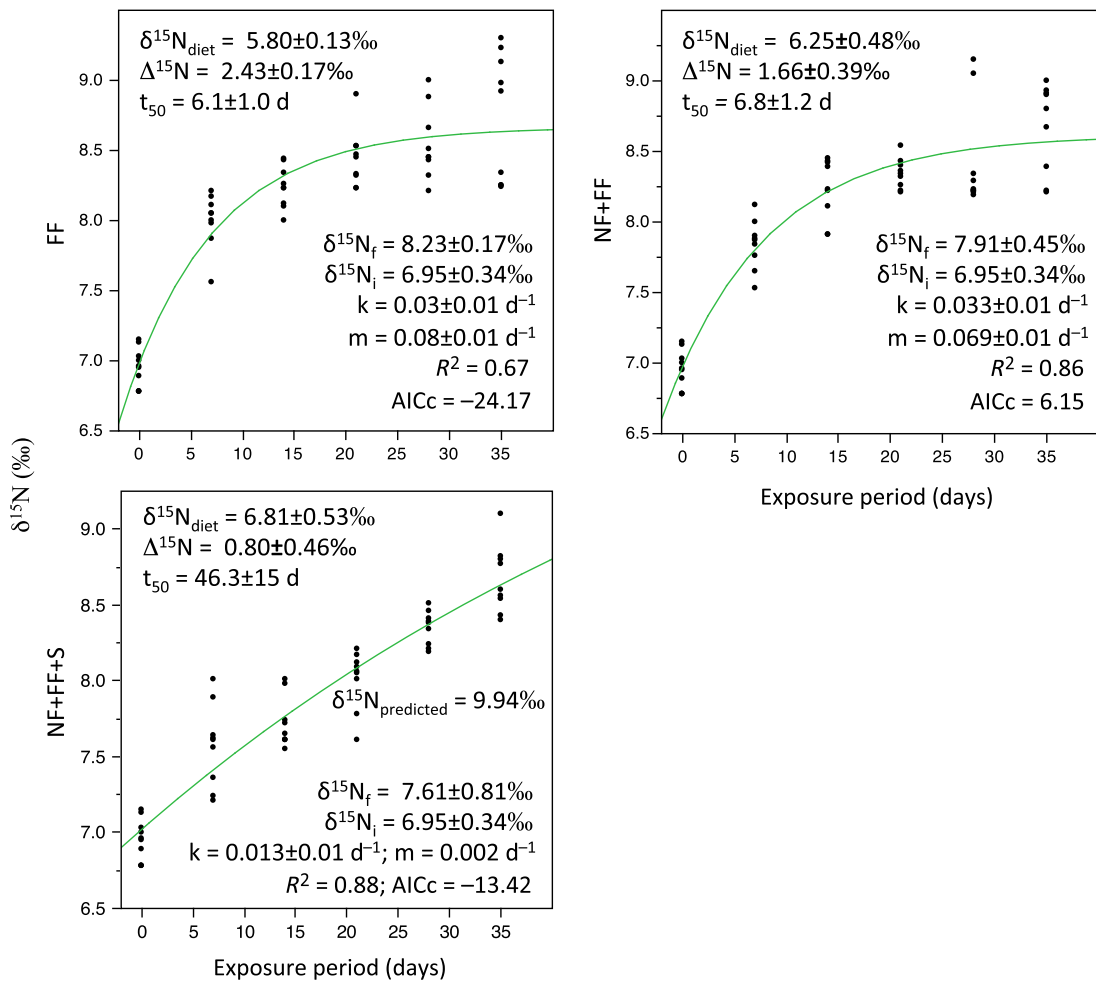


Figure 4 Temporal variation in the $\delta^{15}\text{N}$ in *Litopenaeus vannamei* muscle reared on satiation scenario with different combinations of natural and formulated food in trial 4 (large juveniles). Formulated food (FF), combinations of natural and formulated food (NF + FF) and enhancing natural productivity adding sediments (NF + FF + S). Solid lines represent model results derived from curve fitting Hesslein *et al.* (1993) equation to the data to assess the relative contribution of growth and metabolic turnover to isotopic change. Coefficient of determination refers to curve fit results and the AICc value is a measurement of the relative quality of the model.

mortality. At the end of experiment, we separated the specimens from tanks with cannibalism from those without cannibalism. The coefficients k (0.024 day^{-1}) and m (0.234 day^{-1}) in tanks with cannibalism were lower than those from tanks without cannibalism ($k = -0.0238 \text{ day}^{-1}$ and $m = 0.355 \text{ day}^{-1}$; Table 2). High coefficients of metabolic decay indicated a high contribution of metabolism in isotopic turnover, like that observed in satiated and limited-fed juveniles.

