

Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces

María Teresa Viana^a y Daniel Badillo Zapata^b

^aInstituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC),
Km 107 Autopista Tj-Ens, C.P. 22760, Ensenada, BC México

^b Programa de Doctorado en Ecología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Marinas,
UABC, México

Phone +52 646 1744601, E-mail: viana@uabc.edu.mx

Resumen

La asimilación de macromoléculas (en este caso proteína), pueden ser evaluada a través de marcadores internos como los isótopos estables. El ¹⁵N y ¹⁴N, son los isótopos estables del nitrógeno que son utilizados comúnmente en ecología para dilucidar los patrones tróficos, de las fuentes de producción. Esto se basa en la presunción fundamental de que los isótopos son integrados a un organismo de acuerdo a la fuente de su alimentación en un determinado tiempo y por tanto, cada ingrediente tendrá una relación isotópica muy particular. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la substitución en cuatro niveles (0, 33,67 y 100%) de la harina de pescado (FM) por la de subproducto de ave (PBM) para estimar la asimilación de estas dos fuentes principales de N y que a través de un modelo de mezcla con un sistema isotópico (N) y dos fuentes poder discernir el grado de asimilación. A partir de un mismo diseño experimental se trabajó con dos especies dulceacuícolas: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), lobina rayada (*Morone saxatilis x M. chrysops*) y tres de origen marino: totoaba (*Totoaba macdonaldi*), curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*) y lenguado de California (*Paralichthys californicus*). En todos los ensayos se hicieron cuatro tratamientos con tres repeticiones con un nivel de proteína y lípidos de acuerdo a las necesidades de cada especie respetando que las dietas fuesen isoproteicas e isoenergéticas. Se colectaron muestras al inicio y al final del experimento de las dietas, músculo e hígado. Se realizó una caracterización isotópica de los ingredientes, dietas y muestras del tejido (músculo e hígado) desengrasadas para determinar la composición relativa de ¹⁵N / ¹⁴N. Para

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

el modelo de mezcla se utilizaron los valores obtenidos de los tratamientos 33 y 67 PBM contrastados con aquellos en las que tienen como principal fuente de proteína la harina de pescado y harina de subproducto de ave. Los valores isotópicos obtenidos en cada dieta experimental para cada uno los ensayos mostró ser distinto permitiendonos una clara diferencia isotópica entre las dietas. De acuerdo al modelo de mezcla fue posible observar que las combinaciones entre las dos harinas (33 y 67% de remplazo) la contribución de N fue mayor a partir de la harina de subproducto de ave al 33% de la proporción que se había establecido inicialmente, esto nos indica que los organismo están asimilando de mejor manera el N proporcionado por la harina de subproducto de ave que la de pescado. Sin embargo, cuando se aumentó la substitución en el tratamiento 67% la contribución de nitrógeno fue ligeramente menor que la proporcionada inicialmente, dándonos una mejor aceptación por la harina de pescado que la harina de subproducto de ave, sin embargo la trucha arcoíris fue la única especie que obtuvo mayores proporciones de asimilación de N proveniente de la harina de PBM incluso en la substitución de un 67%. Como conclusión, se estima que la utilización de la técnica de isotopos estables representa una buena herramienta para poder estimar el nivel de asimilación de distintas fuentes de proteína que son incorporadas en la formulación de alimentos balanceados. En nuestros ensayos se pudo observar que los organismos marinos tienden a poder asimilar de mejor manera la FM que la PBM, sin embargo la asimilación de estas dos fuentes de proteína dependerá también de la especie con la que se esté trabajando.

Palabras clave: *isótopos estables, dietas, peces*

Introducción

Dentro de la nutrición acuícola existen dos grandes retos, uno el conocer los requerimientos nutricionales exactos de las distintas especies acuícolas que nos permitan diseñar dietas con un mínimo de pérdida al medio ambiente maximizando la eficiencia de conversión. Y otro, buscar un sustituto de las harinas de pescado ya que están llegando a su límite de producción.

Con relación a los requerimientos nutricionales, un hecho es que se sigan formulando dietas muy parecidas para las distintas especies en cuanto al nivel de proteína. A excepción de tilapia, trucha y salmón, el resto se formulan para contener entre un 50 y 55% de proteína. Considerando que las dietas de salmón iniciaron a un nivel similar, hoy en día han logrado reducir el nivel de proteína en más del 10%. Por esto resulta de gran importancia investigar de manera precisa el destino que lleva la incorporación de la proteína ingerida en el alimento. Por otro lado, el uso de harinas de pescado elaboradas a partir de pelágicos menores es uno de los temas que preocupa a un gran número de sectores tanto de investigación, producción y sociedad en general, no sólo por la inminente reducción de las pesquería, sino también por las fuertes presiones que existen hoy en día en utilizar los pelágicos menores para alimentar a la población en vez de ser industrializada para su uso en la alimentación animal.

