

Isótopos estables ($\delta^{15}\text{N}$) como herramienta para medir la calidad de alimentos comerciales para lobina rayada (*Morone saxatilis*) en jaulas marinas

Stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$) as a tool for quality estimation of commercial aquafeeds for striped bass (*Morone saxatilis*) in sea cages farming

Daniel Badillo Zapata¹ y Maria Teresa Viana²

¹ Programa de Maestría y Doctorado en Ecología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), 21100. México

² Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, Km 103 Autopista Tij-Ens, Ensenada, B.C. 22860. México
e-mail: viana@uabc.edu.mx

Badillo Zapata D. & M. T. Viana. 2015. Isótopos estables ($\delta^{15}\text{N}$) como herramienta para medir la calidad de alimentos comerciales para lobina rayada (*Morone saxatilis*) en jaulas marinas. *Hidrobiológica* 25 (2): 303-306.

RESUMEN

La calidad entre dos alimentos comerciales ("A" y "B") se evaluó utilizando isótopos estables como trazadores de la retención de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) en lobina rayada (*Morone saxatilis*) mantenidas en jaulas marinas. Con base en un diseño cruzado, se utilizaron peces que habían sido alimentados durante 270 días con el alimento "A", mismos que fueron cambiados al alimento "B" durante otros 160 días. Se analizaron muestras de los alimentos comerciales y de tejido de músculo e hígado antes y durante la alimentación con el alimento comercial "B", para determinar su composición química e isotópica. El valor isotópico de los alimentos comerciales, músculo e hígado, al término de la alimentación con el alimento "A" fue de 10.3, 14.6 y 13.1‰, lo que refleja un factor de discriminación para músculo e hígado de 4.3 y 2.7, respectivamente. Al hacer el cambio al alimento "B" (11.09‰), se observó una reducción en los valores isotópicos. Para los días 90 y 160, los valores de discriminación ya eran casi constantes tanto para músculo como para hígado (2.3 y 0.0). Se concluye que el alimento "B" presentó una mejor calidad al incorporarse con un menor factor de discriminación que lo observado con el alimento "A". La técnica de isótopos estables demostró ser una herramienta útil para monitorear la calidad del alimento bajo condiciones comerciales, ya que mide directamente la eficiencia de la retención del nitrógeno, mientras que en otras pruebas como las de consumo y de digestibilidad aparente, es difícil de obtener.

Palabras clave: Cultivo en jaulas, isótopos estables, nutrición, peces, retención de nitrógeno.

ABSTRACT

Aquafeed quality for striped bass (*Morone saxatilis*) was evaluated under commercial conditions in sea cages using stable isotopes as tracers

for nitrogen. Using a crossover experimental design, fish that were fed during 270 days with aquafeed "A" was switched to aquafeed "B" during the following 160 days. Samples of aquafeeds and of muscle, and liver tissues were analyzed before and during feeding with aquafeed "B". The isotopic value from diet "A" and muscle and liver tissues after being fed during 270 days were 10.3, 14.6 and 13.1‰ resulting in a discrimination factor of 4.3 and 2.7 for muscle and liver. At day 90 and 160 the discrimination factor reach the equilibrium both for muscle and liver tissues (2.3 and 0.0). It was concluded that diet "B" had better quality as a result of a lower discrimination factor than that observed with diet "A". The nitrogen stable isotope is a reliable tool to evaluate aquafeeds quality under commercial conditions where the other estimations like feed intake and apparent digestibility are difficult to obtain.

Key words: Cage culture, fish, nitrogen retention, nutrition stable isotopes.

En la acuicultura marina existen grandes retos para lograr un crecimiento sostenido, como son: mejorar las dietas de acuerdo a sus requerimientos; disminuir el uso de harinas elaboradas con pelágicos menores; producir una menor cantidad de desechos nitrogenados al medio ambiente, entre otros. Los estudios para evaluar la digestibilidad *in vitro* se basan en la técnica del pH-Stat (Pedersen & Eggum, 1983), que si bien han sido útiles para predecir el potencial digestivo de un alimento formulado o de un organismo determinado (Ezquerro *et al.*, 1997; Cheng & Hardy, 2002), o para describir la calidad, no dejan de ser una predicción. Un método recientemente incorporado dentro del área de nutrición acuícola es la técnica de isótopos estables (Preston *et al.*, 1996; Gamboa-Delgado & Le Vay, 2009; Felip *et al.*, 2012). Se basa en que muchos elementos poseen dos o más isótopos en donde los estables son aquellos que no sufren una desintegración nuclear. Los isótopos estables dentro de las cadenas tróficas favorecen la re-