Through our models, we predicted equilibrium values for the satiated trial 3 NF treatment (10.13‰ , Fig. 3) and the satiated trial 4 NF+FF+S (9.94‰ , Fig. 4), as well as for limited-fed NF

(9.76‰), FF (8.89‰) and NF + FF (8.87‰) treatments (Fig. 5). For starved specimens, we used the final values ($\delta^{15}\text{N}_{\text{final}}$) at day 10 as the isotopic equilibrium values, 11.6‰ and 12.53‰ in tanks with cannibalism and without cannibalism respectively (Fig. 6).

Nitrogen isotope fractionation and variation as a function of diet and size

Isotopical equilibrium values from treatments with sufficient weigh gain ($W_r \geq 4$) were included in estimations of isotopic fractionation (Table 2). Variation in $\Delta^{15}\text{N}$ was observed among individuals on

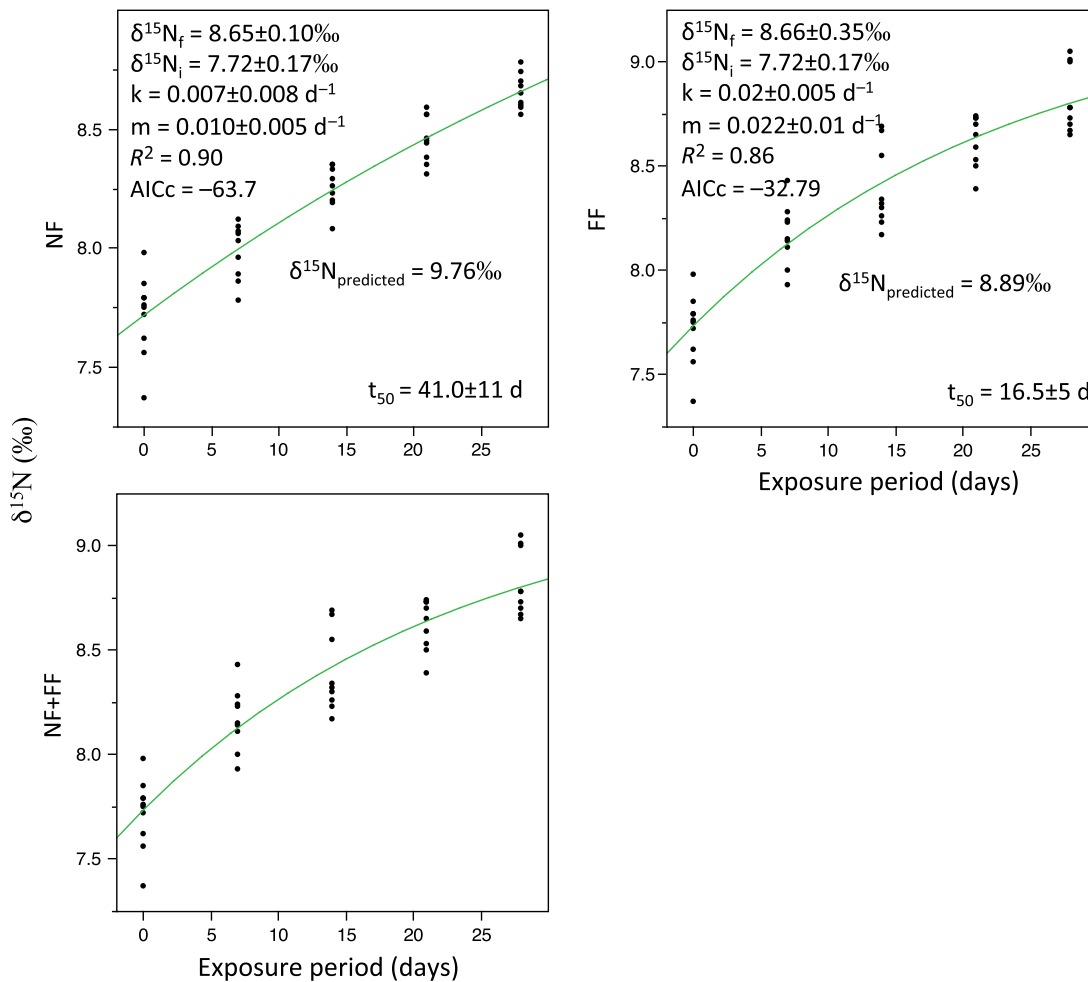


Figure 5 Temporal variation in the $\delta^{15}\text{N}$ in *Litopenaeus vannamei* muscle reared on limited-fed scenario with different combinations of natural and formulated food in trial 3 (medium juveniles). NF, natural food; FF, formulated food; NF + FF, natural and formulated food. Solid lines represent model results derived from curve fitting Hesslein *et al.* (1993) equation to the data to assess the relative contribution of growth and metabolic turnover to isotopic change. Coefficient of determination refers to curve fit results and the AICc value is a measurement of the relative quality of the model.

the same diet; however, differences were small, relative to variation among means for diets. $\Delta^{15}\text{N}$ values varied from 0.3‰ to 3.50‰ for satiated specimens. Although differences in mean isotopic signatures were observed among experiments (Table 2, $P < 0.05$), non-significant differences in the $\Delta^{15}\text{N}$ were found for specimens reared on pure diets (NF and FF, $P > 0.05$). However, $\Delta^{15}\text{N}$ was significantly lower in combined diets than in pure diets within each animal size ($P < 0.05$). Furthermore, we estimated $\Delta^{15}\text{N}$ values in non-equilibrated treatments using predicted $\delta^{15}\text{N}$ values from curve fits from Hesslein *et al.*'s (1993) model.