No obstante de esta presión, existe el argumento de que la industrialización de los pelágicos menores da también origen a la producción de aceites de pescado. Ya sea como producto de su extracción durante el proceso, así como también el constituir una fuente importante de lípidos dentro de la harina de pescado, cantidad que suele estar entre el 8 y 12% (FAO, 2006). El hecho de que la producción mundial de harina y aceite de pescado se haya conservado relativamente constante en los últimos 20 años, mientras que el porcentaje consumido por la acuicultura se ha elevado, (60-70% de la harina, y 80-90% del aceite de pescado; Tacon y Metian, 2008) se debe a

que su uso en la producción de otros organismos como aves, cerdos y mascotas han logrado independizarse de su utilización, precisamente gracias a estudios finos de nutrición.

Dentro de las propiedades que presenta la harina de pescado es su alta digestibilidad, un balance casi perfecto de aminoácidos, y el promover un buen crecimiento. Dentro de los aciertos más importantes para la sustitución de harina de pescado, aparte del uso de harina de soya, es el uso de las harinas de subproducto de animales terrestres en donde se ha logrado encontrar una harina de calidad que en gran medida ha logrado sustituir la fuente proteica (NRC, 2011; Hernández *et al.*, 2009). Una de ellas es la harina de subproducto de ave la cual se ha venido usando desde la década de los 80's aún cuando no en todos los casos con el éxito deseado ya que no se había podido substituir al 100% por harina de pescado. Sin embargo, debido a la mejora tecnológica en la separación de grasa, secado y el poder mantener una calidad constante, el subproducto de ave a la fecha se ha podido substituir en su totalidad por harina de pescado en algunas especies (Sealey *et al.*, 2011). La NRC (2011) hace referencia que el nivel de proteína y el perfil de aminoácidos de la harina de subproducto de ave es muy similar al de la harina de pescado.

El haber logrado sustituir la harina de pescado por harina de subproducto de ave no implica que conozcamos el nivel preciso de los requerimientos de las especies, sino que en términos generales hayamos encontrado una fuente proteica que pueda en términos generales, cumplir su función. Es así que el reto en la búsqueda de los requerimientos nutricionales precisos para las distintas especies siga siendo de gran importancia.

La calidad de la proteína generalmente se evalúa de acuerdo a su contenido de aminoácidos, que a menudo se prueba con base a la capacidad de digestión por enzimas como tripsina o extractos digestivos de peces a través de un análisis de digestibilidad *in vitro* con el pH-Stat. Como extractos digestivos se utilizan comúnmente homogenados crudos del hepatopáncreas o páncreas de las especies de interés o incluso utilizando un coctel de enzimas comerciales (Esquerra *et al.*,

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

1997; Cheng *et al.*, 2002). Aunque estos experimentos *in vitro* proporcionan información sobre la calidad de las fuentes proteicas con relación al potencial digestivo de las especies estudiadas, esta información sólo servirá para predecir el posible aprovechamiento de los distintos ingredientes y no da información con relación a la incorporación de los nutrientes en los tejidos (asimilación) para maximizar el crecimiento.

Las metodologías tradicionales empleadas en el estudio de la utilización de proteína, incluyendo la ingestión de alimento, el crecimiento, y la digestibilidad aparente se basan en experimentos *in vivo* bajo condiciones controladas de laboratorio. En algunos casos incluso es posible medir el gasto de energía y la producción de amonio para estimar la cantidad de proteína utilizada en funciones metabólicas y como fuente de energía (Gnaiger *et al.*, 1983).

Los resultados de los experimentos *in vitro* han sido criticados por no ser reproducibles en condiciones comerciales (NRC, 2011), además de que gran parte de los experimentos se realizan sólo por períodos cortos de tiempo y por lo general se centran en etapas de la vida temprana que en muchas ocasiones no se reflejan durante el proceso hasta la talla comercial (NRC, 2011).

Otro método novedoso dentro del área de nutrición acuícola es la utilización de isótopos estables. Este método si bien ha sido ampliamente utilizado dentro de la ecología para dar seguimiento a las poblaciones para el estudio de interacciones entre depredador y presa, recientemente se han estado aplicando dentro de la nutrición acuícola con gran precisión para rastrear el nivel de asimilación de las fuentes proteicas. Esta técnica se basa en que cada ingrediente contiene un sello único en la relación de masa de sus componentes de C:N los cuales varían de acuerdo a la cadena trófica en que se encuentran (Fry y Sherr, 1984; Focken, 2005). La técnica de isótopos estables representa una herramienta útil para poder estimar la dinámica de los nutrientes que son proporcionados por las distintas fuentes proteicas. Esto, ya que debido a la abundancia natural de la masa atómica y como se componen dentro de los distintos tejidos de plantas y animales,

