

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudio de la variabilidad de $\delta^{15}\text{N}$ en aminoácidos de productores primarios: implicaciones en ecología trófica de ecosistemas acuáticos

Estudo da variabilidade de $\delta^{15}\text{N}$ en aminoácidos de produtores primarios: implicacións en ecoloxía trófica de ecosistemas acuáticos

Study of $\delta^{15}\text{N}$ variability in amino acids of primary producers: implications in trophic ecology of aquatic ecosystems

Rocío M^a González Pico

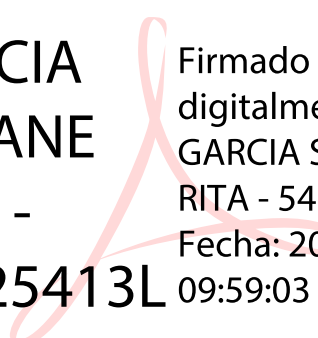
Curso: 2021-2022. Convocatoria: xullo

Directora 1: Rita García Seoane

Directora 2: Nuria Fernández Rodríguez

Las directoras académicas Rita García Seoane y Nuria Fernández Rodríguez autorizamos la defensa del siguiente TFG realizado por la alumna Rocío María González Pico.

GARCIA
SEOANE
RITA -
54125413L



Firmado
digitalmente por
GARCIA SEOANE
RITA - 54125413L
Fecha: 2022.07.08
09:59:03 +02'00'

Rita García Seoane

Nuria Fernández Rodríguez

A Coruña, 8 de julio de 2022.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	1
Palabras clave.....	2
1. Introducción.....	3
2. Objetivos.....	6
3. Material y métodos.....	6
3.1. Búsqueda bibliográfica.....	6
3.2. Recopilación de datos.....	7
3.3. Análisis estadístico.....	7
4. Resultados.....	9
5. Discusión.....	16
6.a. Conclusiones.....	20
6.b. Conclusions.....	21
7. Bibliografía.....	22
ANEXO I.....	25

RESUMEN

El análisis de $\delta^{15}\text{N}$ en aminoácidos (CSIA-AA) se está convirtiendo en una herramienta cada vez más útil para investigar las fuentes de nitrógeno de los productores primarios en la base de la cadena trófica y su destino en ecosistemas acuáticos. Esta técnica también ha emergido como una vía alternativa para estimar la posición trófica de los consumidores a lo largo de la cadena trófica. Sin embargo, aunque es una técnica prometedora, ciertas cuestiones metodológicas todavía se encuentran en discusión. El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica y un meta-análisis a partir de estudios que emplean la técnica CSIA-AA en productores primarios de ambientes acuáticos y terrestres, con la finalidad de aportar mejoras a los métodos de estimación de las fuentes de nitrógeno en las cadenas tróficas y poder evaluar de manera más precisa la posición trófica (PT) de los organismos consumidores. Los resultados indican que la mayoría de datos proceden de muestras experimentales de productores primarios vasculares, siendo Ácido glutámico + Glutamina (Glx) y Fenilalanina (Phe) los aminoácidos (AA) más frecuentemente analizados y utilizados para estimar PT. Además, se vio que los valores $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ son más elevados en productores primarios vasculares, y que los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ se correlacionan de forma positiva en los cuatro grupos individuales de productores (fitoplancton, macroalgas, plantas vasculares terrestres y acuáticas), siendo el ajuste mejor en los grupos no vasculares. También se vio que las huellas dactilares isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ de AA y los valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$, sirven para diferenciar grupos de productores primarios en función de su grado de vascularización. Concluimos que, en ecología trófica, sería más correcto hacer una diferenciación en dos grandes grupos de productores primarios según su grado de vascularización (vasculares y no vasculares), en lugar de en cuatro grupos independientes.

ABSTRACT

The analysis of $\delta^{15}\text{N}$ in amino acids (CSIA-AA) is becoming an increasingly useful tool for investigating the nitrogen sources of primary producers at the base of the food webs and their fate in aquatic ecosystems. This technique has also emerged as an alternative way to estimate the trophic position of consumers along the food webs. However, although it is a promising technique, certain methodological issues are still under discussion. The objective of this work is to carry out a bibliographic review and a meta-analysis based on studies that use the CSIA-AA technique in primary producers of aquatic

and terrestrial environments, with the purpose of contributing improvements to the estimation methods of nitrogen sources in food webs and to more accurately assess the trophic position (TP) of consumer organisms. The results indicate that most of the data come from experimental samples of vascular primary producers, being Glutamic Acid + Glutamine (Glx) and Phenylalanine (Phe) the amino acids (AA) most frequently analyzed and used to estimate TP. In addition, it was also seen that the $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ values are higher in primary vascular producers and that the values of $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ are positively correlated in the four individual groups of producers (phytoplankton, macroalgae, terrestrial and aquatic vascular plants), with the better fit in non-vascular groups. It was also found that AA $\delta^{15}\text{N}$ isotopic fingerprints and $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ values serve to differentiate groups of primary producers based on their degree of vascularization. We conclude that, in trophic ecology, it would be more correct to differentiate into two large groups of primary producers according to their degree of vascularization (vascular and non-vascular), instead of four independent groups.

PALABRAS CLAVE

aminoácidos; compound-specific isotope analysis; ecología trófica; isótopos estables de nitrógeno; productores primarios; posición trófica; cadenas tróficas; valores de beta

1. INTRODUCCIÓN

La evaluación de las fuentes de nitrógeno (N) y la estimación de las posiciones tróficas (PT) de los organismos en las cadenas tróficas son útiles para comprender la estructura y función de las comunidades ecológicas (Chikaraishi *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2021). Para estimar las PT en organismos consumidores del medio marino, se han utilizado varios métodos a lo largo del tiempo, los cuales evolucionaron para intentar lograr una estimación más exacta y con menos probabilidades de error. El análisis de contenido estomacal es el método convencional utilizado en estudios de dietas y hábitos alimentarios de organismos marinos, basado en la identificación directa de los alimentos ingeridos. Sin embargo, tiene el problema de que es engañoso porque nos revela solo los alimentos más recientemente ingeridos, y no todo el material dietético es asimilado, por lo que es difícil identificar todas las presas digeridas (Bradley *et al.*, 2015; Xing *et al.*, 2020). Debido a los problemas del análisis de contenido estomacal, se desarrollaron otros métodos más precisos, como el análisis de isótopos estables de N en tejidos completos ($\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$) que, a diferencia del método anterior, permite identificar alimentos ingeridos hace varias semanas (Xing *et al.*, 2020). El análisis de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ es un valor integrado de todas las biomoléculas que contienen N en una muestra, y se ha utilizado para investigar las estructuras de las cadenas tróficas en multitud de estudios ecológicos (Ohkouchi *et al.*, 2017). La composición isotópica del N se ha utilizado ampliamente para identificar las PT de los organismos y el flujo de N en las cadenas tróficas, y así comprender bien las vías energéticas, la depredación y la competencia dentro de los ecosistemas (Nielsen *et al.*, 2015). La PT utilizando $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ se estima generalmente mediante la siguiente ecuación (Chikaraishi *et al.*, 2009):

$$PT(Bulk) = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}(\text{consumidor}) - \delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}(\text{productor})}{\text{TDF}} + 1$$

Donde $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ (consumidor) es el valor de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ de los organismos consumidores, $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ (productor) es el valor de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ de los productores primarios y TDF es el factor de enriquecimiento de $\delta^{15}\text{N}$ con cada nivel trófico ($\sim 3,4\text{‰}$ por nivel trófico).

Sin embargo, el análisis de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ conlleva errores en la estimación de la PT (Chikaraishi *et al.*, 2009; Bradley *et al.*, 2015; McMahon & McCarthy, 2016). Uno de ellos es el asociado con el valor del TDF, ya que con este método se asume que el valor de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ de los organismos y sus tejidos se incrementa un 3,4‰ con cada nivel trófico, pero en realidad este valor varía en función de las distintas especies, fisiología y ecología

trófica (McMahon & McCarthy, 2016). Además, un inconveniente de esta técnica es la necesidad de determinar los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ en los productores primarios basales de la cadena trófica en cuestión. Esto es difícil en muchas ocasiones, por ejemplo, en el caso de los productores de ambientes acuáticos, estos muestran gran variabilidad espacial y temporal en los valores de $\delta^{15}\text{N}$, incluso más de un 10 ‰ de variación en algunos casos (Chikaraishi *et al.*, 2009; McMahon & McCarthy, 2016).