Values are shown in Table 2 with an asterisk. Overall, $\Delta^{15}\text{N}$ values estimated in limited-fed and starvation treatments were significantly higher than those from satiation treatments ($P < 0.05$).

We examined relationships between $\Delta^{15}\text{N}$ and food nutritional quality (measured as diet's C:N ratio) and shrimp size, using values from equilibrated treatments. We found a positive relationship ($R^2 = 0.58$, $P < 0.05$) between $\delta^{15}\text{N}$ enrichment and the C:N ratio of the diet (Fig. 7). As $\delta^{15}\text{N}$ enrichment increased significantly with the C:N ratio of the diet, diet quality plays an important role in controlling discrimination factor values. We also

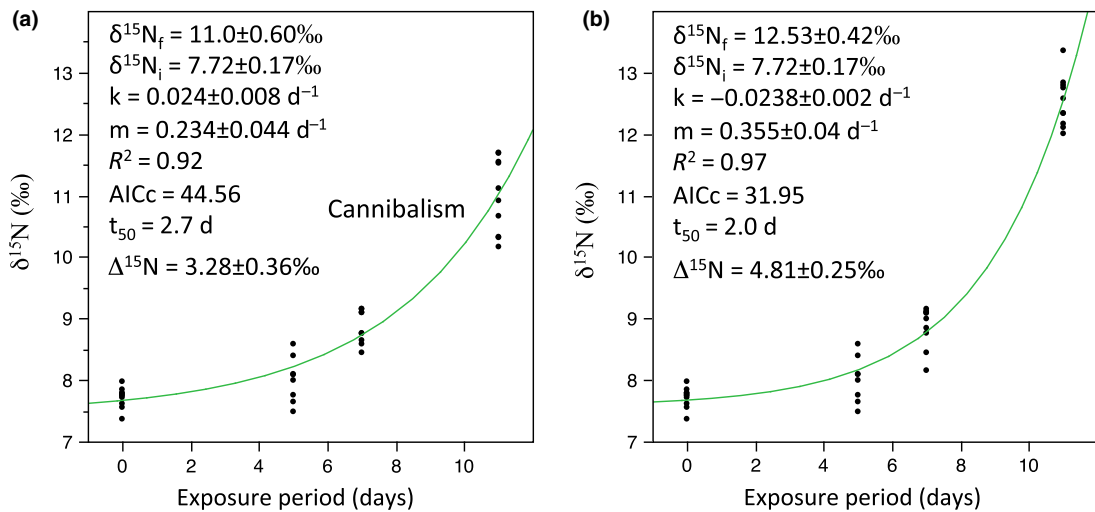


Figure 6 Temporal variation of the $\delta^{15}N$ in *Litopenaeus vannamei* muscle reared on food-deprivation scenario in trial 3 (medium juveniles). Solid lines represent model results derived from curve fitting Hesslein et al. (1993) equation to the data to assess the relative contribution of growth and metabolic turnover to isotopic change. Coefficient of determination refers to curve fit results and the AICc value is a measurement of the relative quality of the model.

studied the effect of shrimp size on isotopic discrimination and found differences among shrimp size classes ($P < 0.05$; Table 2) – lowest values occurred in PL20's and highest values occurred in larger specimens. In addition, a significant $\Delta^{15}N$ increase occurred as a function of weight ($R^2 = 0.60$, $P < 0.05$) (Fig. 8). Regression analysis between $\Delta^{15}N$ and size indicated an intercept of 2.268‰ and a slope of 0.0466‰ per gram.