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

constituyen un reflejo en la alimentación en los animales (Fry y Sherr, 1984; Focken y Becker, 1998). Es así que a través del crecimiento y/o incorporación de los isótopos estables con mayor masa dentro de los distintos tejidos, resulte factible el poder determinar el impacto de su alimentación. Entre los componentes principales que integran la materia orgánica (CHON), son el carbono (C) y nitrógeno (N) los elementos que se utilizan y determinan la abundancia relativa de sus isótopos ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$). El análisis de los isótopos estables también se ha utilizado para distinguir entre fuentes de proteínas y estimar su contribución relativa a la biomasa de un animal y para inferir el grado de participación entre fuentes alimenticias (Gaye-Siessegger *et al.*, 2004a, b; Karasov y Martínez del Río, 2007). Los diversos componentes y/o ingredientes con los cuales son elaboradas las dietas podrán presentar firmas isotópicas distintas, esta característica única de cada ingrediente podrá ser integrada en un modelo de mezcla isotópico (Lochman y Phillips, 1996; Martínez del Río *et al.*, 2009; Le Vay y Gamboa-Delgado, 2010). Permitiendo estimar la contribución relativa de cada ingrediente. El uso de modelos de mezcla isotópica requiere de que ciertos requisitos sean satisfechos en el diseño experimental (Martínez del Río *et al.*, 2009). Una de estas condiciones es que el consumidor esté en equilibrio isotópico con su dieta, es decir, que ambas señales isotópicas sean similares por haber estado ingiriendo un tiempo definido. Sin embargo, a pesar de que un organismo pudiera estar en equilibrio isotópico con su alimento (dinámica de transferencias isotópicas), existe un efecto fisiológico llamado enrutamiento isotópico (Gannes *et al.*, 1997) en el cual se observa que los elementos dietarios y sus isótopos no son homogéneamente mezclados en los tejidos de los organismos. Es decir que son selectivamente metabolizados e incorporados respondiendo a estados metabólicos distintos entre los distintos tejidos. Es así que un hígado podrá presentar una dinámica distinta a la del músculo en cuanto a la velocidad de incorporación de los isótopos estables.

Los experimentos realizados en nuestro laboratorio han involucrado en una primera fase, el efecto de la asimilación en un diseño de sustitución de harina de pescado por harina de subproducto de ave, calidad “*Pet food grade*” donada por la NRA (National Renderers

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

Association) y procedente de los Estados Unidos. Misma que posee un marcaje isotópico muy distinto a la harina de pescado por proceder de ambientes lejanos dentro de la cadena trófica.

Materiales y métodos

A partir de un mismo diseño experimental para distintas especies, se estudiaron en experimentos independientes, evaluando la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), lobina rayada (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*), curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*) y lenguado de California (*Paralichthys californicus*). Entre estas especies, todas ellas carnívoras, se encuentra uno de agua dulce, otro de agua dulce pero adaptado al ambiente marino y tres netamente marinos.

Con tal fin, el diseño experimental consistió en 4 niveles de sustitución proporcional de la harina de pescado (HP) por harina de subproducto de ave (HA). La dieta 0HA constituida con 100% harina de pescado, dieta 33HA, 33% harina de ave (HA) con 67 de harina de pescado (HP), dieta 67HA, 67/33 de HA y HP y la dieta 100HA, con el 100% de HA (Cuadro 1). Las dietas se formularon de acuerdo a los requerimientos de cada especie y para cada diseño las dietas fueron isoproteicas e isoenergéticas. Antes de su elaboración se realizó un mapeo isotópico de los ingredientes con contenido proteico (harinas de pescado, subproducto de ave y gelatina) conteniendo valores isotópicos distintos (14.1, 3.4 y 7.8‰, respectivamente).

En todos los casos juveniles de las especies a experimentar se mantuvieron en un sistema de recirculación ya sea con agua dulce y/o con agua de mar (33‰) utilizando un biofiltro conectado a un reservorio manteniendo las condiciones constantes de temperatura. Los peces se alimentaron a saciedad con tres raciones (0800, 1300 y 1900 hrs). Muestras de tejido de músculo e hígado fueron tomadas al inicio (6 peces) y al final del experimento (3 peces por estanque).

Cuadro 1. Ingredientes (g kg^{-1} peso seco) de cuatro dietas experimentales conteniendo 4 niveles de sustitución de harina de ave (0, 33, 67 y 100 %) por harina de pescado para cada uno de los experimentos (5) por especie

Especies	Ingredientes	Tratamientos			
		0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Harina de ave ^a	0.0	23.5	44.0	59.0
	Harina de pescado ^b	66.0	40.0	17.5	0.0
	Aceite de pollo	0.0	0.5	1.7	3.5
	Aceite de Pescado	7.2	5.2	2.8	0.0
	Maizena	9.1	13.1	16.6	20.1
Lobina rayada (<i>Morone saxatilis x M. chrysops</i>)	Harina de ave ^a	0.0	21.2	43.0	64.3
	Harina de pescado ^b	63.2	42.3	21.7	0.0
	Aceite de pollo	0.0	3.2	6.7	10.5
	Aceite de pescado	12.9	8.8	4.4	0.0
	Maizena	8.7	9.2	9.2	10.3
Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	Harina de ave ^a	0.0	22.5	45.0	67.0
	Harina de pescado ^b	65.2	43.3	21.5	0.0
	Aceite de pollo	0.0	0.0	0.0	0.0
	Aceite de pescado	2.9	1.9	0.9	0.0
	Maizena	16.7	16.9	17.6	17.9
Curvina golfina (<i>Cynoscion Othonopterus</i>)	Harina de ave ^a	0.0	23.5	44.0	59.0
	Harina de pescado ^b	66.0	40.0	17.5	0.0
	Aceite de pollo	0.0	0.5	1.7	3.5
	Aceite de pescado	7.2	5.2	2.8	0.0
	Maizena	9.1	13.1	16.6	20.1
Lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>)	Harina de ave ^a	0.0	21.0	43.5	65.0
	Harina de pescado ^b	63.0	42.5	21.0	0.0
	Aceite de pollo	0.0	0.0	0.0	0.0
	Aceite de pescado	2.9	2.0	0.97	0.0
	Maizena	18.8	19.2	19.6	20.7