Para evitar estas limitaciones, en los últimos años se ha desarrollado un nuevo método que utiliza el análisis de la composición isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ en aminoácidos (AA) individuales (en inglés, *Compound-specific stable isotope analysis of individual amino acids*, "CSIA-AA"). Los análisis por CSIA-AA, además de proporcionar información sobre el metabolismo del N en los organismos y los ecosistemas, tienen otras muchas aplicaciones, como la estimación de la PT de un amplio número de consumidores del medio acuático y terrestre, la evaluación del origen y transformación de la materia orgánica disuelta y detrítica en aguas y sedimentos marinos, el descubrimiento de patrones de alimentación de especies o el rastreo de la migración animal (Ohkouchi *et al.*, 2017; Ramirez *et al.*, 2021). Esta técnica también nos da información sobre la fisiología y composición bioquímica de un organismo (McCarthy *et al.*, 2013), debido a que el N se encuentra principalmente contenido en las proteínas, que son largas cadenas de AA unidas por enlaces peptídicos (Ohkouchi *et al.*, 2017). Así, este método ha demostrado ser un indicador robusto para rastrear fuentes de energía y estimar la PT de los consumidores marinos (Besser *et al.*, 2022), reflejando una estructura real de las cadenas tróficas en ambientes naturales (Chikaraishi *et al.*, 2010). En este método, las estimaciones de PT se basan en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de AA individuales, teniendo en cuenta el enriquecimiento variable de $\delta^{15}\text{N}$. Así, los AA "tróficos", como Ácido glutámico + Glutamina (Glx), sufren un enriquecimiento de $\delta^{15}\text{N}$ durante la transferencia trófica (hasta un 10‰ por cada nivel trófico), como resultado del fraccionamiento isotópico durante la transaminación metabólica, donde se escinde el enlace C-N (Chikaraishi *et al.*, 2009; Ohkouchi *et al.*, 2017). Sin embargo, los AA "fuente" mantienen sus valores de $\delta^{15}\text{N}$ constantes a lo largo de la cadena trófica, y se cree que experimentan poca o ninguna transaminación en los consumidores (<0,5 ‰ por cada nivel trófico), ya que sus procesos metabólicos dominantes no forman ni escinden enlaces relacionados con el N. Por esta razón, los AA "fuente", como Fenilalanina (Phe) son un indicador directo de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los productores primarios, es decir, de las fuentes en la base de las cadenas tróficas (McCarthy *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2015; Besser *et al.*, 2022). La

mayoría de estudios utilizan Glx y Phe para evaluar la PT debido al enriquecimiento relativamente elevado y constante del $\delta^{15}\text{N}$ en el Glx en relación con la Phe (Ramirez *et al.*, 2021).

En este análisis, la PT de los consumidores se estima utilizando la siguiente fórmula (Chikaraishi *et al.*, 2009):

$$PT(CSIA-AA) = \frac{\delta^{15}\text{N}_{Glx} - \delta^{15}\text{N}_{Phe} - \beta}{TDF} + 1$$

Donde $\delta^{15}\text{N}_{Glx}$ y $\delta^{15}\text{N}_{Phe}$ son los valores en el consumidor, β es la diferencia entre $\delta^{15}\text{N}_{Glx}$ y $\delta^{15}\text{N}_{Phe}$ ($\beta_{Glx-Phe}$) en los productores primarios y TDF es el factor de enriquecimiento de $\delta^{15}\text{N}$ de Glx en relación a Phe con cada nivel trófico. Habitualmente se utilizaron como valores universales: $TDF_{Glx-Phe} = 7,6 \pm 0,9 \text{ ‰}$ y $\beta_{Glx-Phe} = 3,4 \pm 0,9 \text{ ‰}$, en el caso de los productores primarios marinos (no vasculares) (Chikaraishi *et al.*, 2009), mientras que para las plantas vasculares se utilizaron unos valores de $\beta_{Glx-Phe} = -8,4 \pm 1,6 \text{ ‰}$ para C3 y $\beta_{Glx-Phe} = -0,4 \pm 1,7 \text{ ‰}$ para C4 (Chikaraishi *et al.*, 2010).

El método CSIA-AA tiene una mayor precisión y exactitud al estimar la PT en comparación con el $\delta^{15}\text{N}_{Bulk}$, porque permite calcular la PT con una sola muestra de un organismo consumidor basándose en dos de sus AA, en lugar de comparar el valor de $\delta^{15}\text{N}$ en los consumidores con el de los productores primarios. Por esta razón, cada vez es más frecuente el uso de este método en estudios ecológicos (Nielsen *et al.*, 2015; Ohkouchi *et al.*, 2017).

Sin embargo, uno de los problemas del método CSIA-AA, es la no universalidad de los valores de β en los productores primarios. Como se ha demostrado en un estudio reciente (Ramirez *et al.*, 2021) estos valores varían, por ejemplo, entre el fitoplancton marino (no vascular) y las plantas terrestres C3 y C4 (vasculares). Probándose así que, esas grandes variaciones entre grupos taxonómicos dependen del grado de vascularización y no del tipo de hábitat (terrestre o acuático). Dentro de las plantas vasculares, se cree que la variación del valor β se debe fundamentalmente al AA Phe, que es un precursor de muchos metabolitos secundarios y compuestos estructurales como la lignina (Ramirez *et al.*, 2021; Besser *et al.*, 2022).

Por otra parte, el análisis de isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ en AA, también se utiliza para entender la estructura y dinámica de las cadenas tróficas. Esta técnica emplea una clasificación para los AA diferente, clasificándolos en "esenciales" y "no esenciales" (Besser *et al.*, 2022).

A partir de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de AA se pueden crear huellas dactilares isotópicas que permiten distinguir grupos específicos de productores primarios (Larsen *et al.*, 2022), como plantas C3, C4, CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*) y algas verdes filamentosas, trazando así diferencias entre productores terrestres y de agua dulce (Besser *et al.*, 2022). McCarthy *et al.* (2013) también demostraron que los productores primarios pueden ser diferenciados por sus huellas dactilares isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ de sus AA. Este es el primer estudio que ha examinado el potencial trazador de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de AA, obteniendo una separación significativa de dos grupos de fitoplancton (cianobacterias y microalgas eucariotas). La aplicación de las huellas dactilares isotópicas en AA ha permitido investigar el flujo de energía, la conectividad y la estructura de la red trófica en ecosistemas marinos. Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio ha caracterizado a los productores primarios acuáticos y terrestres utilizando huellas dactilares de $\delta^{15}\text{N}$.

En relación con las estimas de PT en organismos consumidores, los productores primarios son la “línea de base” de las cadenas tróficas y su análisis es fundamental para obtener, a partir de sus valores de $\delta^{15}\text{N}$ de AA, los valores de β (Ramirez *et al.*, 2021; Besser *et al.*, 2022). Además, entender los patrones de $\delta^{15}\text{N}$ de AA en los productores primarios es fundamental para el desarrollo de nuevas aplicaciones en ecología, por ejemplo, para estudiar variaciones temporales en las fuentes de N, entender los flujos de N desde los productores primarios a los consumidores, averiguar la importancia de los distintos grupos de productores en la producción primaria global, etc. (McCarthy *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene por objetivo realizar una revisión bibliográfica y un meta-análisis a partir de los datos encontrados en la literatura científica que emplea la técnica CSIA-AA en productores primarios de ambientes acuáticos y terrestres, con la finalidad de aportar mejoras a los métodos de estimación de las fuentes de nitrógeno en las cadenas tróficas y poder evaluar de manera más precisa la PT de los organismos consumidores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica el día 10 de noviembre de 2021 en la base de datos Scopus (<https://www.scopus.com/>), con el fin de obtener resultados de $\delta^{15}\text{N}$ de AA individuales en distintos grupos de productores primarios vasculares (plantas) y no vasculares (fitoplancton y macroalgas).

A la hora de realizar la búsqueda, se introdujeron como palabras clave: "isotope" and "nitrogen" or "amino acids" and "trophic levels" or "food web" and "csia-aa" or "bulk" or "trophic discrimination factor", obteniendo así 264 resultados. A continuación, se llevó a cabo un cribado manual de los artículos, teniendo en cuenta los títulos y resúmenes de los mismos. Finalmente, se seleccionaron 27 de esos artículos (ver ANEXO I), de los cuales se recopilieron todos los datos y se elaboró una tabla con datos de productores primarios, tanto acuáticos como terrestres.

3.2. Recopilación de datos

Para cubrir la tabla con los datos de productores primarios, dentro de cada artículo se seleccionaron los datos de valores de AA "tróficos" (Asx: Ácido aspártico + Asparagina; Ala: Alanina; Glx: Ácido glutámico + Glutamina; Ile: Isoleucina; Leu: Leucina; Pro: Prolina y Val: Valina) y "fuente" (Gly: Glicina; Phe: Fenilalanina; Lys: Lisina; Ser: Serina; Met: Metionina; His: Histidina; Arg: Arginina; Tyr: Tirosina y Thr: Treonina). También se seleccionaron datos de hábitat (marino, terrestre o agua dulce), región, grado vascularización, taxón, clase, especie, sistema de crecimiento (cultivo o naturaleza), valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ y valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$. Todos los valores de $\delta^{15}\text{N}$ se expresaron en ‰ (peso seco).

Cuando en el propio artículo no estaban disponibles los datos en tablas o en el texto, pero si aparecían en figuras, como en el caso de Ostle *et al.* (1999) y Smallwood *et al.* (2003), para poder extraer los datos de las figuras se utilizó el software Digitizeit (<https://www.digitizeit.xyz/es/>).

Además, para obtener información sobre el grado de vascularización y la clase de determinadas especies se utilizaron las bases de datos globales AlgaeBase (<https://www.algaebase.org/>), WoRMS taxonomy (<https://www.marinespecies.org/>) y The

Plant List (<https://www.theplantlist.org/>). Estas bases de datos fueron consultadas los días 12 y 17 de enero de 2022.

3.3. Análisis estadístico

En todos los análisis y test realizados en este trabajo se empleó el software informático R versión 4.2.0 (R Core Team, 2022), utilizando para cada caso distintos paquetes específicos, citados a continuación.