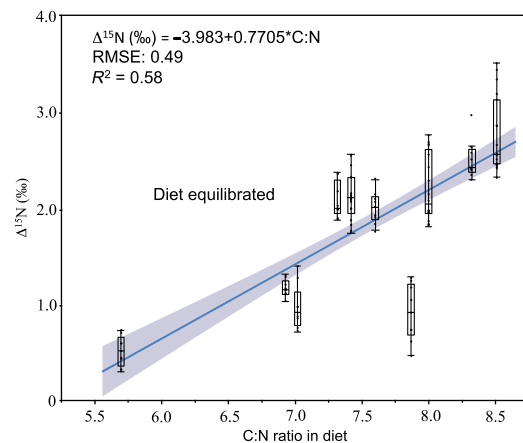


Figure 7 Variation of $\Delta^{15}N$ measured in specimens equilibrated with its diet in function of the diet quality (in terms of C:N ratio).

Discussion

Tissue turnover consists of catabolism (tissue breakdown) and synthesis (tissue accretion) of amino acids and proteins. Turnover depends on the growth (k) and metabolic rates (m), which are a functions of size and diet (quality and quantity) (Fry & Arnold 1982; Tieszen et al. 1983; Houlihan 1991; Wolfe & Chinkes 2005). In our study, isotopic change rate was a function of newly added biomass (growth) and of the breakdown and replacement of existing body tissues (metabolic turnover), which varied as a function of size. For growing animals (e.g. PL20's and smaller juveniles in trial 1 and 2, respectively), the isotopic composition occurred primarily as a result of tissue accretion, which is associated with the fast growth rates characteristic to *L. vannamei* early life stages. During this fast growing period, the metabolic turnover of structural N was also significant. As tissue accretion decreased as a function of animal weight, we expected turnover rates would be primarily related to the breakdown and replacement of existing body tissues. However, the elevated variability in the parameter m obscured any potential trend in body tissues as a function of weight.

Overall, short muscle tissue N half time changes were observed in *L. vannamei* specimens on different diets (treatment) and sizes (trials). t_{50} values

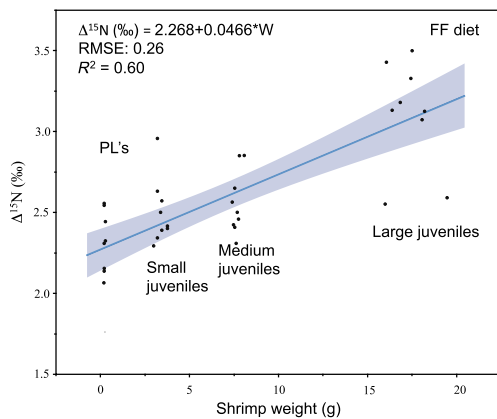


Figure 8 Variation of $\Delta^{15}\text{N}$ measured in specimens equilibrated with its diet in function of the shrimp size (in weight).

increased with shrimp size, but we observed no differences among treatments, except in those non-equilibrated. Previous determinations of tissue turnover rates by SIA in various ectotherm and endotherm taxa suggest that turnover rates are specific to taxons and analysed tissue (Fry & Arnold 1982; Tieszen *et al.* 1983; Hobson & Clark 1992; Hesslein *et al.* 1993; Herzka & Holt 2000). Short isotopic equilibrium periods have been estimated for decapods at early life stages. For example, periods in postlarvae *Penaeus semisulcatus* span 15 days (Al-Maslmani, Le Vay & Kennedy 2009), 9 days in *Piaractus mesopotamicus* (Jomori, Ducatti, Carneiro & Portella 2008), 6–9 days in *Sesarma rectum* and *Petrolisthes armatus* (Schwamborn, Ekau, Voss & Saint-Paul 2002) and 5 days in *L. vannamei* mysis larvae (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009b). Low t_{50} values were also found for juvenile brown shrimp, which may reflect the fact that they were actively growing (Fry & Arnold 1982).