Ingredientes comunes en todas las dietas: Harina de maíz 5.5; gelatina 6; mezcla de vitaminas y minerales 3; stay C 0.4; benzoato de sodio 0.23; cloruro de colina 0.09; tocopherol 0.01.

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

^a“Pet food grade” procedente de los Estados Unidos y donada por la “National Renderers Association”

^bHarina de pescado de Proteínas Marinas y Agropecuarios de Guadalajara Jalisco, México.

^c Mezcla de vitaminas rovimix; Stay-C y mezcla de minerales, generosamente donados por DSM, Guadalajara, México.

Cuadro 2. Composición proximal en cuanto a proteína cruda y grasa cruda para cada una de las especies a experimentar

Especie	Composición Proximal	
	Proteína Cruda %	Grasa cruda %
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	43.1	12.5
Lobina rayada (<i>Morone saxatilis x M. chrysops</i>)	51.5	18.5
Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	54.1	8.0
Curvina golfina (<i>Cynoscion Othonopterus</i>)	54.3	9.0
Lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>)	50.0	9.0

Análisis proximales

El análisis proximal de las dietas y tejido fue medido por triplicado y expresado en materia seca de acuerdo a los estándares propuestos por AOAC (1995). Las muestras de músculo de los peces fueron colectadas a partir de la aleta dorsal y el hígado. Cada muestra por separado fue llevada a peso seco constante (100°C). El contenido de proteína cruda (PC) se determinó estimando el nitrógeno total por el método de micro-kjeldahl utilizando %N x 6.25. La concentración de lípidos se determinó por gravimetría después de la extracción por el método de Soxhlet utilizando como solvente éter de petróleo. El contenido de cenizas se determinó después de haber incinerado las muestras a 550°C durante 6hrs. El Extracto Libre de Nitrógeno se determinó por diferencia (% ELN = 100 – (% de proteína cruda + % de lípidos + % de cenizas).

Análisis Isotópico

La determinación del isótopo estable $\delta^{15}\text{N}$ se realizó a partir de muestras desengrasadas de las muestras iniciales y finales de músculo e hígado, así como de los ingredientes y dietas. Con los valores de dichas muestras se determinó la composición relativa de $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$. En resumen, muestras de 1.5 mg pesados en una ultra balanza ($\pm 0.1\mu\text{g}$) se guardaron en cápsulas de estaño para su envío y análisis al laboratorio de isótopos estables de la Universidad de California Davis (USA). Dichos análisis se llevaron a cabo utilizando un analizador elemental de interfaz con un espectrómetro de flujo continuo de masas de relación isotópica (IRMS) con una precisión de 0.3‰ para $\delta^{15}\text{N}$. El valor isotópico de la muestra fue expresado con la connotación delta (δ) en partes por (‰) relativo al nitrógeno atmosférico siguiendo la siguiente fórmula:

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

donde R de la muestra y R del estándar representan la relación del isótopo pesado al isótopo ligero ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). La discriminación Isotópica del tejido del músculo (Δ) relativo a cada una de las dietas experimentales que se encuentran en equilibrio isotópico se calculó con la siguiente ecuación:

$$\Delta = (\delta_{\text{tejido}} - \delta_{\text{dieta}})$$

Para los tratamientos 33 y 67 PBM se utilizó el modelo de mezcla isotópico con dos fuentes principales de proteína (harina de pescado y harina de subproducto de ave) para poder estimar las diferencias entre la contribución de nitrógeno que fue asimilada en el músculo de los peces por alimento, asumiendo que el organismo consumidor ya se encuentre en equilibrio con la dieta (Phillips and Koch 2002):

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{músculo}} (\text{‰}) = f_{\text{harina de pescado}} (\delta^{15}\text{N}_{\text{harina de pescado}} + \Delta) + f_{\text{HA}} (\delta^{15}\text{N}_{\text{HA}} + \Delta)$$

$$1 = f_{\text{harina de pescado}} + f_{\text{HA}}$$

Los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{músculo}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{harina de pescado}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{harina de subproducto de ave}}$, representan la composición isotópica del músculo del pez, la harina de pescado y la harina de subproducto de ave. El valor $\delta^{15}\text{N}_{\text{músculo}}$ son corregidos por el factor de discriminación trófica. Para el 0% y el 100% de harina de subproducto de ave, la composición isotópica del músculo de las distintas especies a experimental se considera que reflejan el equilibrio con la harina de pescado o la harina de subproducto de ave según sea el caso.