tención de los pesados sobre los ligeros, ya que energéticamente estos últimos son más fáciles de metabolizar (Martínez del Río *et al.*, 2009). De tal manera que con los valores isotópicos del nitrógeno (relación del isótopo ligero y pesado) presente en el alimento y el que fue incorporado en el tejido, se calculó la retención de N (Carleton & Martínez del Río, 2010). Si todo organismo tiende a equilibrar los valores isotópicos del alimento ingerido, la diferencia entre el alimento y lo acumulado, representa los valores de discriminación isotópica o factor de discriminación, de tal manera que las desviaciones entre el equilibrio reflejará que tanto nitrógeno del alimento o ingrediente es integrado y de que manera lo hace (Phillips & Eldridge, 2006). A la fecha esta técnica no ha sido reportada para evaluar la calidad de alimentos comerciales para peces marinos expuestos a condiciones no controladas en un ambiente marino. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue probar esta técnica en el estudio de retención de N con dos fuentes de alimento comercial de distinto origen (o marca comercial) para ser evaluados *in situ* (jaulas marinas).

Dos alimentos comerciales, con 47% de proteína y 12% de grasa se utilizaron para alimentar a veinticinco mil juveniles de lobina rayada *Morone saxatilis* (Walbaum, 1792), que fueron cultivados en jaulas marinas de 22.0 m de diámetro y 10.0 m de profundidad. Se recurrió a un diseño experimental cruzado en el que peces alimentados durante 9 meses (270 días) con el alimento comercial "A", posteriormente fueron alimentados con el alimento comercial "B". El ensayo experimental se llevó a cabo en la empresa *Pacífico Aquaculture S. de R.L. de C.V.*, localizada en Ensenada Baja California, México. Muestras de los alimentos y tejidos (hígado y músculo) fueron tomadas y procesadas de forma individual (por triplicado) antes y durante el cambio del alimento, las cuales fueron congeladas a -30 °C para su análisis.

El análisis proximal de los alimentos y tejidos fue evaluado por triplicado y expresado en materia seca de acuerdo a los estándares propuestos por la AOAC (1995).

Los valores isotópicos ($\delta^{15}\text{N}$) se determinaron a partir de muestras desengrasadas de alimento y tejido (músculo e hígado) para determinar la composición relativa de ^{15}N / ^{14}N . En resumen, 1.5 mg de muestras pesadas en una ultra balanza ($\pm 0.1 \mu\text{g}$), y guardadas en cápsulas de estaño se analizaron en la Universidad de California Davis (USA), en donde se utilizó un analizador elemental de interfase con un espectrómetro de flujo continuo de masas de relación isotópica (IRMS) con una precisión de 0.3‰. El valor isotópico de la muestra (δ) es reportado en partes por mil (‰) relativo al nitrógeno atmosférico siguiendo la siguiente fórmula:

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = [(R \text{ muestra} - R \text{ estándar}) / R \text{ estándar}] \times 1000$$

donde R de la muestra y R del estándar representan la relación del isótopo pesado al ligero ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). El factor de discriminación isotópico del tejido del músculo e hígado (Δ) relativo a cada una de las dietas experimentales se calculó con la siguiente ecuación: $\Delta = (\delta \text{ tejido} - \delta \text{ dieta})$

Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (n=3) con las muestras obtenidas a partir de un diseño experimental cruzado (Quinn & Keough, 2010). Se utilizó la prueba a posteriori de Tukey en aquellos valores en donde se observaron diferencias utilizando SigmaStat para Windows 3.5.

Los peces alimentados con el alimento "A" durante 270 días alcanzaron un peso de 71.0 ± 6.0 g y una longitud de 14.9 ± 0.1 cm, tiempo en que se cambió al alimento "B". Posteriormente se realizaron tres biometrías y recolecta de muestras en un lapso de 160 días. Fecha en que los peces alcanzaron un peso promedio de 296.0 ± 23 g y una longitud de 30.9 ± 1.1 cm y aumentaron un 316% en peso (Tabla 1).