Isotopic discrimination as a function of diet, shrimp size and feeding scenario

The $\delta^{15}\text{N}$ diet-tissue discrimination factor ranged greatly across experiment groups (0.3–3.5‰) and averaged $1.87 \pm 0.87\text{‰}$ in satiated *L. vannamei*. While our range of $\Delta^{15}\text{N}$ includes the commonly assumed value of 3.4‰ (De Niro & Epstein 1978; DeNiro & Epstein 1981; Post 2002), our average differs. However, our value is comparable to those reported by Caut *et al.* (2009) of 2.1‰ (0.1–5.3‰) for whole-body samples of inverte-

brates, Vanderklift and Ponsard (2003) of 1.6‰ for ammonotelic invertebrates (excrete ammonia as their primary nitrogenous waste; include *L. vannamei*) and Al-Maslmani *et al.* (2009) of 1.9‰ for tiger-prawn muscle.

Controversial results have been reported with respect to the influence of food quality on $\Delta^{15}\text{N}$ values. Previous authors found differences among animals fed on different diets (Gaye-Siessegger *et al.* 2004; Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a; Malpica-Cruz *et al.* 2012) but other authors not (Post 2002; Vanderklift & Ponsard 2003). In our feeding experiments, the discrimination factors measured in specimens equilibrated with their diets showed elevated variability among trials (size) and treatments (type of food). $\Delta^{15}\text{N}$ variations in specimens reared on different treatments may result from the influences of diet protein quality (Roth & Hobson 2000; Waddington & MacArthur 2008) and quantity (Fantle, Dittel, Schwalm, Epifanio & Fogel 1999; Pearson *et al.* 2003) and shrimp excretion rates (Olive *et al.* 2003; Gamboa-Delgado, Cañavate, Zerolo & Le Vay 2008). The $\Delta^{15}\text{N}$ variations within a trial and treatment may also be relate shrimp stress and moult stage (McCutchan *et al.* 2003; Yokoyama *et al.* 2005). In spite of this elevated $\Delta^{15}\text{N}$ variability, we observed significant differences among treatments, as well as a significant correlation with C:N ratio. Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a also identified $\Delta^{15}\text{N}$ differences related to the protein content of diets. Lower values (0.8–3.6‰) characterized 46% crude protein diets, and higher $\Delta^{15}\text{N}$ values (1.1–5.0‰) characterized 23 crude protein diets. Our results show that $\Delta^{15}\text{N}$ increased with a diet's C:N, indicating an effect of diet quality on isotopic discrimination. Furthermore, we support the hypothesis that better quality food (i.e. lower C:N) tends relate to a lower $\delta^{15}\text{N}$ enrichment. This coincides with Perga and Grey (2010) conclusion's that a N-rich diet leads to low N fractionation, but contradicts Vanderklift and Ponsard (2003) argument that an N-poor diet has low $\Delta^{15}\text{N}$.

As growth rate and the degree of metabolic turnover depend on shrimp size (Fry & Arnold 1982; Hesslein *et al.* 1993), we expected that isotopic turnover rates and discrimination factors would vary as a function of size. Results confirmed our hypothesis. In rapidly growing animals, the isotopic turnover rates were more rapid (shorter equilibrium time), due to the elevated tissue accretion

rates characteristic of early life stages (e.g. PL's and small juveniles). Thus, their N trophic discrimination factors were also lower (Martínez del Rio *et al.* 2009). Conversely, in slower-growing organisms (e.g. larger juveniles) isotopic turnover rates, which depend strictly on tissue metabolic turnover, were slower and took longer to reach isotopic equilibrium. Thus, their isotopic discrimination was greater. Variations in $\Delta^{15}\text{N}$ with size have been reported for *L. vannamei*, with values of 0.8–5.0‰ in postlarval shrimp and 1.3–7.8‰ in juvenile shrimp (Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a).

In penaeid crustaceans, amino acids in tissue protein and food are used as the primary source of energy for metabolism (Rosas, Cuzon, Gaxiola, LePriol, Pascual, Rossignol, Contreras, Sánchez & van Wormhoudt 2001; Rosas, Cuzon, Taboada, Pascual, Gaxiola & van Wormhoudt 2001b). Amino acids are catabolized via transamination, resulting in ammonia excretion and the production of free amino acids that are metabolized to obtain direct energy (Rosas, Cuzon, Gaxiola *et al.* 2001; Rosas, Cuzon, Taboada, *et al.* 2001). During amino acid transamination, isotopic fractionation may occur due to the preferential excretion of ^{15}N -depleted ammonia (Macko *et al.*, 1986). As the ammonia excretion of unfed and fed shrimp is related to shrimp size (Rosas, Cuzon, Gaxiola *et al.* 2001; Rosas, Cuzon, Taboada, *et al.* 2001), their discrimination factors also vary directly with size.