Para comprobar que el conjunto de datos formado por las $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ de productores primarios vasculares (plantas terrestres y acuáticas) y no vasculares (macroalgas y fitoplancton) se ajustaban a una distribución normal, se utilizó la prueba Lilliefors, basada en el test estadístico de ajuste a la distribución normal Kolmogorov-Smirnov, puesto que $n > 50$ (Universitat de Barcelona, s.f.). Para ello se usó la función *lillie.test* en el paquete de R nortest, versión 1.0.4 (Gross & Ligges, 2015). Una vez se comprobó que los datos seguían una distribución normal, se realizó un test estadístico paramétrico del análisis de la varianza (ANOVA), para poder determinar si existían diferencias significativas entre las $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ de productores primarios vasculares y no vasculares. Para realizar el test ANOVA en R se empleó la función *aov*, usando los paquetes Rapport, versión 1.1 (Blagotic & Daróczy, 2022) y car, versión 3.0.13 (Fox & Weisberg, 2019).

Para comparar los valores de Phe entre los distintos grupos de productores primarios se utilizaron diagramas de cajas (box-plots). Los box-plots se obtuvieron a partir de 335 registros de valores de Phe, a los que previamente se le detectaron los valores atípicos, definidos como los valores que distan 1,5 veces el rango intercuartílico por debajo del cuartil más bajo (Q1) o 1,5 veces el rango intercuartílico por encima del cuartil más alto (Q3). A continuación, se repitió el análisis con box-plots, pero eliminando los valores atípicos detectados en R anteriormente. Las diferencias entre los valores de Phe para los cuatro grupos se estudiaron mediante la prueba de Tukey, basada en el test ANOVA, utilizando la función *TukeyHSD*.

Para realizar el gráfico de los box-plots y la detección de los valores atípicos con R se usó la función *boxplot*, con el paquete ggplot2, versión 3.3.6 (Wickham, 2016). Mientras que para poder realizar la prueba de Tukey, primero se llevó a cabo un test ANOVA para estudiar la existencia de diferencias significativas entre grupos, donde se empleó la función *aov*, usando los paquetes Rapport, versión 1.1 (Blagotic & Daróczy, 2022) y car, versión 3.0.13 (Fox & Weisberg, 2019).

La correlación existente entre $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ en los cuatro grupos principales de productores primarios se utilizó para poder estudiar de forma individual las diferencias entre grupos, y se representó mediante regresiones lineales. En las regresiones, R^2 es el coeficiente de determinación que va a predecir si el ajuste lineal es correcto o no. Cuando más se aproxima R^2 a 1, mayor es el ajuste del modelo. La significación de las regresiones lineales se estudió utilizando la función *lm*, usando los paquetes *car*, versión 3.0.13 (Fox & Weisberg, 2019) y *boot*, versión 1.3.28 (Canty & Ripley, 2021).

Para poder estudiar las diferencias entre las huellas dactilares isotópicas de los 4 grupos de productores primarios se realizó un análisis discriminante lineal (LDA), usando los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los siguientes AA: Ala, Glx, Ile, Leu y Val, normalizados a Phe. La normalización con Phe se hace con el fin de eliminar la posible influencia de la fuente de N en cada muestra, ya que Phe es considerado el AA fuente mejor indicador de las fuentes en la cadena trófica (Chikaraishi *et. al*, 2009), por lo que de esta forma podríamos interpretar las diferencias entre grupos de manera más clara. Además, no hay datos de $\delta^{15}\text{N}$ de todos los registros incluidos en la tabla y, puesto que se necesita representación en todos los grupos de AA, se eliminaron datos de algunos registros. Todo esto se hace para intentar maximizar el número de datos de la tabla y lograr que los resultados del LDA sean más robustos, intentando perder el número mínimo de registros y utilizando el mayor número posible de AA. Finalmente nos quedamos solo con cinco AA (Ala, Glx, Ile, Leu y Val) normalizados a Phe, empleando un total de 1055 datos (211 por cada AA).

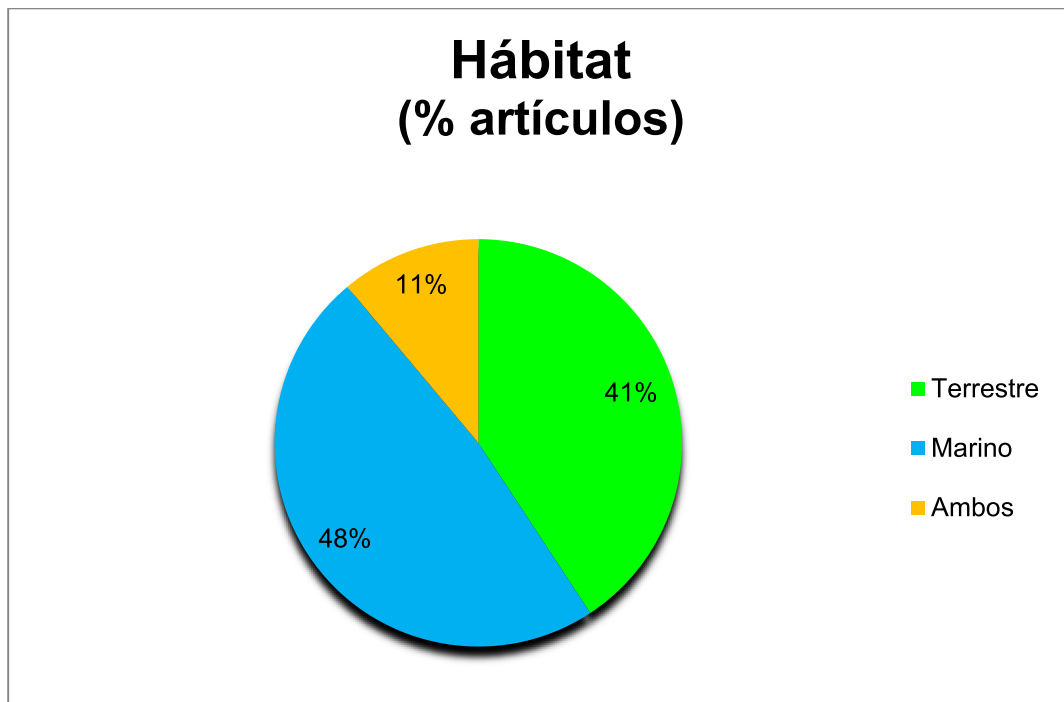
Al realizar el análisis LDA en R la función empleada fue *lda*, dentro del paquete MASS, versión 7.3.57 (Venables & Ripley, 2002). Para graficar los resultados del LDA se empleó el paquete *ggplot2*, versión 3.3.6 (Wickham, 2016) y se añadieron las elipses del 95% con el paquete *ellipse*, versión 0.4.2 (Murdoch & Chow, 2020).

4. RESULTADOS

Al revisar los 27 artículos empleados en este trabajo, se observó que en la mayoría de los trabajos se usaron muestras de productores primarios pertenecientes al hábitat marino (48%), otra gran parte al terrestre (41%) y en pocos casos el mismo trabajo combinaba muestras de ambos hábitats (11%) (Figura 1A). Respecto al sistema de crecimiento de las muestras (Figura 1B), la mayoría (74%) fueron cultivadas en laboratorio (en el caso de las muestras marinas y acuáticas) y en parcelas con condiciones ambientales controladas (en el caso de las muestras terrestres). Otra parte

de las muestras fueron recolectadas en el medio natural (19%), mientras que varios artículos utilizaron muestras con ambos sistemas de crecimiento (7%).

A)



B)

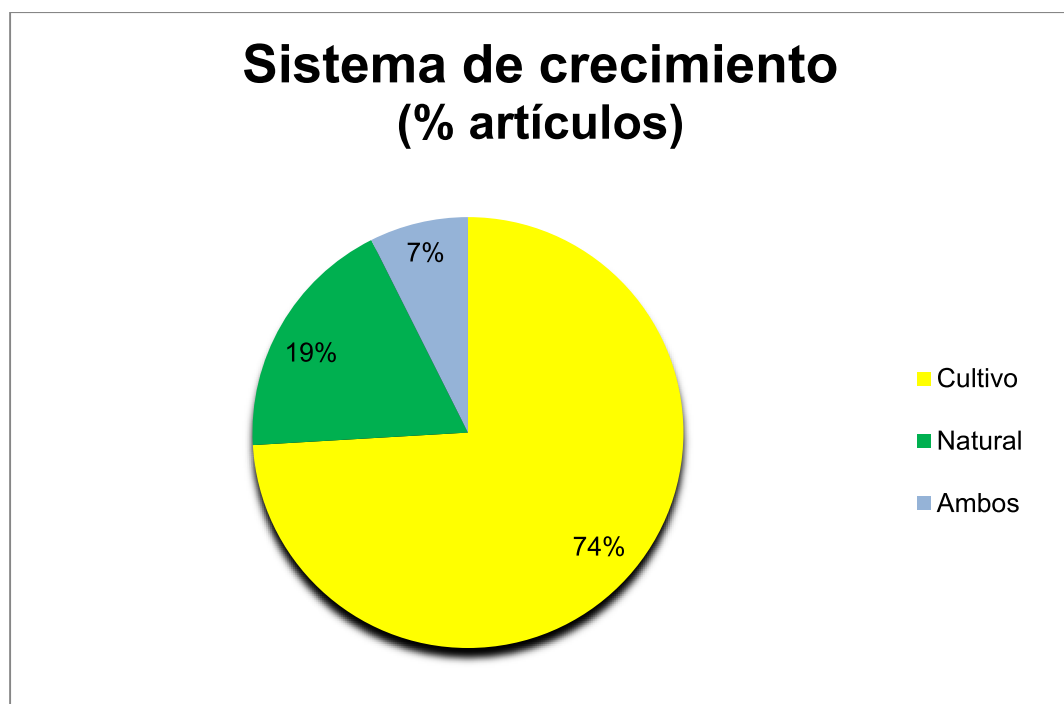


Figura 1. Representación en porcentajes (%) de los artículos revisados (n=27), separados en función del tipo de hábitat al que pertenecen las muestras estudiadas en cada artículo: terrestre,

marino o ambos (A), y según el sistema de crecimiento de esas muestras: cultivo, natural o ambos (B).