El valor isotópico de las muestras iniciales de músculo e hígado fueron mayores al valor isotópico del alimento "A" (10.3‰) con 14.6 ± 0.1 ‰ y 13.1 ± 0.2 ‰ obteniendo un factor de discriminación de 4.3 y 2.7 respectivamente. Al día 160 los peces alimentados con el alimento "B" (11.09‰) presentaron valores en el músculo e hígado de 13.2 ± 0.2 ‰, y 11.1 ± 0.1 ‰, con un factor de discriminación de 2.1 y 0.0‰ respectivamente.

Los organismos alimentados con el alimento "A" se consideraron en equilibrio isotópico con su dieta, ya que habían sido alimentados durante 270 días. De acuerdo al productor, el peso inicial de los juveniles estaba entre 5 y 10 g dando un valor estimado de crecimiento total del 846%. Si bien se puede afirmar que los peces deberían estar en equilibrio isotópico con su dieta (10.3‰), los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para el músculo e hígado alcanzaron valores de 14.6 y 13.1‰ respectivamente, lo que implica un mayor enriquecimiento que el observado en esos mismos peces con el alimento "B". El enriquecimiento de isótopos pesados puede ser un indicador de una deficiencia en aminoácidos limitantes, dando lugar a un proceso catabólico con el consecuente enriquecimiento de $\delta^{15}\text{N}$ en músculo e hígado, o bien, podría reflejar una calidad deficiente de la proteína por baja digestibilidad (Martínez del Río *et al.*, 2009). Al cambiar al alimento "B", bajo las mismas condiciones de cultivo y con los mismos peces, se mostró una rápida incorporación de tejido y se obtuvo en 160 días el 316% de incremento en peso. Para el día 36 con un $\delta^{15}\text{N}$ de 19.8‰ el hígado presentó una discriminación de 1.2 (del 2.7 para el día cero). Al comparar con la composición proximal del pez entero se aprecia una disminución continua del contenido de cenizas, indicando una menor proporción relativa con el resto de los nutrientes (proteína y lípidos) y que desde el día 90 con tan sólo un 222.1% de ganancia total en peso, el hígado ya presentó valores isotópicos muy similares a los del alimento. La respuesta de enriquecimiento isotópico por tejido es variable de especie a especie e incluso de tejido a tejido, considerando que el factor de discriminación isotópica para N en sistemas acuáticos

Tabla 1. Análisis proximal y valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de los alimentos comerciales de lobina rayada (*Morone saxatilis*) en jaulas marinas.

| Análisis proximal | Alimento A | Alimento B |
|---|------------|------------|
| Proteínas (%) | 42.0 | 42.0 |
| Lípidos (%) | 12.0 | 12.0 |
| Cenizas | 10.0 | 10.0 |
| ELN | 36.0 | 36.0 |
| Composición isotópica $\delta^{15}\text{N}$ (‰) | 10.33 | 11.09 |

Tabla 2. Índices biológicos, valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) y Factor de discriminación isotópica de músculo e hígado de lobina rayada (*Morone saxatilis*) en jaulas marinas.

| Tiempo (días) | Alimento A | | Alimento B | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0-270 | 36 | 90 | 160 |
| Peso inicial (g) | 10.0±2.0 | | | |
| Peso final (g) | 71.0±6.0 | 85.1±22.1 | 230.6±31.8 | 296.0±23.0 |
| Longitud (cm) | 14.9±0.1 | 16.1±1.7 | 22.0±0.8 | 30.9±1.1 |
| Ganancia en peso (%) | 710.0 | 19.8 | 222.1 | 316.9 |
| <i>Valores isotópicos en equilibrio con su dieta $\delta^{15}\text{N}$ (‰)</i> | | | | |
| Músculo | 14.6±0.1 ^a | 14.2±0.1 ^b | 13.4±0.2 ^c | 13.2±0.2 ^c |
| Hígado | 13.1±0.2 ^a | 12.2±0.2 ^b | 11.1±0.2 ^c | 11.1±0.1 ^c |
| <i>Factor de Discriminación isotópica</i> | | | | |
| Músculo | 4.3 | 3.2 | 2.3 | 2.1 |
| Hígado | 2.7 | 1.2 | 0.0 | 0.0 |

Tabla 3. Análisis proximal de organismos completos y de músculo de lobina rayada (*Morone saxatilis*) en jaulas marinas.