As the equilibrium state was reached only in satiated specimens in our study, we were unable to compare $\Delta^{15}\text{N}$ values among scenarios. However, according to our observed trend, $\Delta^{15}\text{N}$ would increase in limited-fed and starved specimens. We assumed a nutrient deficiency diet might increase the metabolic cycling of non-essential nutrients and cause greater isotopic fractionation (Martínez del Rio & Wolf 2005). As enrichment may be greater under conditions of nutritional stress (Hobson & Clark 1992; Hobson, Alisauskas & Clark 1993; Fantle *et al.* 1999; Adams & Sterner 2000), higher ^{15}N enrichment may characterize starved specimens. In fact, Gamboa-Delgado & Le Vay (2009a) explained unusually high $\Delta^{15}\text{N}$ values as imbalances in the dietary nutrients necessary for shrimp development. Our results indicated that starving animals had a progressive ^{15}N enrichment as result of the re-utilization of existing tissues to sustain metabolic demands and selective excretion of ^{14}N in body tissues catabolism (Hobson *et al.* 1993; Gannes *et al.* 1997).

Thus, it was not surprise that lower isotopic turnover values and trophic discrimination characterized better-fed organisms, rather than protein-deficient or food-deprived specimens (e.g. high C:N values and/or in limited-fed and starvation).

Implications

Since 2003, the Pacific white shrimp (*L. vannamei*) has become the main crustacean species produced worldwide through various aquaculture systems (e.g. extensive to hyper-intensive) (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2012). This industry represents profit sales of approximately US\$700 million in México. However, shrimp aquaculture is criticized for its unsustainable practices that include the effect of this activity on stocks of sardines and anchovies used for the production of formulated food and the pollution by discharge of effluents rich in nutrient and organic matter, causing eutrophication and frequent harmful algal blooms in coastal waters (Páez-Osuna, Gracia, Flores-Verdugo, Lyle-Fritch, Alonso-Rodríguez, Roque & Ruiz-Fernández 2003; Amezcua & Soto-Jiménez 2014). Thus, knowledge on the adequate nutrition of shrimp and development of improved feeds at all stages of the culture cycle is urgent to use efficiently the commercial diets, maximize the shrimp production and minimize the discharges of food wastes.

Stable isotopes analysis method is useful to examine the assimilation and nutritional contributions of diets in *L. vannamei* (e.g. Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a; Le Vay & Gamboa-Delgado 2011; Gamboa-Delgado *et al.* 2011, 2012; Bojórquez-Mascareño & Soto-Jiménez 2013; Martínez-Rocha, Gamboa-Delgado, Nieto-López, Ricque-Marie & Cruz-Suárez 2013). However, the appropriated use of this tool requires a careful validation of $\Delta^{15}\text{N}$ and t_{50} values in *L. vannamei* and other CAFO species allows us (1) to estimate the temporal relationship between an organism's isotope ratio and its diet and (2) to analyse the variations of food availability or preferences along a culture cycle. In our controlled feeding experiments reveal, the whiteleg shrimp is a diet sensitive species, as indicated by the effects of food quantity (feeding rate) and quality (in terms of C:N) on growth and metabolic processes (Jomori *et al.* 2008; Gamboa-Delgado & Le Vay 2009a). Results also show metabolic changes related to size, diet changes that can significantly affect t_{50}

and $\Delta^{15}\text{N}$ values. This knowledge is critical in nutrition studies to avoid unsubstantiated interpretation of isotopic data that results in ambiguous conclusions.

Acknowledgments

The authors would like to thank the directives and personnel of Granja Aquastrat for their support in this research, we would also like to thank H. Bójorquez-Leyva, S. Rendón-Rodríguez, J. Salgado-Barragán and A. Nuñez-Pastén for their invaluable assistance in the field and laboratory work, and V. Montes for its logistic support during this project and Y. Montaña-Ley, S. Soto-Morales and E. Jaffer for their help in the preparation of this manuscript. We thank the editor and anonymous reviewers for their constructive comments, which helped us to improve the manuscript. Financial support was provided by the grant SEP-CONACYT 60215.