Análisis estadístico

Para observar posibles diferencias entre los índices biológicos y los valores de discriminación trófica de tejido del músculo y/o hígado de cada unidad experimental según sea el caso, fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (n=3). Para aquellos en donde se hayan detectado diferencias estadísticas, se utilizó la prueba a posteriori de Tukey utilizando SigmaStat para Windows 3.5.

Resultados y Discusión

Los valores isotópicos ($\delta^{15}\text{N}$ (‰)) de cada una de las dietas experimentales que contenían 4 niveles de sustitución de harina de ave (0, 33, 67 y 100 %) por harina de pescado se muestran en el Cuadro 2. Como se puede observar, los valores isotópicos de las dietas en todos los casos reflejan el contenido de las distintas fuentes de nitrógeno. Por ejemplo, la gelatina que fue utilizada como enlazante con un contenido de 84% de proteína cruda representa el 10% del contenido de proteína en el caso de la trucha y en menor medida para las otras especies con mayor requerimiento proteico. Sin embargo, la HP y HA como principales fuentes de proteína representan el 88% del nitrógeno presente asumiendo que el N de la harina de maíz correspondió al 0.1%. Es así que tanto la HP como la HA muestran un valor isotópico distinto lo cual es ideal para permitir una clara diferencia isotópica (Karasov *et al.*, 2011).

Cuadro 3. Valor isotópico $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de las distintas dietas experimentales para las distintas especies con diferentes niveles de sustitución de HP por HA.

Especie	Tratamientos			
	0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	12.7	9.0	6.1	4.2
Lobina rayada (<i>Morone saxatilis x M. chrysops</i>)	14.5	11.2	8.5	4.6
Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	15.3	11.5	7.7	4.7
Curvina golfina (<i>Cynoscion othonoptera</i>).	14.6	11.3	8.5	4.8
Lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>)	15.0	11.4	8.1	4.8

Es también importante resaltar la variación que pueden sufrir los distintos lotes de ingredientes. Por ejemplo, la dieta 0HA presenta valores desde 12.7 hasta 15.3 dependiendo del lote mismo de HP así como la influencia de la gelatina, la cual fue mayor en la dieta para trucha y menor para la totoaba y curvina. Estas últimas formuladas con un mayor contenido relativo de proteína (54 contra 43 % de proteína para la trucha), mientras que la gelatina permaneció constante al 6%.

En el cuadro 4 se muestran los valores obtenidos en las muestras de hígado y músculo (según sea el caso) de los distintos tratamientos contrastándolos con su valor inicial y entre los distintos experimentos realizados. Una vez realizados los ensayos se tomaron las muestras individuales de tejido (músculo e hígado en la mayoría de los casos), y al igual que las muestras de las dietas se desengrasaron para evitar cualquier error o alteración de la muestra debido al incremento en grasa de cada individuo. Como se puede observar en dicho cuadro, existe una tendencia a lo que fue el valor isotópico de la dieta que se le estaba suministrando a cada especie.

En el caso de la trucha no se cuenta con el valor inicial, sin embargo, las muestras de músculo lograron llegar a un equilibrio isotópico con los valores de sus respectivos alimentos como se muestra en el cuadro 3. En general el valor isotópico en el músculo es ligeramente superior al de los alimentos salvo en del tratamiento 100HA. Se sabe que la incorporación isotópica no es

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

homogénea a lo largo de todos los tejidos así como tampoco es igual entre las distintas especies (Martínez del río y Carleton, 2012). Esto se debe a las distintas adaptaciones en el aparato digestivo y fisiología, o bien a una serie de interacciones dentro de los organismos como la actividad metabólica del individuo. En este caso se trabajó con especies carnívoros aunque trucha ha sido descrito con una cierta omnivoría o al menos adaptable a distintos tipos de alimentación lo cual sugiere que la trucha sea capaz de aprovechar mayormente sus alimentos.

Mientras que con trucha se observa claramente el efecto de la dieta en la composición isotópica del músculo, no ocurre así en las otras especies. Si bien en todos los casos los valores isotópicos decrecieron conforme se fue agregando la harina de ave, la diferencia fue haciéndose más marcada en aquellos tratamientos alimentados con una mayor cantidad de HA. Entre los experimentos en donde se evaluó el hígado, éste logró contener un fraccionamiento isotópico menor que lo que se observó en el músculo. La razón por la que puede deberse dicha diferencia entre el músculo y el hígado es que éste último es uno de los órganos con mayor tasa de recambio. En vertebrados se sabe que los tejidos del plasma e hígado son los de mayor tasa de recambio y por tanto, el recambio isotópico refleja de mayor manera la reintegración de la comida reciente, a diferencia del hueso o colágeno (Martínez del Río *et al.*, 2009). No obstante las cifras mostradas para el músculo se encuentran dentro del rango esperado para poder establecer un equilibrio con su dieta.