En total, se recopilaron 335 registros de productores primarios, que comprenden cuatro grandes grupos (Tabla 1), vasculares (plantas terrestres y acuáticas) y no vasculares (fitoplancton y macroalgas). Dentro del grupo de productores no vasculares, la mayoría de registros pertenecen a muestras de fitoplancton (83), que en un 52% de los casos fueron cultivadas en laboratorio. Existen menos datos de macroalgas (solo 17), donde la mayoría son algas verdes. En el caso del grupo de vasculares, la mayor parte de los datos que se encuentran en la literatura pertenecen a plantas terrestres (209), principalmente plantas C3. En cuanto a las vasculares acuáticas (26), la mayoría de registros son de muestras de manglares.

Tabla 1. Número de registros (N) de cada grupo de los cuatro productores primarios (fitoplancton, macroalgas, plantas vasculares terrestres y acuáticas), recogidos en la base de datos elaborada tras la revisión de 27 artículos. ND: información no disponible.

Taxones	Grupos	N	N (Total)
Fitoplancton	Dinoflagelados	8	83
	Diatomeas	3	
	Cianobacterias	10	
	Clorófitas (algas verdes)	11	
	Perifiton	32	
	ND	19	
Macroalgas	Algas verdes	9	17
	Algas pardas	5	
	Algas rojas	3	
Vasculares terrestres	C3	200	209
	C4	9	
Vasculares acuáticas	Manglares	14	26
	Fanerógamas marinas	5	
	Hidrófitas	7	
			335

En cuanto a los AA más analizados en la literatura revisada (Figura 2), hay dos que destacan considerablemente, estos son Glx y Phe. Ambos fueron analizados en más del 95% de los estudios revisados, seguidos de Leu, Ala, Val, Gly y Pro por encima del 70%,

Ile por encima del 65%, Ser por encima del 50%, y el resto de AA (Asx, Thr, Lys, Tyr, Met, Arg e His) por debajo del 50% de los estudios revisados.

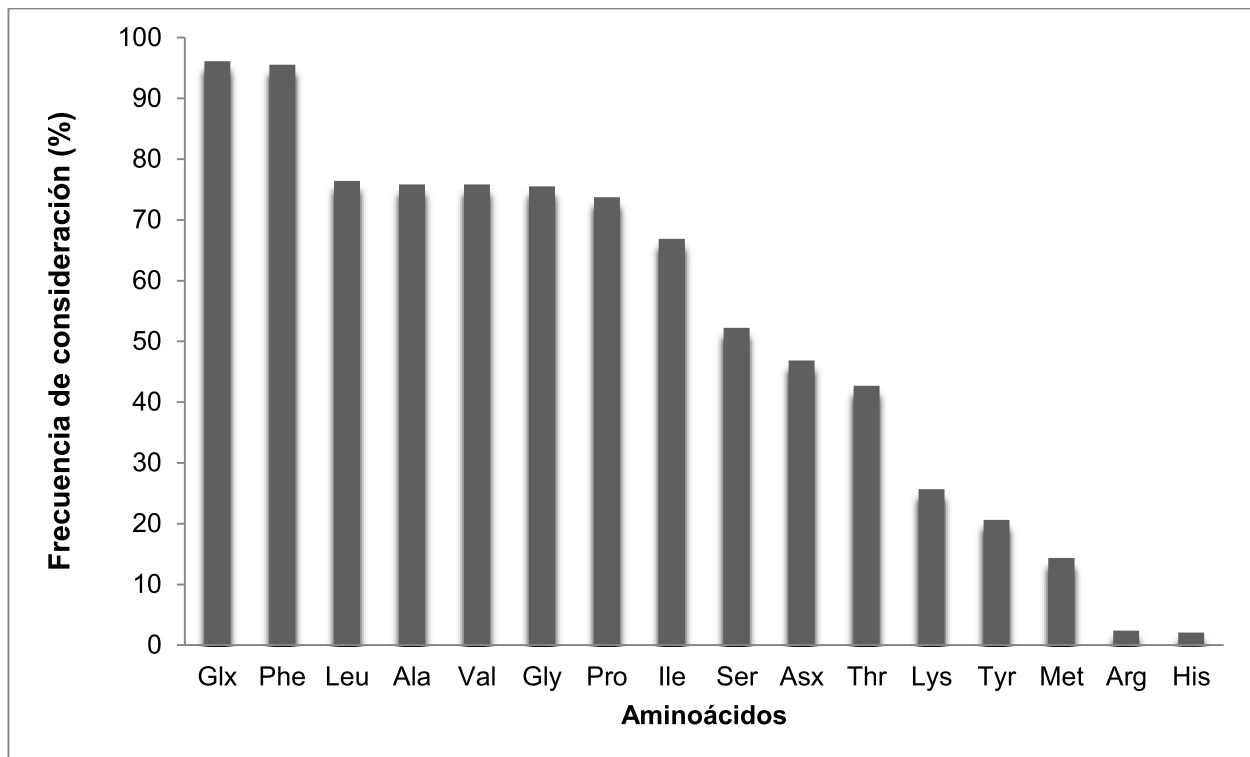


Figura 2. Frecuencia de consideración (% de aparición respecto a todos los artículos revisados, n=27) de los diferentes aminoácidos (AA) en estudios ecológicos. Abreviaturas de los AA: Glx: Ácido glutámico + Glutamina / Phe: Fenilalanina / Leu: Leucina / Ala: Alanina / Val: Valina / Gly: Glicina / Pro: Prolina / Ile: Isoleucina / Ser: Serina / Asx: Ácido aspártico + Asparagina / Thr: Treonina / Lys: Lisina / Tyr: Tirosina / Met: Metionina / Arg: Arginina / His: Histidina.

Las diferencias observadas en los box-plots de los cuatro grupos de productores primarios (Figura 3), mostraron que los grupos de plantas vasculares (acuáticas y terrestres) tienen valores más altos de Phe, en comparación con las no vasculares (fitoplancton y macroalgas). Además, si se compara el grupo de las macroalgas con del fitoplancton, podemos ver que estas tienen valores más altos de Phe y menor variabilidad, puesto que los bigotes del diagrama son más cortos y los valores se alejaron más de la mediana (el valor de su mediana es 4,10 ‰, frente al 0,65 ‰ del grupo de fitoplancton). Si se compara el grupo de las plantas vasculares, se puede ver que las acuáticas tienen valores más altos de Phe pero menos variabilidad que las terrestres (la mediana de las acuáticas es 12,8 ‰, mientras que la de las terrestres es 10,1 ‰).

Mediante la prueba de Tukey se concluyó que los valores de Phe son significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre los grupos de productores vasculares (acuáticas y terrestres) y

no vasculares (fitoplancton y macroalgas). Por otro lado, al comparar las plantas vasculares terrestres con las acuáticas, y las macroalgas con el fitoplancton, se obtuvo un $p > 0,05$, concluyéndose que entre estos grupos no existen diferencias significativas (Figura 3).

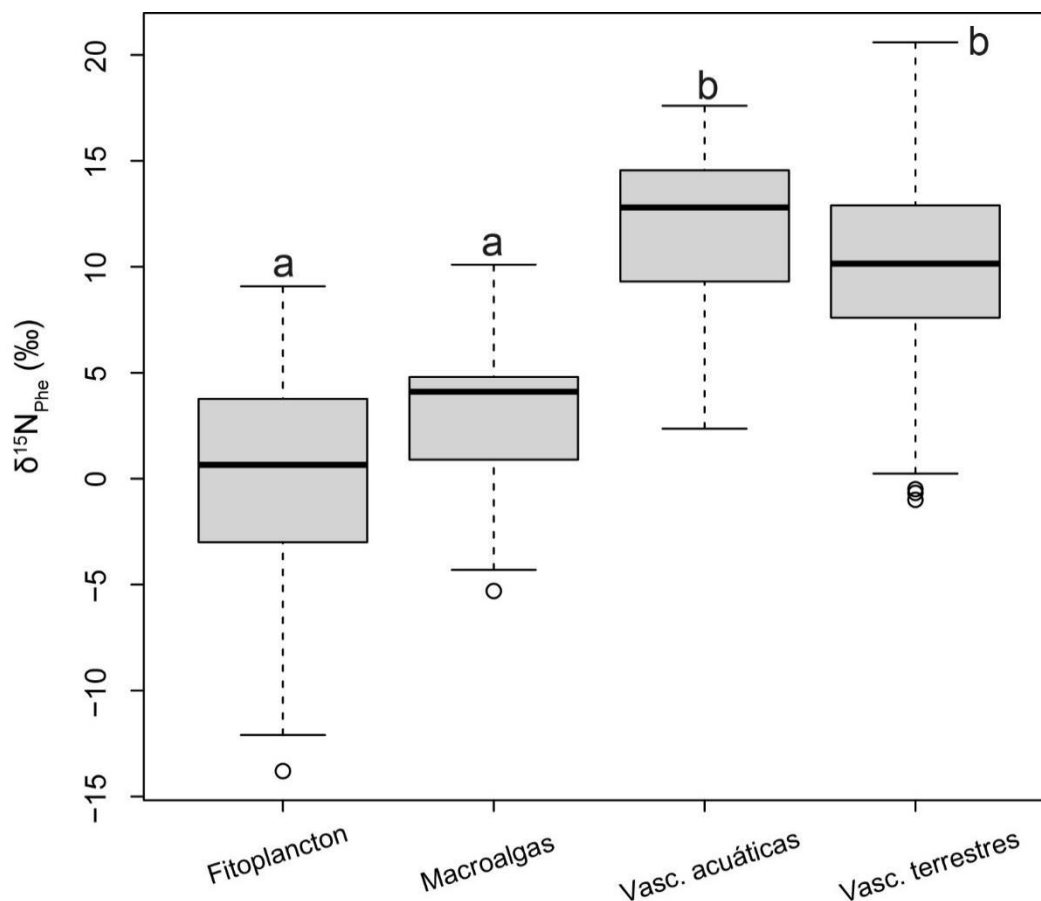


Figura 3. Diagramas de cajas (box-plots) de los valores del aminoácido fenilalanina (Phe), expresados en ‰, en los cuatro grupos de productores primarios evaluados (fitoplancton, macroalgas, plantas vasculares acuáticas y terrestres), $n=335$. Las barras negras representan las medianas y los círculos los valores atípicos. También se proporcionan los valores máximos y mínimos (representados por los bigotes) para cada grupo, así como el cuartil Q1, el cuartil Q2 (mediana) y el cuartil Q3. Las letras (a y b) denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de productores vasculares y no vasculares.