References

- Adams S.A. & Sterner R.W. (2000) The effect of dietary nitrogen content on trophic level ^{15}N enrichment. *Limnology and Oceanography* **45**, 601–607.
- Al-Maslamani I., Le Vay L. & Kennedy H. (2009) Feeding on intertidal microbial mats by postlarval tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Marine Biology* **156**, 2001–2009.
- Amezcuca F. & Soto-Jiménez M.F. (2014) Current state of aquaculture in México. *Fisheries*, **39**, 455–555.
- Bojórquez-Mascareño E.I. & Soto-Jiménez M.F. (2013) Effects of natural diet on growth on white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under experimental mesocosms emulating an intensive culture system. *Journal of Aquaculture Research Development* **4**, 163.
- Burnham K.P. & Anderson D.R. (2002) *Model Selection and Inference: A Practical Information-Theoretic Approach* (2nd edn). Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Cabana G. & Rasmussen J.B. (1996) Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proceeding National Academy Science* **93**, 10844–10847.
- Caut S., Angulo E. & Courchamp F. (2009) Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *Journal of Applied Ecology* **46**, 443–453.
- 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 *Allorchestis compressa*. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* **349**, 370–377.
- De Niro M.J. & Epstein S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**, 495–506.
- DeNiro M.J. & Epstein S. (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**, 341–351.
- Fantle M.S., Dittel A.I., Schwalm S.M., Epifanio C.E. & Fogel M.L. (1999) A food web analysis of the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia* **120**, 416–426.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2012) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome.
- 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. & Le Vay L. (2009a) Artemia replacement in cofeeding 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. & Le Vay L. (2009b) Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fishmeal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture* **291**, 115–123.
- Gamboa-Delgado J., Cañavate J.P., Zerolo 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.
- Gamboa-Delgado J., Peña-Rodríguez A., Ricque-Marie D. & Cruz-Suárez L.E. (2011) Assessment of nutrient allocation and metabolic turnover rate in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* co-fed live macroalgae *Ulva clathrata* and inert feed: dual stable isotope analysis. *Journal of Shellfish Research* **30**, 969–978.
- Gamboa-Delgado J., Rojas-Casas M.G., Nieto-López M.G. & Cruz-Suárez L.E. (2012) Simultaneous estimation of the nutrition contribution of fish meal, soy protein isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using dual stable isotope analysis. *Aquaculture* **380–383**, 33–40.
- Gannes L.Z., O'Brien D.M. & Martínez del Rio C. (1997) Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* **78**, 1271–1276.
- Gaye-Siessegger J., Focken U., Muetzel S., Abel H. & Becker K. (2004) Feeding level and individual metabolic rate affect $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* **138**, 175–183.
- Hays G.C., Adams C.R., Broderick A.C., Godley B.J., Lucas D.J., Metcalfe J.D. & Prior A.A. (2000) The diving behavior of green turtles at Ascension Island. *Animal Behaviors* **59**, 577–586.
- Herzka S.Z. (2005) Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ratio analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **64**, 58–69.