El fraccionamiento isotópico se refiere al cambio isotópico de un elemento con relación a otro. De esta manera se establece el tiempo requerido para que un tejido cambie con relación a su dieta. Como se mencionó con anterioridad el fraccionamiento isotópico difiere entre tejidos. Sin embargo, también existe una marcada diferencia entre las especies. No sólo por la edad y/o tamaño como podría esperarse, sino también debido a la tasa de crecimiento que pueda caracterizar a las distintas especies y claro, a la manera como aprovechas sus alimentos. Si existe una tasa catabólica diferencial entre las especies esto podría dar diferencias. El hecho de o

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

dar las raciones adecuadas durante el día podría ser otra razón que altere la tasa de incorporación del alimento.

Cuadro 4. Valor isotópico $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de hígado y músculo tomado al inicio del experimento y el valor isotópico al final de cada experimento con diferentes niveles de sustitución de Harina de pescado por Harina de subproducto de ave

Especies / tiempo de experimentación (días)		Tratamientos				
		Inicial	0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (80d)	músculo	Nd	14.7±0.9 ^a	10.1±0.1 ^b	7.1±0.11 ^c	4.1±0.05 ^d
	hígado	Nd	Nd	nd	Nd	nd
Lobina rayada (197d)	músculo	14.7	17.2±0.2 ^a	15.7±0.1 ^b	14.3±0.2 ^c	13.1±0.2 ^d
	hígado	13.4	17.1±0.3 ^a	15.5±0.1 ^b	12.9±0.4 ^c	11.9±0.5 ^d
Totoaba (86d)	músculo	13.8	18.1±0.0 ^a	16.3±1.4 ^b	11.9±0.2 ^c	9.64±0.3 ^d
	hígado	Nd	16.5±1.2 ^a	12.8±2.3 ^b	9.9±0.3 ^c	9.1±0.6 ^c
Curvina golfina (137d)	músculo	12.7	16.3±0.8 ^a	14.5±0.6 ^b	13.0±0.3 ^c	10.7±0.2 ^d
	hígado	11.1	15.3±0.5 ^a	12.7±0.9 ^b	8.8±0.3 ^c	6.8±0.5 ^d

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

Lenguado de California (120d)	músculo	10.7	16.7±0.3 ^a	14.5±0.4 ^b	11.7±0.3 ^c	9.8±0.3 ^d
	hígado	9.5	16.1±0.4 ^a	13.2±0.3 ^b	10.5±0.6 ^c	7.5±0.4 ^d

Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); lobina rayada (*Morone saxatilis x M. chrysops*); totoaba (*Totoaba macdonaldi*); curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*); lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

En el cuadro 5 se presenta el factor de discriminación isotópica que existe entre el tipo de tejido que se está analizando y su dieta, como podemos ver los valores en el hígado son relativamente menores a los observados en el músculo. Sólo en la trucha no se determinó el valor isotópico, pero como se puede ver, hay una tendencia en la gran mayoría de los tratamientos al incrementar la inclusión de harina de ave el fraccionamiento aumenta tanto en el hígado como en el músculo. De acuerdo a Martínez del Río *et al.* (2009) la partición entre crecimiento y catabolismo es complicada si el organismo no está creciendo exponencialmente. Las diferencias más marcadas se registraron con la lobina rayada, experimento en donde se registró un bajo crecimiento debido a la baja temperatura. Esto pudo ser un factor que hiciera que el catabolismo fuera mayor al crecimiento y por tanto menor el fraccionamiento isotópico. No obstante, es de llamar la atención que la diferencia se acentúa con la utilización de la harina de subproducto de ave, a pesar de que los tratamientos con 67HA fueran en donde se obtuvo la mayor tasa de crecimiento en la mayoría de los casos.

Cuadro 5. Factor de discriminación isotópico $\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) en muestras de músculo e hígado con diferentes niveles de sustitución de HP por HA ($\Delta = \delta_{\text{tejido}} - \delta_{\text{dieta}}$)

Especies/Tiempo de experimentación	Tejido	Tratamientos			
		0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (80d)	músculo	2.0	1.1	1.0	-0.1
	hígado	nd	nd	nd	nd
Lobina rayada (197d)	músculo	2.7	4.6	5.9	8.6
	hígado	2.5	4.3	4.4	7.3
Totoaba (86d)	músculo	2.8	4.8	4.2	4.9
	hígado	1.2	1.3	2.2	4.4
Curvina golfina (136)	músculo	1.7	3.2	4.5	5.9
	hígado	0.7	1.5	0.2	2.0

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

Lenguado de California (120d)	músculo	1.7	3.2	3.6	5.0
	hígado	1.1	1.9	2.4	2.7

Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); lobina rayada (*Morone saxatilis x M. chrysops*); totoaba (*Totoaba macdonaldi*); curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*); lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

Cuadro 6. Modelo de mezcla estimado al utilizar dos fuentes isotópicas (0HA y 100HA) y muestra el porcentaje de asimilación de nitrógeno para las distintas especies a partir de dietas que contenían dos niveles de inclusión 33 y 67% de remplazo de harina de pescado (HP) por harina de subproducto de ave (HA)