Al estudiar la correlación existente entre el $\delta^{15}N_{Bulk}$ y $\delta^{15}N_{Phe}$ (Figura 4), se puede observar que para los cuatro grupos individuales de productores primarios la correlación es positiva ($R^2 > 0$) y mayor que 0,44 en todos los casos. Además, tras hacer un análisis estadístico de correlación lineal se concluyó que las cuatro correlaciones son significativas ($p < 0,05$). Comparando los valores de R^2 (coeficiente de determinación), también se puede deducir que la correlación más fuerte se observa en los grupos de

macroalgas y fitoplancton, mientras que la más débil, aunque significativa, sería la del grupo de las plantas vasculares terrestres, debido a que es un grupo que muestra gran variabilidad.

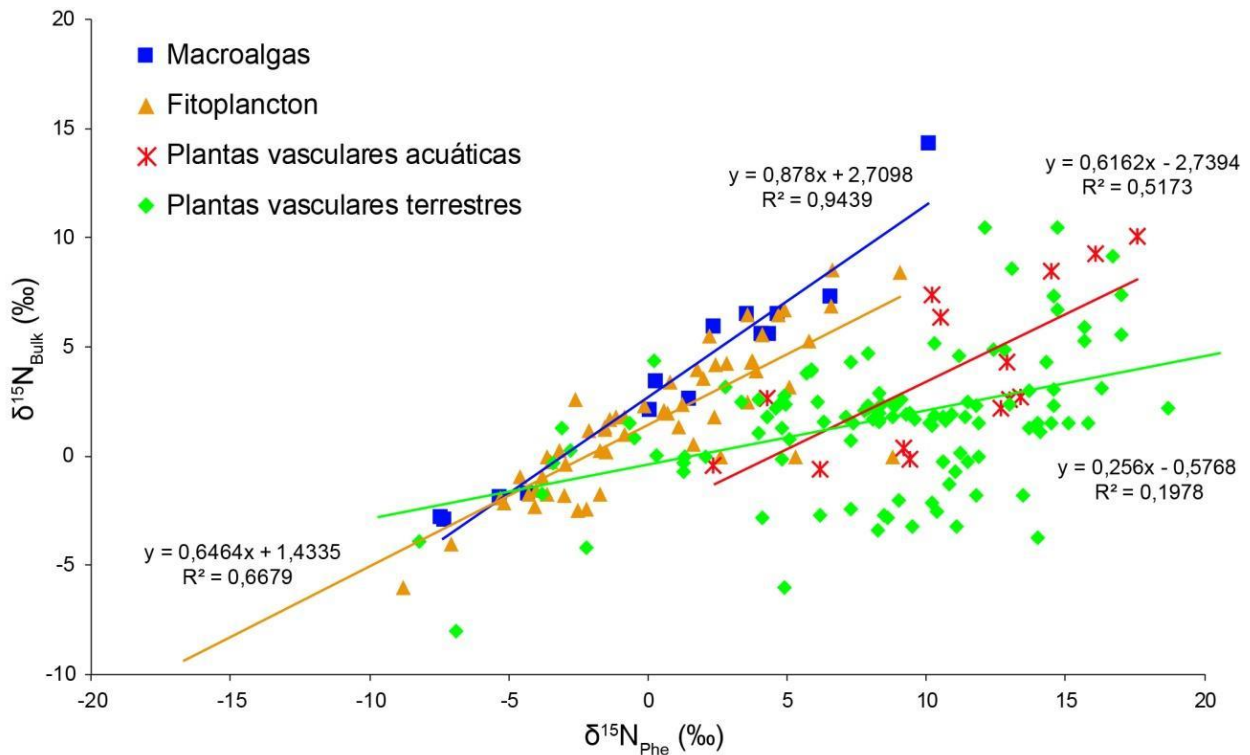


Figura 4. Correlación existente entre $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ (‰) en los cuatro grupos principales de productores primarios (macroalgas, fitoplancton, plantas vasculares acuáticas y terrestres), $n=335$. También se muestran las rectas de las regresiones lineales entre las dos variables, que en este caso fueron todas significativas. En la ecuación $y = mx+b$, m = pendiente y b = intersección en y . R^2 es el coeficiente de determinación. Phe: Fenilalanina

El análisis LDA (Figura 5), también demostró que los patrones de AA son indicadores de los grupos, es decir que permiten distinguir grupos de productores primarios. En el eje x (LD1) se representa el 98% de la variación, por lo que en ese eje se están representando la mayoría de las diferencias entre grupos, marcando así la diferencia respecto al eje y (LD2), donde solo se representa el 2% de la variación. Por lo tanto, es LD1 el que permite separar los productores en grupos de forma considerablemente clara. En esta figura también se observa que las huellas dactilares de fitoplancton y macroalgas (grupos de no vasculares) se solapan. Lo mismo ocurre con las huellas de plantas acuáticas y terrestres (grupos de vasculares). Aunque existe cierto solapamiento entre algunas muestras de fitoplancton y vasculares terrestres, se pueden distinguir claramente dos grupos principales (vasculares y no vasculares).

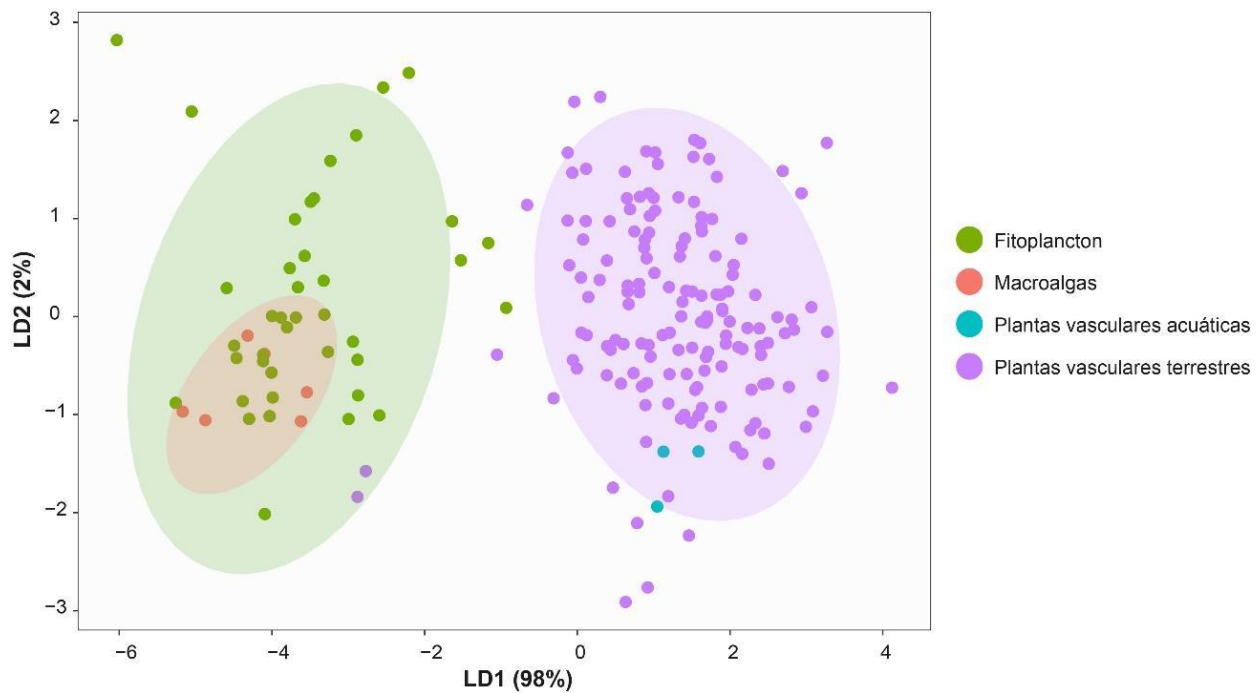


Figura 5. Representación de huellas dactilares isotópicas utilizando los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de aminoácidos (AA) de los cuatro grupos principales de productores primarios (macroalgas, fitoplancton, plantas vasculares acuáticas y terrestres). Esta gráfica representa un análisis discriminante lineal (LDA), realizado usando valores de $\delta^{15}\text{N}$ de cinco AA (Ala, Glx, Ile, Leu y Val) normalizados a Phe (Fenilalanina), $n=211$. Las elipses representan intervalos de confianza del 95% para cada grupo comparado, la ausencia de elipse para las plantas vasculares acuáticas se debe a que no hay un número mínimo de datos para su representación. Abreviaturas de los AA: Ala: Alanina / Glx: Ácido glutámico + Glutamina / Ile: Isoleucina / Leu: Leucina / Val: Valina.