- 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.
- Hesslein R.H., Hallard K.A. & Ramlal P. (1993) Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad white fish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N . *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 2071–2076.
- Hobson K.A. & Clark R.G. (1992) Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of ^{13}C in tissues. *Condor* **94**, 181–188.
- Hobson K.A., Alisauskas R.T. & Clark R.G. (1993) Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analysis of diet. *Condor* **95**, 388–394.
- Houlihan D.F. (1991) Protein turnover in ectotherms and its relationship to energetics. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Vol. 7 (ed. by R. Gilles), pp. 1–43. Springer-Verlag, Berlin.
- 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.
- Kelly J.F. (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology* **78**, 1–27.
- Kusher D.I., Smith S.E. & Cailliet G.M. (1992) Validated age and growth of the leopard shark, *Triakis semifasciata*, with comments on reproduction. *Environmental Biology Fishes* **35**, 187–203.
- Le Vay L. & Gamboa-Delgado J. (2011) Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture* **315**, 95–103.
- Lyndon A.R., Houlihan D.F. & Hall S.J. (1992) The effect of short term fasting and a single meal on protein synthesis and oxygen consumption in cod, *Gadus morhua*. *Journal Comparative Physiology B* **162**, 209–215.
- Macko S.A., Fogel E.M.L., Engel M.H. & Hare P.E. (1986) Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **50**, 2143–2146.
- Madigan D.J., Litvin S.Y., Popp B.N., Carlisle A.B., Farwell C.J. & Block B.A. (2012) Tissue turnover rates and isotopic trophic discrimination factors in the endothermic teleost, Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *PLoS ONE* **7**, e49220.
- Malpica-Cruz L., Herzka S.Z., Sosa-Nishizaki O. & Lazo J.P. (2012) Tissue-specific isotope trophic discrimination factors and turnover rates in a marine elasmobranch: empirical and modeling results. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **69**, 551–564.
- Martínez del Rio C. & Wolf B.O. (2005) Mass-balance models for animal isotopic ecology. In: *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates* (ed. by J.M. Starck & T. Wang), pp. 141–174. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Martínez del Rio C., Wolf N., Carleton S.A. & Gannes L.Z. (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews* **84**, 91–111.
- Martínez-Rocha L., Gamboa-Delgado J., Nieto-López M., Ricque-Marie D. & Cruz-Suárez L.E. (2013) Incorporation of dietary nitrogen from fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low protein compound diets. *Aquaculture Research* **44**, 847–859.
- McCutchan J.H., Lewis W.M., Kendall C. & McGrath C.C. (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* **102**, 378–390.
- Mente E., Coutteau P., Houlihan D.F., Davidson I. & Sorgeloos P. (2002) Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology* **205**, 3107–3122.
- Minagawa M. & Wada E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**, 1135–1140.
- Olive P.J.W., Pinnegar J.K., Polunin N.V.C., Richards G. & Welch R. (2003) Isotope trophic-step fractionation: a dynamic equilibrium model. *Journal of Animal Ecology* **72**, 608–617.
- Overman N.C. & Parrish D.L. (2001) Stable isotope composition of walleye: $\delta^{15}\text{N}$ accumulation with age and area-specific differences in $\delta^{13}\text{C}$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**, 1253–1260.
- Owen S.F., McCarthy I.D., Watt P.W., Ladero V., Sanchez J.A., Houlihan D.F. & Rennie M.J. (1999) In vivo rates of protein synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts measured using a single flooding dose injection of ^{15}N -phe. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**, 87–94.
- Páez-Osuna F., Gracia A., Flores-Verdugo F., Lyle-Fritch L.P., Alonso-Rodríguez R., Roque A. & Ruiz-Fernández A.C. (2003) Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 806–815.
- Pearson S.F., Levey D.J., Greenberg C.H. & Martínez 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.
- Perga M. & Grey J. (2010) Laboratory measures of isotopic discrimination factors: comments on Caut, Angulo & Couchamp (2008, 2009). *Journal of Applied Ecology* **47**, 942–947.
- Peterson B.J. & Fry B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecological Systems* **18**, 293–320.

- Ponsard S. & Ardití R. (2000) What can stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) tell about the food web of soil macro-invertebrates? *Ecology* **81**, 852–864.
- Post D.M. (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* **83**, 703–718.
- Post D.M., Pace M.L. & Hairston N.G. (2000) Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature* **405**, 1047–1049.
- Robbins C., Felicetti L. & Sponheimer M. (2005) The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* **144**, 534–540.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., LePriol Y., Pascual C., Rossignol J., Contreras F., Sánchez A. & van Wormhoudt A. (2001) Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **259**, 1–22.
- Rosas C., Cuzon G., Taboada G., Pascual C., Gaxiola G. & van Wormhoudt A. (2001) Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea; Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research* **32**, 1–20.
- 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.
- Schwamborn R., Ekau W., Voss M. & Saint-Paul U. (2002) How important are mangroves as a carbon source for decapod crustacean larvae in a tropical estuary? *Marine Ecology Progress Series* **229**, 195–205.
- 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.
- Vander Zanden M.J. & Rasmussen J.B. (2001) Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: implications for aquatic food web studies. *Limnology & Oceanography* **46**, 2061–2066.
- Vanderklift M.A. & Ponsard S. (2003) Sources of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* **136**, 169–182.
- Waddington K. & MacArthur L. (2008) Diet quality and muscle tissue location influence consumer–diet discrimination in captive-reared rock lobsters (*Panulirus cygnus*). *Marine Biology* **154**, 569–576.
- Wolfe R.R. & Chinkes D.L. (2005) *Isotope Tracers Metabolic Research: Principles and Practice of Kinetic Analysis* (2nd edn). Wiley-Liss, Hoboken, NJ, USA.
- 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.
- Zar J.H. (2010) *Biostatistical Analysis* (5th edn). Pearson Education, Upper Saddle River, NJ, USA. ISBN 978-0131008465.