Especie / días de ensayo		Tratamientos	
		33HA	67HA
Trucha arcoíris (80d)	HP (%)	53	26
	HA(%)	47	74
Totoaba (86d)	HP (%)	64	36
	HA(%)	34	66
Lobina rayada (197d)	HP (%)	62	38
	HA(%)	40	60
Curvina golfina (136d)	HP (%)	62	38
	HA(%)	40	60
Lenguado de California (120d)	HP (%)	74	26
	HA(%)	43	57

Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*); lobina rayada (*Morone saxatilis x M. chrysops*); totoaba (*Totoaba macdonaldi*); curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*); lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

En el cuadro 6 se muestra el porcentaje de asimilación de nitrógeno utilizando un modelo de mezcla en donde se asume que las mezclas deberían asimilar proporcionalmente la misma cantidad del ingrediente de lo que se obtuvo entre el 0 y el 100HA, cuyas diferencias podrán resaltar a los ingredientes que se asimilan con mayor facilidad. Es así que el 33HA se espera que

Viana, M. y Badillo, D. 2013. Uso de la Técnica de Isótopos Estables para el Diseño de Dietas para Peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.294-319.

asimile proporcionalmente las mismas cantidades de ambos, es decir 33 de HA y 67 de HP. De todas las especies experimentadas es la trucha quien mejor parece aceptar la harina de subproducto de ave ya que la HA se asimila en mayor proporción que lo que existía en la dieta. Es necesario resaltar que en todos los casos en donde la HA se ofreció en un 33% el porcentaje de asimilación de la HA fue mayor que cuando se ofreció en un 67%. Esto pudiera indicar que existe algún aminoácido limitante en la HA que al ser suministrada en mayores proporciones refleja una disminución en la asimilación. Si se observa el crecimiento en todos los casos, esto no afecta pues aún mostrando un mayor crecimiento con los tratamientos de 67HA se refleja una menor proporcionalidad en la asimilación de la HA. Lo anterior puede ser un reflejo de que las dietas están sobradas en proteína y que existe aún espacio para poder balancear mejor las dietas y obtener un ahorro proteico.

Cuadro 7. Tasa específica de crecimiento (SGR) de los distintos tratamientos para cada uno de los experimentos realizados utilizando diferentes niveles de sustitución de HP por HA. Las distintas letras como superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos para cada uno de los experimentos

Especie/ Tiempo de experimentación	Tratamientos			
	0HA	33HA	67HA	100HA
Trucha arcoíris (80d)	3.4±0.1	3.4±0.1	3.5±0.0	3.4±0.2
Lobina rayada (197d)	0.3±0.2 ^a	0.2±0.1 ^a	0.2±0.0 ^b	0.1±0.2 ^c
Totoaba (86d)	2.6±0.1 ^b	2.9±0.2 ^b	3.5±0.0 ^a	1.6±0.5 ^c
Curvina golfina (136d)	0.8±0.1 ^a	0.8±0.0 ^a	0.5±0.0 ^b	0.3±0.0 ^c
Lenguado de California (120d)	0.8±0.1 ^a	0.7±0.2 ^b	0.4±0.0 ^c	0.2±0.5 ^d

Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); lobina rayada (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*); totoaba (*Totoaba macdonaldi*); curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*); lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

Conclusiones

El uso de los isótopos estables constituye una poderosa herramienta para conocer no sólo el porcentaje de asimilación de los distintos ingredientes y/o dietas, sino también nos puede llevar a definir de mejor manera la calidad y tipo de las fuentes proteicas utilizadas, así como el uso y destino de los aminoácidos contenidos en dichas fuentes proteicas.

La harina de pescado puede ser reemplazada por harina de subproducto de ave en un 67%, lo cual constituye una ventaja para el desarrollo de la acuicultura al no contar con suficiente abasto de harina de pescado.

Se presume que la mayor limitante para el reemplazo total de la harina de pescado está en el contenido de los LC-PUFAs.