A partir de los valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ de productores vasculares (plantas acuáticas y terrestres) y no vasculares (fitoplancton y macroalgas), se obtuvo la β media (\bar{X}) y desviación típica (SD) de los cuatro grupos de productores. Al estudiar las diferentes β de los cuatro grupos de productores por separado se puede ver que existen grandes diferencias entre los grupos vasculares (plantas acuáticas y terrestres), que sin embargo tienen unas β similares entre ellas ($\beta = -7,92 \pm 0,63 \text{ ‰}$ en acuáticas y $\beta = -6,13 \pm 3,35 \text{ ‰}$ en terrestres), y los no vasculares (fitoplancton y macroalgas), que al igual que en el caso anterior son similares entre ellas ($\beta = 3,49 \pm 0,94 \text{ ‰}$ en macroalgas y $\beta = 3,52 \pm 1,26 \text{ ‰}$ en fitoplancton).

Además, puesto que los datos proceden de una distribución normal ($p > 0,05$), se realizó un test ANOVA para los productores primarios agrupados en vasculares y no vasculares, donde se obtuvo un $p < 0,05$, por lo que podemos afirmar que existen diferencias significativas entre ambas β . El mismo resultado se obtuvo al realizar otro test ANOVA,

donde se analizan los cuatro grupos por separado, mostrándose diferencias significativas entre los grupos de vasculares (acuáticas y terrestres) y los de no vasculares (fitoplancton y macroalgas). Por esta razón, se decidió agrupar los productores vasculares por un lado y los no vasculares por otro, obteniendo como resultados una $\beta = -6,25 \pm 3,28 \text{ ‰}$ (productores primarios vasculares) y una $\beta = 3,51 \pm 1,20 \text{ ‰}$ (productores primarios no vasculares).

5. DISCUSIÓN

En este trabajo la mayoría de muestras proceden de cultivos de laboratorio, como se puede ver en la Figura 1B, especialmente en el caso del fitoplancton, debido a las dificultades que tiene muestrearlo en medios naturales. Lo mismo se observó en el trabajo de Ramirez *et al.* (2021), donde además se vio que el sistema de crecimiento (natural o cultivo) de los productores primarios podría influir en la variación de los valores de β en algunos taxones que dependen de la fuente de N, ya que en los cultivos de laboratorio se crean unas condiciones artificiales muy diferentes a las de los medios naturales. Además, como se muestra en la Tabla 1, más del 70% de las muestras empleadas para medir los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de AA pertenecen a productores primarios vasculares. Esto mismo ocurre en el trabajo de Besser *et al.* (2022), quienes estudiaron el flujo de energía y estimaron PT de consumidores mediante el análisis de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de AA, donde más del 85% de las muestras que recopilaron son también vasculares.

En la Figura 2 se puede ver que los AA más frecuentemente analizados y utilizados para estimar las PT con el método CSIA-AA son Glx y Phe. La utilización de Phe como AA fuente de referencia en la mayoría de estudios se puede deber, como comentó McMahon & McCarthy (2016), a que es el AA que mostró los valores más bajos de fraccionamiento trófico del N en sus procesos metabólicos dominantes, ya que no forma ni escinde enlaces relacionados con el N. Aunque Met también podría ser un buen AA fuente para estimar PT, suele ser menos abundante que Phe, por lo que no se utiliza en la mayoría de estudios (Ramirez *et al.*, 2021). Lo mismo ocurre con His y Arg, que se encuentran en cantidades muy pequeñas, por lo que su análisis en el laboratorio es complicado (Ohkouchi *et al.*, 2017).

Respecto a utilizar Glx como AA trófico de referencia en la mayoría de estudios, esto se puede deber a la gran precisión que tiene en la estimación de PT ya que, como se vio en Chikaraishi *et al.* (2009), su error de estimación (σ) es bajo ($\sigma = 0,12$). Este valor es aproximadamente la mitad que el de otros AA tróficos como Ala ($\sigma = 0,23$), Val ($\sigma = 0,28$),

Ile ($\sigma = 0,24$) o Pro ($\sigma = 0,26$), lo que hace que estos AA sean poco precisos para llevar a cabo la estimación de PT. Según este mismo estudio, otros AA fuente que también conllevarían a estimaciones poco precisas serían Ser ($\sigma = 0,77$) y Gly ($\sigma = 1,05$). Además, también se observó en McMahon & McCarthy (2016) que Gly se ve afectado por la degradación microbiana, que altera su concentración y sus valores de $\delta^{15}\text{N}$, por lo que este AA ya no se podría utilizar en muestras donde la degradación microbiana es importante.

Por lo tanto, todos estos estudios también apoyan la idea de utilizar Glx y Phe como la combinación de AA más eficaz para estimar PT, lo cual explica que sean los AA más frecuentes (Figura 2), analizados en más del 95% de los estudios.

Al observar los box-plots de la Figura 3 se puede ver que existen solo dos grupos que muestran diferencias significativas entre ellos, que serían el de los productores primarios vasculares (formado por plantas acuáticas y terrestres), con valores más altos de Phe, y el de los no vasculares (formado por fitoplancton y macroalgas). Estos resultados son comparables a los obtenidos por Ramirez *et al.* (2021), por lo que al igual que concluyeron estos autores, sería más adecuado hacer una diferenciación en dos grandes grupos (vasculares y no vasculares), en lugar de en cuatro grupos independientes, en estudios de ecología trófica.

En la Figura 3 también vemos que los valores de Phe presentan gran variación en el grupo del fitoplancton y de las plantas vasculares terrestres, ya que sus cajas tienen unos bigotes más largos y valores atípicos. Esto probablemente se debe a que la mayoría de muestras fueron cultivadas en laboratorio (en el caso del fitoplancton) y en parcelas con condiciones ambientales controladas (en el caso de las vasculares terrestres). Por lo tanto, fueron sometidas a unas condiciones drásticas (como suplementos con altos valores de nitrato), lo que podría explicar que los valores de Phe tengan mayor variabilidad y valores más extremos, ya que están recibiendo más N que el disponible en la naturaleza (Besser *et al.*, 2022).

Al observar las correlaciones de la Figura 4 se diferencian de nuevo dos grandes grupos (vasculares y no vasculares). Por un lado, el fitoplancton y las macroalgas (grupo no vascular), ya que sus rectas son casi paralelas y están muy juntas, y por otro lado las plantas acuáticas y terrestres (grupo vascular). En el caso del grupo de las macroalgas se observa que existe poca variabilidad y su recta es la que mejor se ajusta a la gráfica (R^2 alto), por lo que tanto los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ como de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ serían buenos

indicadores de la fuente basal de N en este grupo. Esto seguramente se debe a que la mayoría de muestras son naturales y pertenecen a la misma zona, y a que probablemente la fuente de N de las macroalgas de esa zona es parecida. De esta manera también se confirmaría que existe variación temporal y espacial en los valores de $\delta^{15}\text{N}$, especialmente en productores de ambientes acuáticos (Chikaraishi *et al.*, 2009; McMahon & McCarthy, 2016). Respecto al grupo del fitoplancton, existe más variabilidad que en el caso anterior, ya que la mayoría de muestras pertenecen a cultivos de laboratorio, al igual que en el estudio de Ramirez *et al.* (2021), pero también posee un R^2 elevado. Mientras que, en el caso de las plantas vasculares acuáticas existe gran dispersión de los datos. Esto se puede deber a que hay pocos datos y las muestras pertenecen a grupos muy diferentes (incluyendo plantas marinas y de agua dulce). Por último, en el caso de las plantas vasculares terrestres existe gran dispersión en los datos. Esto se puede deber a que existe un gran número de datos ($n=209$) y a que las muestras pertenecen tanto a cultivos de parcelas con condiciones ambientales controladas como a medios naturales, ya que la fuente de N (indicada por $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$) varía en función del sistema de crecimiento (cultivo o natural) de las muestras, como ya se vio en el trabajo de Ramirez *et al.* (2021).

Por otra parte, las huellas dactilares isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de AA, son de gran utilidad a la hora de separar grupos de productores primarios. Para realizar el análisis LDA de la Figura 5, solo se necesitaron cinco AA normalizados a Phe para conseguir una buena separación de grupos de productores. Como sugirió Ramirez *et al.* (2021), la combinación de análisis de $\delta^{15}\text{N}$ de AA de consumidores con huellas dactilares isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ o $\delta^{13}\text{C}$ de AA puede caracterizar con gran precisión la dinámica de las cadenas tróficas de consumidores modernas e históricas. El problema es que las huellas dactilares isotópicas están poco estudiadas, especialmente en el caso de los productores terrestres y de agua dulce. De hecho, como indica Besser *et al.* (2022), todavía no se ha publicado ningún estudio en estos ambientes utilizando huellas dactilares de $\delta^{15}\text{N}$ de AA. Por lo tanto, las huellas más estudiadas son las de $\delta^{13}\text{C}$, que permiten distinguir grupos específicos de productores primarios (Larsen *et al.*, 2022). Esto se debe a que, a diferencia del $\delta^{15}\text{N}$ de AA, el $\delta^{13}\text{C}$ de AA no sufre enriquecimiento con cada nivel trófico, por lo que no existe la necesidad de aplicar el factor de discriminación trófica (TDF) cuando se estudia, por ejemplo, la dieta de un organismo consumidor. Es por esta razón que existen muy pocos estudios sobre huellas dactilares isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$, siendo McCarthy *et al.* (2013) el único estudio a día de hoy que obtuvo

una separación de productores primarios empleando esta técnica, logrando una separación significativa de dos grupos de fitoplancton (cianobacterias y microalgas eucariotas).