| Tiempo (días) | Alimento A | | Alimento B | |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0-270 | 36 | 90 | 160 |
| <i>Análisis proximal de organismos completos</i> | | | | |
| Proteínas (%) | 47.0±0.9 | 48.0±1.0 | 47.2±2.6 | 48.8±2.1 |
| Lípidos (%) | 20.8±3.5 ^c | 22.8±3.6 ^c | 35.9±0.7 ^b | 39.3±0.2 ^a |
| Cenizas | 14.8±0.7 ^a | 15.3±0.9 ^a | 15.0±0.5 ^a | 8.6±0.9 ^b |
| ELN | 17.4 | 14.0 | 1.9 | 3.3 |
| <i>Análisis proximal de músculo</i> | | | | |
| Proteínas (%) | 74.2±2.5 | 76.2±3.5 | 71.0±3.9 | 71.6±2.3 |
| Lípidos (%) | 8.9±0.4 ^d | 9.8±0.4 ^c | 14.8±0.4 ^b | 20.7±0.0 ^a |
| Cenizas | 11.7±2.9 ^a | 11.3±2.9 ^a | 10.3±3.0 ^a | 6.2±0.0 ^b |
| ELN | 5.2 | 2.7 | 3.9 | 1.5 |

ELN: Extracto Libre de Nitrógeno

se ha calculado en el orden de 3.2‰ (Peterson & Fry, 1987) El factor de discriminación isotópica con el alimento "A" fue de 4.3 y 2.7‰ para músculo e hígado, por lo que puede decirse que el alimento es aceptable. Sin embargo al comparar los valores del alimento "A" con el alimento "B" se observa que este último presentó un mejor desempeño en la retención. De acuerdo con Carleton y Martínez del Río (2010) el hígado es uno de los órganos más sensibles por su elevada tasa de recambio. Aquí se ve que el hígado alcanza valores de cero lo que demuestra poco enriquecimiento y una clara diferencia entre ambos alimentos. Los alimentos comerciales utilizados eran de empresas distintas con un valor isotópico diferente, seguramente por estar formulados con ingredientes de origen distinto, lo cual podría explicar la diferencia en la retención de N.

En conclusión, se demuestra que la técnica de isótopos estables es una herramienta útil para evaluar la calidad del alimento en condiciones comerciales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor, en el Programa del Doctorado en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología, de la Universidad Autónoma de Baja California, México. Agradecemos al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de esta tesis. El proyecto fue financiado por el Proyecto Conacyt S0007-164673 I y la empresa *Pacífico Aquaculture S de RL de CV*.

REFERENCIAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA. 1200 p.
- CARLETON, S. A. & C. MARTÍNEZ DEL RÍO. 2010. Growth and catabolism in isotopic incorporation: a new formulation and experimental data. *Functional Ecology* 24 (4): 805-812.
- CHENG, Z. J. & R. W. HARDY. 2002. Apparent digestibility coefficients of nutrients and nutritional value of poultry by-product meals for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* measured in vivo using settlement. *Journal of the World Aquaculture Society* 33 (4): 458-465.
- EZQUERRA, J. M., F. L. GARCÍA-CARREÑO, R. CIVERA & N. F. HAARD. 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in White shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157 (3-4): 251-262.
- FELIP, O., A. IBARZ, J. FERNÁNDEZ-BORRAS, M. BELTRÁN, M. MARTÍN-PÉREZ, J. V. PLANAS & J. BLASCO. 2011. Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes (^{13}C) and (^{15}N) protein: effects of gelatinization of starches and sustained swimming. *British Journal of Nutrition* 107: 834-844.
- GAMBOA-DELGADO J. & L. LE VAY. 2009. Nitrogen stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture* 291: 115-123.
- MARTÍNEZ DEL RÍO, C., N. WOLF, S. A. CARLETON & L. Z. GANNES. 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews* 84: 91-111.
- PEDERSEN, B. & B. O. EGGUM. 1983. Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernaehrung und Futtermittelkunde* 49 (1-5): 265-277.
- PETERSON, B. J. & B. FRY. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematic* 18: 293-320.
- PHILLIPS, D. L. & P. M. ELDRIDGE. 2006. Estimating the timing of diet shifts using stable isotopes. *Oecologia* 147: 195-203.
- PRESTON, N. P., D. M. SMITH, D. M. KELLAWAY & S. E. BUNN. 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.
- QUINN, G. P. & M. J. KEOUGH. 2010. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge Univ. Press. UK. 537 p.

Recibido: 21 de septiembre de 2014.

Aceptado: 14 de octubre de 2015.