Referencias

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Bowyer JN, Qin JG, Smullen RP, Stone DAJ (2012) Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture* 357:211-222.
- Cheng ZJ, Hardy RW (2002) Apparent digestibility coefficients of nutrients and nutritional value of poultry by-product meals for rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* measured in vivo using settlement. *J World Aquacul Soc* 33:458-465.
- Cruz-Suárez E, Nieto-López M, Guajardo-Barbosa C, Tapia-Salazar M, Scholz U, Ricque-Marie D (2007) Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture* 272:466-476.
- EL-Haroun ER, Azevedo PA, Bureau DP (2009) High dietary incorporation levels of rendered animal protein ingredients on performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972). *Aquaculture* 290:269-274
- Ezquerria JM, Garcia-Carreño FL, Civera R, Haard NF (1997) pH-stat method to predict protein digestibility in White shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157:251-262.
- FAO (2006) State of world Aquaculture. FAO Fisheries Tesheries Technical Paper No. 500, Rome.
- Focken, U (2005) Stable isotopes as tracers for the metabolic routing of individual dietary components. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 14:37.
- Focken U, Becker K (1998) Metabolic fractionation of stable carbon isotopes: Implications of different proximate compositions for studies of the aquatic food webs using delta-C13 data. *Oecologia* 115:337-343
- 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 EB (1984) $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow on marine and freshwater ecosystems. *Contrib in Mar Sci* 27:13-47.
- Gamboa-Delgado J, Cañavate JP, 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, 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.
- Gannes LZ, O'Brien DM, Martínez del Río 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 (2004a) 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.
- Gaye-Siessegger J, Focken U, Abel HR, Becker K (2004b) Individual protein balance strongly influences $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften* 91:90–93.
- Gnaiger E, Forstner H (1983) Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, p. 370.
- Halver JE (2002) The Vitamins. In: Halver JE, Hardy RW (ed), *Fish Nutrition*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, pp. 61–141.
- Herzka SZ (2005) Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ration analysis. *Estuar Coast Shelf S* 64:58-69
- Hesslein R, Hallard K, 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 $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$. *Can J Fish Aquat Sci* 50:2071–2076.
- Karasov WH, Martínez del Río C (2007) *Physiological Ecology: How Animals Process Energy, Nutrients, and Toxins*. Book for Princeton University Press, Princeton, NJ, pp 724
- Karasov, W.H., Martínez del Río, C., Caviedes-Vidal, E. (2011) *Ecological Physiology of Diet and Digestive System*. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 69-93.
- Lochman R, Phillips H (1996) Stable isotopic evaluation of the relative assimilation of natural and artificial foods by golden shiners *Notemigonus crysoleucas* in ponds. *J World Aquacult Soc* 27:168-177
- Le Vay L, Gamboa-Delgado J (2010) Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture* 315:95-103
- MacAvoy SE, Macko SA, Arneson LS (2005) Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Can J Zool* 83:631–641.
- Macko SA, Estep ML F (1984) Microbial alteration of stable nitrogen and carbon isotopic composition of organic matter. *Org Geochem* 6:787-790.
- Martínez del Río, C, Carleton SA (2012) How fast and how faithful –the dynamics of isotopic incorporation into

- animal tissues. *J. Mammal.* 93: 353-359
- Martínez del Río C, Wolf BO (2005) Mass-balance models for animal isotopic ecology. In: *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates.* (Starck, J.M., Wang, T. Eds.). Science Publishers, Enfield, NH, pp. 141-174.
- Martínez del Río C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev* 84:91-111.
- McCutchan Jr JH, Lewis Jr WM, Kendall C, McGrath CC, (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ration of carbon, nitrogen, and sulfur. *OIKOS* 102:378-390.
- National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.* National Academies Press, Washington, DC, p 376
- Parés-Sierra G, Durazo E, Ponce MA, Badillo D, Correa-Reyes G, Viana MT (2012) Partial to total replacement of fishmeal by poultry by-product meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effect on fatty acids from muscle tissue and the time required to retrieve the effect. *Aquacult Res* doi:10.1111/are.12092
- Phillips DL, Koch PL (2002) Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130:114-125.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83:703-718
- Rawles SD, Riche M, Gaylord TG, Webb J, Freeman DW, Davis M (2006) Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂) in recirculate tank production. *Aquaculture* 259: 377-389.
- Rawles SD, Gaylord TG, McEntire ME, Freeman DW (2009) Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for hybrid striped bass, *Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂ in pond production. *J World Aquacult Soc* 40:141-156.
- Robbins CT, Felicetti LA, Sponheimer M (2005) The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* 144:534-540.
- Robbins CT, Felicetti LA, Florin ST (2010) The impact of protein quality on stable nitrogen isotope ration discrimination and assimilate diet estimation. *Oecologia* 162:257-579.
- Rossi Jr W, Davis DA (2012). Replacement of fishmeal with poultry by-product meal in the diet of Florida pompano *Trachinotus carolinus* L. *Aquaculture* 338-341:160-166

- Sargent JR, Tocher DR, Bell JG (2002) The lipids, In: Halver, JE, Hardy, RW (ed), Fish Nutrition, 3rd edn. Academic Press, San Diego, pp. 181–257.
- Sakano H, Fujiwara E, Nohara S, Ueda H (2005) Estimation of nitrogen stable isotope turnover rate of *Oncorhynchus nerka*. Environ Biol Fishes 72:13–18.
- Sealey WM, Hardy RW, Barrows FT, Pan Q, Stone DA, (2011) Evaluation of 100% fish meal substitution with chicken concentrate, protein poultry by-product blend, and chicken and egg concentrate on growth and disease resistance of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J World Aquacult Soc 42:46-55
- 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
- Subhadra B, Lochman R, Rawles S, Chen R (2006) Effect of fish-meal replacement whit poultry by-product meal on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed diets containing different lipids. Aquaculture 260:221-231
- Tacon AGJ, Metian M (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture 285:146-158.
- Zhou Q, Zhao J, Li P, Wang H, Wang L (2011) Evaluation of poultry by- product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture 323:122-127.