Al observar los valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ de productores vasculares ($\beta = -6,25 \pm 3,28 \text{ ‰}$) y no vasculares ($\beta = 3,51 \pm 1,20 \text{ ‰}$) obtenidos en este meta-análisis, se puede ver que existe una gran diferencia entre ambos grupos. Lo mismo ocurre en el estudio llevado a cabo por Ramirez *et al.* (2021), que obtuvo unos valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ muy similares a estos, siendo su $\beta = -6,6 \pm 3,4 \text{ ‰}$ en productores vasculares y $\beta = 3,3 \pm 1,8 \text{ ‰}$ en no vasculares. Ambos resultados respaldan la idea de que la biosíntesis de lignina es un elemento clave en la variabilidad de β según el grado de vascularización de los productores (Ohkouchi *et al.*, 2017; Kendall *et al.*, 2019), puesto que todas las plantas vasculares producen lignina, y por esta razón van a tener unos valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ (precursor de lignina) más elevados que las no vasculares. Esto también confirmaría la idea de Ramirez *et al.* (2021) de que el tipo de hábitat (terrestre o acuático) no influye en los valores de β , pero si influye el grado de vascularización.

A pesar de que los valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ obtenidos en ambos meta-análisis son similares, el criterio de recolección de datos fue diferente. Por su parte, Ramirez *et al.* (2021) analizaron datos de productores primarios en más trabajos ($n=51$) que en el presente estudio ($n=27$), pero para reducir el sesgo de muestreo de su estudio calcularon un valor medio de β para aquellas muestras de tejidos específicos que pertenecían a la misma especie dentro del mismo estudio. Es decir, aunque partieron de 450 valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ de productores primarios, se quedaron finalmente con 236 valores. Mientras que en el presente trabajo, se utilizó otro criterio para calcular los valores de β , ya que se consideraron todos los valores de β de productores primarios individuales en lugar de hacer medias, obteniendo así valores representativos de la variabilidad real existente en las muestras. Así, partiendo de 27 trabajos, se obtuvieron 211 valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ pertenecientes a los cuatro grupos principales de productores primarios.

Después de constatar que existen dos grandes grupos de productores primarios (vasculares y no vasculares) para los que se han estimado valores significativamente diferentes de Phe y de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$, y que además pueden ser diferenciados utilizando sus huellas dactilares de $\delta^{15}\text{N}$ en AA, una recomendación a tener en cuenta en ecosistemas donde de forma natural conviven ambos tipos de productores (por ejemplo, manglares, praderas de fanerógamas marinas, ríos, etc.), sería utilizar un valor de β_{mix} , como ya han

sugerido varios autores (Ishikawa *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2017; Ramirez *et al.*, 2021), que refleje la mezcla real de productores primarios vasculares y no vasculares de los que se alimentan los consumidores.

6.a. CONCLUSIONES

A partir de la revisión bibliográfica y el meta-análisis realizados, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. La mayoría de los datos de $\delta^{15}\text{N}$ publicados proceden de muestras experimentales (cultivadas en laboratorio o en parcelas) de productores primarios vasculares.
2. La combinación de AA más utilizada en la mayoría de estudios es la de Glx y Phe, debido a su precisión a la hora de estimar PT.
3. Los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ son significativamente más elevados en productores primarios vasculares que en no vasculares, posiblemente debido a la presencia de lignina en las plantas vasculares.
4. Los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ se correlacionan de forma positiva significativamente en los cuatro grupos individuales de productores primarios, siendo el ajuste mejor en el caso del grupo de los no vasculares.
5. Los diferentes grupos de productores primarios se pueden distinguir según sus huellas dactilares isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ de AA, pudiendo diferenciar claramente dos grandes grupos (vasculares y no vasculares).
6. Los valores de las $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ son significativamente diferentes entre los distintos grupos de productores primarios, por lo que para reducir errores a la hora de estimar PT se deberían tomar ciertas medidas, como utilizar β_{mix} en determinados ecosistemas o una combinación de análisis de $\delta^{15}\text{N}$ de AA de consumidores con huellas dactilares isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ o $\delta^{13}\text{C}$ de AA.
7. En estudios de ecología trófica, resultaría más adecuado hacer una diferenciación en dos grandes grupos de productores primarios (vasculares y no vasculares), en lugar de en cuatro grupos independientes.

En consecuencia, el método CSIA-AA se ha convertido en una herramienta muy útil en ecología trófica en estos últimos años, pero todavía presenta ciertas limitaciones. Serían necesarios nuevos estudios que empleen más muestras recolectadas en ambientes

naturales, para así comprobar si los valores de $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ varían o no, nuevas combinaciones de AA para estimar PT, etc.

6.b. CONCLUSIONS

From the literature review and meta-analysis carried out, the following conclusions can be drawn:

1. Most of the published $\delta^{15}\text{N}$ data come from experimental samples (grown in the laboratory or in plots) of vascular primary producers.
2. The AA combination most used in most studies is that of Glx and Phe, due to its precision when estimating TP.
3. $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ values are significantly higher in vascular than in non-vascular primary producers, possibly due to the presence of lignin in vascular plants.
4. The values of $\delta^{15}\text{N}_{\text{Bulk}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ are significantly positively correlated in the four individual groups of primary producers, with the best fit in the case of the non-vascular group.
5. The different groups of primary producers can be distinguished according to their AA $\delta^{15}\text{N}$ isotopic fingerprints, being able to clearly differentiate two large groups (vascular and non-vascular).
6. The values of $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ are significantly different between the different groups of primary producers, so certain measures should be taken to reduce errors when estimating TP, such as using β_{mix} in certain ecosystems or a combination of analyzes of AA $\delta^{15}\text{N}$ from consumers with isotopic fingerprints of AA $\delta^{15}\text{N}$ or $\delta^{13}\text{C}$.
7. In studies of trophic ecology, it would be more appropriate to differentiate between two large groups of primary producers (vascular and non-vascular), instead of four independent groups.

Consequently, the CSIA-AA method has become a very useful tool in trophic ecology in recent years, but it still has certain limitations. New studies would be necessary that use more samples collected in natural environments, in order to verify if the values of $\beta_{\text{Glx-Phe}}$ vary or not, new AA combinations to estimate PT, etc.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AlgaeBase. (2022). <https://www.algaebase.org/>. Consultado el 12 y 17 de enero de 2022.
- Besser, A. C., Elliott Smith, E. A. & Newsome, S. D. (2022). Assessing the potential of amino acid $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis in terrestrial and freshwater ecosystems. *Journal of Ecology*, 00, 1–16.
- Blagotic, A. & Daróczy, G. (2022). Rapport: a report templating system. R package version 1.1.
- Bradley, C. J., Wallsgrove, N. J., Choy, C. A., Drazen, J. C., Hetherington, E. D., Hoen, D. K. & Popp, B. N. (2015). Trophic position estimates of marine teleosts using amino acid compound specific isotopic analysis. *Limnology and oceanography: Methods*, 13(9), 476-493.
- Canty, A. & Ripley, B. (2021). boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-28.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O. & Ohkouchi, N. (2010). Further evaluation of the trophic level estimation based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Earth, life, and isotopes*, 415, 37-51.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. (2009). Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: methods*, 7(11), 740-750.
- Chikaraishi, Y., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ishikawa, N. F., Sasaki, Y., Tsuchiya, M. & Ohkouchi, N. (2014). High-resolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecology and evolution*, 4(12), 2423-2449.
- Choi, B., Ha, S., Lee, J.S., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N. & Shin, K. (2017). Trophic interaction among organisms in a seagrass meadow ecosystem as revealed by bulk $\delta^{13}\text{C}$ and amino acid $\delta^{15}\text{N}$ analyses. *Limnology and Oceanography*, 62(4), 1426–1435.
- Davison, A. C. & Hinkley, D. V. (1997). Bootstrap Methods and Their Applications. *Cambridge University Press*, Cambridge.

- Fox, J. & Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression*, 3rd Edition. Thousand Oaks, CA.
- Gross, J. & Ligges, U. (2015). *nortest: Tests for Normality*. R package version 1.0-4.
- Ishikawa, N. F., Kato, Y., Togashi, H., Yoshimura, M., Yoshimizu, C., Okuda, N. & Tayasu, I. (2014). Stable nitrogen isotopic composition of amino acids reveals food web structure in stream ecosystems. *Oecologia*, *175*(3), 911-922.
- Kendall, I. P., Woodward, P., Clark, J. P., Styring, A. K., Hanna, J. V. & Evershed, R. P. (2019). Compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ values express differences in amino acid metabolism in plants of varying lignin content. *Phytochemistry*, *161*, 130-138.
- Larsen, T., Wang, Y. V. & Wan, A. H. (2022). Tracing the trophic fate of aquafeed macronutrients with carbon isotope ratios of amino acids. *Frontiers in Marine Science*, *9*, 813961.
- McCarthy, M. D., Lehman, J. & Kudela, R. (2013). Compound-specific amino acid $\delta^{15}\text{N}$ patterns in marine algae: Tracer potential for cyanobacterial vs. eukaryotic organic nitrogen sources in the ocean. *Geochimica et cosmochimica Acta*, *103*, 104-120.
- McMahon, K. W. & McCarthy, M. D. (2016). Embracing variability in amino acid $\delta^{15}\text{N}$ fractionation: mechanisms, implications, and applications for trophic ecology. *Ecosphere*, *7*(12), e01511.
- Murdoch, D. & Chow, E.D. (2020). *ellipse: Functions for Drawing Ellipses and Ellipse-Like Confidence Regions*. R package version 0.4.2.
- Nielsen, J. M., Popp, B. N. & Winder, M. (2015). Meta-analysis of amino acid stable nitrogen isotope ratios for estimating trophic position in marine organisms. *Oecologia*, *178*(3), 631-642.
- Ohkouchi, N., Chikaraishi, Y., Close, H. G., Fry, B., Larsen, T., Madigan, D. J., McCarthy, M. D., McMahon, K. W., Nagata, T., Naito, Y. I., Ogawa, O. N., Popp, B. N., Steffan, S., Takano, Y., Tayasu, I., Wyatt, A. S. J., Yamaguchi, Y. T. & Yokoyama, Y. (2017). Advances in the application of amino acid nitrogen isotopic analysis in ecological and biogeochemical studies. *Organic Geochemistry*, *113*, 150-174.
- R Core Team (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Ramirez, M. D., Besser, A. C., Newsome, S. D. & McMahon, K. W. (2021). Meta-analysis of primary producer amino acid $\delta^{15}\text{N}$ values and their influence on trophic position estimation. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(10), 1750-1767.
- Scopus. (2021). <https://www.scopus.com/>. Consultado el 10 de noviembre de 2021.
- The Plant List. (2022). <https://www.theplantlist.org/>. Consultado el 12 y 17 de enero de 2022.
- Universitat de Barcelona. (s.f.). *Contrastes de normalidad*. http://www.ub.edu/apli-ca_infor/spss/cap5-6.htm/. Consultado el 31 de mayo de 2022.
- Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., D'Agostino McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester J., Kuhn, M., Lin Pedersen, T., Miller, E., Milton Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Paige Seidel, D., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K. & Yutan, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686.
- WoRMS taxonomy. (2022). <https://www.marinespecies.org/>. Consultado el 12 y 17 de enero de 2022.
- Xing, D., Choi, B., Takizawa, Y., Fan, R., Sugaya, S., Tsuchiya, M., Ohkouchi, N. & Chikaraishi, Y. (2020). Trophic hierarchy of coastal marine fish communities viewed via compound-specific isotope analysis of amino acids. *Marine Ecology Progress Series*, 652, 137-144.

ANEXO I (Bibliografía incluida en la base de datos)

- Bontempo, L., van Leeuwen, K. A., Paolini, M., Laursen, K. H., Micheloni, C., Prenzler, P. D., Ryan, D. & Camin, F. (2020). Bulk and compound-specific stable isotope ratio analysis for authenticity testing of organically grown tomatoes. *Food Chemistry*, 318, 126426.
- Chikaraishi, Y., Kashiya, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. (2007). Metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Marine Ecology Progress Series*, 342, 85-90.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O. & Ohkouchi, N. (2010). Further evaluation of the trophic level estimation based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Earth, life, and isotopes*, 415, 37-51.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Doi, H. & Ohkouchi, N. (2011). $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios of amino acids as a tool for studying terrestrial food webs: a case study of terrestrial insects (bees, wasps, and hornets). *Ecological research*, 26(4), 835-844.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Kashiya, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. (2009). Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: methods*, 7(11), 740-750.
- Chikaraishi, Y., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ishikawa, N. F., Sasaki, Y., Tsuchiya, M. & Ohkouchi, N. (2014). High-resolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecology and evolution*, 4(12), 2423-2449.
- Décima, M., Landry, M. R., Bradley, C. J. & Fogel, M. L. (2017). Alanine $\delta^{15}\text{N}$ trophic fractionation in heterotrophic protists. *Limnology and Oceanography*, 62(5), 2308-2322.
- Germain, L. R., Koch, P. L., Harvey, J. & McCarthy, M. D. (2013). Nitrogen isotope fractionation in amino acids from harbor seals: implications for compound-specific trophic position calculations. *Marine Ecology Progress Series*, 482, 265-277.

- Gutiérrez-Rodríguez, A., Décima, M., Popp, B. N. & Landry, M. R. (2014). Isotopic invisibility of protozoan trophic steps in marine food webs. *Limnology and oceanography*, 59(5), 1590-1598.
- Ishikawa, N. F., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Sasaki, Y., Takizawa, Y., Tsuchiya, M., Tayasu, I., Nagata, T. & Ohkouchi, N. (2018). A new analytical method for determination of the nitrogen isotopic composition of methionine: Its application to aquatic ecosystems with mixed resources. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(9), 607-620.
- Ishikawa, N. F., Kato, Y., Togashi, H., Yoshimura, M., Yoshimizu, C., Okuda, N. & Tayasu, I. (2014). Stable nitrogen isotopic composition of amino acids reveals food web structure in stream ecosystems. *Oecologia*, 175(3), 911-922.
- Kendall, I. P., Lee, M. R. & Evershed, R. P. (2017). The effect of trophic level on individual amino acid $\delta^{15}\text{N}$ values in a terrestrial ruminant food web. *STAR: Science & Technology of Archaeological Research*, 3(1), 135-145.
- Kendall, I. P., Woodward, P., Clark, J. P., Styring, A. K., Hanna, J. V. & Evershed, R. P. (2019). Compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ values express differences in amino acid metabolism in plants of varying lignin content. *Phytochemistry*, 161, 130-138.
- Maeda, T., Hirose, E., Chikaraishi, Y., Kawato, M., Takishita, K., Yoshida, T., Verbruggen, H., Tanaka, J., Shimamura, S., Takaki, Y., Tsuchiya, M., Iwai, K. & Maruyama, T. (2012). Algivore or phototroph? *Plakobranchnus ocellatus* (Gastropoda) continuously acquires kleptoplasts and nutrition from multiple algal species in nature.
- McCarthy, M. D., Benner, R., Lee, C. & Fogel, M. L. (2007). Amino acid nitrogen isotopic fractionation patterns as indicators of heterotrophy in plankton, particulate, and dissolved organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(19), 4727-4744.
- McClelland, J. W. & Montoya, J. P. (2002). Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology*, 83(8), 2173-2180.
- McClelland, J. W., Holl, C. M. & Montoya, J. P. (2003). Relating low $\delta^{15}\text{N}$ values of zooplankton to N_2 -fixation in the tropical North Atlantic: insights provided by stable isotope ratios of amino acids. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 50(7), 849-861.

- Ostle, N. J., Bol, R., Petzke, K. J. & Jarvis, S. C. (1999). Compound specific $\delta^{15}\text{N}$ (‰) values: amino acids in grassland and arable soils. *Soil biology & biochemistry*, 31(12), 1751-1755.
- Paolini, M., Ziller, L., Laursen, K. H., Husted, S. & Camin, F. (2015). Compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ analyses of amino acids for potential discrimination between organically and conventionally grown wheat. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(25), 5841-5850.
- Smallwood, B. J., Wooller, M. J., Jacobson, M. E. & Fogel, M. L. (2003). Isotopic and molecular distributions of biochemicals from fresh and buried *Rhizophora* mangle leaves. *Geochemical Transactions*, 4(7), 38-46.
- Styring, A. K., Fraser, R. A., Bogaard, A. & Evershed, R. P. (2014). Cereal grain, rachis and pulse seed amino acid $\delta^{15}\text{N}$ values as indicators of plant nitrogen metabolism. *Phytochemistry*, 97, 20-29.
- Takizawa, Y. & Chikaraishi, Y. (2017). Change in the $\delta^{15}\text{N}$ value of plant amino acids on the phenology of leaf flush and senescence. *Researches in Organic Geochemistry*, 33(1), 1-6.
- Takizawa, Y., Dharampal, P. S., Steffan, S. A., Takano, Y., Ohkouchi, N. & Chikaraishi, Y. (2017). Intra-trophic isotopic discrimination of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ for amino acids in autotrophs: Implications for nitrogen dynamics in ecological studies. *Ecology and evolution*, 7(9), 2916-2924.
- Vander Zanden, H. B., Arthur, K. E., Bolten, A. B., Popp, B. N., Lagueux, C. J., Harrison, E., Campbells, C. L. & Bjorndal, K. A. (2013). Trophic ecology of a green turtle breeding population. *Marine Ecology Progress Series*, 476, 237-249.
- Yoneyama, T. & Tanaka, F. (1999). Natural abundance of ^{15}N in nitrate, ureides, and amino acids from plant tissues. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45(3), 751-755.
- Zhang, Z., Tian, J., Cao, Y., Zheng, N., Zhao, J., Xiao, H., Guo, W., Zhu, R. & Xiao, H. (2019). Elucidating food web structure of the Poyang Lake ecosystem using amino acid nitrogen isotopes and Bayesian mixing model. *Limnology and Oceanography: Methods*, 17(11), 555-564.

Zhang, Z., Wang, W. X., Zheng, N., Cao, Y., Xiao, H., Zhu, R., Guan, H. & Xiao, H. (2021). Methylmercury biomagnification in aquatic food webs of Poyang Lake, China: Insights from amino acid signatures. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 123700.